

Příprava a hodnocení mukoadhezivních orálních filmů (MOF)

TEORIE

➤ MUKOADHEZIVNÍ LÉKOVÉ FORMY

Mukoadhezivní lékové formy jsou určeny pro **aplikaci na sliznici** (např. dutiny ústní nebo urogenitálního traktu). Po aplikaci dochází k jejich přilnutí na povrch sliznice (bioadhezi), kde mohou mít **systémový** nebo **lokální účinek** či plnit pouze **krycí funkci** pro rychlejší zahojení drobných ran. Hlavní pomocnou látkou jsou polymery (např. sodná sůl karboxymethylcelulosity nebo polyethylen oxid) schopné interagovat s glykoproteiny sliznice (tzv. **muciny**). Mukoadhezivní lékové formy mohou být **pevné** (tablety, filmy) nebo **polotuhé / tekuté** (gely, roztoky).

Příprava filmů probíhá nejčastěji třemi metodami – **odpařováním rozpouštědla**, extruzí taveniny nebo 3D tiskem. U připravených filmů se *in vitro* hodnotí hmotnostní a obsahová stejnoměrnost, reologické vlastnosti (viskozita, roztržení, protržení, sklopná odolnost), povrchové pH, bobtnavost, doba setrvání a disoluce léčiva z LF.

➤ HMOTNOSTNÍ STEJNOMĚRNOST MOF

Dvacet náhodně odebraných jednotek zkoušeného přípravku se jednotlivě zváží a stanoví se jejich průměrná hmotnost. Pro lékové formy (tablety) s průměrnou hmotností nižší než 80 mg je dle ČL 2017 (str. 388) povolená odchylka 10 % (hmotnostních). Nejvýše dvě hmotnosti se mohou lišit od této povolené odchylky a žádná jednotlivě stanovená hmotnost se nesmí lišit o více než dvojnásobek této odchylky. Potom můžeme říci, že léková forma vyhovuje lékopisným požadavkům na hmotnostní stejnoměrnost.

➤ TLOUŠŤKA MOF

U dvaceti náhodně vybraných jednotek zkoušeného přípravku se změří tloušťka. Zjištěná průměrná hodnota se využije u stanovení síly nutné k protržení a roztržení filmu. Tloušťka filmu by měla být pokud možno konstantní. Velké odchylky ukazují na chyby, případně nevhodnou technologii použitou při výrobě filmu, které ve výsledku mohou vést například ke zhoršené mechanické odolnosti filmu, k rozdílům v disolučních profilech a logicky i nevyhovující hmotnostní a obsahové stejnoměrnosti.

➤ ODOLNOST MOF PROTI PROTRŽENÍ A ROZTRŽENÍ

Odolnost filmu proti protržení je důležitá vlastnost zaručující, že film nebude prskat nebo se příliš protahovat při výrobě (tj. vyrážení) nebo při manipulaci samotným pacientem (např. vyjmutím z obalu). Rovněž umožňují vyhodnotit, zda film nebude působit dráždivě v ústech pacienta a zda je schopen bez narušení fungovat v ústech po dobu zamýšleného setrvání.

Hodnocení se provádí změřením síly potřebné pro protržení nebo roztržení filmu pomocí siloměru. Pro účely porovnání je zjištěná hodnota síly vztažena na 100 μm tloušťky filmu, viz vzorec (1):

$$F_R = \frac{F}{s} \cdot 100 \text{ (N)}$$

kde F_R je výsledná síla vztažená na tloušťku filmu 100 μm , F je síla zjištěná pomocí siloměru a s je průměr zjištěné tloušťky filmu v μm .

