

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Polysacharidové tobolky připravované technikou FDM 3D tisku

Adéla Pospíšilová

Diplomová práce

2024

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Polysaccharide-based capsules prepared using FDM 3D printing
technique

Adéla Pospíšilová

Master thesis

2024

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Pospíšilová**
Osobní číslo: **C22412**
Studijní program: **N0531A130035 Fyzikální chemie**
Téma práce: **Polysacharidové tobolky připravované technikou FDM 3D tisku**
Téma práce anglicky: **Polysaccharide-based capsules prepared using FDM 3D printing technique**
Zadávající katedra: **Katedra fyzikální chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte stručnou literární rešerši na téma: Příprava tobolek z biopolymerních materiálů.
2. Připravte tobolky s obsahem vybraných biopolymerů technikou FDM 3D tisku.
3. Proveďte rozměrovou charakterizaci připravených tobolek.
4. Proveďte disoluční zkoušku připravených tobolek s modelovým léčivem.
5. Porovnejte disoluční chování tobolek s různým materiálovým složením.
6. Na základě experimentálních dat zhodnoťte potenciál techniky FDM pro přípravu tobolek s obsahem biopolymeru.
7. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce v souladu se Směrnicí UPCE č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Jana Macháčková**

Datum zadání diplomové práce: **29. února 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Polysacharidové tobolky připravované technikou FDM 3D tisku jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 5. 2024

Adéla Pospíšilová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala za odborné vedení a vřelý přístup doc. Ing. Aleně Komersové, Ph.D. Také si velice vážím cenných rad a poznatků, které mi poskytla konzultantka Ing. Jana Macháčková. Poděkování patří i mé rodině za jejich trpělivost a podporu.

ANOTACE

Tato práce se v teoretické části zabývá novými poznatky v oblasti přípravy tobolek z biopolymerních materiálů, s důrazem na alternativní techniky, jež otevírají perspektivní možnosti pro farmaceutický průmysl. Konkrétně se zaměřuje na kombinaci technologií hot melt extruze (HME) a FDM 3D tisku.

V experimentální části byly tyto inovativní metody aplikovány na přípravu enterosolventních polysacharidových tobolek. Pro výrobu těchto tobolek byla použita kombinace polosyntetického a biopolymerního materiálu (Affinisol™ s citrusovým pektinem nebo alginátem sodným). Studován byl také přídavek plastifikátoru polyethylenglykolu (PEG) s cílem snížit teplotu extruze a zlepšit vlastnosti extrudovaného vlákna s ohledem na 3D tisk. Proces přípravy zahrnoval extruzi filamentů metodou HME, následovanou samotným 3D tiskem, plněním a testováním tobolek (rozměrová analýza, disoluční testování).

Tato práce přináší nové poznatky v oblasti výzkumu enterických tobolek na bázi polysacharidů pro cílený transport léčiva do oblasti kolonu. V rámci diskuze byly zhodnoceny možnosti použití připravených tobolek, jak z hlediska směrování léčiv do oblasti kolonu, tak i jako potenciálního přístupu pro fekální mikrobiální transplantaci.

KLÍČOVÁ SLOVA

enterosolventní tobolka, biopolymery, polysacharidy, hot melt extruze, FDM 3D tisk, disoluční test

ANNOTATION

The theoretical part of the thesis deals with novel insights into preparing capsules from biopolymer materials, emphasizing alternative techniques that open up promising possibilities for the pharmaceutical industry. Specifically, it focuses on combining hot melt extrusion (HME) and FDM 3D printing technologies.

In the experimental part, these innovative methods were applied to prepare enteric-coated capsules. A combination of semi-synthetic and biopolymer materials (Affinisol™ with citrus pectin or sodium alginate) was used to produce these capsules. The addition of plasticizer polyethylene glycol (PEG) was also studied to reduce the extrusion temperature and improve the properties of the extruded filament concerning 3D printing. The preparation process included filament extrusion using the HME method, followed by 3D printing, filling, and testing of the capsules (dimensional analysis, dissolution testing).

The thesis provides new insights into the research of polysaccharide-based enteric-coated capsules for targeted drug transport to the colon area. As part of the discussion, the possibilities of using the prepared capsules were evaluated in terms of targeted drug delivery to the colon area and as a possible approach for fecal microbial transplantation.

KEYWORDS

enteric capsule, biopolymers, polysaccharides, hot melt extrusion, FDM 3D printing, dissolution test

Obsah

ÚVOD	16
1 TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1 Tobolky z biopolymerních materiálů	17
1.1.1 Tobolky pro přívod léčiva do kolonu.....	18
1.1.1.1 GIT a jeho zásadní vlastnosti ovlivňující vstřebávání léčiv.....	18
1.1.1.2 Rozdělení polymerů používaných pro výrobu tobolek směřovaných do prostředí střev.....	20
1.1.1.3 Enterické tobolky	21
1.2 Příprava tobolek z biopolymerních materiálů	22
1.2.1 Extruze filamentů.....	23
1.2.1.1 Úvod do procesu extruze.....	23
1.2.1.2 Popis extrudéru.....	24
1.2.1.3 Postup extruze	25
1.2.2 Analýza filamentů	28
1.2.3 FDM 3D tisk	29
1.2.3.1 Úvod do techniky FDM	30
1.2.3.2 Popis 3D tiskárny	30
1.2.3.3 Postup procesu 3D tisku.....	31
1.2.4 Testování tobolek připravených metodou 3D tisku.....	32
1.2.4.1 Disoluční testování.....	32
1.2.4.2 Dezintegrační test.....	33
1.2.4.3 Další metody testování.....	34
1.3 Biopolymery	34
1.3.1 Úvod do biopolymerů	34
1.3.2 Aplikace biopolymerů ve farmaceutickém průmyslu	35
1.3.3 Rozdělení biopolymerů.....	37
1.3.4 Charakteristické vlastnosti polysacharidů.....	37
1.3.4.1 Celulóza.....	39
1.3.4.2 Hemicelulóza.....	40

1.3.4.3	Pektin.....	41
1.3.4.4	Deriváty celulózy	42
1.3.4.4.1	HPMC.....	43
1.3.4.4.2	HPC	43
1.3.4.5	Algináty.....	44
1.3.4.6	Chitin a chitosan.....	45
1.3.4.7	Xanthan	47
1.3.4.8	Guarová guma	48
1.3.4.9	Karagenany	48
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	50
2.1	Seznam použitých chemikálií a přístrojové vybavení.....	51
2.1.1	Chemikálie	51
2.1.1.1	Chemikálie k přípravě filament.....	51
2.1.1.2	Chemikálie k plnění tobolek	51
2.1.1.3	Chemikálie k přípravě disolučních médií	51
2.1.2	Přístroje a zařízení.....	51
2.1.3	Software	52
2.1.4	Další laboratorní pomůcky	52
2.2	Experimentální postupy.....	52
2.2.1	Příprava filament.....	52
2.2.2	3D tisk	55
2.2.2.1	Návrh modelu tobolek.....	55
2.2.2.2	Průběh FDM 3D tisku	57
2.2.3	Plnění tobolek.....	59
2.2.4	Disoluční zkouška	60
2.2.4.1	Příprava disolučních médií.....	60
2.2.4.1.1	Disoluční médium pH 1,2	60
2.2.4.1.2	Disoluční médium pH 6,8	61
2.2.4.2	Průběh disolučního testu	61
2.2.4.3	Stanovení kofeinu metodou UV/VIS spektroskopie	63
2.2.4.4	Vyhodnocení disolučních profilů.....	64
2.2.5	Rozměrová a hmotnostní analýza	64

2.3	Výsledky a diskuze	65
2.3.1	Příprava vlákna metodou hot melt extruze.....	65
2.3.2	3D tisk tobolek	66
2.3.2.1	Vzniklé defekty na tobolkách.....	68
2.3.3	Disoluční testy.....	70
2.3.4	Rozměrová a hmotnostní analýza	74
	ZÁVĚR.....	77
	POUŽITÁ LITERATURA.....	79
	PŘÍLOHA.....	85

Seznam obrázků

Obrázek 1: Postup přípravy tobolek.....	23
Obrázek 2: Schéma uspořádání dvoušnekových extrudérů: (1) protirotující, (2) korotující. Převzato z [21].....	25
Obrázek 3: Schéma jednošnekového extrudéru. Převzato a upraveno z [24].....	25
Obrázek 4: Měření tvrdosti filamentu kuličkovou indentační metodou. Převzato z [28].....	28
Obrázek 5: Schéma 3D tiskárny. Převzato a upraveno z [35].....	31
Obrázek 6: Podněty pro lékové formy s cílenou distribucí.....	37
Obrázek 7: Struktura celulózy. Převzato z [59].....	40
Obrázek 8: Etherové deriváty celulózy: (A) methylcelulóza, (B) ethylcelulóza, (C) hydroxyethylcelulóza, (D) hydroxypropylcelulóza, (E) hydroxypropylmethylcelulóza. Převzato z [20].....	42
Obrázek 9: Strukturní jednotky alginátu: (1) α -(1,4)-L-guluronová kyselina, (2) β -(1,4)-D-mannuronová kyselina. Převzato z [72].....	44
Obrázek 10: Struktura chitosanu. Převzato z [75].....	46
Obrázek 11: Extrudéry od firmy Noztek: (1) Noztek Touch, (2) Noztek Pro.	53
Obrázek 12: V-mixér Filtra Vibracion.....	54
Obrázek 13: Návrh tobolky v programu Autodesk Fusion 360.	56
Obrázek 14: G kód z PrusaSlicer.	57
Obrázek 15: Zachycení průběhu 3D tisku těl.....	58
Obrázek 16: Homogenizátor používaný při plnění tobolek.	59
Obrázek 17: Připravené tobolky (formulace C a D) k disolučnímu testování.	60
Obrázek 18: Disoluční aparatura Sotax AT 7 Smart: (1) kolektor s čistými zkumavkami, (2) čerpadlo pro odebrání vzorků, (3) disoluční lázeň se sedmi žaludky, uspořádání s košíčky, (4) disoluční hlavice pro umístění filtrů.....	62
Obrázek 19: Připravené tobolky v košíčkách pro disoluční test.	63
Obrázek 20: Digitální posuvné měřítko pro rozměrovou analýzu.	64
Obrázek 21: Měřené rozměry tobolky pro rozměrovou analýzu.....	65
Obrázek 22: Připravená vlákna (formulace A – E).....	66
Obrázek 23: Tobolka připravená metodou 3D tisku: (1) tělo tobolky, (2) víčko tobolky, (3) sestavená tobolka.....	67
Obrázek 24: Vrstevnatá struktura tobolky.	67

Obrázek 25: Tobolky všech připravených formulací (A – E).....	68
Obrázek 26: Grafické znázornění vzniklých defektů při tisku těl tobolek: vlevo nedotisknuté, vpravo zdeformované.	69
Obrázek 27: Zdeformovaná víčka tobolek.	69
Obrázek 28: Tělo tobolky s chybně natištěnými vrstvami materiálu.....	70
Obrázek 29: Víčka tobolky s deformovanou první vrstvou.	70
Obrázek 30: Disoluční profil pro tobolky formulace A a C.....	72
Obrázek 31: Disoluční profil pro tobolky formulace B a D.....	72
Obrázek 32: Disoluční profil pro tobolky formulace E.	73

Seznam tabulek

Tabulka 1: Druh a procentuální zastoupení látek ve směsi pro jednotlivé formulace filamentů (A – E).	54
Tabulka 2: Teploty extruze pro jednotlivé formulace (A – E).....	55
Tabulka 3: Složení tobolek, procentuální zastoupení jednotlivých složek.	59
Tabulka 4: Odběry vzorků během disolučního testu.....	62
Tabulka 5: Průměr vyextrudovaných vláken (formulace A – E).	66
Tabulka 6: „Lag time“ u testovaných formulací A – E.....	74
Tabulka 7: Shrnutí vyhodnocených statistických charakteristik u formulace (A – E)	75
Tabulka 8: Rozměrová analýza pro víčka tobolek (formulace A).	86
Tabulka 9: Rozměrová analýza pro těla tobolek (formulace A).	87
Tabulka 10: Rozměrová analýza pro víčka tobolek (formulace B).	88
Tabulka 11: Rozměrová analýza pro těla tobolek (formulace B).	89
Tabulka 12: Rozměrová analýza pro víčka tobolek (formulace C).	90
Tabulka 13: Rozměrová analýza pro těla tobolek (formulace C).	91
Tabulka 14: Rozměrová analýza pro víčka tobolek (formulace D).....	92
Tabulka 15: Rozměrová analýza pro těla tobolek (formulace D).	93
Tabulka 16: Rozměrová analýza pro víčka tobolek (formulace E).....	94
Tabulka 17: Rozměrová analýza pro těla tobolek (formulace E).	95

Seznam zkratek

3D	Trojrozměrný, z angl. three dimensional
API	Aktivní farmaceutická substance, z angl. active pharmaceutical ingredient
DDS	Systém podávání léků, z angl. drug delivery system
DMA	Dynamická mechanická analýza, z angl. dynamic mechanical analysis
DSC	Diferenční skenovací kalorimetrie, z angl. differential scanning calorimetry
DMSO	Dimethylsulfoxid, z angl. dimethyl sulfoxide
DSE	Extrudér s dvěma šneky, z angl. double screw extruder
EC	Ethylcelulóza, z angl. ethylcellulose
ECDDT	Enteric capsule drug delivery technology
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, z angl. Food and Drug Administration
FDM	Fused deposition modeling
GIT	Gastrointestinální trakt
HME	Proces vytlačování taveniny, z angl. hot melt extrusion
HPC	Hydroxypropylcelulóza, z angl. hydroxypropylcellulose
HPMCA	Hydroxypropylmethylcelulóza acetát, z angl. hydroxypropylmethylcellulose acetate
HPMCAS	Hydroxypropylmethylcelulóza acetylsukcinát, z angl. hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate
HPMCP	Hydroxypropylmethylcelulóza ftalát, z angl. hydroxypropylmethylcellulose phthalate
HPMC	Hydroxypropylmethylcelulóza, z angl. hydroxypropylmethylcellulose
IČ	Infračervená
IVIVC	<i>In Vitro-In Vivo</i> korelace, z angl. <i>in vitro-in vivo</i> correlation
LF	Léková forma
MDSC	Modulovaná diferenciální skenovací kalorimetrie, z angl. modulated differential scanning calorimetry
MSE	Extrudér s více šneky, z angl. multi screw extruder
PCL	Polykaprolakton, z angl. polycaprolactone
PEG	Polyethylenglykol, z angl. polyethylene glycol
PEO	Polyethylenoxid, z angl. polyethylene oxide

PLA	Kyselina polylactická, z angl. polylactic acid
PVA	Polyvinylalkohol, z angl. polyvinyl alcohol
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie, z angl. scanning electron microscopy
SSE	Extrudér s jedním šnekem, z angl. single screw extruder
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie, z angl. transmission electron microscopy
TGA	Termogravimetrická analýza, z angl. thermogravimetric analysis
UV/VIS	Ultrafialová/viditelná, z angl. ultraviolet/visible

Úvod

Práce se zabývá přípravou polysacharidových tobolek a je strukturována do dvou hlavních částí: teoretické a experimentální. V teoretické části jsou shrnuty různé metody přípravy tobolek, přičemž je kladen důraz především na kombinaci techniky hot melt extruze a FDM 3D tisku. Tyto techniky mají vysoký potenciál především pro personalizovanou léčbu a společně tvoří významný pilíř ve farmaceutickém výzkumu. Dále byla věnována pozornost výjimečným fyzikálně-chemickým vlastnostem polysacharidů a výhodám při jejich zakomponování do tobolek.

V experimentální části bylo hlavním úkolem připravit pět různých formulací enterosolventních tobolek na bázi hypromelózy (AffinisolTM), které se lišily typem a obsahem biopolymerní složky. Prvním a klíčovým krokem přípravy byla extruze filamentu metodou HME. Směsi pro extruzi obsahovaly různé procentuální zastoupení biopolymeru (alginát sodný, citrusový pektin) a u vybraných filamentů byl testován také přídavek plastifikátoru (PEG). Následně byla tato vlákna použita pro přípravu tobolek pomocí FDM 3D tisku. Zkompletované a naplněné tobolky plnivem (laktózou) a modelovou účinnou látkou (kofeinem) byly podrobeny rozměrové analýze a následně disoluční zkoušce. Podmínky disoluční zkoušky vycházely z Českého lékopisu [1] a byly voleny s ohledem na průchod lékové formy prostředím GIT (simulace prostředí žaludku a střev).

V experimentální části této práce byla získána řada nových poznatků, které představují významný přínos pro moderní farmakoterapii. Tyto poznatky vycházejí z analýzy výzkumu enterických kapslí na bázi polysacharidů, které byly připraveny pomocí metody FDM 3D tisku. Byla diskutována jejich možná aplikace jednak z hlediska cíleného transportu léčiv do prostředí kolonu, tak i jako potenciálního využití pro fekální mikrobiální transplantaci.

1 Teoretická část

Teoretická část této diplomové práce se zaměřuje na přípravu tobolek z biopolymerních materiálů. V první části budou diskutovány vlastnosti tobolek, jejich použití a specifika této enterosolventní lékové formy. Následně budou rozebrány základní principy a postupy používané při přípravě těchto lékových forem. V neposlední řadě bude také zmíněno využití a aplikace biopolymerů ve farmacii, s důrazem na biopolymerní materiály využívané pro přípravu tobolek.

1.1 Tobolky z biopolymerních materiálů

Tbolka patří mezi lékové formy, které jsou podávány perorální cestou. Jedná se o pevnou lékovou formu, která je velmi rozšířená [2,3]. Existuje několik důvodů, proč je tobolka často preferovanou možností. Jedním z faktorů je kratší vývoj formulace a jednodušší dodávkový systém ve srovnání s tabletami [2,4]. Z pohledu pacienta nabízí tobolka také značné výhody, jako je snadná aplikace a možnost eliminace nepříjemné chuti aktivní farmaceutické složky (API) díky uzavření do obalu tobolky [3]. V důsledku svých předností se tobolka stala klíčovým prvkem farmaceutického odvětví, což platí nejen z ekonomického hlediska, ale i v souvislosti s významem pro zdravotní péči [2,3]. Statistiky uvádí, že tržby z prodeje tobolek dosáhly v roce 2016 částky 1,4 miliardy USD a předpokládané tržby pro rok 2026 činí 2,9 miliardy USD [2]. Ještě významnější je fakt, že v roce 2001 představovaly tobolky podstatnou část všech lékařských předpisů, a to až 20 % [3].

Stavba tobolky není technicky složitá. Jedná se o relativně jednoduchou strukturu, která se skládá ze dvou částí: spodní část (tělo, top) a horní část (víčko, bottom). Tyto dva díly se vyrábí samostatně [3] a společně tvoří tobolku o určité velikosti [2]. Finální struktura slouží jako „nádoba“ pro plnicí směs a současně může poskytovat ochranu pro málo stabilní API. Směs účinné látky je nejprve naplněna do těla tobolky. Následně je nasazeno víčko, které musí být kompatibilní, aby došlo k vytvoření požadovaného integrovaného celku. Plnění tobolek probíhá různými způsoby v závislosti na konkrétním účelu aplikace. V rámci akademického výzkumu se většinou uplatňuje manuální plnění, naopak ve farmaceutickém průmyslu se tento proces převedl na poloautomatizovanou nebo zcela automatizovanou zařízení [3].

Tento typ lékové formy může být připraven z celé řady pomocných látek, avšak nejčastější variantou je želatinová tobolka [2,5]. V některých případech může být

želatina nahrazena deriváty celulózy (např. HPMC), pullulanem, škrobem [2] nebo jinými hydrofilními polymery [3].

1.1.1 Tobolky pro přívod léčiva do kolonu

Tobolky pro přívod léčiva do prostředí tlustého střeva se využívají pro lokální léčbu postižené části střeva, ale také za účelem absorpce léčiva v prostředí kolonu, neboť může trpět celou škálou patologických onemocnění, od běžného průjmu až po závažnější nemoci. Funkce tlustého střeva může být omezena vznikem nádorů spojených s kolorektálním karcinomem. Další komplikaci představuje postižení střevní sliznice zánětlivými procesy, především v rámci Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy [6,7,8].

Jedním z terapeutických přístupů pro řešení chorobných stavů tlustého střeva může být tzv. chronoterapie. Tato léčebná metoda využívá časově řízenou absorpci léčiva vycházející z biorytmu onemocnění [8].

Existují rozmanité lékové formy pro přívod léčiva do kolonu. Tyto lékové systémy obsahují strukturní prvky využívající změny vlastností GIT [8]. Jednotlivé mechanismy mohou fungovat na základě proměnlivé hodnoty pH gastrointestinálních tekutin, fermentačních procesů kolonických bakterií, enzymatického působení, tlakových změn v GIT (např. zvýšení tlaku v oblasti kolonu) nebo na základě rozdílné doby průchodu lékové formy trávicím traktem [8,9,10].

V moderní farmakoterapii je stále více pozornosti věnováno individualizaci terapie a specifickým potřebám pacientů. Jedním z aktuálně řešených témat je fekální mikrobiální transplantace, kde se použití enterických tobolek ukazuje jako vhodná volba. Cílem výzkumu v této oblasti je zajistit snadno realizovatelný a společensky přijatelnější přístup léčby, jelikož dochází k aplikaci lyofilizované stolice dárce k obnovení poškozené střevní mikroflóry pacienta (její rovnováha může sekundárně zajistit léčbu zánětlivých onemocnění) [3]. Dalším impulsem pro tyto studie je nekomfortní způsob aplikace fekální suspenze, při kterém jsou používány speciální sondy, klystýr a kolonoskopie [11,12].

1.1.1.1 GIT a jeho zásadní vlastnosti ovlivňující vstřebávání léčiv

Gastrointestinální trakt (GIT) představuje velice složitý systém uvnitř těla, zaujímající tvar trubice a vynikající celou řadou funkcí [7]. Hlavními částmi GIT jsou tři útvary, a to žaludek, tenké a tlusté střevo, které vykazují rozdílné vlastnosti [13].

Rozšířená část GIT se nazývá žaludek, jenž je vyplněn kyselou žaludeční šťávou obsahující kyselinu chlorovodíkovou a příslušné trávicí enzymy. Významnou funkcí další části GIT, tenkého střeva, je především vstřebávání živin, které je usnadněno specifickými útvary na jeho povrchu, tzv. klky [7]. Úkolem tlustého střeva je vstřebávat a odstraňovat odpadní látky [7,13].

Při vývoji lékových forem, např. tobolek, pro směrování léčiva do různých částí GIT je zásadní zohlednit širokou škálu proměnlivých vlastností GIT. Na chování tobolek ve velké míře působí kolísavé pH, které je v jednotlivých částech trávicího systému proměnlivé [7,13]. V žaludku dosahuje pH obvykle hodnot od 1,2 až do 5 [8], což souvisí s přítomností HCl [7,8,13]. V tenkém střevě vzrůstá pH až na hodnotu 7,5 a obdobné pH (rozmezí 5,5 – 8) se pohybuje v tlustém střevě [8]. Velké rozpětí kolonických hodnot pH je zapříčiněno vznikem kyselých produktů (např. kyseliny mléčné), které jsou vytvářeny fermentací přítomnými bakteriemi [8,13]. Gastrointestinální pH může být ovlivněno přítomností potravy v trávicím systému a různými dietními omezeními, ale také zdravotním stavem pacienta [13]. Například zánět střev může vést ke snížení pH v kolonu [8].

Neméně důležitým faktorem ovlivňující biologickou dostupnost léčiv je přítomnost enzymů, žlučových solí a bakterií v gastrointestinálních tekutinách [7,8]. Enzymy (proteázy, peptidázy, lipázy, sacharidázy) vylučované v segmentech GIT, s výjimkou tlustého střeva, mohou vyvolat nestabilitu léčiva a ovlivnit jeho uvolňování z lékové formy [8,13]. Zejména u těch, které ve svých strukturách obsahují bílkoviny [7]. Enzymová aktivita může poškodit důležité vazby účinných látek, matrice a potahy léčivých přípravků [13]. Povrch tlustého střeva je kolonizován rozsáhlou populací koliformních bakterií, osidluje ho více než 400 anaerobních druhů těchto mikroorganismů (bakteroidy, bifidobakterie, eubakterie, ...) [8,13].

Kolísající doba tranzitu lékové formy přes GIT (18 – 85 hodin) představuje další fyziologický vliv působící na chování léčiva [7,8,12]. Tato časová proměnlivost závisí na pohlaví a věku pacienta [9], jeho zdravotním a psychickém stavu, závislosti na drogách a jiných psychoaktivních látkách, či na typu stravy [13]. V žaludečních šťávách může léková forma setrvat okolo 1 – 5 hodin. V tenkém střevě má tendenci léčivo zůstat většinou konstantní dobu (3 – 4 hod), zatímco u tlustého střeva se doba jeho pobytu může prodloužit až na 72 hodin [8].

Důležité je zmínit i další vlivy ovlivňující farmakokinetiku, jako je například obsah a objem žaludku a jeho vyprazdňování [7,8], stejně jako metabolismus v játrech

a střevní stěně. Nejenomže na lékovou formu působí tyto všechny zmíněné fyziologické faktory, ale je třeba při posuzování biologické dostupnosti léčiva zohlednit i jeho rozpustnost, velikost částic, použité excipienty a také permeabilitu biomembrán [7].