➤ DYNAMICKÁ VISKOZITA

Pro měření viskóznějších látek se používá reoviskozimetr s tlačnou kuličkou. Ten umožňuje měřit viskozitu až do velikosti $4 \cdot 10^3 \text{ Pa} \cdot \text{s}$. Viskozimetr sestává z kalibrované trubice, ve které se nachází měřená kapalina, do kapaliny je protlačována kulička, která je pevně spojena s vahadlem pomocí tyčinky. Na vahadlo se vkládá závaží, čímž je kulička protlačována do kapaliny. Pomocí vhodného indikátoru je měřena dráha kuličky a současně je měřen čas, potřebný pro proběhnutí kuličky po zvolené dráze. Viskozita se následně vypočítá z rovnice (2):

$$\eta = k \cdot m \cdot t \text{ (Pa} \cdot \text{s)}$$

kde k je konstanta viskozimetru stanovená výrobcem (závisí na velikosti kuličky a na průměru nádoby, nebo je stanovena cejchováním v kapalině známé viskozity), m je hmotnost použitého závaží a t je doba poklesu kuličky o stanovenou dráhu.

➤ DOBA SETRVÁNÍ MOF *IN VITRO*

Jedna z nejdůležitějších zkoušek pro MOF. Simuluje, jak dlouho zůstane film přichycen na sliznici po aplikaci. Čím delší doba setrvání, tím déle bude docházet k postupnému uvolňování léčiva z LF, a tím déle bude i rána chráněna v případě, že film slouží jen pro krytí. Film je pomocí 5% roztoku mucinu přichycen k plastové destičce, která se pohybuje směrem nahoru a dolů rychlostí 50 ponorů za minutu do roztoku fosforečnanového pufru o pH 6,8, temperovaného na 37 °C. Měří se čas rozpuštění (případně odpadnutí) filmu z plastové destičky.

ÚKOL

- Připravte mukoadhezivní film (4 % sodná sůl karboxymethylcelulosity (NaCMC), 3 % glycerol, ad 100 % čištěná voda) a proveďte hodnocení již připravených MOF: hmotnostní stejnoměrnost, tloušťka, odolnost proti roztržení a protržení, dynamická viskozita a doba setrvání *in vitro*.

POMŮCKY A CHEMIKÁLIE

- **1. Příprava disperze:** glycerol 85%, NaCMC; kovová / smaltovaná třenka s těrku, stěrka, kovová lžička, 100ml kádinka.

- **2. Hmotnostní stejnoměrnost a tloušťka MOF:** 25× forma s MOF, kruhové razidlo, kladivo, podložka, pinzeta, vatové tyčinky, analytické váhy, tloušťkoměr Elcometer 456.
- **3. Odolnost MOF proti roztržení a protržení:** 20× forma s MOF, obdélníkové a čtvercové razidlo, kladivo, podložka, pinzeta, vatové tyčinky, siloměr s příslušenstvím.
- **4. Dynamická viskozita disperze:** reoviskozimetr s tlačnou kuličkou, sada závaží, pinzeta, 50ml kádinka.
- **5. Doba setrvání MOF *in vitro*:** 5× forma s MOF, fosforečnanový tlumivý roztok o pH 6,8, 1000ml kádinka, rozpadostroj, teploměr, štětec, kruhové razidlo, kladivo, podložka, pinzeta, vatové tyčinky.
- **6. Dokončení disperze a odlévání MOF:** 100ml kádinka, vysokootáčkový homogenizátor, ultrazvuková lázeň, 6× plastová forma na odlévání filmu, pipeta, pipetovací nástavec.