1.1.1.2 Rozdělení polymerů používaných pro výrobu tobolek směřovaných do prostředí střev

Pro přípravu tobolek směřovaných do prostředí střev (tzv. enterické tobolky) se používají polymery, které by měly zohledňovat specifika GIT, ale také by měly splňovat určitá kritéria související s mechanickou odolností, toxikologickou nezávadností, snadnou manipulací, správnou funkčností a v neposlední řadě také kritéria ekonomická [6]. Enterické polymery se rozdělují obvykle do dvou skupin [3].

První skupinu tvoří enterické polymery, které regulují uvolňování účinné látky z lékové formy v závislosti na pH GIT [3,14]. Jedná se tedy o **pH senzitivní** (pH dependentní) **polymery** [9]. Do této skupiny patří polymery s kyselou povahou, které vykazují rozpustnost v rozmezí pH 5 – 7 [3]. Tyto podmínky splňují některé druhy Eudragitů (např. L, S, FS) [5,8,9,15] a deriváty celulózy (acetáty, ftaláty, sukcináty, ...), které bývají kombinovány s hydroxypropylmethylcelulózou (HPMC) [3,5,7].

U druhé skupiny polymerů princip zpožděného uvolňování API spočívá ve vytvoření gelové vrstvy kolem celé lékové formy [3] nebo v použití speciální lékové matrice [8]. Jedná se o **gelotvorné polymery degradovatelné bakteriemi kolonu**. Tyto dva charakteristické rysy brání uvolňování účinné látky v předních částech trávicího traktu [3]. Polymery z této skupiny podléhají degradacím v rámci redukčních a hydrolytických reakcí, které vyvolává mikroflóra přítomná v kolonu [8]. Mezi zástupce těchto hydrofilních polymerů patří celá řada polysacharidů a proteinů, které mohou být taktéž využity v kombinaci s HPMC. Jmenovitě se jedná např. o alginát, amylozu, amylopektin, karagenan, arabinogalaktan, dextrany, cyklodextrin, pektin, kolagen, xanthan, pullulan a arabskou, gellanovou a guarovou gumu [3,8].

Specifické vlastnosti jednotlivých polymerů budou detailně popsány v kapitole 1.3.4.

1.1.1.3 Enterické tobolky

Charakter žaludečního prostředí, specifický vysokou agresivitou díky přítomnosti kyseliny chlorovodíkové a velkého počtu enzymů, může způsobit nestabilitu, nebo dokonce i rychlou degradaci řady účinných látek [7]. Některé API mohou naopak po kontaktu s žaludeční výstelkou vykazovat negativní a dráždivé účinky [7,15]. Vzhledem k těmto dvěma hlavními důvodům jsou enterosolventní lékové formy široce využívány. Enterické lékové formy poskytují i jiné výhody, mezi něž patří schopnost řízeného uvolňování API do prostředí střev a eliminace nepříjemných organoleptických vlastností účinných látek [7].

Z důvodu rychlé degradace želatiny, která je značně využívána pro přípravu konvenčních tobolek, se v poslední době objevují snahy o začlenění alternativních substancí s gastrorezistentními vlastnostmi do struktury této lékové formy. Nové enterosolventní materiály by měly zaručit nerozpustnost léčiva v kyselé oblasti žaludku [3,16]. Jejich schopnost odolat nízkému pH žaludku a v nedegradované formě se dostat až do střev, kde dochází k uvolňování aktivní farmaceutické látky, je velmi důležitým faktorem [4,6,7,16]. Pro ověření acidorezistence se sleduje chování tobolek při kontaktu s prostředím o různém pH, resp. s médii o pH 1,2 a 6,8, které simulují přirozené podmínky v těle. Testování probíhá většinou prostřednictvím dvou metod. První zahrnuje test dezintegrace, který se zaměřuje na vznik prasklin/poruch lékové formy. Druhým testem je disoluce, kdy se hodnotí rozpustnost lékové formy ve zmíněných médiích [3]. Detailní podmínky a limity disoluční zkoušky budou dále prodiskutovány v kapitole 1.2.4.1.

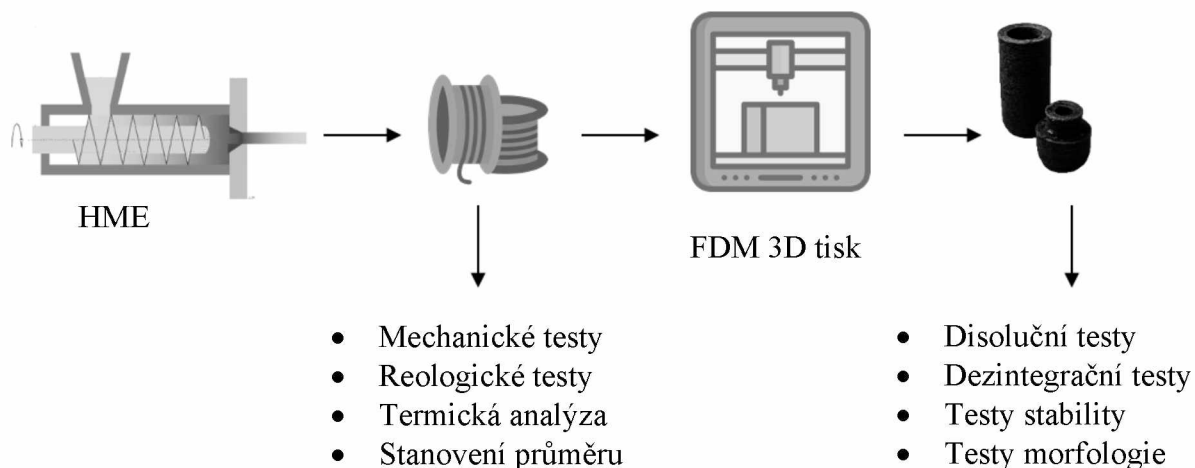
V případě tobolek se zpožděným uvolňováním API ve střevech, existuje několik variant jejich přípravy, avšak s rozdílnou úrovní spolehlivosti [2,15]. Potažení tobolky enterosolventním obalem není tak častou variantou, jako je tomu u tablet [2,5]. Ačkoliv technologie potahování prošla významným pokrokem a úpravami, proces stále disponuje několika citlivými kroky. I přes tento vývoj a respektování podmínek pracovního postupu nebývá aplikovaný povlak vždy optimální [17]. Často nedojde k dokonalému přilnutí potahu ke „skořápce“ tobolky [5], nebo naopak může po procesu potahování dojít ke křehnutí struktury kapslí při jejich sušení [4]. Nicméně, k potahování se může využít několik principů, jedná se například o fluidní potahování, zhutňování a potahování horkou taveninou [7]. K tvorbě potahu s reprodukovatelnými vlastnostmi nedochází ani ponořením kapslí do příslušné polymerní disperze [3]. Častěji se pokrývají jen granule, nebo pelety, kterými se dané tobolky naplňují [2,5].

V současné době se ve velké míře vyskytují studie, které se zabývají začleněním schválených enterosolventních složek do samotné struktury formulace, což eliminuje nutnost obtížného potahování tobolek [2,3]. Tato inovativní metoda se označuje jako ECDDT, z anglického termínu Enteric Capsule Drug Delivery Technology [3,4].

1.2 Příprava tobolek z biopolymerních materiálů

Jak již bylo dříve uvedeno, tobolky z biopolymerních materiálů mohou být připraveny několika způsoby. Nicméně, následující kapitoly této práce se zaměří na jednu alternativní techniku, která v moderním farmaceutickém průmyslu vykazuje vysoký potenciál. Jedná se o metodu FDM 3D tisku v kombinaci s přípravou filamentů pomocí hot melt extruze (HME) [6]. Tento nový přístup je považován za efektivní nástroj pro přípravu speciálních lékových systémů. Výhodou této metody je mimo jiné možnost modifikace způsobu uvolňování API a snadná úprava její dávky. V současnosti je výzkum zaměřen také na 3D tištěné tobolky naplněné kapalným obsahem, který se může upravit v závislosti na individuálních potřebách daného pacienta, tzv. personalizované dávkování. Dále je důležité zmínit, že tento přístup, umožňující snadnou přípravu širokého spektra lékových forem, je finančně dostupný [18].

Tato kapitola je strukturována s ohledem na postup přípravy tobolek technikou FDM 3D tisku. Proces výroby začíná produkcí filament metodou HME, po níž následuje samotný 3D tisk tobolek. Tato kombinace metod představuje proces, který umožňuje zhotovení speciálních lékových produktů, a dokonce může vést i ke zlepšení rozpustnosti API. Nepostradatelným nástrojem pro monitorování průběhu výroby a kontroly kvality výrobků je celé spektrum různých analytických a farmaceutických metod [19]. Postup přípravy tobolek metodou FDM 3D tisku je schematicky znázorněn na obr. 1.



Obrázek 1: Postup přípravy tobolek.

1.2.1 Extruze filamentů

Komerčně dostupná vlákna určená pro 3D tiskárny nejsou vhodná pro použití ve farmaceutickém průmyslu. Z tohoto důvodu se přistupuje k využití HME jako vhodné metody pro přípravu filament, a to z dostupných biopolymerů, které jsou adekvátní pro přípravu různých lékových forem [20].

1.2.1.1 Úvod do procesu extruze

Zkratka HME, odvozená z anglického výrazu „hot melt extrusion“, odkazuje na proces vytlačování taveniny za vysokých teplot. Jedná se tedy o postup, který je založený na protlačování viskózní taveniny přes otvor s daným rozměrem a tvarem za předem přesně nastavených podmínek [21].

Tento termín se poprvé objevil v 30. letech 20. století v kontextu s gumárenským, plastikářským a potravinářským průmyslem. Ve farmacii nabyla metoda HME větší pozornosti až v pozdějších letech (70. léta 20. století) [19,21,22], přičemž její schopnost zlepšit organoleptické vlastnosti API a rovněž připravit lékové formy s řízeným uvolňováním hrála klíčovou roli [20]. Dalším důvodem pro použití HME je její schopnost zvýšit biologickou dostupnost u farmaceuticky aktivních látek, které vykazují nízkou rozpustnost ve vodě. Tento problém v současné době postihuje asi 40 % schválených a 70 – 90 % testovaných účinných látek [21,23]. Během HME se nepoužívají organická rozpouštědla, nýbrž pouze látky ve formě prášků, což kromě dalších výhod minimalizuje uhlíkovou stopu a činí HME preferovanou metodou z hlediska ekologie [19,22]. Z pohledu náročnosti procesu toto přináší výhodu

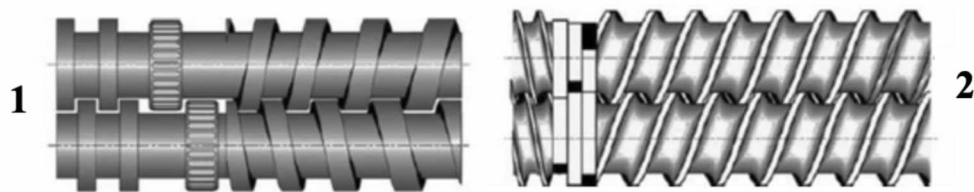
v podobě nižšího počtu kroků při zpracování materiálů, např. odpadá časově náročné sušení, a umožňuje provoz bez přerušování [22,24]. V současné době se výrazně zvyšuje zájem o tuto inovativní technologii, což je patrné z rostoucího počtu citací, výzkumných studií a patentů, které se věnují využití této techniky pro produkci nových farmaceutických lékových forem [21,24].

1.2.1.2 Popis extrudéru

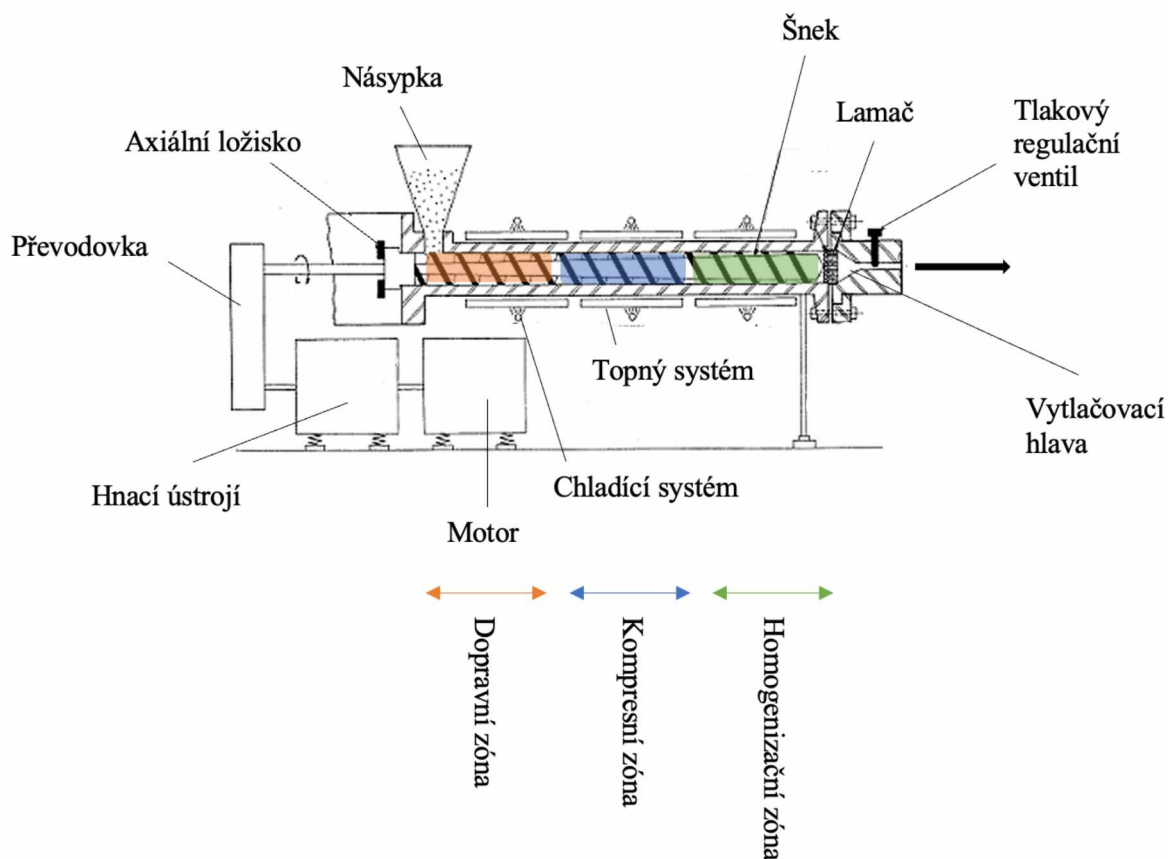
Základním zařízením pro přípravu filamentů metodou HME je extrudér buď s jedním (SSE), dvěma (DSE), nebo více rotujícími šneky (MSE) [19,22]. Materiál, ze kterého jsou tyto přístroje vyráběny, by neměl vykazovat reaktivitu s používanými farmaceutickými substancemi [24].

Extrudér je tvořen násypkou, tělem s určitým počtem šneků a koncovou maticí, přes kterou výsledný filament putuje ven a tvaruje se do požadované geometrie [22]. Šnek se nachází ve struktuře připomínající válec, která je opatřena topnými tělesy, jež ji vyhřívají [24]. Tento válcový prvek slouží pro vytlačování filamentu a může být složen z jedné části, nebo z více sešroubovaných sekcí. K samotné extruzi slouží motor, vystupující zde jako pohonná jednotka. Důležitou částí je také elektronický systém, na kterém se nastavuje rychlost rotace šneků v otáčkách za minutu a požadovaná teplota [21].

Často využívaným typem je dvoušnekový extrudér, který může mít dvě konfigurace: protirotační a korotující (obrázek 2). Jeho častá aplikace souvisí s vysokou hnětací a dispergační kapacitou, kratší dobou přepravy materiálu a menším sklonem k přehřátí konkrétních částí používaného aparátu. Jednotlivé typy DSE se liší svými vlastnostmi, výhodami i nevýhodami a oblastmi použití. Funkce protirotačních extrudérů může být omezena zachycením vzduchu uvnitř samotného válce přístroje, což má za následek nízkou rychlost rotace šneků a vysoký tlak uvnitř zařízení. Naopak u korotujících (souběžných) šneků dochází jejich souhlasným pohybem ke stírání chemikálií z těchto šroubových konstrukcí [21,24]. Avšak nejrozšířenějším extrudérem je jednošnekový (obrázek 3), který je typický pro svoji jednoduchou konstrukci, snadnou údržbu a nízkou cenu. Plynule otáčející se šnek s různým počtem závitů představuje štíhlý mechanismus, který umožňuje velmi efektivní promíchání materiálu díky optimální době jeho zadržení. Tímto typem extrudéru lze též snadno regulovat přítomné teplotní gradienty napříč jeho celým válcem [21].



Obrázek 2: Schéma uspořádání dvoušnekových extrudérů: (1) protirotující, (2) korotující.
Převzato z [21]



Obrázek 3: Schéma jednošnekového extrudéru. Převzato a upraveno z [24]

1.2.1.3 Postup extruze

Prvním krokem je příprava práškových materiálů pro proces extruze. Musí se pečlivě vybrat, navážit a zhomogenizovat široká škála substancí, která tvoří pestrou směs látek potřebnou pro zahájení příslušné metody. Pro výrobu filamentů je možné použít jen ty suroviny, které splňují přísné požadavky na hladkou a nepřerušovanou výrobu vlákna [21,22,24]. Je nutné vybírat takové materiály, které jsou používané ve farmacii a zároveň splňují vysoké standardy bezpečnosti a čistoty. Dále by měly být schopny se v rámci extruze deformovat a mít dostatečnou tepelnou stabilitu. Na výstupu z extrudéru by měly také tuhnout do finálního tvaru filamentu [21,24].

Fyzikální směs látek vstupující do extruzního procesu by měla obsahovat několik základních typů surovin:

Nosiče

V hot melt extruzi lze jako nosiče využít polymerní i nepolymerní materiály s nízkou teplotou tání [21]. Nepolymerní látky zahrnují zástupce z vosků nebo lipidů, např. kyselina stearová, glyceryldibehenát, glycerylpalmitostearát, karnaubský vosk atd. [22]. Používané polymery mohou být buď biodegradovatelné, nebo nikoliv. Nejčastěji se využívají polymethakryláty (Eudragit E, S, RS) a deriváty celulózy (HPMC, HPMCAS, HPMCP, HPMCA, EC, HPC) [20,24].

Nosič v dané směsi vystupuje jako nosný systém pro zabudování aktivních farmaceutických látek (API) [21]. Výběrem nosiče i pomocných látek může docházet ke změně typu uvolňování přidané účinné substance. Fyzikální a chemické vlastnosti použitého nosiče ve většině případů určují podmínky vedení extruze [20,24].

Pomocné látky

Výběrem pomocných látek lze nastavit specifické vlastnosti připravované lékové formy, nebo jen optimalizovat reologické a mechanické vlastnosti filamentů pro následný 3D tisk [20,24]. Do směsi mohou být přidány plastifikátory (změkčovadla), které zaručí snížení teploty extruze a viskozity příslušné taveniny. To umožňuje extruzi při nižší teplotě a s menším kroutícím momentem. Plastifikátory jsou nízkomolekulární sloučeniny, které také zvyšují flexibilitu výsledných filamentů. Tento efekt je způsoben přítomností mezimolekulárních sekundárních valenčních sil mezi plastifikátorem a daným polymerem, což vede ke zvýšení volného objemu mezi polymerními řetězci a snížení pohybu těchto molekulových struktur vůči sobě. Mezi vhodné plastifikátory se řadí estery mastných kyselin, citráty, ftaláty, glykoly (např. PEO, PEG, kolidony) [24], stejně jako některá léčiva (hydrokortizon [25], ibuprofen [26]). Dále se do směsi pro extruzi mohou přidávat různá plniva, tepelná maziva, antioxidanty a další aditiva [21,24].

Léčiva

Aplikace léčiv do směsi pro HME může nabídnout řadu výhod. Krystalická léčiva se tímto procesem mohou přeměnit na amorfní formu [21], což zajišťuje zvýšení rozpustnosti dané API [19] a naopak snížení rizika možných polymorfních přeměn

krystalické účinné látky. Nicméně, za nevhodných skladovacích podmínek se mohou termodynamicky nestabilní amorfny produkty přeměnit na termodynamicky stabilní krystalickou formu. Těto nežádoucí přeměně by se ale mohlo zamezit při monitorování T_g příslušné API, jehož hodnota by se měla pohybovat o 50 °C výše než teplota, při níž se amorfny produkt skladuje [21].

Připravená homogenizovaná směs o určitém složení je vložena do násypky samotného extrudéru, odkud je šneky postupně odebírána a přepravována dovnitř samotného přístroje [21]. Klíčové je nastavení správného úhlu násypky, aby nedošlo k tvorbě pevného můstku, který by bránil plynulému toku látek. Nejenom tento strukturní prvek ovlivňuje rychlost podávání materiálu, jež souvisí s rychlostí výstupu a kvalitou výsledného tuhého extrudátu. Objemová hustota a velikost částic vstupní směsi a také koeficienty tření mezi použitými surovinami a jednotlivými částmi extrudéru, mají rovněž vliv na efektivitu vkládání směsi do těla extrudéru. Přičemž optimální podmínky pro nepřetržitý posun materiálu zahrnují vysoké tření uvnitř válce a nízké tření u šroubu extrudéru [24].

V těle extrudéru je tato směs podrobena celé řadě procesů, včetně mletí, tavení, míchání na molekulární úrovni, hnětení a také odvodušňování [22,27]. Pro přípravu kvalitního filamentu je důležité sledovat již popsaný proces plnění přístroje, ale také rychlost rotace a konfiguraci šneků, dobu zadržení materiálu uvnitř extrudéru a zvolenou teplotu [22].

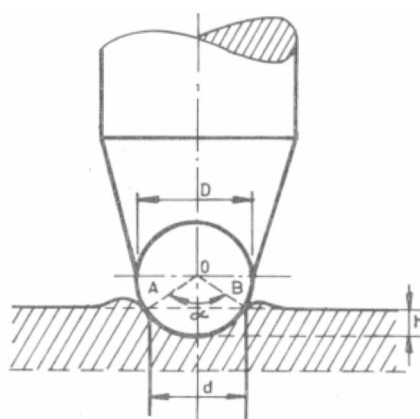
Rotace šneků je důležitým procesem pro extruzi, protože zajišťuje intenzivní míchání částic a vznik rovnoměrné disperze [22,24]. Šneky rovněž zaručí přísun materiálu ve viskózním stavu až k výstupní trysce, což umožňuje vytvoření produktu s požadovaným tvarem a hustotou [21].

Pro kontinuální a hladkou extruzi je nezbytné, aby zařízení disponovalo vysokými teplotami, které se liší v závislosti na konkrétních částech zařízení a na použitých materiálech [24]. Obvykle je extrudér vyhříván o 20 – 40 °C nad teplotu skelného přechodu (T_g), v některých případech i nad teplotu tání (T_m) použitých látek [20, 21,22]. Teplota by měla být nastavena s ohledem na možnou degradaci aplikovaných substancí [22]. Prostřednictvím tepla, které vzniká buď třením, nebo přítomností topných těles, dochází ke zvýšení pružnosti materiálu [21, 24].

1.2.2 Analýza filamentů

Filamenty připravené pomocí metody HME lze podrobit analýze pro účely úspěšné integrace právě HME a FDM 3D tisku.

Mechanické vlastnosti filamentů se testují z důvodu posouzení jejich vhodnosti pro použití při 3D tisku. Například pružnost, křehkost a tuhost připravených vláken se určuje pomocí analyzátoru textury. Testování pružnosti a křehkosti probíhá v třibodovém uspořádání a při zatížení o určité síle na střední část tyčinky daného filamentu [19]. Hodnotí se Youngův model pružnosti, který je klíčový pro snadné navíjení a úspěšné zavedení vlákna do 3D tiskárny [19,20]. Cílem extruze je také připravit filament s malou křehkostí, aby nedocházelo k jeho prasknutí uvnitř trysky 3D tiskárny [20]. Zkouška tvrdosti definuje odolnost povrchu vlákna proti vtlačování indentoru o určitém zatížení. Měří se hloubka průniku velmi tvrdého a různě tvarovaného tělesa, jak je zřejmé z obrázku 4 [19].



Obrázek 4: Měření tvrdosti filamentu kuličkovou indentační metodou. Převzato z [28]

Připravená vlákna mohou být také testována v rámci jednoosých tahových, rázových a kvazistatických zkoušek [29]. Mechanické parametry se testují i při určitém teplotním programu, např. v rámci dynamické mechanické analýzy (DMA) [20].

Filamenty mohou být testovány nejen z hlediska jejich mechanických vlastností, ale rovněž jsou důležité jejich vlastnosti reologické [19,20,30]. Nejzásadnější je měření viskozity materiálu, jejíž hodnota ovlivňuje vytlačování vlákna z extrudéru a 3D tiskárny [19,20]. Pokud vlákno vyniká vysokou viskozitou, bude se příslušná tavenina pohybovat v trysce 3D tiskárny velmi pomalu. Naopak při velmi nízké viskozitě bude tavenina protékat vysokou rychlostí a zároveň se bude velice těžce kontrolovat průběh 3D tisku. Při extruzi filamentů díky nevhodné hodnotě

viskozity může dojít ke vzniku vzduchových bublin a aglomerátů. Jednak určuje rozložení, vzájemné přilnutí a tloušťky jednotlivých vrstev tisknutého objektu, tak i hmotnost celého 3D výrobku. Viskozita je tepelně závislá charakteristika, která se měří kapilární reometrií. Mezi další stanovované reologické parametry spadá viskoelasticita, která také umožňuje predikovat chování jednotlivých materiálů [20].