POSTUP

- **Všichni studenti začínají 1. úlohou a následně se po skupinkách vystřídají na ostatních stanovištích** (4 skupiny, cca 6 studentů / sk.; úlohy 2 – 5), nakonec všichni studenti **končí společně úlohou č. 6.** Mezi stanovišti postupovat systematicky (2 → 3 → 4 → 5).
- **1. PŘÍPRAVA DISPERZE** (dvojice)
 - Do kovové / smaltované třenky navážíme na předvážkách 2,4 g glycerolu a 74,4 g čištěné vody, směs těrkou promícháme (**nepoužívat předvážky s váživostí omezenou na 200 g, hrozí poškození vah!** – vhodné předvážky jsou umístěny na každém stole, společné pro dvě dvojice studentů). Na hladinu následně rovnoměrně po celém jejím povrchu navrstvíme 3,2 g NaCMC a polymer necháme bobtnat.
- **2. HMOTNOSTNÍ STEJNOMĚRNOST A TLOUŠŤKA MOF** (trojice)
 - Pomocí razidla a kladiva na podložce vyrazíme **20 kruhových vzorků MOF** o průměru 15 mm (každá trojice má své vzorky). Zásadně nerazíme vzorek z prostředku odlitku, ale co nejvíce při jeho okraji! Z jednoho odlitku lze získat 7 kruhových MOF. Tyto kruhové MOF poté použijeme jak pro stanovení hmotnostní stejnoměrnosti, tak pro zjištění tloušťky filmu. Po dokončení práce uschováme vyražené kruhové filmy do kelímku k tomu určenému.
- **2a. HMOTNOSTNÍ STEJNOMĚRNOST MOF** (trojice)
 - Na analytických vahách stanovíme postupně hmotnost 20 vyražených kruhových MOF. Vypočítáme průměr a příslušnou směrodatnou odchylku. Výsledky hodnotíme podle Lékopisu: Léková forma vyhovuje lékopisným požadavkům na hmotnostní stejnoměrnost, pokud se nejvýše dvě stanovené hmotnosti liší od průměru o povolenou odchylku 10 % (hmotnostních) a žádná jednotlivě stanovená hmotnost se neliší o více než dvojnásobek této odchylky.

- **2b. TLOUŠŤKA MOF** (trojice)
- Určíme postupně tloušťku 20 vyražených kruhových MOF přístrojem Elcometer 456.
- Přístroj zapneme tlačítkem on/off. Měření se provádí položením filmu na kovovou desku a přiložením měřicí sondy tloušťkoměru kolmo k povrchu filmu. Přístroj okamžitě zobrazuje zjištěnou tloušťku. Vypočítáme průměr a směrodatnou odchylku výsledků měření.

- **3. ODOLNOST MOF PROTI PROTRŽENÍ A ROZTRŽENÍ** (šestice)
- Pomocí siloměru změříme maximální sílu nutnou k roztržení a protržení filmu. Výslednou sílu vztáhneme na tloušťku filmu.
- Pomocí pinzety / skalpelu vyjmeme z plastové formy MOF. Pomocí razidla a kladiva vyrazíme **3 obdélníkové** (10 × 40 mm) a **3 čtvercové vzorky** (20 × 20 mm) MOF. Z jednoho odlitku bychom měli získat 4 obdélníkové či 2 čtvercové MOF.
- Při měření **odolnosti proti roztržení** použijeme obdélníkový vzorek, který vždy upevníme do svorek tak, aby mezi svorkami byla viditelná cca 2 cm dlouhá část filmu. Nastavíme siloměr pro záznam maximální síly tlačítkem **Max** a zavěsíme svorku s očkem na hák siloměru. Jednou rukou chytíme siloměr a druhou rukou vzdálenější svorku.
- Plynulým a pozvolným tahem se snažíme dosáhnout síly, při které se film roztrhne. Dáváme **pozor na kolegy a zařízení okolo sebe!** Získanou hodnotu maximální síly zaznamenáme. Vypočítáme průměr a směrodatnou odchylku výsledků měření. Mezi jednotlivými měřeními siloměr vždy vynulujeme tlačítkem **Zero**.
- Při měření **odolnosti proti protržení** použijeme čtvercový vzorek, který upevníme do stolku tak, aby byl jeho střed zarovnan se středem kruhové díry ve stolku. Vzorek upevníme pomocí 4 matic mezi kovové desky. Na siloměr namontujeme kónický hrot a v případě potřeby opět nastavíme záznam maximální síly tlačítkem **Max**.
- Plynulým a pozvolným tlakem do viditelné části filmu se snažíme dosáhnout síly, při které se film protrhne. **Použijeme přiměřenou sílu tak, aby siloměr po protržení vzorku nenarazil do stolku.** Získanou hodnotu maximální síly zaznamenáme. Vypočítáme průměr a směrodatnou odchylku výsledků měření.