Pro zajištění plynulého spojení obou technik (HME a 3D tisku) je důležité, aby mělo dané vlákno konstantní průměr, obzvláště v případech, kdy obsahuje API (potenciální variabilita v dávkách) [20,31]. Pokud filameny disponují zvětšeným průměrem dochází k ucpaní 3D tiskárny. Zatímco úseky s menším průměrem poskytují nepravidelné 3D produkty a vykazují nižší odolnost proti působení ozubených kol při jejich zavádění do trysky tiskárny [31]. Tento rozměr vlákna lze měřit pomocí digitálního posuvného měřítka, laserového mikrometru nebo ultrazvukového tloušťkoměru [20].

Tepelné vlastnosti filamentu mohou odhalit změny termodynamických stavů (krystalické/amorfni) použitého materiálu, související s jeho fyzikálními vlastnostmi. Cílem je identifikovat charakteristické fázové přechody, endotermické a exotermické procesy [20]. Stanovení může probíhat diferenční skenovací kalorimetrií (DSC) [6,20], termogravimetrickou analýzou (TGA) a modulovanou diferenční skenovací kalorimetrií (MDSC) [20].

Kvalita produktu může být sledována v čase, a to prostřednictvím několika optických metod: Ramanova, UV/VIS [22] a blízká IČ spektroskopie [19,22,32]. Filameny se mohou testovat i za použití práškové rentgenové difrakce [19].

1.2.3 FDM 3D tisk

Fused deposition modeling (FDM) není jedinou uplatňovanou metodou 3D tisku. K vytváření 3D objektů lze využít selektivní laserové sintrování, stereolitografii, tryskání pojiva, extruzi polotuhých materiálů atd. [19,20]. Zájem o tuto techniku ve farmacii začal růst zejména až po schválení prvního léčivého přípravku SPRITAM vyrobeného pomocí 3D tisku, konkrétně prostřednictvím tryskání pojiva. Významným mezníkem je tedy rok 2015 [20].

Tato diplomová práce se bude orientovat na metodu FDM zejména kvůli jejímu použití pro výrobu tobolek testovaných v rámci experimentální části a také vzhledem k celé řadě výhod, které přináší.

1.2.3.1 Úvod do techniky FDM

Uplatnění FDM je pestré díky jeho příznivé rychlosti, jednoduchosti a relativně nízkým pořizovacím a provozním nákladům. Nicméně, není vhodná pro termolabilní látky, jelikož proces probíhá za vysokých teplot [33].

Tato metoda se ve farmacii stává stále populárnější díky její schopnosti vytvářet různé lékové formy (tablety, tobolky), které mohou zaujímat širokou škálu tvarů. K oblíbenosti také přispívá možnost modifikace uvolňování, úpravy a kompartmentace dávek účinné látky podle aktuálních potřeb pacienta [20,33]. Jedná se tedy o nástroj pro přípravu malých šarží pro personalizovanou léčbu, nikoliv pro standartní léčivé přípravky [33,34]. Právě snížené riziko nežádoucích účinků, které přináší personalizovaná léčba, se stalo atraktivní pro výzkum [34].

FDM není využívána jen pro produkci perorálních lékových forem, ale aplikuje se i v biomedicině, například při výrobě implantátů [18,20]. Tato technika má také poměrně dlouhou historii v leteckém a automobilovém průmyslu [30,34].

Jedná se o aditivní výrobu, jejíž podstatou je připravit trojrozměrný produkt s velkou flexibilitou a možnostmi individuality a rozmanitého designu [19,33]. Průběh tohoto procesu probíhá na základě předem připraveného digitálního návrhu, podle kterého 3D tiskárna řídí každý svůj pohyb [19]. Principem metody FDM je vytlačování vláknů tryskou přístroje. Tento krok se uskutečňuje za vysokých teplot. Filamenty pro farmaceutickou aplikaci se obvykle vyrábí metodou HME [20].

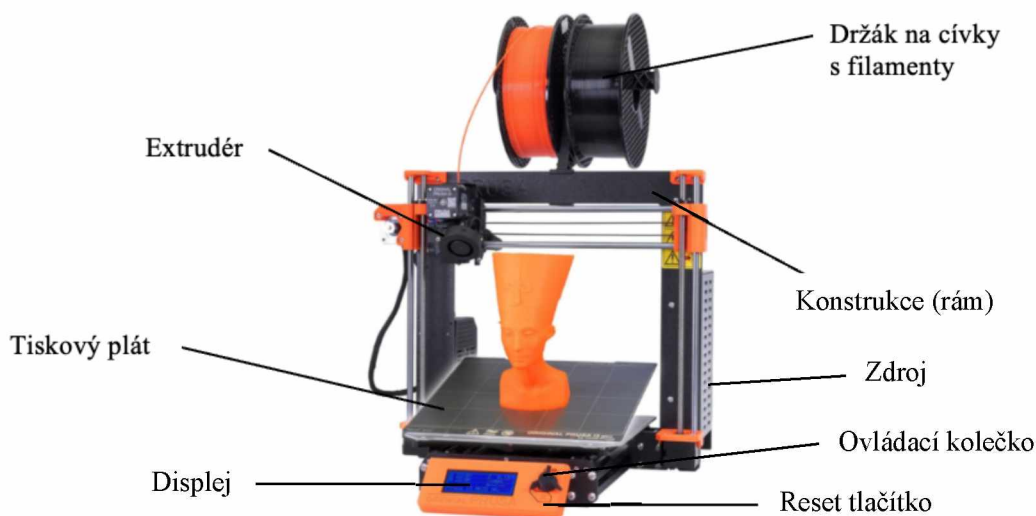
Na kvalitu výsledného 3D produktu má vliv celá řada aspektů. Souvisí jednak s výkonem samotné 3D tiskárny, který se liší podle modelu a značky. Klíčovým parametrem jsou i reologické, tepelné a mechanické vlastnosti připraveného vlákna. Neméně důležité je správné nastavení procesu tisku, zejména teploty trysky. Propracovanost vytvořeného digitálního návrhu rovněž charakterizuje 3D objekt [20].

1.2.3.2 Popis 3D tiskárny

Na trhu je dostupná široká škála výrobců 3D tiskáren, což má za následek existenci i různých typů těchto zařízení. Tato kapitola popisuje 3D tiskárnu, konkrétně model i3 MK3S+ vyrobené českou firmou Prusa, která byla použita v experimentální části této diplomové práce.

Jak lze vidět na obrázku 5, tato 3D tiskárna nabízí velmi robustní a snadno montovatelný rám, který se vyrábí z duralu. Je vybaven kovovými úchyty s vysoce kvalitními ložisky. Zásadním prvkem tiskárny je extrudér, jehož trysku lze vyhřát až

na teplotu 300 °C. Pro samotný provoz tiskové hlavy se využívají např. topná tělesa, motor a větráček. Její součástí jsou také podávací kolečka pro přívod vláken a sonda pro monitorování jejich přítomnosti v trysce. Pro dosažení přesnějšího tisku je na extrudéru umístěn senzor, který je schopný si před zahájením tisku zmapovat a změřit povrch podložky a tím si vytvořit představu o tiskové oblasti. Podložka 3D tiskárny („bed“) je k dispozici ve třech typech (hladká, zrnitá a saténová) a volí se podle použitého tiskového materiálu, aby umožnila snadnou adhezi a následné odstranění vytištěného 3D výrobku. Tiskový plát, vyrobený z oceli, může dosáhnout teploty až 120 °C a díky přítomným magnetům je snadno odnímatelný a vyměnitelný. Kromě toho má tiskárna i celou řadu bezpečnostních prvků, včetně schopnosti pokračovat v tisku tam, kde byla práce přerušena v případě výpadku napájení. Tento typ přístroje dokáže tisknout produkty z různých typů filamentů. Dokonce je k dispozici speciálně vytvořený software (PrusaSlicer), který zajišťuje kompatibilitu tisku a poskytuje široké možnosti úprav 3D objektů [35].



Obrázek 5: Schéma 3D tiskárny. Převzato a upraveno z [35]

1.2.3.3 Postup procesu 3D tisku

Příprava digitálního návrhu tisknutého 3D objektu předchází samotnému procesu 3D tisku. Tento krok probíhá na počítači za pomoci specializovaného softwaru [19,33].

Po vyhřátí trysky i podložky 3D tiskárny na požadovanou teplotu a po správném zavedení filamentu, buď komerčně zakoupeného, nebo připraveného

metodou extruze, může být zahájen samotný 3D tisk [20]. Teplota je obvykle nastavena nad T_g nosného polymeru [18]. Tisk objektu probíhá po jednotlivých vrstvách tak, aby odpovídal připravenému návrhu [33]. Uživatel může volit různé faktory tisku, jako je hustota výplně, výška vrstvy, rychlost vytlačování atd., které ovlivňují výsledný vzhled 3D objektu [20,33].

Když projde připravený filament ozubenými koly a tryskou 3D tiskárny, materiál se roztaví [18]. Tekutá hmota je extrudována z trysky tiskárny o určitém průměru a pečlivě nanese na pevně zvolené místo tiskového plátu [20,33]. Extrudér je vybaven schopností korigovat polohu tohoto místa pohybem do stran (ve směru os x a y). Po přilnutí první vrstvy materiálu na platformu se okamžitě vytvářejí i další vrstvy. Tisková deska se během procesu pohybuje v ose z , respektive směrem dolů, aby mohly být aplikovány další vrstvy na tu stávající. Postupně se jednotlivé vrstvy formují, spojují a tuhnou do požadovaného tvaru. Tato podstata 3D tisku je částečně zajištěna možností vyhřívání tiskové desky, což umožňuje dosažení optimální teploty pro pevné spojení vytištěných vrstev [20].

1.2.4 Testování tobolek připravených metodou 3D tisku

Kvalitu a vlastnosti připravených tobolek metodou 3D tisku lze testovat řadou metod. Je nezbytné ověřit, zda tyto tobolky odpovídají zamýšlenému účelu a fungují podle očekávání. Odolnost enterických tobolek musí být dle Českého lékopisu [1] ověřena dvěma testy. Měly by splnit požadavky disolučního i dezintegračního testu [3].

1.2.4.1 Disoluční testování

Disoluční testy, známé také jako rozpouštěcí testy, představují klíčovou lékopisnou metodu při zavádění nových lékových forem, nebo při vývoji generika. Jejich hlavním cílem je monitorovat uvolňování účinné látky z testovaných lékových forem. Na základě získaných dat z této zkoušky můžeme získat částečný náhled na chování testovaných lékových forem v těle pacienta a odhadnout biologickou dostupnost API [36]. Avšak korelace dat, tj. převedení získaných disolučních *in vitro* záznamů na predikci chování API *in vivo*, není vůbec jednoduchá. Existuje celá řada matematických modelů s rozdílnými úrovněmi přesnosti. Pokud se získají adekvátní data po IVIVC (*In Vitro-In Vivo* Correlation), lze tyto informace využít jako alternativu pro klinické zkoušky [37].

Průběh disolučního testu se řídí pravidly a postupy definovanými v Českém lékopisu [1]. Tyto normy vychází ze směrnic obsažených v Evropském lékopise. Je však důležité mít na paměti místo registrace léčiva při jeho uvedení na trh, jelikož je třeba zohlednit mírné rozdíly v podmínkách a limitech napříč lékopisy [3].

Disoluční testy se uskutečňují ve speciálních přístrojích, které jsou určeny jen pro tento účel. Existují v různých konfiguracích. Disoluční aparatury obsahují buď košíčky, pádla, vratné válce, nebo průtokové cely. Ke spuštění testu jsou zásadní disoluční média, která mají za cíl simulovat průchod lékového přípravku přirozeným prostředím GIT [1]. Pro co nejpřesnější napodobení podmínek v organismu se používají tzv. biorelevantní média obsahující enzymy, surfaktanty nebo různé zbytky potravy [3]. Standardně se „žaludek“ aparatury plní 900 ml tohoto roztoku. Disoluce se provádí při teplotě $37 \pm 0,5$ °C, která opět odpovídá podmínkám v těle. Dle směrnice lékopisu je považováno za dostačující testovat 6 jednotek s API a 1 blank [1].

V souladu s vlastnostmi testované lékové formy je nutné pečlivě volit například vhodný typ disoluční aparatury, optimální rychlost otáčení košíčků, nebo pádel, specifický druh a objem disolučního média, celkovou dobu disoluce a počet odebíraných vzorků [3].

Výsledkem disolučního testování je tzv. disoluční profil, který představuje grafickou závislost uvolněné API z lékové formy (v %) na čase. Získaná data mohou být vyhodnocena s použitím různých matematických modelů, které charakterizují rychlost a mechanismus uvolňování léčiva z lékové formy. Ze sestavených disolučních profilů může být určena také celá řada kinetických parametrů [38,39].

1.2.4.2 Dezintegrační test

K testování lékových forem se dezintegrační test standardizoval v 50. letech 20. století. V praxi je tento test považován za velmi jednoduchý a rychlý. Jeho výsledky mohou být korelovány s disolučním testem [16].

Zkouška dezintegrace se rovněž provádí v 900 ml disolučního média a za teploty $37 \pm 0,5$ °C. Specifické podmínky testování jsou závislé na charakteristikách testovaného léčiva. Před zahájením testu se volí vhodný typ média, doba setrvání lékové formy v příslušném roztoku a uspořádání používaného přístroje. Po umístění lékové formy do daného média se sleduje přítomnost žádoucího, nebo nežádoucího rozpadu, či jen tvorby prasklin [3].

1.2.4.3 Další metody testování

Stabilitní testy

Stabilitní testy se aplikují na všechny typy lékových forem s cílem správně určit vhodné podmínky jejich skladování a uchovávání, stabilitu během doby expirace, druh a složení obalového materiálu. Po absolvování těchto testů by neměla léková forma vykazovat pokles účinnosti vyšší než 5 % a nemělo by dojít ke změně vzhledu nebo fyzikálních a chemických vlastností. Mezi typy stabilitních testů patří stresové, zrychlené a dlouhodobé zkoušky [40].

Testy na morfologii

Pro zhodnocení povrchu použitého filamentu a struktury připravené tobolky se mohou využít optické metody. Analýza může probíhat elektronovou mikroskopií, a to skenovací (SEM) [4,6,18,20] nebo transmisní (TEM) [20].

1.3 Biopolymery

1.3.1 Úvod do biopolymerů

V posledních letech se v mnoha průmyslových odvětvích výrazně projevuje trend využívání „zelených“ zdrojů. Tento tlak je vyvíjen jednak z ekologické stránky, tak z důvodu stoupajících cen ropy. Do dalších vlivů spadá například velká spotřeba vody, fosilních paliv, energie a produkce nebezpečného odpadu. Ani farmaceutický průmysl není výjimkou. K této moderní koncepci se přistupuje prostřednictvím různých metod, přičemž hlavní důraz je kladen na studium vlastností biopolymerních materiálů [41], které jsou přirozenou součástí živých organismů („bio“ odkazuje na živou hmotu) [42]. Výzkum se zaměřuje na funkce a fyzikálně-chemické charakteristiky jednotlivých biopolymerů. Také se vyvíjí snaha o porozumění jejich chování v lékových formách, a dokonce i o možnosti určování mechanismu uvolňování léčiva [41,43]. Tento aktivní postoj souvisí s jejich vysokým potenciálem pro následné využití ve farmacii [41].

Biopolymery s sebou nesou několik pozitivních vlastností. Mezi faktory, které zvyšují pozornost a zmiňovaný zájem o tyto přírodní materiály, spadá především možnost jejich biologické odbouratelnosti (tzv. biodegradace) [41,42,43,44]. Samozřejmě s tím souvisí jejich ekologicky šetrný profil, během kterého dochází k rozkladu materiálu působením bakterií, a tím dochází ke snížení emise CO₂ (oproti likvidaci spalováním) [41]. Dále se mezi výhody biopolymerů řadí jejich vysoká četnost v přírodě, poměrně nízká cena (ve srovnání se syntetickými a polosyntetickými

protějšky), toxikologická nezávadnost a jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti [41,43]. Důležitým faktorem pro jejich použití je také skutečnost, že nové syntetické látky musí podstoupit velmi přísné a finančně nákladné bezpečnostní zkoušky [41].

Díky velkému zájmu o tyto materiály se předpokládá, že budou nalezena řešení pro některé nevýhody spojené s jejich používáním. Především se jedná o snižování výrobních nákladů, související s jejich nesnadnou izolací z přírodních materiálů [41], čistěním a výběrem výnosného substrátu [42]. Pracuje se také na vylepšení jejich termomechanických a bariérových vlastností [41,42]. Dalším cílem je optimalizace jejich degradace v rámci kompostovacích procesů [41].

1.3.2 Aplikace biopolymerů ve farmaceutickém průmyslu

S postupujícím výzkumem v oblasti biopolymerů se ve farmaceutickém průmyslu začíná více uplatňovat, dokonce i upřednostňovat, využití biopolymerních materiálů [41,42,43]. Existuje mnoho studií, které zkouší do tradičních lékových forem zakomponovat biopolymer s cílem zlepšit účinnost, bezpečnost a stabilitu léku, snížit náklady a celkově ovlivnit léčebnou terapii v pozitivním směru nebo zajistit individualizaci dávkování [41,43]. Biopolymery dokonce mohou hrát i klíčovou roli ve skladování léčiv [43,44]. V rámci výroby lékových forem (tablety, tobolky, kapsle, gely, masti, ...) nacházejí různá uplatnění, která souvisí s jejich unikátními vlastnostmi a původem. Vzhledem k jejich schopnosti být vstřebávány organismem se využívají nejen k výrobě léků, ale i různých zdravotnických pomůcek využívaných ve stomatologii, chirurgii a tkáňovém inženýrství [41,42].

Konvenční lékové formy

Jedná se o „klasické“ lékové formy, které zajišťují okamžité uvolňování účinné látky. Udržení koncentrace API v optimálním terapeutickém intervalu (specifický pro dané léčivo) prostřednictvím těchto lékových forem netrvá příliš dlouho. Je tedy důležité poznamenat, že tento typ lékového přípravku vyžaduje častější podávání jednotlivých dávek, což souvisí s nežádoucím kolísáním hladiny léčiva v organismu [41,45].

Biopolymery zde vystupují v roli pomocných látek [43]. Mohou se tedy přidávat do tablet jako plniva (např. škrob, alginát, deriváty celulózy, ...), pojiva, dezintegranty pro usnadnění rozpadu příslušných lékových forem, potahy pro zamaskování nepříjemné chuti API (modifikovaný škrob) [41], nebo jako sladidla

a ochucovadla [43]. V případě tobolek se mohou biopolymerní materiály využívat jak k potahování, tak i jako matrice pro inkorporaci léčivých látek. Naopak u injekčních přípravků zajišťují správné uvolňování daného léčiva, jeho stabilitu a také tokové nebo mechanické vlastnosti celé této lékové formy [41].

Lékové formy s řízeným uvolňováním

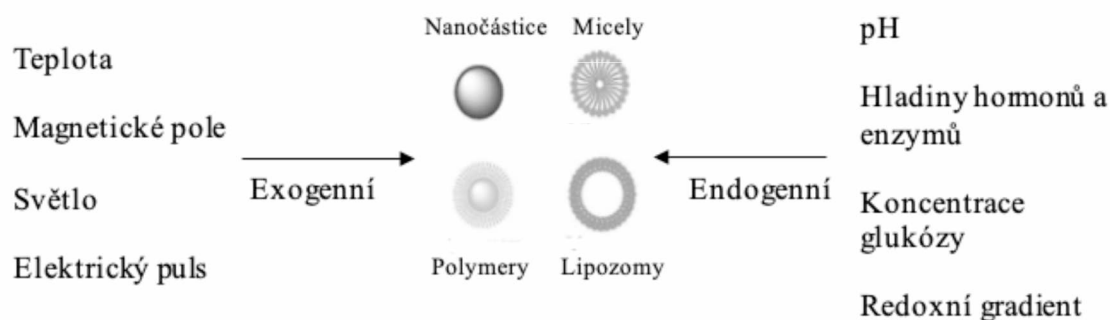
Biopolymery se mohou aplikovat také do lékových forem s řízeným uvolňováním, přičemž tento koncept přináší řadu výhod [41]. Jedna z klíčových předností lékových forem s řízeným uvolňováním je minimalizace vedlejších účinků spojených s nedodržením předepsané medikace a s nesprávným užíváním léků. Tento fakt je zapříčiněn tím, že lékové formy obsahují speciální nosiče umožňující snížení frekvence podání léčiv. Díky řízenému uvolňování a speciálním nosičům na bázi biopolymerů je zároveň možné dosáhnout zlepšení terapeutického účinku API [46,47]. U léků, které vykazují vysokou rozpustnost ve vodě, nebo silně lipofilní charakter, či krátký poločas rozpadu, je nezbytné pro zajištění úspěšné léčby onemocnění právě řízené uvolňování [48].

Systémy pro cílené podávání léků

Biopolymery se aplikují také v tzv. „drug delivery systems“ (DDS), kde se podílejí na řízeném uvolňování účinné látky pouze v postižené části těla, např. receptory, orgány nebo buňky [41,49,50].

Pokročilé DDS přepravují potřebné množství léčiva pouze na postižené místo, což vede ke snížení vedlejších účinků [42,49,50,51]. Tyto systémy zajišťují dobrou dostupnost léčiva související s vysokým terapeutickým účinkem a zároveň poskytují profily uvolňování API s vhodnou rychlostí a bez kolísání hladiny léčiva v těle pacienta [50,51,52].

Ke spuštění samotného efektu slouží dva typy přístupů. Léčivo je citlivé na endogenní, nebo exogenní stimuly. Endogenní souvisí s prostředím v těle, zatímco exogenní jsou citlivé na vnější impulsy [51]. Takové materiály s možností reagovat na podněty se označují jako „chytré“ [41,51]. Mezi ně patří polymery a micely [51], ale i nanočástice [51,53], lipozomy [51] a popřípadě niozomy [54].



Obrázek 6: Podněty pro lékové formy s cílenou distribucí.

1.3.3 Rozdělení biopolymerů

Rozdělení biopolymerů lze provést na základě různých hledisek [42]. V závislosti na vlastnostech a chování po vystavení teplotnímu zatížení se biopolymery klasifikují na termoplasty (možnost opakovaného zahřívání a tvarování), termosety (zpevnění struktury natrvalo) a elastomery (elasticita a pružné deformace) [42,55]. Biopolymerní materiály se mohou vyskytovat ve formě směsí, laminátů nebo kompozitů, přičemž každý typ má rozdílnou strukturu a složení. Mezi další kritéria spadá jejich původ nebo schopnost biologické rozložitelnosti [42].

Nejčastěji se ale biopolymery dělí do dvou skupin, a to na přírodní a syntetické biodegradovatelné polymery [42,56]. Do přírodních biopolymerů se řadí rostlinné i živočišné proteiny (kolagen, keratin, elastin, ...) a polysacharidy získané z různých zdrojů (agar, celulóza, chitosan, pektin, ...). Extrahují se z látek, jež se běžně nachází v přírodě. Na druhou stranu syntetické biopolymery mají sice také původ v biomase, ale jsou z ní syntetizovány uměle. Do této skupiny například patří polymléčná kyselina (PLA), polyvinylalkohol (PVA), polykaprolakton (PCL) a mnoho dalších [42,57].

1.3.4 Charakteristické vlastnosti polysacharidů

V posledních letech farmaceutický průmysl zaměřuje svoji pozornost a zároveň klade vysoké naděje do biopolymerních materiálů, přičemž mezi nejvíce studované a využívané biomakromolekulární látky patří polysacharidy. Tento zájem je způsoben širokým spektrem jejich jedinečných vlastností [52,58]. Vzhledem k zaměření této diplomové práce bude pozornost věnována především této skupině biopolymerů.

Ve struktuře těchto biomakromolekul se opakují glykosidické vazby spojující stejné nebo odlišné sacharidové jednotky (více jak 10) [58,59], které se hydrolyzou rozkládají na jednoduché sacharidy (glukózu, galaktózu, manózu, arabinózu, ...), jež

nacházejí uplatnění v metabolických drahách organismu. Polysacharidy jsou schopné plnit strukturální, zásobní, nebo jiné speciální funkce [52]. V organismu mohou sloužit jako mediátory v buněčné komunikaci a hrát důležitou roli při adhezi molekul. Důležitá je i jejich účast v buněčném rozpoznávání při imunitních reakcích [58,60].

Tato velmi rozšířená skupina látek přírodního původu se izoluje z rostlin, zvířat, hub nebo mořských řas. Kvůli jejich složité, velmi rozmanité a druhově specifické struktuře se k jejich separaci využívají různé extrakční techniky. Je důležité pečlivě zvolit správný postup extrakce, aby nedošlo k nežádoucím změnám v jejich struktuře či dokonce k jejich degradaci. Významným faktorem, na který se musí hledět při jejich získávání z přírodních zdrojů, je aktuální umístění separovaného polysacharidu uvnitř materiálu. Pokud se nachází v buněčné stěně, je nezbytné nejprve provést mechanické rozdrčení nebo rozbití prostřednictvím ultrazvukového proudění plynu, aby extrahovaná intracelulární látka přešla do extracelulárního prostoru. Před samotnou extrakcí je dalším krokem eliminace lipidové izolace buněčné stěny. Tento proces zahrnuje zahřívání příslušného materiálu pod zpětným chladičem za použití ethanolu po dobu 6 – 8 hodin v přístroji, který se nazývá Soxhletův extraktor. Po úspěšném provedení těchto nezbytných kroků je možné zahájit samotnou extrakci. Existují čtyři základní postupy pro získání polysacharidů z přírodních zdrojů: extrakce horkou vodou, zředěným alkálním roztokem, enzymem či dimethylsulfoxidem (DMSO). Každá z těchto metod má své výhody i nevýhody, není tedy žádná univerzální technika a je důležité dbát na její výběr. Je podstatné si uvědomit, že získání frakce homogenních polysacharidů je velmi obtížné, což může ovlivňovat následné výzkumné studie [52,61].

Fyzikálně-chemické vlastnosti polysacharidů kladně přispívají k jejich častému využití při výrobě lékových přípravků, zejména jako složky systémů pro řízenou nebo cílenou distribuci API [52,59]. Jsou totiž schopné vytvářet trojrozměrné molekulární sítě, tzv. gely. Vlastnosti této gelové struktury jsou ovlivněny řadou faktorů, jako je teplota, iontová síla, pH a koncentrace polysacharidu. Dále je pro aplikaci polysacharidů důležitá jejich schopnost bobtnání a snadná biodegradace (enzymatická nebo mikrobiální), která se využívá při vývoji lékových forem cílených do tlustého střeva [52]. Zájem farmaceutického a biomedicínského odvětví o tuto skupinu látek roste i díky jejich předpokládané bioaktivitě. V současné době jsou intenzivně prováděny výzkumné aktivity, jež jsou zaměřené na využití těchto látek při vývoji vakcín a nových specializovaných léčiv. Hlavním cílem je využít jejich

imunoregulační, protinádorové, antivirové, hypoglykemické, antioxidační a protizánětlivé vlastnosti [58,60].

Polysacharidy zahrnují širokou škálu látek, včetně gum a slizů, které jsou často produkovány rostlinami jako odezva na jejich poranění. Funkcí těchto biomateriálů je zacelit ránu a udržet požadovanou vlhkost uvnitř rostlinného těla [43]. Tyto látky se formují v různých tkáních rostlin, jako jsou buněčné stěny semen, listů, kořenů, kůry nebo střední lamely řas, a následně vytékají ze vzniklého řezu ve formě viskózní tekutiny [43,62]. Tyto výměšky (klovatiny) na vzduchu následně ztratí vlhkost a stane se z nich průhledná sklovitá hmota [43]. Jedná se tedy o průsvitné hydrokoloidy s amorfním charakterem [43,62]. Z chemického hlediska jsou gummy a slizy považovány za soli polysacharidů. Gummy se obvykle vyskytují jako soli hořčíku nebo vápníku, což je dáno jejich schopností hydrolyzovat se na organické kyseliny, které reagují právě s těmito prvky. Rozlišení těchto dvou skupin je založeno na různých kritériích [43]. Prvním z nich je rozpustnost ve vodě, kde sliz je nerozpustný (vytváří pouze slizkou hmotu), zatímco guma je rozpustná. Dále je rozhodující jejich charakter, přičemž sliz je považován za patologický a guma za fyziologickou obrannou látku [43,62].

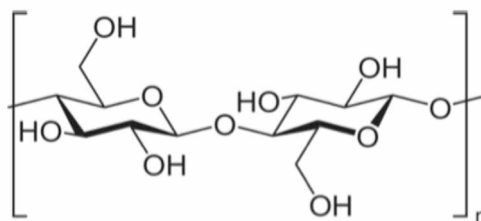
1.3.4.1 Celulóza

Jedná se o jednu z nejrozšířenějších sloučenin na planetě, jež společně s hemicelulózou a pektinem tvoří buněčné stěny vyšších rostlin [43,59]. Díky své struktuře, která je charakterizována pevností a vysokou odolností vůči enzymatickým systémům, může plnit stavební funkci. Tyto důležité mechanické vlastnosti jsou způsobeny charakteristickým uspořádáním D-glukozových jednotek do paralelně orientovaných řetězců, jež tvoří krystalické mikrofibrily. Tuto typickou kompozici (obrázek 7) udržují jak vodíkové, tak i glykosidické vazby, konkrétně β -1,4 vazby [43].

Celulóza je pro lidský organismus nestravitelná, avšak býložravci a termiti tuto sloučeninu dokáží efektivně metabolizovat. Další vlastností, která nemůže být opomenuta, je její nerozpustnost ve vodě [43].

Role celulózy se v lékových formách zásadně liší v závislosti na jejím charakteru. Celulóza získaná ze dřeva či bavlny v práškové formě se často využívá jako plnivo do tablet. Tato forma celulózy může být modifikována prostřednictvím kyseliny chlorovodíkové na mikrokrytalickou formu, která je pro přípravu léčiv

preferovaná díky své volnější struktuře. Mikrokrystalická celulóza se přidává nejen jako plnivo do tablet, které se vyrábějí metodou přímého lisování [43] nebo granulací, ale může také zastupovat funkci potahů [59]. Mikrokrystalická celulóza při kontaktu bobtná, což může vést k prasknutí příslušných lékových forem [44].



Obrázek 7: Struktura celulózy. Převzato z [59]

1.3.4.2 Hemicelulóza

Termín hemicelulóza zahrnuje rozmanitou skupinu polysacharidů, které jsou běžnou součástí rostlin, resp. jejich buněčných stěn. Tvoří například dřevo nebo obiloviny. Do této skupiny patří xyloglykany, glykany, xylany, manany a glukomanany. Na rozdíl od celulózy se vyznačují amorfním uspořádáním a nižší tepelnou a chemickou stabilitou, jelikož ve své větvené struktuře postrádají mikrofibrily [43,63]. Hydrolýzou těchto sloučenin vznikají odpovídající pentózy (xylóza, arabinóza), hexózy (manóza, glukóza, galaktóza) a cukerné kyseliny (glukuronová, manuronová) [63].

Významnou skupinou jsou glukomanany, jež jsou specifikovány přítomností D-manózy a D-glukózy ve svých strukturách. Poměr těchto dvou monosacharidů se může lišit v závislosti na původu glukomananů. Vyznačují se vysokou viskozitou a schopností vázat vodu. Navíc mohou obsahovat acetylátové skupiny, což přispívá k dalším podstatným charakteristikám, zejména k výraznému zvýšení jejich rozpustnosti. Jedním z klíčových příkladů je glukomannan konjac, získávaný z hlíz asijské rostliny. Společně s xantanovou gumou se uplatňuje při formulaci tablet, kde zajišťují zpomalení uvolňování léčiv, a to vytvářením sítě propojené vodíkovými vazbami [43]. Dále se zkoumá jeho uplatnění v kapslích obsahujících i HPMC a laktózu. Tyto tobolky mají potenciál pro pulzní uvolňování API do prostředí tlustého střeva [64]. Také se zjistilo, že oxidovaná forma tohoto glukomannanu je nadějná pro výrobu konvenčních tvrdých tobolek [65].

1.3.4.3 Pektin

Název tohoto polysacharidu je odvozen od řeckého slova „pekticos“, což v překladu znamená zmrazit [52]. Tento bílý až světle hnědý prášek se získává z buněčných stěn rostlin, přičemž nejčastějším zdrojem je citrusová kůra. Nicméně, v menší míře lze pektin nalézt také v jablkách [52,66]. Alternativně jej lze izolovat z vedlejších zemědělských produktů, jako jsou cukrová řepa, mango či slunečnicová semínka [66,67]. Na základě zvoleného zdroje, použité metody extrakce, způsobu skladování a zpracování se jeho charakteristiky významně mění, což úzce souvisí s jeho následnou aplikací [67,68]. Nejenže se tento aniontový biopolymer vyznačuje vysokou molekulovou hmotností (50 – 150 kDa) a hydrofilní povahou, ale je také schopný vytvářet elastické hydrogely [66,67,68]. Viskozita roztoků vodou rozpustného pektinu závisí na jeho koncentraci a M_w , přítomnosti iontů a pH daného roztoku [68].

Hlavním strukturním prvkem pektinů je homogalakturonan skládající se z opakujících se jednotek D-galakturonové kyseliny, které jsou propojeny α -(1,4) glykosidickými vazbami [52,68]. Vlastnosti pektinů jsou ve značné míře ovlivněny působením fyzikálních, chemických i enzymatických vlivů [67]. V homogalakturonanu dochází k methylaci, amidaci nebo acetylaci velké části D-galakturonové kyseliny, což má za následek vznik struktur nazývaných rhamnogalakturonan (I, II) a xylogalakturonan, které obsahují příslušné zbytky [52,67].

Pektin se často využívá jako texturovací látka pro úpravu konzistence potravin a kosmetických výrobků [52]. Nicméně, rostoucí zájem o tuto makromolekulární látku spočívá v objevení jejích příznivých vlastností pro lidské zdraví. Na základě svých probiotických a hypoglykemických schopností, efektu snížení hladiny cholesterolu a účinku na metastáze a apoptózu nádorových buněk se aplikace tohoto polysacharidu rozšířila i do farmaceutického průmyslu [52,66]. Pektin se využívá jako účinná látka pro tvorbu obvazů a zásypů, přičemž se jejich fungování opírá o jeho pravděpodobnou úlohu v hojení ran. Naopak ve formě pomocných látek se přidává do lékových forem jednak jako pojivo, ale i jako matrice pro řízené uvolňování [66].

Pektin prokazuje schopnost vystupovat jako konstituční prvek v léčivých přípravcích pro dodávání API do tlustého střeva, a to díky svým gelujícím schopnostem. Tento mechanismus prodlouženého uvolňování je podpořen tím, že enzymy přítomné v horní části GIT pektin nerozkládají, zatímco kolonická mikroflóra

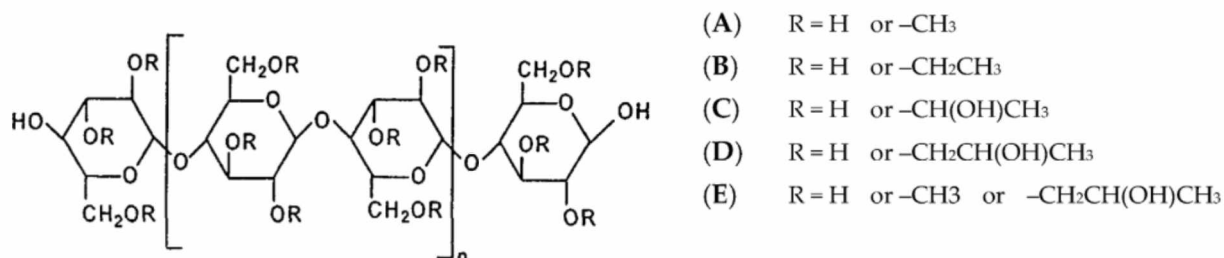
ano. Pro dosažení tohoto cíle je avšak nezbytné překonat vysokou rozpustnost pektinu v prostředí trávicích tekutin. Z tohoto důvodu se do formulace přidává navíc činidlo, např. HPMC, které zpomaluje uvolňování a upravuje příslušný profil uvolňování účinné látky. V souladu s uvedeným principem byly v rámci studie připraveny peletky, jež byly následně naplněny do želatinových tobolek. Tento postup výroby, využívající HME a peletizaci, se jevil jako perspektivní [69].

1.3.4.4 Deriváty celulózy

Do léčiv se často začleňují deriváty celulózy, a to ve formě etherů, esterů či kopolymerů [43,59]. Při jejich vzniku reagují celulózové hydroxylové skupiny [43]. U etherových reakcí je vodík z –OH skupiny D-glukopyranózy nahrazen alkylovou nebo substituovanou alkylovou skupinou [44,59]. Modifikace celulózy indukuje změnu ve vlastnostech, čímž se vytvořené deriváty stávají ve vodě rozpustnými [20].

Do struktur léčivých přípravků se deriváty celulózy začleňují z důvodu jejich schopnosti řídit uvolňování API z lékové formy. Jednak mohou tvořit jejich enterosolventní potah nebo semipermeabilní membrány, jednak mohou být součástí matricových systémů [43]. Kromě toho se využívají jako zahušťovadla, stabilizační a dezintegrační činidla, nebo jako substance maskující nepříjemné chutě [44].

V oblasti farmacie se nejvíce používají ethery, viz. obrázek 8. Jejich častá aplikace souvisí s využitím metody 3D tisku při přípravě perorálních lékových forem. Tyto látky vykazují variabilní vhodnost pro 3D tisk, rozmanité fyzikálně-chemické vlastnosti a odlišné možnosti uvolňování léčiv. Počet substituentů má například vliv na hodnotu T_g . Čím je větší četnost těchto skupin ve struktuře celulózy, tím dochází k efektivnějšímu blokování tvorby vodíkových vazeb, což vede ke snížení hodnoty skelného přechodu těchto materiálů [20].



Obrázek 8: Etherové deriváty celulózy: (A) methylcelulóza, (B) ethylcelulóza, (C) hydroxyethylcelulóza, (D) hydroxypropylcelulóza, (E) hydroxypropylmethylcelulóza.

Převzato z [20]

1.3.4.4.1 HPMC

Hypromelóza (HPMC) vzniká modifikací celulózy, proto bývá klasifikována jako polosyntetický biopolymer [44,59]. Tento druh etheru představuje jednu z nejčastěji zkoumaných sloučenin, což je zapříčiněno jeho unikátními vlastnostmi, vyniká například svou rozpustností. Hydroxypropylmethylcelulóza je hydrofilní sloučenina, tedy je dobře rozpustná ve vodě. Tato schopnost není omezena pouze na vodné prostředí, ale projevuje se i v organických rozpouštědlech jak při zvýšené, tak i při laboratorní teplotě [20].

Jedná se o bílý nebo krémově bílý prášek s neutrálním celkovým nábojem [44,70], s molekulovou hmotností 10 – 1500 kDa a teplotou skelného přechodu pohybujícího se v rozmezí 160 – 210 °C [70]. Molekulová hmotnost HPMC se může mezi jednotlivými zástupci lišit, tato variabilita má následně vliv i na přesnou hodnotu T_g . Nicméně, HPMC nemůže být vystavena teplotě nad 220 °C, jelikož za těchto podmínek hrozí riziko degradace [20]. Blízké rozmezí těchto teplot může způsobit obtíže při následném zpracování tohoto materiálu, proto se hypromelóza v klasické formě při procesu HME příliš nevyužívá. Pro přípravu filament je vhodnější speciální typ HPMC, známý jako Affinisol™. Tato modifikovaná varianta se upřednostňuje díky její nižší teplotě skelného přechodu a lepším viskózním vlastnostem [71]. Další výhodou je relativně vysoká stabilita léčiv připravených z tohoto polymeru, jelikož Affinisol™ nepodléhá snadné absorpci vzdušné vlhkosti. Aby se zajistil hladší průběh extruze, mohou se přidat do extruzní směsi také změkčovadla, ale je třeba zvážit jejich možný vliv na dobu průchodu dané lékové formy trávicím traktem [70].

Jedním z klíčových rysů hypromelózy je její schopnost bobtnání, která má vliv na farmakokinetiku léčiv obsažených spolu s ní v lékové formě. Po kontaktu HPMC s vodným prostředím GIT se vytvoří hydrogel, skrz který API s hydrofilním charakterem difunduje ven na základě koncentračního gradientu [20]. Zatímco hydrofobní účinné látky se uvolňují erozním mechanismem až po rozpadu lékové formy [70].

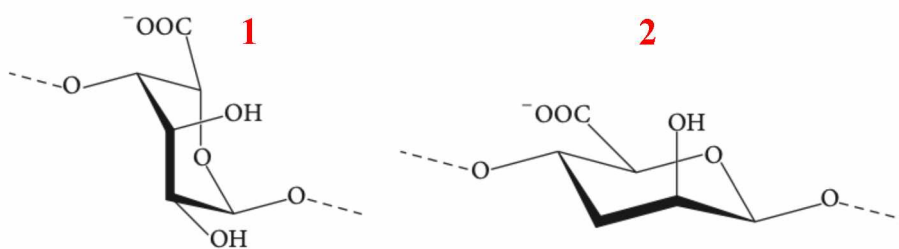
1.3.4.4.2 HPC

Tento ether vzniká jako produkt reakce, v níž reaguje alkalická celulóza a propylenoxid za vysoké teploty a tlaku. Hydroxypropylcelulóza (HPC) existuje ve formě prášku bez chuti a zápachu, avšak s bílou až slabě nažloutlou barvou. Jeho

rozpuštěnost závisí jak na teplotě, tak charakteru rozpouštědel. V organických rozpouštědlech vykazuje nízkou rozpustnost, dobře se rozpouští ve studené vodě, zatímco v teplé (40 – 45 °C) vytváří nabobtnalé útvary. Jeho struktura, o vysoké molekulové hmotnosti (20 – 1500 kDa), má neiontový charakter [70]. Podobně jako HPMC, se i tato látka vyznačuje vysokou bobtnatelností, což jí činí vhodnou komponentou pro modifikaci uvolňování API z lékových forem [20]. Ve farmaceutických aplikacích se přidává do struktur léčivých přípravků také jako plnivo, potahový materiál nebo jako činidlo pro zahušťování a emulgaci [70].

1.3.4.5 Algináty

Pod tento termín se obecně zahrnuje kyselina alginová a její soli [72]. Tyto látky přírodního původu jsou běžně izolovány z mořských zdrojů, resp. z hnědých řas *Phaeophyceae* [43]. Sekundárním zdrojem alginátu může být také bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, avšak ta poskytuje velmi nízké výtěžky (~ 4 g/l) [52]. Algináty se řadí do kategorie polysacharidů, což vyplývá z jejich lineární aniontové struktury, která se skládá ze střídajících se jednotek D-mannuronové a L-guluronové kyseliny spojených glykosidickými vazbami β -(1,4) a α -(1,4) (obrázek 9) [43,52]. V závislosti na použitém zdroji a postupu extrakce vykazují algináty heterogenní poměr jednotlivých strukturních bloků, což má za následek rozdílné fyzikálně chemické vlastnosti související s jejich kvalitou a následným použitím [72].



Obrázek 9: Strukturní jednotky alginátu: (1) α -(1,4)-L-guluronová kyselina, (2) β -(1,4)-D-mannuronová kyselina. Převzato z [72]

Algináty, o molekulové hmotnosti 33 000 – 400 000 g/mol [72], jsou schopné po styku s vodou tvořit gel, který po zesíťování může ovlivňovat rychlost difúze zachycené API a jiných biologických makromolekul (DNA, proteinů, buněk). Tento

proces probíhá buď v přítomnosti dvoumocných kationtů, nebo za tvorby intramolekulárních vodíkových vazeb při $\text{pH} < 3,5$. Avšak kyselá gelace neposkytuje příliš silné propojení. Naopak iontová gelace vytváří stabilnější gelovou síť, přičemž je preferována přítomnost Ca^{2+} , který je iontem přirozeným pro tělo a nevykazuje toxicitu. Stabilita vytvořené gelové struktury závisí na složení alginátu, neboť jednotlivé kyseliny formující jeho strukturu vykazují variabilní afinitu ke kovům [52]. Pokud je kyselina guluronová v převaze, vzniká gel s vyšší pevností [52,72].

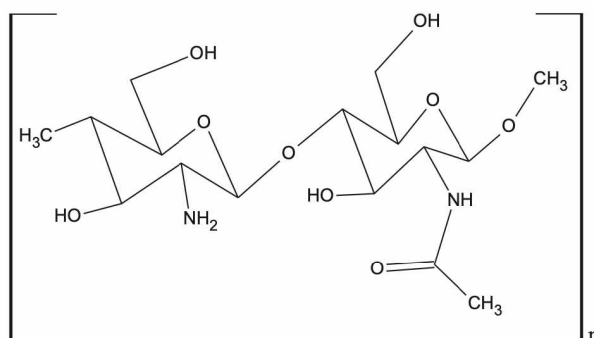
Vzhledem k významné schopnosti vytvářet gely mají algináty široké uplatnění v potravinářském průmyslu i ve farmacii, kde plní funkci stabilizátorů a činidel pro zvýšení viskozity materiálů nebo pro maskování nežádoucích chutí. Některé transdermální náplasti jsou také založeny na tvorbě alginátového gelu, jehož přítomnost vytváří optimální vlhké prostředí pro hojení ran. Tato přednost se osvědčila v systémech pro prodloužené a řízené uvolňování API [72]. Vlastnosti alginátů se mohou modifikovat prostřednictvím jiných polymerů, čímž se rozšíří možnosti jejich aplikace při výrobě léčiv [52].

Jednou z běžně používaných forem alginátu je jeho sodná sůl, respektive alginát sodný [43,72]. Rozpustnost této soli je ovlivněna celou řadou aspektů. Jednak záleží na typu rozpouštědla, kdy v organických rozpouštědlech (alkoholy, chloroform, ether, ...) rozpustnost nevykazuje. Ale naopak ve vodě je tato látka rozpustná, a dokonce i při nízkých teplotách, avšak pomalu a za vzniku velmi hustého koloidu. Mezi další faktory, které pozitivně ovlivňují rozpustnost, patří přítomnost deprotonovaných skupin karboxylových kyselin, hodnota pH nižší než kritická hodnota pK_a a absence dvojmocných iontů [52,72]. Tento přírodní polymer vykazuje v GIT poměrně dlouhou odolnost vůči působení bakterií nebo enzymů [73]. Pro zajištění účinného dodávání léčiv do trávicího traktu přispívá také jeho dobrá mukoadheze [52]. Alginát sodný může být i součástí filmů pro prodloužené uvolňování léčiva [73].

1.3.4.6 Chitin a chitosan

Chitin je polysacharid, který se získává z živočišných zdrojů, kde vykonává strukturální funkci. U hmyzu je integrován do systému exoskeletu a je také součástí schránek korýšů, skořápek humrů, krevet a krabů [43,74]. Respektive tvoří kutikulu členovců. Také se může vyskytovat u hub, kde je složkou jejich buněčné stěny společně s β -glukany [43], což bylo poprvé potvrzeno v roce 1811 [75].

Chitin je významný svou nerozpustností ve vodě [43]. Ale pokud je vystaven silným alkáliím, jako je hydroxid sodný či draselný, a vysoké teplotě (100 °C), dochází k procesu nazývanému alkalická N-deacylace [52,75], čímž vzniká derivát s menším počtem acetylových skupin, resp. chitosan. Výsledkem je lineární aminopolysacharid, který se skládá z glukosaminových a N-acetylglukosaminových jednotek, který je znázorněn na obrázku 10. Aby se předešlo časté degradaci přírodního řetězce chitinu v alkalickém prostředí, využívá se během deacetylační reakce přítomnost thiofenolu nebo inertní atmosféry dusíku [75].



Obrázek 10: Struktura chitosanu. Převzato z [75]

Fyzikální vlastnosti chitosanu jsou ovlivněny jak počtem zbylých acetylových skupin v jeho struktuře, tak i zdrojem, odkud byl izolován [75]. Na rozdíl od chitinu je chitosan rozpustný ve vodě [43]. Míra jeho rozpustnosti je spojena s poměrem strukturních jednotek a distribucí acetylových skupin v molekule [75]. Chitosan je charakterizován svou vysokou molekulovou hmotností (20 – 1200 kDa) [76] a pevnou strukturou, jelikož je schopný vytvářet intramolekulární vodíkové vazby [52].

Kromě své vysoce biokompatibilní povahy, biologické rozložitelnosti a minimální toxicity je chitosan schopný tvořit epiteliální spojení prostřednictvím nekovalentních vazeb [52]. Chitosan je polysacharid, který ve své molekule nese kladný náboj [43,52]. Může sloužit jako nosič pro složité makromolekuly, včetně léků, které mohou být inkorporovány do jeho struktury, nebo jen připojeny na vazebná místa na jeho povrchu. Dokonce může i léčiva chránit před jejich degradací [52]. Nicméně, značnou nevýhodou nosiče připraveného z chitosanu je jeho snadná rozpustnost v kyselém pH. Z tohoto důvodu se celá řada studií zaměřuje na výzkum modifikovaných hydrogelových systémů na bázi chitosanu, které mají za cíl zlepšit biologickou funkčnost tohoto biopolymeru [75].

Využití chitosanu sahá až do tkáňového inženýrství, dokonce i k léčbě rakoviny, kde se spoléhá na jeho dlouhou bioadhezi. Díky celé řadě příznivých vlastností má chitosan rozmanité funkce v lékových formách a je považován za jeden z nejperspektivnějších biopolymerů [52]. Může být například aplikován v lékových formách jako potenciální polymer zajišťující uvolňování API, citlivé na přítomnost a působení bakterií GIT, v prostředí tlustého střeva [76]. K tomuto využití přispívají také jeho výrazné mukoadhezivní vlastnosti [43].