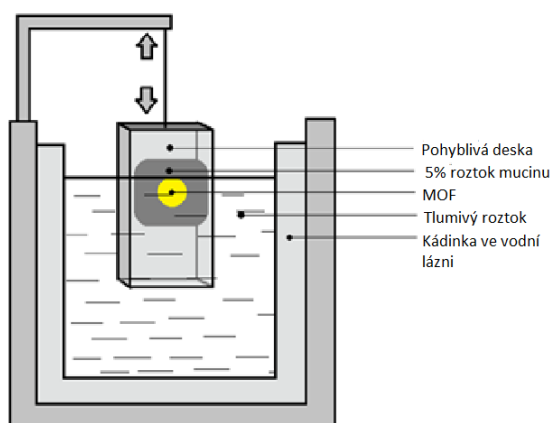
- **4. DYNAMICKÁ VISKOZITA DISPERZE** (šestice)
- Konstanta **k** daného viskozimetru, kterou využijeme při dalších výpočtech, byla stanovena pomocí 85% roztoku glycerolu o známé viskozitě (**k = 0,023 mPa · g⁻¹**).
- Do kalibrované zkumavky nalijeme měřený vzorek MOF až po spodní hranici zábrusu, vložíme zkumavku do držáku a do ní vložíme tyčinku s kuličkou (1). Zaaretujeme volný konec tyčinky do upínacího systému (2). Na miskou vahadla (3) umístíme zvolené závaží, případně více kusů závaží, jejichž hmotnost určíme předem na analytických vahách. Odaretujeme rameno

šroubem (4) a měříme čas, za který se kulička posune po dráze 30 mm určené indikátorem (5), tedy od značky 0 po značku 30. Po skončení měření zaaretujeme rameno šroubem (4).

- Postup **opakujeme 2× pro každé závaží** (není nutné měnit měřený roztok!). Měření provedeme s využitím 3 různých závaží (tj. celkem 6 časových hodnot), využijeme závaží v celkové hmotnosti postupně: **80, 100 a 120 g**. Zadaných celkových hmotností docílíme složením několika závaží o různých hmotnostech, které **máme umístěné na stojanu reoviskozimetru** (6). Získané časy pro jednotlivá závaží k využití v dalších výpočtech zprůměrujeme.
- Po ukončení práce s viskozimetrem zkumavku několikrát důkladně promyjeme destilovanou vodou a vydrhneme kartáčem (platí pouze pro poslední skupinu). Z naměřených výsledků vypočítáme dynamickou viskozitu pro daná závaží a směrodatné odchylky.



- **5. DOBA SETRVÁNÍ MOF IN VITRO** (šestice)
- Pomocí pinzety/skalpelu vyjmeme z plastové formy MOF. Pro testování doby setrvání pomocí razidla a kladiva na podložce vyrazíme potřebný počet kruhových vzorků MOF o průměru 15 mm (pro skupinu **6 kruhových vzorků**). Zásadně nerazíme vzorek z prostředku odlitku, ale co nejvíce při jeho okraji! Z jednoho odlitku lze získat 7 kruhových MOF.
- Zapojíme přístroj do zásuvky, lázně v případě potřeby doplníme destilovanou vodou a zapneme vyhřívání nádoby (levé tlačítko pro nádobu vlevo).
- Kádinku o objemu 1000 ml naplníme asi 850 ml fosforečnanového tlumivého roztoku o pH 6,8, vložíme do vodní lázně přístroje a zahřejeme na 37 °C.
- Plastovou destičku na konci pádla přístroje potřeme štětcem vodou. Na destičku položíme vzorky filmů (střední pásmo, stejná výška, dostatečná vzdálenost od sebe) a lehce je přitlačíme, pokud mají okraje tendenci se kroutit. **Z jedné strany destičky vedle sebe pokládáme 3 kruhové MOF, z druhé strany také 3.** Vzorky necháme po přilepení na destičku cca 30 s zaschnout na vzduchu.
- Destičku zavěsíme na pohyblivé rameno přístroje a zahájíme měření prostředním tlačítkem. Závěsný aparát se vzorky se pohybuje směrem nahoru a dolů rychlostí 50 ponorů za minutu do kádinky s tlumivým roztokem (simulace prostředí dutiny ústní). Měříme čas, za který se film oddělí od desky, sklouzne do kádinky, nebo se úplně rozpustí. Průběžně přitom kontrolujeme teplotu lázně, která by se měla pohybovat v rozmezí 37 ± 2 °C. Pokud dojde k překročení tohoto rozmezí, zavoláme vyučujícího. Z výsledků spočítáme průměr a směrodatnou odchylku.
- Pokud **do 15 minut** nedojde k rozpuštění, nebo odpadnutí filmu, **měření ukončíme**.
- Po ukončení měření vypneme pohyb ramena v horní poloze. Destičku sejmeme a vyčistíme od případných zbytků polymeru a osušíme. Dále vypneme vyhřívání lázně, vylijeme obsah kádinky a přístroj vypojíme ze zásuvky (**platí jen pro poslední skupinu**).