1.3.4.7 Xanthan

Xanthanová guma se řadí do kategorie mikrobiálních heteropolysacharidů, jejichž vznik je charakterizován fermentačním procesem. V tomto případě rostlinná bakterie *Xanthomonas campestris* metabolizuje cukry, což vede k produkci xanthanu jako vedlejšího produktu [43]. Tato guma je složena ze tří základních podjednotek: D-glukózy, D-manózy a D-glukuronové kyseliny, a to v poměru 2:2:1 [52]. Základní řetězec této látky je strukturně podobný celulóze, jelikož je složen z molekul D-glukózy spojených β -(1,4) glykosidickou vazbou [43]. Kromě toho jsou na strukturu navázány další stavební prvky (acetylová skupina a zbytek kyseliny pyrohroznové), čímž vzniká komplexní molekula xanthanu s molekulovou hmotností od 2 000 do 20 000 kDa [43,52]. Přesné uspořádání molekuly a počet jednotlivých stavebních podjednotek se odvíjí od průběhu a podmínek fermentace, stejně jako od zdrojové bakterie [52].

Xanthanová guma byla vzhledem ke svým příznivým reologickým vlastnostem předmětem mnoha studií. Viskozita tohoto polysacharidu roste s obsahem kyseliny pyrohroznové uvnitř molekuly a za přítomnosti solí. Tento parametr závisí i na hodnotě pH. Xanthan vykazuje nenewtonovské chování měnící se s časem a smykovou rychlostí. Další charakteristikou této bílé až krémově bílé látky je schopnost udržet si stabilitu v širokém rozmezí pH, včetně prostředí kyselin a alkálií. Projevuje také vynikající rozpustností v teplé i studené vodě, avšak vyžaduje neustálé míchání kvůli možné nežádoucí aglomeraci částic [52].

Uplatnění sahá do široké škály průmyslových odvětví, včetně kosmetiky a tkáňového inženýrství. Xanthanová guma byla uznána FDA (Food and Drug Administration) za netoxickou přísadu [43], a proto není opomenuta ani ve farmaceutickém průmyslu. Zde se využívá jako činidlo pro zvýšení viskozity, přísada umožňující gelovatění, smáčedlo nebo stabilizátor [52]. V pevných perorálních

lékových formách může být využita jako hydrofilní matrice pro cílené podání léku do tlustého střeva. Zpomaleného uvolňování API je dosaženo tím, že tento polysacharid nepodléhá trávení v žaludku ani v tenkém střevě [77].

1.3.4.8 Guarová guma

Guarová guma se získává ze semen rostliny *Cyamopsis tetragonolobus*, která spadá do čeledi bobovitých. Tento rozvětvený neiontový polysacharid se skládá z jednotek D-galaktopyranózy a D-mannopyranózy, které jsou spojené prostřednictvím α -(1,6) a β -(1,4) glykosidických vazeb do specifické struktury o vysoké molekulové hmotnosti. Po kontaktu s vodou se rychle hydratuje a vytváří koloidní disperze s velmi vysokou viskozitou. Dokonce i ve studené vodě vykazuje dobrou rozpustnost a bobtnatelnost [43,52].

Vlastností guarové gummy, a to především schopnost vytvářet již zmíněné hydrokoloidy, jsou atraktivní pro její začlenění do lékových forem [43,52], kde může sloužit jako pojivo, dezintegrační činidlo [52], nebo nosič pro cílenou distribuci léčiv jak v matricových tabletách, tak i u mikročastic či obalů [43]. V tomto případě se uvolňování API směřuje do střeva, kde jsou zbytky galaktomananu pod vlivem bakteriálních enzymů GIT degradovány. Pro optimalizaci farmakokinetického profilu je možné guarovou gumu modifikovat různými způsoby, např. derivatizací nebo roubováním [52]. V jedné výzkumné studii bylo úspěšně provedeno roubování gummy polyakrylamidem, čímž byly připraveny kopolymerové struktury obsahující hydrolyzované funkční skupiny. Uvolňování API bylo následně regulováno v závislosti na jejich citlivosti na pH. Tato klíčová charakteristika otevírá perspektivní možnosti využití tohoto polysacharidu jako materiálu s vysokým potenciálem pro tvorbu lékových forem umožňujících řízený transport léčiva do střevního traktu [78].

1.3.4.9 Karagenany

Karagenany jsou přirozenou složkou červených řas třídy *Rhodophyceae* a vyznačují se lineární aniontovou strukturou, jež obsahuje různý počet sulfátových skupin [43,79].

Tyto polysacharidy jsou klasifikovány do tří hlavních tříd (kappa κ , iota ι a lambda λ) podle strukturního uspořádání, které zaujímají po kontaktu s vodou. Lambda karagenan vytváří viskózní roztoky, zatímco kappa a iota se za vhodných

podmínek transformují do gelových struktur [43]. Průběh gelace podporuje teplota 50 °C a přítomnost iontů K^+ a Ca^{2+} [79]. Charakteristiky těchto tepelně reverzibilních trojrozměrných struktur se liší mezi jednotlivými třídami: u iota ι typu se setkáme s elastickým gelem, zatímco κ karagenan vytváří po želatinaci křehký gel [43,79]. Tato důležitá vlastnost karagenanů souvisí jednak s počtem sulfátových skupin v jejich struktuře, což má za následek rozdílnou hustotu náboje a rozpustnost. Dále, přítomnost 3,6-anhydro můstků v iota a kappa typech tohoto polysacharidu sehrává významnou roli, neboť právě tyto můstky iniciačně zahajují první fázi gelace, tj. vytvoření nadmolekulární šroubovice [79].

Karagenany se využívají jako stabilizátory a emulgátory v potravinářském průmyslu, ale v posledních letech nacházejí uplatnění i ve farmaceutickém průmyslu. Mohou být začleněny do lékových forem s řízeným uvolňováním díky svým gelujícím vlastnostem a odolnosti proti kyselým žaludečním podmínkám [43,79].

Výše zmíněné polysacharidy se velice často inkorporují do struktur enterosolventních tobolek, a to především v kontextu personalizované léčby. Tyto tobolky slouží nejen jako lékové forma pro řízené uvolňování API do střevního prostředí, ale také jako alternativní cesta pro fekální mikrobiální transplantaci. Zejména jsou preferovány takové tobolky, které již ve svých strukturách obsahují acidorezistentní polymery, což umožňuje vynechat náročný proces potahování. Tento přístup je znám jako ECDDT (z angl. Enteric capsule drug delivery technology) [3].

Na přístup ECDDT navazuje experimentální část, která si klade za cíl otestovat potenciální materiály pro výrobu enterosolventních tobolek. Celkem bylo připraveno pět formulací těchto tobolek pomocí metody FDM 3D tisku, přičemž v jejich strukturách byly zahrnuty některé z výše uvedených polysacharidů.

2 Experimentální část

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na přípravu enterických tobolek na bázi hypromelózy a jejich následné testování (rozměrová analýza, disoluční chování). Veškeré postupy a podmínky experimentů, které byly provedeny v rámci této diplomové práce, se řídily požadavky uvedenými v Českém lékopisu [1].

Tobolky byly připraveny metodou FDM 3D tisku z pěti různých typů filamentů na bázi HPMC připravených s využitím technologie HME. Integrace biopolymerů do vláken byla navržena s cílem vytvořit materiál s minimální toxicitou, dobrou kompatibilitou s živými systémy a odolností vůči kyselému prostředí žaludku. Základním požadavkem na enterosolventní lékovou formu je odolnost vůči kyselému prostředí žaludku (pH 1,2) po dobu 2 hodin a její následná degradace v prostředí střev (uvolnění obsahu). Na základě těchto požadavků byly voleny materiály pro přípravu vláken a následný tisk tobolek. Základem vláken byla modifikovaná HPMC pod komerčním názvem Affinisol™, která má nižší T_g a nižší viskozitu ve srovnání s HPMC běžně využívanou v pevných lékových formách. Testován byl vliv přídavku biopolymerů (citrusový pektin a alginát sodný) na proces extruze a tisknutelnost připravených vláken, ale také na disoluční chování tobolek připravených z uvedených vláken metodou 3D tisku. Do tří druhů filamentů bylo přidáno (nad rámec původně plánovaných experimentů) také změkčovadlo polyethylenglykol (PEG) s cílem snížit teplotu extruze a zlepšit vlastnosti extrudovaného vlákna.

U připravených tobolek byla provedena rozměrová analýza s cílem posoudit kvalitu a reprodukovatelnost tiskového procesu. Následně byl proveden disoluční test se změnou pH (1,2 → 6,8), který simuloval průchod lékové formy GIT. Cílem všech provedených experimentů bylo prostudovat vliv složení vláken na jejich mechanické vlastnosti, tisknutelnost a odolnost připravených tobolek při průchodu GIT zejména s ohledem na změnu pH. Primárním výstupem experimentální části byly disoluční profily ukazující chování enterických tobolek připravených metodou FDM 3D tisku. Z těchto grafických závislostí byla posouzena jejich vhodnost pro fekální mikrobiální transplantaci, nebo pro směřování léčiva do oblasti kolonu.

Druhá část experimentu byla zaměřena na reprodukovatelnost výroby tobolek navrženou technikou FDM 3D tisku. Byla provedena rozměrová analýza na 20 tobolkách formulace A – E.

2.1 Seznam použitých chemikálií a přístrojové vybavení

2.1.1 Chemikálie

2.1.1.1 Chemikálie k přípravě filament

- Affinisol™ HPMC HME 15LV (*Dow Chemical Company, Michigan, USA / šarže: F293G2C008*)
- Citrusový pektin (*Sigma-Aldrich, Co., St.Louis, USA / product of Denmark / šarže: SLCB2455*)
- Alginát sodný (*Sigma-Aldrich, Co., St.Louis, USA / product of United Kingdom / šarže: MKCJ1280*)
- Polyethylenglykol (*Sigma-Aldrich, Co., St.Louis, USA / product of Germany / average Mn 6000 / šarže: BCCC1842*)

2.1.1.2 Chemikálie k plnění tobolek

- Kofein (*Sigma-Aldrich, Co., St.Louis, USA / product of Germany / C0750 – 100G*)
- Laktóza monohydrát (*Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové, ČR, šarže: 0000070252*)

2.1.1.3 Chemikálie k přípravě disolučních médií

- Redestilovaná voda
- Kyselina chlorovodíková 35 % p.a. (*Lach-Ner s.r.o, Neratovice, ČR*)
- Chlorid sodný p.a. (*Lach-Ner s.r.o, Neratovice, ČR*)
- Hydroxid sodný p.a. (*Lach-Ner s.r.o, Neratovice, ČR*)
- Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. (*Lach-Ner s.r.o, Neratovice, ČR*)

2.1.2 Přístroje a zařízení

- Extrudér Noztek Touch a Noztek Pro (*Noztek, Shoreham, UK*)
- Homogenizátor: V-mixér (*Filtra Vibration, Barcelona, Španělsko*)
- 3D tiskárna Original Prusa i3 MK3S+ (*Prusa Research a.s., Praha, ČR*)
- Analytické váhy KERN ALT 310-4AM (*KERN & Sohn GmbH, Balingen, Německo*)

- Homogenizátor Mixer Mill MM200 (*Retsch GmbH, Haan, Německo*) a homogenizační patrona (komůrka mlecí 10 ml, nerez. ocel) pro MM200
- Laboratorní váha Sartorius H 120-D (*Sartalex s.r.o, Ústí nad Labem*)
- Disoluční aparatura Sotax AT 7 Smart (*Solution for Pharmaceutical Testing - Sotax AG, Allschwill, Švýcarsko*), košíčky pro aparaturu Sotax AT 7 Smart a skleněné mikrovláknové filtry GF/D 25 mm (*Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA*)
- UV-Vis spektrometr Aligent 8453 (*Aligent Technologies Deutschland GmbH & Co.KG, Waldbronn, Německo*) a kyveta z křemenného skla 5 mm
- Digitální posuvné měřítko 0 – 150 mm/0,02 mm (*Extrol® Premium*)

2.1.3 Software

- Autodesk Fusion 360 (*Autodesk, Inc., San Rafael, USA*)
- Prusa Slicer (*Prusa Research a.s., Praha, ČR*)
- GraphPad Prism (*GraphPad Software, San Diego, USA*)
- Microsoft Excel (*Microsoft Corporation, Redmonf, Washington, USA*)

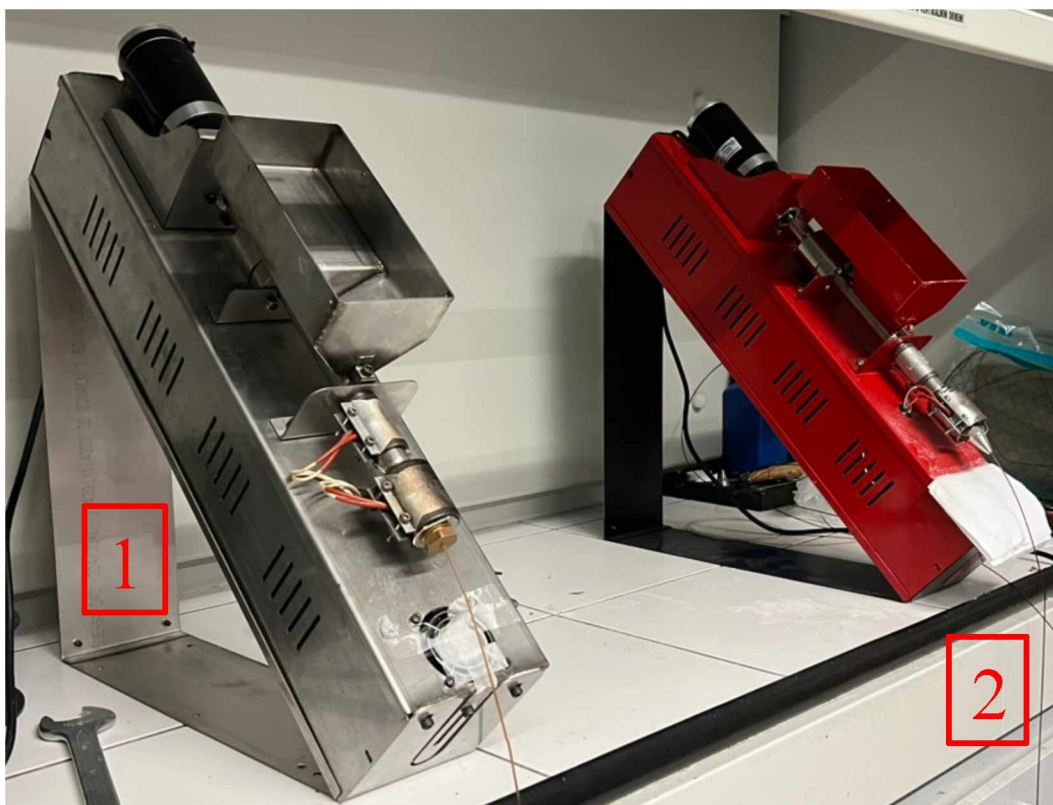
2.1.4 Další laboratorní pomůcky

- Laboratorní sklo: nálevka, zkumavka, odměrný válec, kádinka, baňka, skleněná tyčinka
- Pomůcky k vážení: lodička, lžička

2.2 Experimentální postupy

2.2.1 Příprava filament

Veškeré použité filamenty v této práci byly připraveny v laboratoři na přístrojích, které jsou znázorněny na obrázku 11. Jedná se o dva modely extrudérů firmy Noztek.



Obrázek 11: Extrudéry od firmy Noztek: (1) Noztek Touch, (2) Noztek Pro.

Nejprve byla připravena fyzikální směs látek podle přesně stanovených kvalitativních a kvantitativních parametrů. Procentuální zastoupení jednotlivých složek této směsi je uvedeno v Tabulce 1. Veškeré práškové komponenty byly postupně naváženy na předvážkách značky Kern. Hypromelóza (Affinisol™) zaujímala v každé formulaci největší podíl. K Affinisolu™ (polosyntetický polymer) byl přidáván do všech pěti filamentů také biopolymer (polysacharid). Jednalo se buď o citrusový pektin, nebo o alginát sodný. Do tří formulací bylo navíc přidáno změkčovadlo (plastifikátor) - polyethylenglykol (PEG) - za účelem snížení teploty při extruzi a zlepšení mechanických vlastností extrudovaného filamentu.

Tabulka 1: Druh a procentuální zastoupení látek ve směsi pro jednotlivé formulace filamentů (A – E).

Formulace	Plnivo		Biopolymer		Plastifikátor	
	Typ	Zastoupení [%]	Typ	Zastoupení [%]	Typ	Zastoupení [%]
A	Affinisol™	90	Citrusový pektin	10	–	–
B	Affinisol™	90	Alginát sodný	10	–	–
C	Affinisol™	85	Citrusový pektin	10	PEG	5
D	Affinisol™	85	Alginát sodný	10	PEG	5
E	Affinisol™	75	Citrusový pektin	20	PEG	5

Následně byly tyto substance homogenizovány po dobu 5 minut na rotačním V-mixéru, který je znázorněn na obrázku 12. Pro jeden cyklus extruze bylo vždy připraveno 20 g této homogenizované směsi, která byla následně vložena pomocí násypky do samotného těla extrudéru, kde byla vystavena celé řadě operací (např. mletí, míchání a tavení). Po dokončení všech nezbytných procesů byl vytlačen tuhý filament, který byl postupně namotáván na připravenou cívku. Doba, po kterou setrval materiál uvnitř extrudéru, se u každého typu vlákna lišila (v závislosti na viskozitě taveniny a homogenitě vlákna).



Obrázek 12: V-mixér Filtra Vibracion.

Před samotným zahájením extruze byla na přístroji nastavena specifická teplota, na kterou byl přístroj vyhříván prostřednictvím jeho topných těles. Tato teplota byla optimalizována dle složení zpracovávané směsi s cílem zajistit bezproblémový a efektivní průběh extruze a reprodukovatelnost přípravy vláken o vysoké kvalitě. Tato teplota se u jednotlivých typů filamentů mírně lišila, což dokládá tabulka 2. Dále byla klíčovým faktorem volba extruzní trysky, která ovlivňovala konečnou podobu a rozměrové vlastnosti vlákna. V rámci této práce byla použita tryska o průměru 1,75 mm. Optimalizace procesu extruze byla prováděna zejména s ohledem na přípravu vlákna o konstantním průměru a o dostatečné pružnosti, což usnadňuje navíjení vytlačeného filamentu a jeho následné zavádění do trysky 3D tiskárny. Konstantní průměr vlákna pozitivně ovlivňuje samotný proces tisku a zvyšuje jeho reprodukovatelnost. Po dokončení extruze bylo vlákno uloženo pro další zpracování do uzavíratelného obalu na místo bez přímého dopadu slunečních paprsků.

Tabulka 2: Teploty extruze pro jednotlivé formulace (A – E)

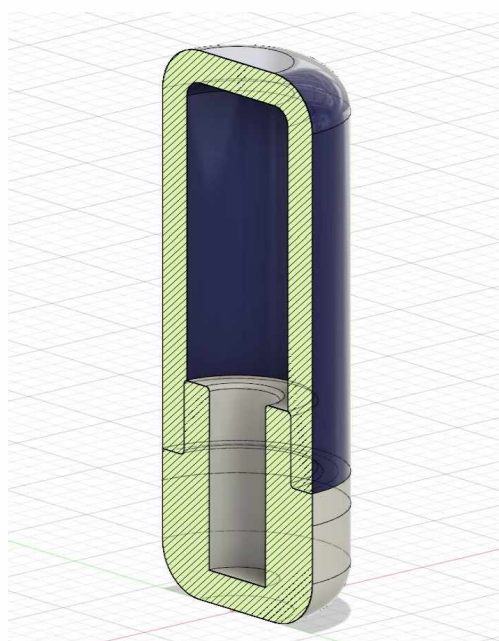
Formulace	Teplota extruze [°C]
A	145
B	130
C	140 – 155
D	130 – 140
E	135 – 150

2.2.2 3D tisk

2.2.2.1 Návrh modelu tobolek

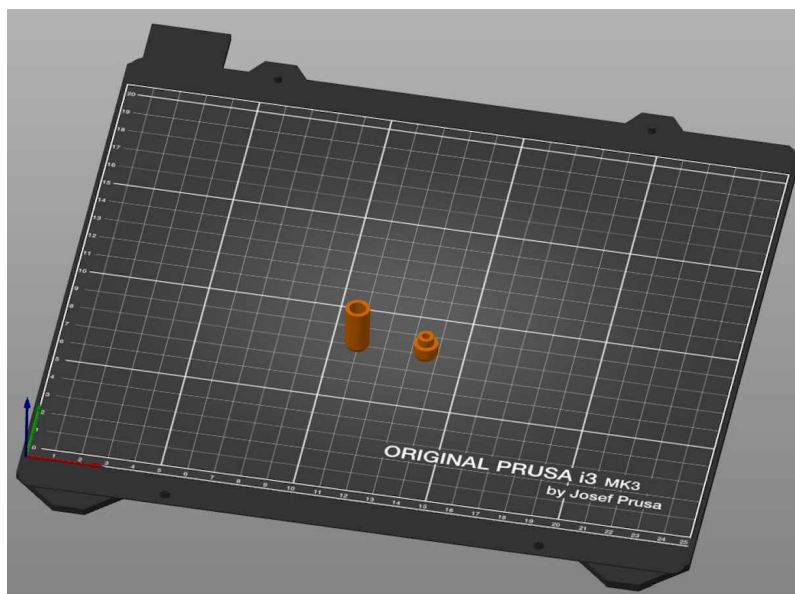
Prvním a neodmyslitelným krokem 3D tisku byla tvorba grafického modelu silnostěnné tobolek, který následně sloužil jako podklad pro samotný tisk. K této části experimentu byly využity 2 PC softwary.

Pro vytvoření požadovaného 3D objektu byl v první části použit speciální program Autodesk Fusion 360, který umožnil jeho detailní modelování. V tomto případě byla navržena tobolek s průměrem 9,25 mm a s výškou 25,5 mm, jež je znázorněna na obrázku 13. Dokončený návrh příslušného modelu byl uložen do stereolitografického formátu (značený příponou „.stl“). Tento formát je standardem pro přenos 3D modelů do softwarů 3D tiskáren, což zajišťuje kompatibilitu procesu 3D tisku.



Obrázek 13: Návrh tobolky v programu Autodesk Fusion 360.

Druhá část návrhu byla prováděna v softwaru PrusaSlicer, který umožnil zpracovat a rozdělit navrženou tobolku na jednotlivé tisknutelné vrstvy. Tento program dovolil také navrhout dráhu a směr pohybu trysky 3D tiskárny. Dále byly v tomto programu nastaveny i další speciální parametry důležité pro tisk. Mezi tyto konfigurované specifikace patřila například výška jednotlivé vrstvy, teplota procesu, hodnota násobení materiálu, typ výplně či výchozí pozice na podložce 3D tiskárny, která určila místo pro počátek tisku jednotlivého dílku tobolky. Obrázek číslo 14 prezentuje návrh tobolky na tiskovém plátu vygenerovaný v tomto programu, jenž byl uložen se zmíněnými vlastnostmi do souboru nazývaného jako G kód. Veškeré instrukce a informace o průběhu tisku z G kódu byly interpretovány a převedeny 3D tiskárnou do finálního formátu 3D produktu. V tomto případě se jednalo buď o víčka, nebo těla, které se následně kompletovaly.



Obrázek 14: G kód z PrusaSlicer.

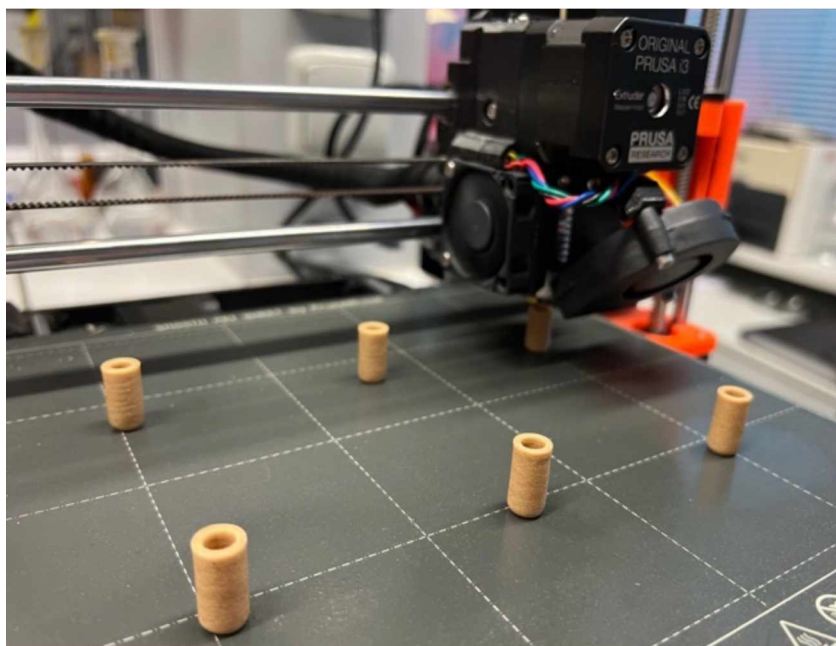
2.2.2.2 Průběh FDM 3D tisku

3D tisk tobolek byl prováděn na tiskárně Prusa i3 MK3S+ využívající technologii FDM (Fused Deposition Modeling). Prvním krokem samotného 3D tisku bylo pečlivé stanovení teploty tryskové hlavy a podložky 3D tiskárny. Teplota trysky byla klíčovým faktorem pro plynulý průběh procesu a během něj byla optimalizována v závislosti na vlastnostech použitého materiálu. Nastavení teploty bylo většinou prováděno s ohledem na aplikovanou teplotu extruze, nebo často byla volena teplota tak, aby bylo minimalizováno riziko degradace materiálu a případného zanesení trysky tiskárny. Zároveň ale muselo dojít při této teplotě k tavení materiálu a k dobrému přilnutí jednotlivých vrstev taveniny na sebe. Mnohdy byla při tisku tobolek preferována volba nižší teploty s postupným zvyšováním této hodnoty v případě potřeby.