- **6. DOKONČENÍ DISPERZE A ODLÉVÁNÍ MOF** (dvojice)
- Rozbobotnalou disperzi MOF pomocí třerky vymícháme do hladka a přeplníme do skleněné kádinky o objemu 100 ml. Následně ji **zhomogenizujeme** vysokootáčkovým homogenizátorem při 13 000 rpm po dobu 30 sekund. Poté provedeme čištění lopatky (**každý student!**) čištěnou vodou – lopatku ponoříme do kádinky s čištěnou vodou a na chvíli (5 s) zapneme míchání, poté lopatku osušíme buničitou vatou. Disperzi následně odvzdušníme pomocí **ultrazvuku** do vymizení bublin.
- Pipetou odléváme do plastové formy (průměr 63 mm) 10 ml disperze, snažíme se disperzi vrstvit tak, aby došlo k rovnoměrnému vyplnění celé formy. Jelikož je disperze značně viskózní, nenecháme disperzi z pipety při odlévání samovolně vytékat (příliš pomalé), ale pro urychlení procesu použijeme vytlačení disperze z pipety pomocí pipetovacího nástavce/balonku.
- Připravíme **6 odlitků** a umístíme je na podnos k tomu určený (informace u vedoucího cvičení). Rozpouštědlo necháme odpařit v horkovzdušné sušárně nastavené na 30 °C (zajistí laborantky) a vzniklé MOF se použijí pro testování další skupinou. Zbytek disperze přelijeme do kádinky společné pro celé cvičení, označené „TLF MOF disperze“.

PROTOKOL

- Protokol vypracuje **každý student** s vlastními naměřenými údaji v trojici (úloha 2) nebo údaji společnými pro skupinu studentů (úlohy 3, 4 a 5).
- **2a. Hmotnostní stejnoměrnost MOF:** Tabulka naměřených hodnot, stanovený průměr a směrodatná odchylka, procentuální odchylka od průměru pro každý film. Komentář, srovnání s lékopisnými limity.
- **2b. Tloušťka MOF:** Tabulka naměřených hodnot, stanovený průměr a směrodatná odchylka. Komentář.
- **3. Odolnost MOF proti protržení a roztržení:** Tabulka naměřených hodnot, včetně hodnot přepočtených na 100 μm tloušťky filmu, stanovený průměr a směrodatná odchylka. Komentář.
- **4. Dynamická viskozita disperze:** Tabulka naměřených časů pro jednotlivé hmotnosti závaží a vypočtené hodnoty dynamické viskozity v závislosti na hmotnosti závaží. Graf závislosti zjištěné viskozity MOF na hmotnosti závaží. Do diskuze okomentujte chování roztoků při zvyšující se hmotnosti závaží.
- **5. Doba setrvání MOF *in vitro*:** Tabulka naměřených hodnot, stanovený průměr a směrodatná odchylka. Komentář.