Dalším krokem bylo zavedení připraveného filamentu do 3D tiskárny. Manipulace s vláknem byla jednoduchá díky jeho pružnosti, což přispělo nejen k plynulejšímu průběhu samotného tiskového procesu, ale také ke zvýšení jeho kvality a reprodukovatelnosti.

Před samotným spuštěním výroby tobolek byla ještě ošetřena podložka tiskárny speciálním sprejem, a to na místech, kde bylo plánováno zahájení tisku jednotlivých víček a těl. Tento krok byl výhodný pro zajištění spolehlivé adheze jejich první vrstvy k podložce.

Po zvolení navrženého modelu byl zahájen samotný 3D tisk (obrázek 15). Tento proces byl náročný a často doprovázený různými defekty a komplikacemi. Vady na tobolkách vzniklé během jejich tisku budou podrobně diskutovány v kapitole 2.3.2.1. Pro dosažení ideálních výsledků, respektive kvalitních tobolek, vyžadoval 3D tisk celou řadu optimalizačních kroků.



Obrázek 15: Zachycení průběhu 3D tisku těl.

Optimalizované podmínky 3D tisku: teplota podložky: 90 °C, teplota trysky: 195 °C, násobič extruze: 0,95 – 1,5 (korigován podle typu a průměru vlákna a také kvality vytištěných částí tobolek), nastavený průměr vlákna: 1,6 mm, výška vrstvy: 0,3 mm, perimetr: 1, hustota výplně: 90 %, na počátku 5 plných vrstev, vzor výplně jednotlivých vrstev: zarovnaná přímočará, vzor výplně poslední vrstvy: koncentrická, ventilátor: vypnutý, průběh tisku: dokončení individuálních objektů.

Po úspěšném 3D tisku byla získána jednotlivá těla a víčka pro tobolky. Po zchlazení podložky byly vytisknuté objekty velmi opatrně sejmuty, zkompletovány a následně vloženy do popsáných obalů.

2.2.3 Plnění tobolek

Po úspěšném 3D tisku a zkompletování jednotlivých částí tobolek, tedy víčka a těla, následovalo jejich plnění. Na jednu disoluční zkoušku bylo vždy připraveno šest tobolek s modelovou účinnou látkou (kofeinem) a s plnivem (laktózou) a 1 blank pouze s plnivem (tobolka číslo 7). Každá tobolka obsahovala 150 mg homogenizované směsi o určitém složení. Tabulka 3 shrnuje informace o plnění tobolek: druh odměřovaných látek, jejich množství a procentuální zastoupení ve směsi.

Tabulka 3: Složení tobolek, procentuální zastoupení jednotlivých složek.

Číslo tobolek	Složení			
	Množství [mg]		Procentuální zastoupení [%]	
	Plnivo: laktóza	API: kofein	Plnivo: laktóza	API: kofein
1 – 6	110	40	73,33	26,67
7 (blank)	150	0	100	0

Nejprve bylo na analytických vahách odměřeno dané množství laktózy, nebo kofeinu. Navážené práškové komponenty pro plnění 1 tobolek byly převedeny do patrony homogenizátoru (bez kuličky). Následoval tedy proces homogenizace (obrázek 16), který byl rozdělen do tří třiminutových intervalů s nastaveným třepáním o frekvenci 15 Hz za sekundu. Na závěr byly tobolky kvantitativně naplněny připravenou homogenizovanou směsí, jejíž hmotnost činila $150 \text{ mg} \pm 1,5 \text{ mg}$.



Obrázek 16: Homogenizátor používaný při plnění tobolek.

Tobolky (formulace A – E), které byly naplněny v souladu s předepsanými parametry v tabulce 3, byly uzavřeny do popsanych lékovek, aby následně mohly být podrobeny disoluční zkoušce (obrázek 17).



Obrázek 17: Připravené tobolky (formulace C a D) k disolučnímu testování.

2.2.4 Disoluční zkouška

Bylo provedeno celkem pět disolučních testů na tobolkách připravených metodou FDM 3D tisku. Disoluce probíhala v disolučních médiích, která simulovala přirozená prostředí v těle. Bylo použito disoluční médium pH 1,2 (kyselé prostředí v žaludku) a médium pH 6,8 (prostředí střev). Odpovídající disoluční média byla připravena dle Českého lékopisu [1] a rovněž všechny fáze disolučních zkoušek byly provedeny podle postupů uvedených v Českém lékopisu [1].

2.2.4.1 Příprava disolučních médií

Jedním z nezbytných kroků disolučního testu byla příprava disolučních médií. Jak bylo zmíněno výše, dle Českého lékopisu [1] byly připravovány 2 typy médií, která měla za úkol napodobit podmínky jednotlivých částí gastrointestinálního traktu. Disoluční médium pH 1,2, obsahující kyselinu chlorovodíkovou, simulovalo kyselé prostředí žaludku. Naopak fosforečnanové médium (pH 6,8), odpovídalo lumenu střev.

2.2.4.1.1 Disoluční médium pH 1,2

Disoluční médium o pH 1,2 obsahuje kyselinu chlorovodíkovou a chlorid sodný. Prvním krokem byla tedy příprava zásobního roztoku HCl o koncentraci

0,2 mol/l, druhým krokem byla příprava roztoku NaCl s koncentrací 0,2 mol/l (úprava iontové síly výsledného média). Poté byly oba roztoky smíchány v poměru uvedeném v Českém lékopise [1].

Postup:

Kyselina chlorovodíková (0,2 mol/l): Do odměrné baňky o objemu 2000 ml bylo odměřeno 35,3 ml 35 % HCl a doplněno po rysku redestilovanou vodou.

Chlorid sodný (0,2 mol/l): 23,38 g NaCl bylo naváženo, kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 2000 ml a doplněno po rysku redestilovanou vodou.

Médium: Do dvoulitrové baňky bylo smícháno 500 ml 0,2 mol/l roztoku NaCl, 850 ml 0,2 mol/l roztoku HCl, zbylý objem byl doplněn po rysku redestilovanou vodou.

2.2.4.1.2 Disoluční médium pH 6,8

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky dihydrogenfosforečnanu draselného o koncentraci 0,2 mol/l a roztoku hydroxidu sodného také o koncentraci 0,2 mol/l. Smícháním těchto roztoků bylo připraveno výsledné médium.

Postup:

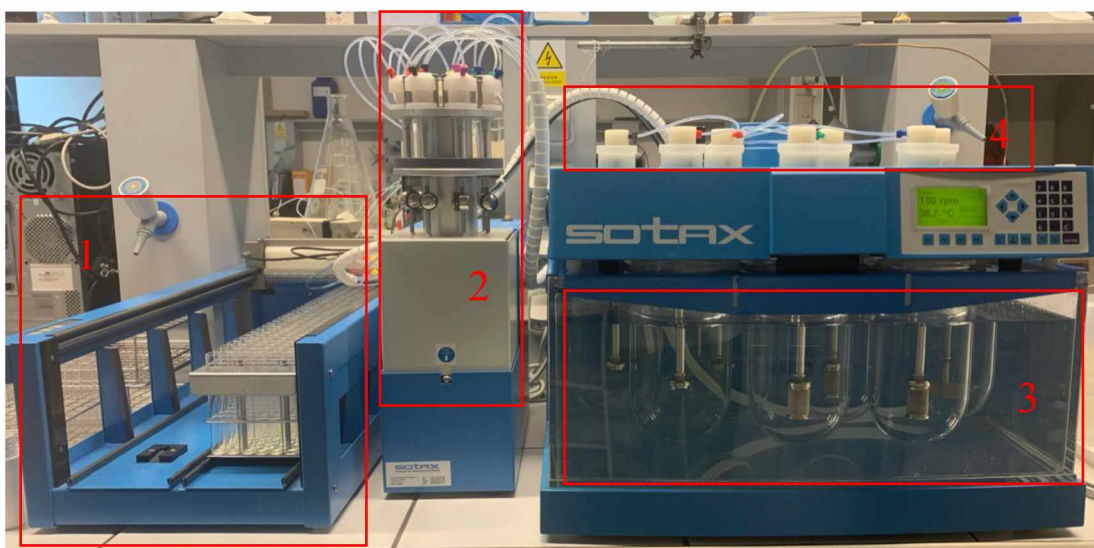
Dihydrogenfosforečnan draselný (0,2 mol/l): 54,4 g KH_2PO_4 bylo naváženo, kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 2000 ml a doplněno po rysku redestilovanou vodou.

Hydroxid sodný (0,2 mol/l): 8 g NaOH bylo naváženo, kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněno po rysku redestilovanou vodou.

Médium: Do dvoulitrové baňky bylo smícháno 500 ml 0,2 mol/l roztoku KH_2PO_4 , 224 ml 0,2 mol/l roztoku NaOH, zbylý objem byl doplněn po rysku redestilovanou vodou.

2.2.4.2 Průběh disolučního testu

Disoluční testy připravených tobolek byly provedeny v disoluční aparatuře SOTAX AT7 Smart, v uspořádání s košíčky (obrázek 18). Bylo realizováno celkem pět disolučních zkoušek s pěti formulacemi tobolek A – E. Průběh disoluční zkoušky byl v souladu s Českým lékopisem [1]. Disoluční zkouška každého typu tobolek byla provedena vždy se 6 tobočkami (obrázek 19) s modelovou účinnou látkou a jedním blankem (tobolka bez účinné látky). Disoluce probíhala po dobu 24 hodin.



Obrázek 18: Disoluční aparatura Sotax AT 7 Smart: (1) kolektor s čistými zkumavkami, (2) čerpadlo pro odebrání vzorků, (3) disoluční lázeň se sedmi žaludky, uspořádání s košíčky, (4) disoluční hlavice pro umístění filtrů.

Jak již bylo zmíněno, disoluční zkouška připravených enterických tobolek by měla simulovat průchod této lékové formy přirozeným prostředím GIT. Z tohoto důvodu byly tedy v rámci jedné zkoušky využity dva typy médií, a to kyselé o pH 1,2 (reprezentuje přední část GIT - žaludek) a fosforečnanové o pH 6,8 (napodobuje prostředí střev). Disoluce probíhala po dobu 2 hodin v kyselém médiu, poté bylo kyselé médium vyměněno za přehřáté fosforečnanové médium a test pokračoval dalších 22 hodin. Teplota disoluční lázně byla $37 \pm 0,5$ °C (teplota lidského těla), frekvence otáčení košíčků 50 rpm a objem disolučního média v každé nádobě byl 900 ml. Automatické odebrání vzorků probíhalo v přesně nastavených časových intervalech (tabulka 4). Objem odebraného disolučního média činil vždy 3 ml (do výpočtu uvolněného množství léčiva byla zahrnuta korekce na odebraný objem média).

Tabulka 4: Odběry vzorků během disolučního testu.

počet odběrů	druh disolučního média	časový interval [min]
2	kyselé	60
4	fosforečnanové	60
22	fosforečnanové	30
1	fosforečnanové	420



Obrázek 19: Připravené tobolky v košíčkách pro disoluční test.

2.2.4.3 Stanovení kofeinu metodou UV/VIS spektroskopie

Ze vzorků odebraných během disoluce bylo stanoveno množství uvolněné účinné látky (kofeinu) pomocí UV/VIS spektroskopie. K tomuto účelu byl využit UV/VIS spektrometr Agilent 8453 a křemenná kyveta ($l = 5 \text{ mm}$). U formulace A – D bylo celkem analyzováno 174 vzorků po provedení jednoho disolučního testu. U formulace E došlo k redukci počtu analyzovaných vzorků v důsledku rychlého uvolnění API. Měření probíhalo proti slepému vzorku (blanku) při vlnové délce 273 nm. Tato hodnota reprezentuje absorpční maximum kofeinu. Změřené absorbance byly podrobeny třibodové korekci pozadí v rozmezí vlnových délek 245 – 359 nm.

Ze získaných hodnot absorbance jednotlivých vzorků byl proveden přepočít na koncentraci uvolněné účinné látky (mg/l). Tato transformace změřených dat byla provedena prostřednictvím metody kalibrační křivky (1,2).

Rovnice kalibračních křivek byly získány ze závislosti změřených absorbancí roztoků na koncentraci kofeinu. Pro tento účel byla vytvořena tzv. kalibrační série roztoků s přesně známou koncentrací kofeinu. Kalibrační řada byla sestavena jednak pro disoluční médium o pH 1,2, tak pro médium o pH 6,8.

Rovnice kalibrační křivky pro disoluční médium pH 1,2:

$$A = -0,00122 \cdot c + 0,0191 \quad (1)$$

Rovnice kalibrační křivky pro disoluční médium pH 6,8:

$$A = 0,0000055 \cdot c + 0,019585 \quad (2)$$

kde: A = absorbance, c = koncentrace v [mg/l]

2.2.4.4 Vyhodnocení disolučních profilů

Po vyhodnocení prvního 24hodinového disolučního testu nebyly získány adekvátní výsledky pro sestavení disolučního profilu. Bylo zjištěno, že k uvolňování kofeinu dochází později oproti původním předpokladům a intervaly odběrů vzorků jsou tudíž zvoleny nevhodně, což vedlo k nedostatečnému zachycení procesu uvolňování účinné látky. Následně byla provedena optimalizace intervalů odběrů a poté byl zopakován disoluční test pro stejnou formulaci tobolek. Tento optimalizovaný postup byl poté aplikován na všechny typy připravených tobolek. Z hodnot uvolněného množství API v závislosti na čase byly získány disoluční profily, které byly následně vyhodnocovány pomocí tzv. „lag time“ t_{lag} (průměrný čas, kdy došlo k uvolnění 10 % kofeinu). K vyhodnocení byl použit program GraphPadPrism.

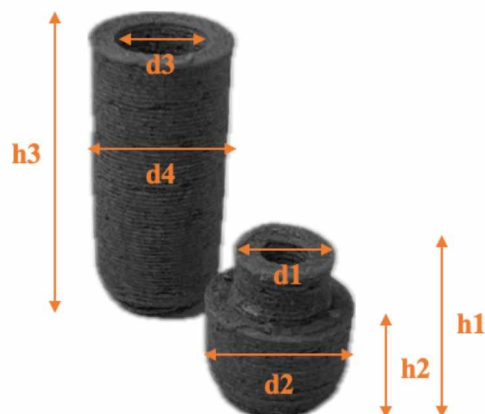
2.2.5 Rozměrová a hmotnostní analýza

Rozměrová analýza byla provedena s cílem posoudit reprodukovatelnost 3D tisku jednotlivých částí tobolek. K měření bylo využíváno digitální posuvné měřítko (obrázek 20).



Obrázek 20: Digitální posuvné měřítko pro rozměrovou analýzu.

U každé tobolky bylo měřeno vždy 7 rozměrů, které znázorňuje obrázek 21. Poté byly jednotlivé díly zváženy na analytických vahách. Výsledkem hmotnostní analýzy byla průměrná hmotnost těla a víčka vytištěných tobolek. Pro účely hmotnostní i rozměrové analýzy bylo hodnoceno 20 tobolek od každého typu (A – E).



Obrázek 21: Měřené rozměry tobolek pro rozměrovou analýzu

2.3 Výsledky a diskuze

2.3.1 Příprava vlákna metodou hot melt extruze

Bylo připraveno 5 druhů vláken (A – E) na bázi HPMC s přídavkem polysacharidů. Připravená vlákna jsou znázorněna na obrázku 22. Všechna vlákna (filamenty) vykazovala vysokou elasticitu (zejména formulace C), což je výhodné pro následné zavádění vlákna do 3D tiskárny. Vláknem formulace A obsahující AffinisolTM a citrusový pektin (10 %) mělo nejsvětlejší barvu. Vláknem formulace B obsahující 10 % alginátu sodného mělo ve srovnání s vláknem typu A tmavší barvu. Vlákna formulací C, D a E obsahovala navíc i plastifikátor (PEG). Tyto tři filamenty měly tmavší barvu. Zvláště vláknem C se vyznačovalo svým výrazným tmavě hnědým až černým odstínem. Tmavé zabarvení vláken C – E by mohlo být způsobeno přídavkem plastifikátoru (PEG), který má výrazně nižší teplotu tání ($\approx 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve srovnání s teplotou extruze ($130 - 155\text{ }^{\circ}\text{C}$) a během procesu extruze tak může docházet k jeho degradaci. Filament typu E obsahoval stejné složky jako vláknem typu C, nicméně s významným rozdílem v obsahu citrusového pektinu. Vláknem formulace E obsahovala dvojnásobné množství polysacharidu (20 %) ve srovnání s filamentem C. Vláknem typu E mělo světlejší odstín, nižší pružnost a vynikalo svojí hrubší strukturou ve srovnání s vláknem C. Průměry všech typů vláken se vzájemně lišily, což dokazuje tabulka 5. Průměr byl měřen v různých úsecích vlákna, které byly rovnoměrně rozloženy podél celé délky extrudovaného materiálu. Získané hodnoty průměru jsou výsledkem 15 provedených měření. Průměr vlákna je ovlivněn viskozitou extrudované taveniny.

Tabulka 5: Průměr vyextrudovaných vláken (formulace A – E).

Formulace	Průměr vlákna \pm SD [mm]
A	1,42 \pm 0,09
B	1,65 \pm 0,11
C	1,55 \pm 0,13
D	1,69 \pm 0,07
E	1,48 \pm 0,09

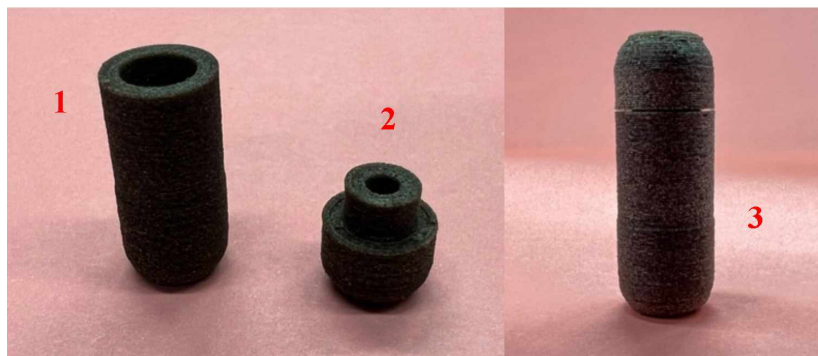


Obrázek 22: Přípravená vlákna (formulace A – E).

2.3.2 3D tisk tobolek

Metodou 3D tisku byly připraveny silnostěnné tobolky, které byly složeny z těla (spodní větší část, tzv. top) a víčka (vrchní část, tzv. bottom). Cílem bylo vyrobit 20 tobolek od každé formulace (A – E) a zároveň optimalizovat průběh tisku tak, aby jejich produkce probíhala bez komplikací a také aby mohly být snadno kompletovány pro následující disoluční testování. Na obrázku 23 jsou vyobrazeny jednotlivé části

tobolky (1,2) a jedna složená tobolka (3). Pro tisk byly využívány filaments, které byly extrudovány podle dříve popsaného postupu (kapitola 2.2.1).



Obrázek 23: Tobolka připravená metodou 3D tisku: (1) tělo tobolky, (2) víčko tobolky, (3) sestavená tobolka.

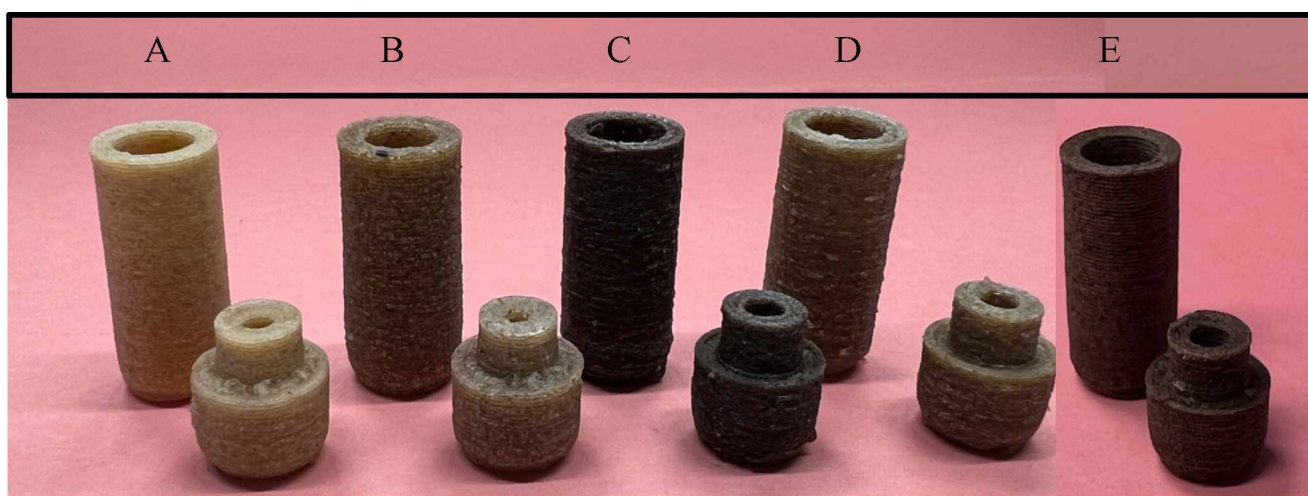
Pro výrobu 3D tištěné tobolky bylo nutné provést pečlivou přípravu filament, vypracovat její detailní digitální návrh a samozřejmě zajistit plynulý průběh samotného 3D tisku. Všechny aspekty byly klíčové pro dosažení optimální kvality tobolky a tyto jednotlivé kroky jsou podrobněji rozepsány v kapitolách 2.2.1, 2.2.2.1 a 2.2.2.2.

Jak je vidět na obrázku 24, tisk tobolky po zdařilé úpravě podmínek probíhal postupně po jednotlivých vrstvách, které přilnuly bez komplikací na sebe a formovaly se do požadované podoby.



Obrázek 24: Vrstevnatá struktura tobolky.

Kompletace tobolek (víčko – tělo) neprobíhala vždy jednoduše, a to kvůli různým rozměrům jednotlivých dílků (kapitola 2.3.4), což bylo pravděpodobně způsobeno nekonzistentním průměrem vyextrudovaného vlákna. Z tohoto důvodu byl uplatňován specifický postup tisku. Nejprve byla tištěna těla tobolek s konstantním průměrem a poté pokračoval tisk víček o určité velikosti, která byla volena tak, aby byly obě části rozměrově kompatibilní. Složené tobolky jednotlivých formulací (A – E) jsou znázorněny na obrázku 25. Tobolky obsahující alginát (formulace B a D) měly hrubší (drsnější) povrch ve srovnání s tobolkami obsahujícími pektin (formulace A, C a E).

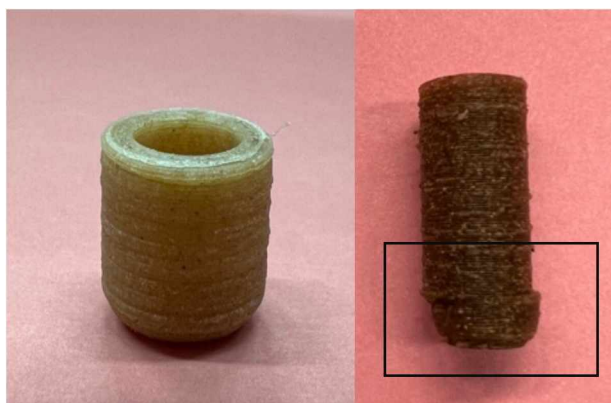


Obrázek 25: Tobolky všech připravených formulací (A – E).

2.3.2.1 Vzniklé defekty na tobolkách

Jak už bylo zmíněno, 3D tisk tobolky musel být optimalizován z důvodu tvorby celé řady defektů jak na těle tobolky, tak na víčku. V této kapitole budou diskutovány pouze defekty, které se při vývoji vhodného modelu a při tisku objevovaly opakovaně.

Velice častou chybou bylo přerušení výroby tobolky v jakékoliv fázi tisku. Tento jev nastal díky špatnému přilnutí následující vrstvy na vrstvu již vytištěnou (vlevo na obrázku 26). Tento defekt byl často přisuzován nízké teplotě trysky 3D tiskárny, nebo zablokování filamentu uvnitř přístroje. U tobolky na pravé části obrázku 26 sice došlo k přilnutí další vrstvy materiálu, ale zároveň také nastalo její posunutí. Tímto způsobem byla tedy vytištěna deformovaná tobolka.

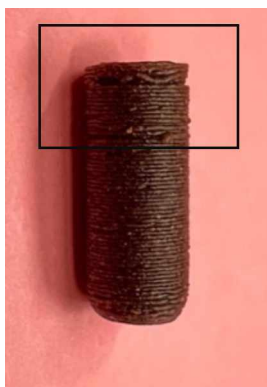


Obrázek 26: Grafické znázornění vzniklých defektů při tisku těl tobolek: vlevo nedotisknuté, vpravo zdeformované.

Zásadním parametrem pro plynulý tisk tobolek byl konstantní průměr použitého filamentu. Tento požadavek bohužel pro naše extrudovaná vlákna nebyl často splněn, což se také projevilo různými defekty na vytištěných tobolkách. V prvním případě na obrázku 27 došlo k vytvoření nepravidelných útvarů na povrchu jednotlivých víček. Na levé straně obrázku 27 je vidět extrémní případ této poruchy, zatímco na pravé straně lze pozorovat rozdíl mezi vadným a bezchybným víčkem. V důsledku této struktury, která postrádá hladký povrch, vznikly komplikace při kompletování jednotlivých dílků do výsledné tobolky. V některých případech byly narušeny jednotlivé vrstvy tištěných objektů oproti danému modelu a vznikla tudíž tobolka s nerovným povrchem a bez rovnoběžných vrstev, jak je vidět na obrázku 28. Tyto problémy byly často vyřešeny tím, že byl v softwaru tiskárny upraven tzv. násobič extruze.

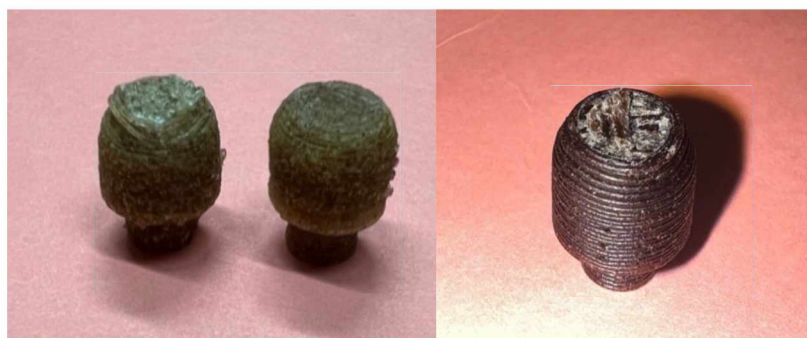


Obrázek 27: Zdeformovaná víčka tobolek.



Obrázek 28: Tělo tobolky s chybně natištěnými vrstvami materiálu.

Dalším, ale méně významným problémem bylo poškození první vrstvy vytvořeného 3D dílku. V levé části obrázku 29 je patrný rozdíl mezi deformovaným a správně vytištěným víčkem. V tomto případě došlo ke zkroucení a následně ke špatnému přilnutí první vrstvy této části tobolky k podložce 3D tiskárny. V pravé části obrázku 29 došlo naopak k velmi dobrému přichycení první vrstvy objektu na podložku, které ale následovalo jeho velmi těžkým sejmutím spojeným s porušením této spodní vrstvy.



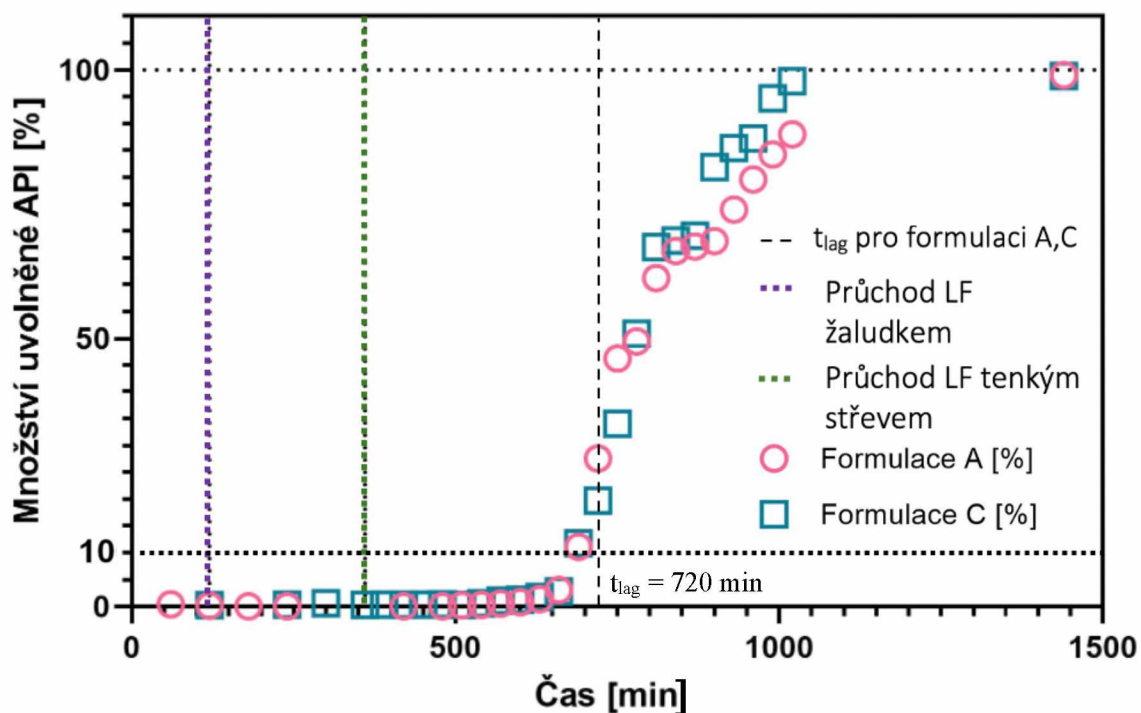
Obrázek 29: Víčka tobolky s deformovanou první vrstvou.

2.3.3 Disoluční testy

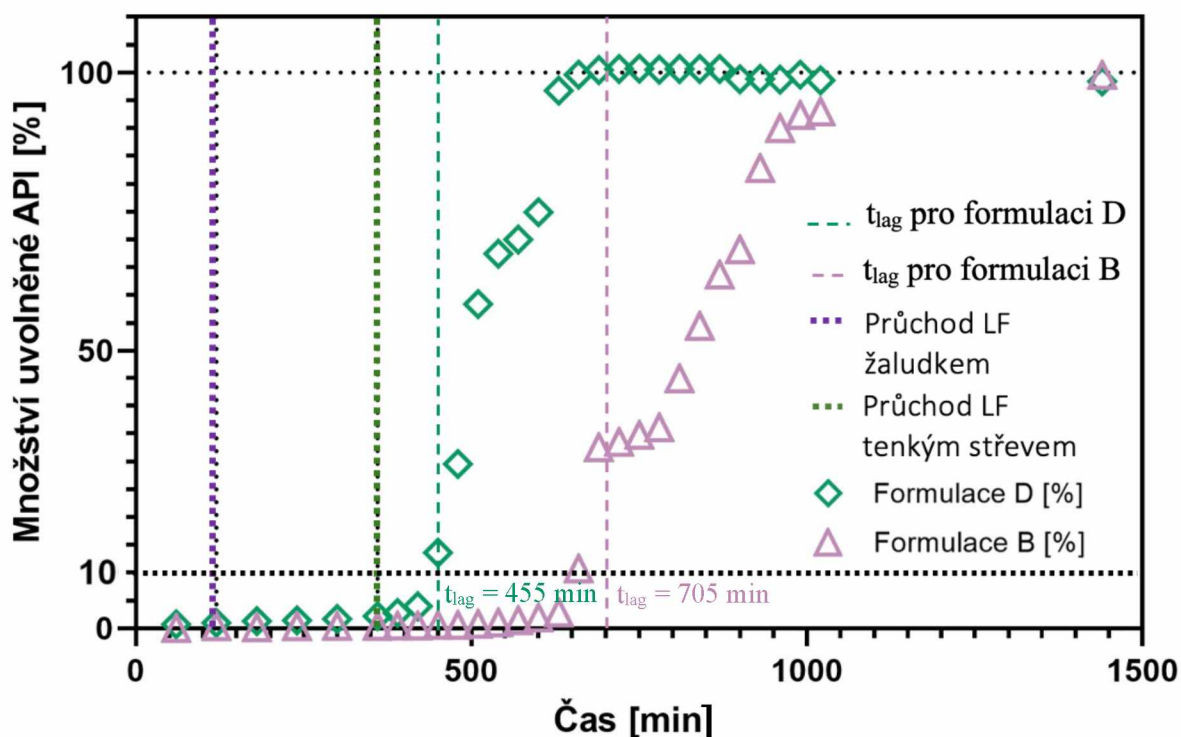
Cílem disolučního testování bylo potvrdit acidorezistenci připravených tobolek a stanovit tzv. „lag time“ t_{lag} . „Lag time“ udává časový interval od počátku disoluce, během kterého se neuvolní více než 10 % účinné látky (Český lékopis toleruje nežádoucí difúzi API do 10 % jejího obsahu v tobolce [1]). V tomto případě by měl „lag time“ trvat minimálně 6 hodin, což je doba, která je potřebná k průchodu tobolky žaludkem a tenkým střevem [8]. Připravované enterické tobolky byly navrženy tak, aby odolaly kyselému prostředí žaludku (2 hodiny v disolučním médiu pH 1,2)

a prostředí tenkého střeva (4 hodiny v disolučním médiu s pH 6,8). Tato stabilita tobolek byla docílena přidáním biopolymerů do fyzikální směsi pro přípravu filament.

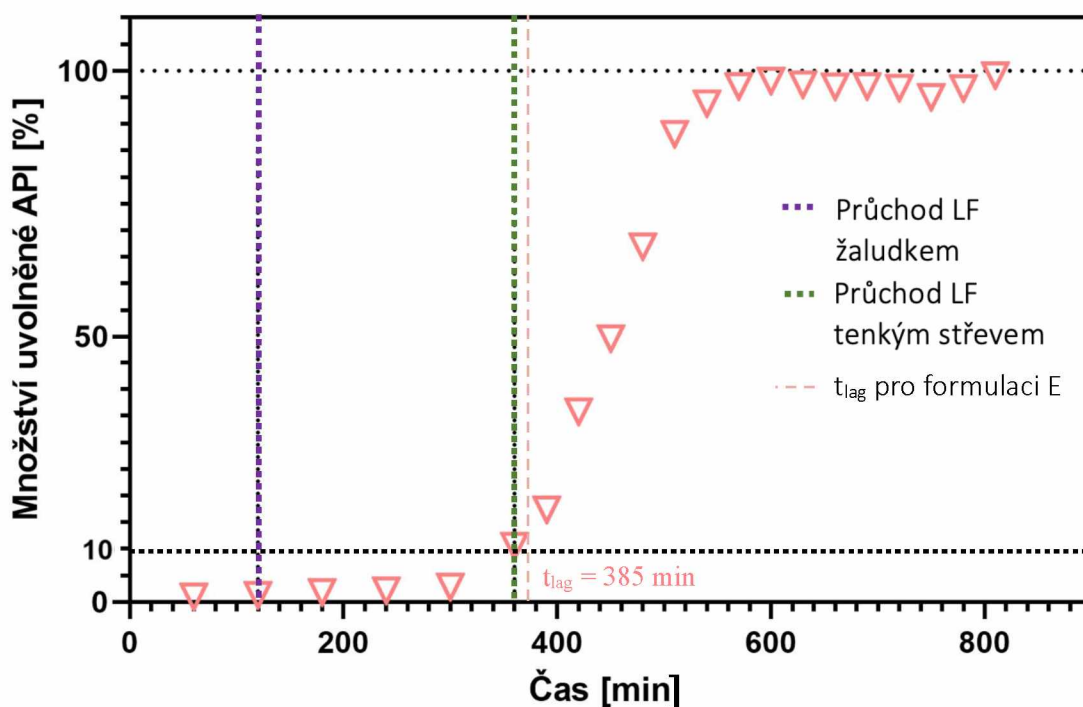
Průběh disolučních testů se zvýrazněním klíčových bodů disoluční zkoušky je znázorněn na obr. 30 – 32. První graf (obr. 30) prezentuje disoluční profily formulací A a C, tedy tobolky na bázi hypromelózy (Affinisol™) s přidavkem 10 % alginátu sodného (A) a tobolky obsahující 10 % alginátu sodného a 5 % PEG (C). Druhý graf (obr. 31) naopak zobrazuje profily formulací B a D, které ve svých strukturách obsahují hypromelózu, citrusový pektin a popřípadě také PEG. Obrázek 32 znázorňuje disoluční profil formulace E, tedy tobolek obsahujících 20 % citrusového pektinu a 5 % PEG. Horní horizontální přerušovaná čára v přiložených grafech zvýrazňuje maximální množství API, které se může z dané tobolky uvolnit, tj. 100 %. Dolní horizontální čára naopak 10 % uvolněné API, která souvisí s hodnotou t_{lag} . První vertikální čára vymezuje 2 hod disoluce v kyselém žaludečním médiu o pH 1,2, druhá vertikální čára ohraničuje 4 hod disoluce ve fosforečnanovém médiu pH 6,8, resp. časový úsek, který odpovídá průměrné době průchodu lékové formy tenkým střevem. U disolučního profilu tobolek s obsahem 20 % citrusového pektinu (obr. 32) bylo analyzováno jen omezené množství odebraných vzorků vzhledem k rychlému uvolnění API a vykreslení „plata“ v příslušném disolučním profilu. Z důvodu lepší přehlednosti nejsou u jednotlivých disolučních profilů znázorněny rozptylové úsečky, které naznačovaly vysokou míru variability mezi jednotlivými tobočkami způsobenou pravděpodobně jejich bobtnáním během testování.



Obrázek 30: Disoluční profil pro tobolky formulace A a C.



Obrázek 31: Disoluční profil pro tobolky formulace B a D.



Obrázek 32: Disoluční profil pro tobolky formulace E.

U všech testovaných tobolek byl získán charakteristický esovitý průběh disolučního profilu. U žádného testovaného typu tobolek nedocházelo k uvolňování API v kyselém prostředí, což potvrzuje acidorezistenci tobolek po dobu 2 hod a schopnost uvolňování API do střevního prostředí. Po změně pH na hodnotu 6,8 nebyl na počátku pozorován žádný uvolněný kofein, avšak po uplynutí specifického času, který se lišil podle typu formulace, docházelo k jeho postupnému uvolňování. Časový interval, po který uvolněné množství kofeinu nepřesáhlo 10 %, byl vyhodnocen jako tzv. „lag time“. Hodnoty t_{lag} pro testované tobolky vyjádřené pomocí průměru a směrodatné odchylky (mean \pm SD) jsou shrnuty v tabulce 6. Český lékopis [1] toleruje pro enterické tobolky maximální uvolnění v kyselém prostředí 10 % API (do 2 hod), což může zahrnovat například narušení povrchu tobolky spojené s difuzí účinné látky. Směrnice disolučního profilu a doba, po kterou docházelo k uvolňování účinné látky, se u jednotlivých typů tobolek liší, což koreluje s jejich stabilitou s ohledem na změnu pH. Všechny disoluční profily limitují po 24 hod k hodnotě 100 %, což indikuje úplné rozpuštění testovaných tobolek a uvolnění modelového léčiva.

Tabulka 6: „Lag time“ u testovaných formulací A – E

Formulace	t_{lag} [min]
A	720 ± 63
B	705 ± 91
C	720 ± 54
D	455 ± 48
E	385 ± 23

Zjištěný „lag time“ se u jednotlivých formulací odlišoval, což bylo způsobeno unikátním složením daného souboru tobolek. Hodnoty t_{lag} u formulací A a C byly velmi vysoké, ale také shodné, což naznačuje, že přídavek plastifikátoru (PEG) do formulace C neměl žádný vliv na jeho délku. Vysoká hodnota tohoto parametru může značit možný problém, neboť tyto formulace nemusí být schopné v podmínkách *in vivo* dostatečně rychle uvolňovat API v oblasti kolonu. Nicméně, působením surfaktantů a různých druhů enzymů, které jsou běžnou součástí organismu, může dojít k jeho zkrácení. U formulace E se „lag time“ výrazně snížil, což bylo pravděpodobně způsobeno zvýšením podílu citrusového pektinu na 20 %. U tobolek ze série B a D byl tento časový interval rozdílný, přičemž u D došlo k výraznému zkrácení, a to o 250 minut. Tento efekt byl pravděpodobně způsoben přídavkem PEGu do jejich složení. Zpoždění uvolňování účinné látky u formulací obsahující alginát sodný (B a D) bylo méně výrazné než u tobolek s citrusovým pektinem.

Nicméně, všechny testované formulace splňují podmínku pro enterické tobolky, jakou udává Český lékopis, tj. uvolnění maximálně 10 % API po dobu 2 hod v kyselém médiu a následně (do 45 minut) se nesmí uvolnit v disolučním médiu o pH 6,8 více než 80 % API [1].

2.3.4 Rozměrová a hmotnostní analýza

Rozměrová analýza byla provedena s cílem posoudit reprodukovatelnost 3D tisku jednotlivých částí tobolek. U tobolek bylo měřeno vždy 7 rozměrů (viz kap. 2.2.5). Po zaznamenání těchto rozměrů u 20 tobolek od každé formulace (A – E) (viz tabulky 8 – 17 v Příloze) byla provedena analýza statistických charakteristik, která zahrnovala výpočet průměru daného rozměru tobolek, směrodatné odchylky, minimální a maximální hodnoty a mediánu (souhrnná tabulka 7). Hodnocení těchto statistických ukazatelů bylo realizováno individuálně pro každý soubor tobolek.

Tabulka 7: Shmutí vyhodnocených statistických charakteristik u formulace (A – E)

FORMULACE	ROZMĚR	PRŮMĚR	SMĚR.ODCHYLKA	MINIMUM	MEDIÁN	MAXIMUM
a	d ₁ [mm]	5,60	0,17	5,31	5,56	6,00
	d ₂ [mm]	9,07	0,38	7,71	9,11	9,51
	h ₁ [mm]	10,01	0,10	9,75	10,03	10,15
	h ₂ [mm]	6,74	0,14	6,52	6,72	7,00
	m [g]	0,4746	0,0414	0,4101	0,4799	0,5422
A	d ₃ [mm]	5,60	0,12	5,39	5,62	5,76
	d ₄ [mm]	9,19	0,14	8,97	9,19	9,49
	h ₃ [mm]	18,83	0,07	18,73	18,83	18,96
	m [g]	0,7909	0,0709	0,6848	0,7765	0,9235
b	d ₁ [mm]	5,53	0,19	5,29	5,47	5,85
	d ₂ [mm]	9,27	0,16	8,93	9,24	9,58
	h ₁ [mm]	9,94	0,10	9,69	9,96	10,12
	h ₂ [mm]	6,92	0,16	6,51	6,94	7,27
	m [g]	0,5171	0,0329	0,4222	0,5214	0,5781
B	d ₃ [mm]	5,51	0,17	5,25	5,49	5,79
	d ₄ [mm]	9,26	0,12	9,07	9,25	9,43
	h ₃ [mm]	18,86	0,06	18,71	18,88	18,95
	m [g]	0,8937	0,0637	0,7706	0,8969	0,9731
c	d ₁ [mm]	5,17	0,09	5,06	5,15	5,33
	d ₂ [mm]	8,96	0,06	8,84	8,97	9,11
	h ₁ [mm]	9,80	0,04	9,67	9,80	9,84
	h ₂ [mm]	6,80	0,06	6,66	6,81	6,90
	m [g]	0,4611	0,0048	0,4490	0,4625	0,4665
C	d ₃ [mm]	5,23	0,11	5,11	5,21	5,45
	d ₄ [mm]	9,22	0,07	9,07	9,24	9,32
	h ₃ [mm]	18,91	0,05	18,79	18,91	19,00
	m [g]	0,9283	0,0293	0,8689	0,9341	0,9725
d	d ₁ [mm]	5,80	0,17	5,56	5,84	6,02
	d ₂ [mm]	9,14	0,12	8,97	9,08	9,40
	h ₁ [mm]	10,15	0,10	10,03	10,11	10,31
	h ₂ [mm]	6,63	0,06	6,52	6,64	6,76
	m [g]	0,4519	0,0471	0,40	0,43	0,54
D	d ₃ [mm]	5,94	0,07	5,81	5,93	6,09
	d ₄ [mm]	9,19	0,08	9,09	9,21	9,31
	h ₃ [mm]	18,95	0,16	18,45	18,98	19,16
	m [g]	0,7664	0,0678	0,6585	0,7736	0,8791
e	d ₁ [mm]	5,74	0,09	5,53	5,75	5,85
	d ₂ [mm]	8,79	0,04	8,73	8,79	8,87
	h ₁ [mm]	9,89	0,05	9,79	9,89	10,01
	h ₂ [mm]	6,76	0,08	6,57	6,76	6,88
	m [g]	0,3762	0,0146	0,3428	0,3770	0,3984
E	d ₃ [mm]	5,83	0,07	5,72	5,82	5,98
	d ₄ [mm]	8,92	0,11	8,81	8,89	9,21
	h ₃ [mm]	18,87	0,06	18,76	18,88	18,95
	m [g]	0,6341	0,0272	0,5909	0,6398	0,6810

Pozn.: označení pro víčko: malé písmeno (např. a), označení pro tělo: velké písmeno (např.

A)

Medián reprezentuje střední hodnotu nacházející se uprostřed distribuce jednoho rozměru tobolky. Směrodatná odchylka, jako ukazatel variability dat, byla spočítána pomocí funkce STDEVA(). Tato základní statistická analýza byla provedena v programu Microsoft Excel.

Z rozměrové analýzy bylo zjištěno, že všechny dílky nedisponují konzistentními velikostmi, ale ani hmotnostmi (viz příložené tabulky v Příloze). Odchylky se nevyskytovaly pouze mezi tobolkami stejné formulace, ale rozdíly byly pozorovatelné i mezi různými formulacemi, přestože pro 3D tisk byly zvoleny vždy stejné podmínky pro všechny druhy filamentů. Významná variabilita rozměrů byla rozložena náhodně, žádný z dílků neměl výraznější odchylku. Získané výsledky neposkytují jasný důkaz, že by rozdíly v rozměrech souvisely s konkrétním složením materiálu. Pravděpodobně jsou tyto rozdílné rozměrové vlastnosti tobolek zapříčiněny fluktuacemi v průměrech vyextrudovaných filamentů.

U formulace A byla sledována vyšší směrodatná odchylka v rozměru d_2 u víček, zatímco u formulace C a E byla zaznamenána vysoká míra reprodukovatelnosti těchto dílků.

Významným potvrzením vyplývajícím z těchto výsledků je obtížná kompletace jednotlivých dílků do finální podoby tobolky. Dochází ke změnám velikosti užší části víčka, která se zasouvá do stále se měnícího průměru těla.

Jelikož žádný limit pro posouzení rozměrové variability vytištěných tobolek Český lékopis [1] neuvádí, bylo by v rámci dalšího výzkumu a zpracování dat z rozměrové a hmotnostní analýzy vhodné posoudit získaná data např. v kontextu s požadavky na hmotnostní stejnosměrnost uvedené v Českém lékopise [1].

Závěr

Cílem této diplomové práce bylo připravit a otestovat pět typů polysacharidových tobolek určených pro směřování léčiva do oblasti střeva. Pro přípravu tobolek byly použity dvě metody, konkrétně hot melt extruze (HME) a FDM 3D tisk. Tobolky byly navrženy tak, aby ve svých strukturách obsahovaly biopolymerní materiály degradovatelné střevními bakteriemi. Základem tobolek byl polosyntetický polymer hypromelóza, který se vyznačuje dobrými gelotvornými vlastnostmi (Affinisol™). Tobolky dále obsahovaly různé procentuální zastoupení biopolymeru (alginát sodný, citrusový pektin) a u vybraných filament byl testován také přídavek plastifikátoru (PEG). Klíčovým krokem přípravy byla extruze filament metodou HME. Připravená vlákna byla použita pro přípravu tobolek pomocí FDM 3D tisku.

Na tobolekách byla nejprve provedena rozměrová a hmotnostní analýza, která odhalila náhodné rozložení variability mezi jednotlivými dílky. Tato různorodost působila obtíže při sestavování těl a víček do finální podoby tobolky. Rozdíly v hmotnosti i v rozměrech nebyly výrazné a byly pravděpodobně zapříčiněny kolísáním průměru extrudovaných vláken.

V další fázi experimentu byly tobolky podrobeny 24hodinovým disolučním testům. Veškeré postupy byly provedeny v souladu s Českým lékopisem [1]. Disoluční zkoušky probíhaly při teplotě $37 \pm 0,5$ °C a ve dvou disolučních médiích simulujících přirozené prostředí v těle. Pro první dvě hodiny disolučního testování bylo využito disolučního média o pH 1,2, odpovídajícího podmínkám v žaludku, zatímco po zbytek disoluční zkoušky byly tobolky testovány v médiu o pH 6,8, simulující prostředí střev. Ze získaných disolučních dat byly sestrojeny disoluční profily v programu GraphPad Prism, které byly následně podrobně analyzovány.

Rychlost uvolňování modelové účinné látky, v tomto případě kofeinu, souvisela se složením jednotlivých formulací. Všechny připravené tobolky splnily podmínku acidorezistence po dobu 2 hodin. Ve fosforečnanovém médiu se objevila variabilita v odolnosti jednotlivých typů tobolek. Nejdelsí „lag time“ vykazovaly tobolky ze série A a C, jejichž složení zahrnovalo hypromelózu (90/85 %), citrusový pektin (10 %) a popřípadě PEG (0/5 %). U těchto tobolek se kofein začal uvolňovat po více než 12 hodinách testu („lag time“). Naopak nejméně stabilní byla formulace E, což bylo pravděpodobně způsobeno zvýšením podílu citrusového pektinu v jejich složení na 20 %. Při hodnocení tobolek obsahujících polysacharidy je však důležité

vzít v úvahu nepatrně odlišné vlastnosti mezi jednotlivými šaržemi těchto biomateriálů, které jsou způsobeny jejich izolací z přírodních zdrojů, a také možný vliv enzymů na jejich stabilitu v *in vivo* podmínkách.

Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že použité biopolymerní materiály mají potenciál pro výrobu tobolek s cíleným uvolňováním účinných látek do střevního prostředí. Navíc je možné uvažovat o těchto tobolkách jako o novém přístupu v oblasti fekální mikrobiální transplantace.

Použitá literatura

1. Ministerstvo zdravotnictví České republiky. Český lékopis 2023. *Praha: Grada Publishing a.s.* **2023**. ISBN: 978-80-271-5059-5.
2. Barbosa, J. A.; Al-Kauraishi, M. M.; Smith, A. M.; Conway, B. R.; Merchant, H. A. Achieving gastroresistance without coating: Formulation of capsule shells from enteric polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2019**, 144, 174-179.
3. Franc, A.; Vetchý, D.; Fülöpová, N. Commercially available enteric empty hard capsules, production technology and application. *Pharmaceutics* **2022**, 15(11), 1398.
4. Fülöpová, N.; Pavloková, S.; DeBono, I.; Vetchý, D.; Franc, A. Development and comparison of various coated hard capsules suitable for enteric administration to small patient cohorts. *Pharmaceutics* **2022**, 14(8), 1577.
5. Cole, E. T.; Scott, R. A.; Connor, A. L.; Wilding, I. R.; Petereit, H. U.; Schminke, C.; Cadé, D. Enteric coated HPMC capsules designed to achieve intestinal targeting. *International journal of pharmaceutics* **2002**, 231(1), 83-95.
6. Nober, C.; Manini, G.; Carlier, E.; Raquez, J. M.; Benali, S.; Dubois, P.; Goole, J. Feasibility study into the potential use of fused-deposition modeling to manufacture 3D-printed enteric capsules in compounding pharmacies. *International journal of pharmaceutics* **2019**, 569, 118581.
7. Maderuelo, C.; Lanao, J. M.; Zarzuelo, A. Enteric coating of oral solid dosage forms as a tool to improve drug bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2019**, 138, 105019.
8. Dvořáčková, K.; Franc, A.; Kejdušová, M. Směrování léčiv do tlustého střeva. *Chemické listy* **2013**, 107(7), 522-529.
9. Janovská, L.; Vetchý, D.; Rabišková, M. Nové systémy pro targeting léčiv do tlustého střeva. *Čes. Slov. Farm.* **2006**, 55, 203-209.
10. Lautenschläger, C.; Schmidt, C.; Fischer, D.; Stallmach, A. Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. *Advanced drug delivery reviews* **2014**, 71, 58-76.
11. Kaito, S.; Toya, T.; Yoshifuji, K.; Kurosawa, S.; Inamoto, K.; Takeshita, K.; Suda, W.; Kakihana, K.; Honda, K.; Hattori, M.; et al. Fecal Microbiota Transplantation with Frozen Capsules for a Patient with Refractory Acute Gut Graft-versus-Host Disease. *Blood Adv.* **2018**, 2, 3097–3101.

12. Ramai, D.; Zakhia, K.; Fields, P.J.; Ofosu, A.; Patel, G.; Shahnazarian, V.; Lai, J.K.; Dhaliwal, A.; Reddy, M.; Chang, S. Fecal Microbiota Transplantation (FMT) with Colonoscopy Is Superior to Enema and Nasogastric Tube While Comparable to Capsule for the Treatment of Recurrent *Clostridioides Difficile* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dig. Dis. Sci.* **2021**, *66*, 369–380.
13. Prasanth, V. V.; Mathew, S. T. Colon specific drug delivery systems: a review on various pharmaceutical approaches. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2012**, 163-169.
14. Rump, A.; Kromrey, M. L.; Scheuch, E.; Jannin, V.; Rehenbrock, L.; Tzvetkov, M. V.; Grimm, M. In Vivo Evaluation of a Gastro-Resistant HPMC-Based “Next Generation Enteric” Capsule. *Pharmaceutics* **2022**, *14*(10), 1999.
15. Al-Tabakha, M. M.; Arida, A. I.; Fafelelbom, K. M.; Sadek, B.; Jarad, R. A. A. Performances of new generation of delayed release capsules. *Journal of Young pharmaceutics* **2015**, *7*(1), 36.
16. Fu, M.; Al-Gousous, J.; Blechar, J. A.; Langguth, P. Enteric hard capsules for targeting the small intestine: Positive correlation between in vitro disintegration and dissolution times. *Pharmaceutics* **2020**, *12*(2), 123.
17. Mehuys, E.; Remon, J. P.; Vervaet, C. Production of enteric capsules by means of hot-melt extrusion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *24*(2-3), 207-212.
18. Okwuosa, T. C.; Soares, C.; Gollwitzer, V.; Habashy, R.; Timmins, P.; Alhnan, M. A. On demand manufacturing of patient-specific liquid capsules via co-ordinated 3D printing and liquid dispensing. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, *118*, 134-143.
19. Zhang, J.; Xu, P.; Vo, A. Q.; Bandari, S.; Yang, F.; Durig, T.; Repka, M. A. Development and evaluation of pharmaceutical 3D printability for hot melt extruded cellulose-based filaments. *Journal of drug delivery science and technology* **2019**, *52*, 292-302.
20. Pereira, G. G.; Figueiredo, S.; Fernandes, A. I.; Pinto, J. F. Polymer selection for hot-melt extrusion coupled to fused deposition modelling in pharmaceuticals. *Pharmaceutics* **2020**, *12*(9), 795.
21. Patil, H.; Tiwari, R. V.; Repka, M. A. Hot-melt extrusion: from theory to application in pharmaceutical formulation. *Aaps Pharmscitech* **2016**, *17*, 20-42.

22. Tambe, S.; Jain, D.; Agarwal, Y.; Amin, P. Hot-melt extrusion: Highlighting recent advances in pharmaceutical applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2021**, 63, 102452.
23. Rams-Baron, M.; Jachowicz, R.; Boldyreva, E.; Zhou, D.; Jamroz, W.; Paluch, M.; Paluch, M. Why Amorphous Drugs? (pp. 1-7). *Springer International Publishing* **2018**. ISBN: 978-3-319-72002-9.
24. Crowley, M. M.; Zhang, F.; Repka, M. A.; Thumma, S.; Upadhye, S. B.; Kumar Battu, S.; Martin, C. Pharmaceutical applications of hot-melt extrusion: part I. *Drug development and industrial pharmacy* **2007**, 33(9), 909-926.
25. Repka, M. A.; Gerding, T. G.; Repka, S. L.; McGinity, J. W. Influence of plasticizers and drugs on the physical-mechanical properties of hydroxypropylcellulose films prepared by hot melt extrusion. *Drug development and industrial pharmacy* **1999**, 25(5), 625-633.
26. De Brabander, C.; Van den Mooter, G.; Vervaet, C.; Remon, J. P. Characterization of ibuprofen as a nontraditional plasticizer of ethyl cellulose. *Journal of pharmaceutical sciences* **2002**, 91(7), 1678-1685.
27. Wesholowski, J.; Berghaus, A.; Thommes, M. Inline determination of residence time distribution in hot-melt-extrusion. *Pharmaceutics* **2018**, 10(2), 49.
28. Sedlak, J.; Joska, Z.; Hrbáčková, L.; Juříčková, E.; Hrušecká, D.; Horák, O. Determination of mechanical properties of plastic components made by 3D printing. *Manufacturing technology* **2022**, 22(6), 733-746.
29. Oviedo, A. M.; Puente, A. H.; Bernal, C.; Pérez, E. Mechanical evaluation of polymeric filaments and their corresponding 3D printed samples. *Polymer Testing* **2020**, 88, 106561.
30. Than, Y. M.; Suriyarak, S.; Titapiwatanakun, V. Rheological investigation of hydroxypropyl cellulose-based filaments for material extrusion 3D printing. *Polymers* **2022**, 14(6), 1108.
31. Ponsar, H.; Wiedey, R.; & Quodbach, J. Hot-melt extrusion process fluctuations and their impact on critical quality attributes of filaments and 3D-printed dosage forms. *Pharmaceutics* **2020**, 12(6), 511.
32. Agbakoba, V. C.; Webb, N.; Jegede, E.; Phillips, R.; Hlangothi, S. P.; John, M. J. Mechanical Recycling of Waste PLA Generated From 3D Printing Activities: Filament Production and Thermomechanical Analysis. *Macromolecular Materials and Engineering* **2023**, 2300276.

33. Elbl, J.; Muselík, J.; Franc, A. Využití 3D tisku při přípravě a výrobě léků. *Chemické listy* **2019**, 113(5), 301-306.
34. Chen, G.; Xu, Y.; Kwok, P. C. L.; Kang, L. Pharmaceutical applications of 3D printing. *Additive Manufacturing* **2020**, 34, 101209.
35. Prusa Research a.s.. Příručka 3D tiskaře. Uživatelský manuál 3D tiskáren: Original Prusa i3 MK3S+ KIT a Original Prusa i3 MK3S+. [CrossRef]
36. Dvořáčková, K.; Bautzová, T.; Rabišková, M. Disoluční studie v hodnocení perorálních léků s řízeným uvolňováním léčiva. *Chemické listy* **2011**, 105, 50-54.
37. Vetchý, D.; Kopecká, M.; Vetchá, M.; Franc, A. Modely in vitro–in vivo ve vývoji léčiv. *Chemické listy* **2014**, 108(1), 32-39.
38. Muselík, J.; Komersová, A.; Lochař, V.; Kubová, K. Regresní analýza disolučního profilu léčiva a odhad mechanismu uvolňování léčiva. *Chemické listy* **2019**, 113(5), 328-336.
39. Muselík, J.; Komersová, A.; Kubová, K.; Matzick, K.; Skalická, B. A critical overview of FDA and EMA statistical methods to compare in vitro drug dissolution profiles of pharmaceutical products. *Pharmaceutics* **2021**, 13(10), 1703.
40. Vetchý, D. Stabilitní testy ve farmacii. *Prakt. lékáren.* **2006**, 2(6), 276-277.
41. Popović, K.; Živanović, S.; Jevtić, I. Biopolymer Packaging Materials in the Pharmaceutical Industry. *AIDASCO Reviews* **2024**, 2(1), 46-56.
42. Udayakumar, G. P.; Muthusamy, S.; Selvaganesh, B.; Sivarajasekar, N.; Rambabu, K.; Banat, F.; Show, P. L. Biopolymers and composites: Properties, characterization and their applications in food, medical and pharmaceutical industries. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2021**, 9(4), 105322.
43. Ogaji, I. J.; Nep, E. I.; Audu-Peter, J. D. Advances in natural polymers as pharmaceutical excipients. *Pharmaceutica Analytica Acta* **2012**, 3(1), 1-16.
44. Abdelhak, M. J. A review: Application of biopolymers in the pharmaceutical formulation. *J. Adv. Bio-Pharm. Pharmacovigil* **2019**, 1(1), 15-25.
45. Rabišková, M.; Fričková, V. Perorální formy s řízeným uvolňováním léčiv. *Praktické lékárenství* **2008**, 4(4), 186-190.
46. Wu, J.; Zhang, Z.; Zhou, W.; Liang, X.; Zhou, G.; Han, C. C.; Liu, Y. Mechanism of a long-term controlled drug release system based on simple blended electrospun fibers. *Journal of Controlled Release* **2020**, 320, 337-346.
47. Lee, J. H.; Yeo, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical engineering science* **2015**, 125, 75-84.

48. Shen, S. I.; Jasti, B. R.; Li, X. Design of controlled release drug delivery systems. *Standard Handbook of Biomedical Engineering & Design* **2003**, 1, 161-179.
49. Manish, G.; Vimukta, S. Targeted drug delivery system: a review. *Res J Chem Sci* **2011**, 1(2), 135-138.
50. Devarajan, P. V.; Jain, S. Targeted Drug Delivery: Concepts and Design. *Springer Cham* **2015**, ISBN: 978-3-319-11354-8.
51. Liu, D.; Yang, F.; Xiong, F.; Gu, N. The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics* **2016**, 6(9), 1306.
52. Hasnain, M. S.; Nayak, A. K. Natural polysaccharides in drug delivery and biomedical applications. *Academic Press* **2019**, ISBN: 978-0-12-817055-7.
53. Mou, X.; Ali, Z.; Li, S.; He, N. Applications of magnetic nanoparticles in targeted drug delivery system. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **2015**, 15(1), 54-62.
54. Kazi, K. M.; Mandal, A. S.; Biswas, N.; Guha, A.; Chatterjee, S.; Behera, M.; Kuotsu, K. Niosome: a future of targeted drug delivery systems. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* **2010**, 1(4), 374-380.
55. Holden, G. Thermoplastic elastomers. In Applied Plastics Engineering Handbook. *William Andrew Publishing*. **2024**, 97-113, ISBN: 978-0-323-88667-3.
56. Strassburg, S.; Mayer, K.; Scheibel, T. Functionalization of biopolymer fibers with magnetic nanoparticles. *Physical Sciences Reviews* **2022**, 7(10), 1091-1117.
57. Lupuleasa, D.; Drăgănescu, D.; Hincu, L.; Tudosă, C. P.; Cioacă, D. Biocompatible polymers for 3D printing. *Farmacia* **2018**, 66(5).
58. Yu, Y.; Shen, M.; Song, Q.; Xie, J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydrate polymers* **2018**, 183, 91-101.
59. Basha, S. K.; Muzammil, M. S.; Dhandayuthabani, R.; Kumari, V. S. Polysaccharides as excipient in drug delivery system. *Materials Today: Proceedings* **2021**, 36, 280-289.
60. Mohammed, A. S. A.; Naveed, M.; Jost, N. Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (a review of current applications and upcoming potentialities). *Journal of Polymers and the Environment* **2021**, 29, 2359-2371.

61. Shi, L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International journal of biological macromolecules* **2016**, 92, 37-48.
62. Jani, G. K.; Shah, D. P.; Prajapati, V. D.; Jain, V. C. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. *Asian J Pharm Sci* **2009**, 4(5), 309-323.
63. Muchlisyam, J. S.; Harahap, U. Hemicellulose: isolation and its application in pharmacy. *Handbook of sustainable polymers: Processing and applications* **2016**, 305-339.
64. Liu, J.; Zhang, L.; Hu, W.; Tian, R.; Teng, Y.; Wang, C. Preparation of konjac glucomannan-based pulsatile capsule for colonic drug delivery system and its evaluation in vitro and in vivo. *Carbohydrate polymers* **2012**, 87(1), 377-382.
65. Chen, Y.; Zhao, H.; Liu, X.; Li, Z.; Liu, B.; Wu, J.; Li, Y. TEMPO-oxidized Konjac glucomannan as appliance for the preparation of hard capsules. *Carbohydrate polymers* **2016**, 143, 262-269.
66. Akin-Ajani, O. D.; Okunlola, A. Pharmaceutical applications of pectin. In *Pectins-The New-Old Polysaccharides*. *IntechOpen* **2021**. ISBN: 978-1-83969-597-1.
67. Freitas, C. M. P.; Coimbra, J. S. R.; Souza, V. G. L.; Sousa, R. C. S. Structure and applications of pectin in food, biomedical, and pharmaceutical industry: A review. *Coatings* **2021**, 11(8), 922.
68. Sriamornsak, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *Silpakorn University International Journal* **2003**, 3(1-2), 206-228.
69. Narala, S.; Nyavanandi, D.; Mandati, P.; Youssef, A. A. A.; Alzahrani, A.; Kolimi, P.; Repka, M. Preparation and in vitro evaluation of hot-melt extruded pectin-based pellets containing ketoprofen for colon targeting. *International Journal of Pharmaceutics: X* **2023**, 5, 100156.
70. Giri, B. R.; Poudel, S.; Kim, D. W. Cellulose and its derivatives for application in 3D printing of pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Investigation* **2021**, 51, 1-22.
71. Huang, S.; O'Donnell, K. P.; Keen, J. M.; Rickard, M. A.; McGinity, J. W.; Williams, R. O. A new extrudable form of hypromellose: AFFINISOL™ HPMC HME. *Aaps Pharmscitech* **2016**, 17, 106-119.
72. Szekalska, M.; Puciłowska, A.; Szymańska, E.; Ciosek, P.; Winnicka, K. Alginate: current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications. *International journal of polymer science* **2016**, 2016.

73. Gajdziok, J.; Vetchý, D. Mucoadhesive polymers in medical forms. *Chemické listy* **2012**, 106(7), 632-638.
74. Nayak, A. K.; Hasnain, M. S.; Pal, D. (Eds.). Natural Polymers for Pharmaceutical Applications, Volume 2: Marine- and Microbiologically Derived Polymers. *CRC Press* **2019**. ISBN: 978-0-42932-829-9.
75. Pal, D.; Nayak, A. K.; Saha, S. Interpenetrating polymer network hydrogels of chitosan: applications in controlling drug release. *Cellulose-based superabsorbent hydrogels* **2018**, 1-41.
76. Kulkarni, N.; Jain, P.; Shindikar, A.; Suryawanshi, P.; Thorat, N. Advances in the colon-targeted chitosan based multiunit drug delivery systems for the treatment of inflammatory bowel disease. *Carbohydrate Polymers* **2022**, 288, 119351.
77. Ramasamy, T.; Kandhasami, U. D. S.; Ruttala, H.; Shanmugam, S. Formulation and evaluation of xanthan gum based aceclofenac tablets for colon targeted drug delivery. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, 47, 299-311.
78. Toti, U. S.; Aminabhavi, T. M. Modified guar gum matrix tablet for controlled release of diltiazem hydrochloride. *Journal of Controlled Release* **2004**, 95(3), 567-577.
79. Liu, J.; Zhan, X.; Wan, J.; Wang, Y.; Wang, C. Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects. *Carbohydrate Polymers* **2015**, 121, 27-36.

Příloha

Pozn.: označení pro víčko: malé písmeno (např. a1), označení pro tělo: velké písmeno (např. A1)

Tabulka 8: Rozměrová analýza pro víčka tobolek (formulace A).

Víčka formulace A (90 % Affinisol™ + 10 % citrusový pektin)					
Číslo víčka	d₁ [mm]	d₂ [mm]	h₁ [mm]	h₂ [mm]	m [g]
a1	5,43	9,39	9,94	6,96	0,5379
a2	5,50	9,33	9,87	6,77	0,4808
a3	5,84	9,40	10,01	7,00	0,5260
a4	5,57	9,12	10,13	6,77	0,4887
a5	5,73	9,19	10,15	6,88	0,4873
a6	5,47	9,15	9,96	6,68	0,4837
a7	5,58	8,96	10,09	6,71	0,4548
a8	5,52	8,98	10,02	6,66	0,4411
a9	5,51	8,86	10,03	6,52	0,4190
a10	5,54	9,03	10,04	6,63	0,4387
a11	5,43	8,80	10,04	6,55	0,4101
a12	5,52	8,98	10,04	6,64	0,4365
a13	5,65	9,09	10,08	6,75	0,4790
a14	6,00	9,51	10,12	6,93	0,5422
a15	5,45	8,90	10,01	6,52	0,4132
a16	5,92	9,26	10,12	6,67	0,4861
a17	5,31	8,96	9,75	6,70	0,4563
a18	5,66	9,38	9,95	6,87	0,5254
a19	5,72	9,42	9,88	6,90	0,5232
a20	5,65	7,71	9,91	6,73	0,4626
PRŮMĚR	5,60	9,07	10,01	6,74	0,4746
SMĚR.ODCHYLKA	0,17	0,38	0,10	0,14	0,0414
MINIMUM	5,31	7,71	9,75	6,52	0,4101
MEDIÁN	5,56	9,11	10,03	6,72	0,4799
MAXIMUM	6,00	9,51	10,15	7,00	0,5422

Tabulka 9: Rozměrová analýza pro těla tobolek (formulace A).

Těla formulace A (90 % AffinisolTM + 10 % citrusový pektin)				
Číslo těla	d₃ [mm]	d₄ [mm]	h₃ [mm]	m [g]
A1	5,62	9,03	18,73	0,7428
A2	5,63	9,02	18,76	0,7220
A3	5,75	9,02	18,74	0,7180
A4	5,76	9,10	18,83	0,7344
A5	5,76	9,19	18,74	0,7485
A6	5,65	9,21	18,86	0,7423
A7	5,55	9,40	18,91	0,8912
A8	5,63	9,18	18,89	0,7063
A9	5,43	9,26	18,90	0,8628
A10	5,40	9,44	18,96	0,9123
A11	5,57	9,22	18,86	0,7667
A12	5,48	9,49	18,90	0,9235
A13	5,59	8,97	18,78	0,6848
A14	5,66	9,23	18,76	0,8397
A15	5,57	9,07	18,82	0,7950
A16	5,72	9,13	18,79	0,7795
A17	5,44	9,17	18,92	0,7735
A18	5,39	9,23	18,90	0,8351
A19	5,62	9,34	18,83	0,8579
A20	5,71	9,18	18,77	0,7817
PRŮMĚR	5,60	9,19	18,83	0,7909
SMĚR.ODCHYLKA	0,12	0,14	0,07	0,0709
MINIMUM	5,39	8,97	18,73	0,6848
MEDIÁN	5,62	9,19	18,83	0,7765
MAXIMUM	5,76	9,49	18,96	0,9235

Tabulka 10: Rozměrová analýza pro víčka tobolek (formulace B).

Víčka formulace B (90 % Affinisol™ + 10 % alginát sodný)					
Číslo víčka	d₁ [mm]	d₂ [mm]	h₁ [mm]	h₂ [mm]	m [g]
b1	5,72	9,36	9,91	7,00	0,5404
b2	5,72	9,37	9,90	6,51	0,5216
b3	5,49	9,40	9,92	6,94	0,5291
b4	5,39	9,24	9,79	6,88	0,4222
b5	5,56	9,24	9,98	6,94	0,5211
b6	5,30	9,12	9,85	6,88	0,5178
b7	5,29	9,21	9,96	6,94	0,5049
b8	5,30	9,23	9,69	6,78	0,5058
b9	5,43	8,98	9,87	6,83	0,4582
b10	5,73	9,22	9,98	6,95	0,5278
b11	5,69	9,27	9,96	6,99	0,5203
b12	5,85	9,22	10,03	6,94	0,5289
b13	5,44	8,93	9,98	6,62	0,4896
b14	5,60	9,36	9,96	6,93	0,5280
b15	5,45	9,57	10,07	7,16	0,5781
b16	5,45	9,58	10,12	7,27	0,5630
b17	5,32	9,23	10,02	6,93	0,5221
b18	5,85	9,21	9,88	6,88	0,5202
b19	5,31	9,38	9,95	6,95	0,5216
b20	5,73	9,21	9,98	7,00	0,5210
PRŮMĚR	5,53	9,27	9,94	6,92	0,5171
SMĚR.ODCHYLKA	0,19	0,16	0,10	0,16	0,0329
MINIMUM	5,29	8,93	9,69	6,51	0,4222
MEDIÁN	5,47	9,24	9,96	6,94	0,5214
MAXIMUM	5,85	9,58	10,12	7,27	0,5781

Tabulka 11: Rozměrová analýza pro těla tobolek (formulace B).

Těla formulace B (90 % Affinisol™ + 10 % alginát sodný)				
Číslo těla	d₃ [mm]	d₄ [mm]	h₃ [mm]	m [g]
B1	5,47	9,25	18,87	0,8876
B2	5,45	9,28	18,91	0,9266
B3	5,33	9,38	18,87	0,9669
B4	5,48	9,25	18,89	0,8793
B5	5,42	9,41	18,89	0,9414
B6	5,53	9,16	18,90	0,9061
B7	5,70	9,19	18,83	0,8726
B8	5,51	9,27	18,84	0,8596
B9	5,79	9,08	18,71	0,7706
B10	5,50	9,21	18,86	0,8274
B11	5,69	9,16	18,82	0,7931
B12	5,67	9,11	18,79	0,8322
B13	5,76	9,07	18,75	0,8043
B14	5,25	9,40	18,94	0,9709
B15	5,31	9,43	18,89	0,9610
B16	5,32	9,39	18,95	0,9731
B17	5,36	9,24	18,91	0,9219
B18	5,54	9,42	18,90	0,9711
B19	5,33	9,29	18,83	0,8800
B20	5,77	9,12	18,90	0,9276
PRŮMĚR	5,51	9,26	18,86	0,8937
SMĚR.ODCHYLKA	0,17	0,12	0,06	0,0637
MINIMUM	5,25	9,07	18,71	0,7706
MEDIÁN	5,49	9,25	18,88	0,8969
MAXIMUM	5,79	9,43	18,95	0,9731

Tabulka 12: Rozměrová analýza pro víčka tobolek (formulace C).

Víčka formulace C (85 % Affinisol™ + 10 % citrusový pektin + 5 % PEG)					
Číslo víčka	d₁ [mm]	d₂ [mm]	h₁ [mm]	h₂ [mm]	m [g]
c1	5,18	8,84	9,81	6,66	0,4490
c2	5,20	8,89	9,67	6,70	0,4524
c3	5,23	8,99	9,79	6,85	0,4578
c4	5,32	8,98	9,80	6,76	0,4597
c5	5,32	9,05	9,82	6,85	0,4665
c6	5,30	9,11	9,80	6,85	0,4660
c7	5,15	8,88	9,77	6,75	0,4538
c8	5,09	9,00	9,82	6,90	0,4658
c9	5,14	8,88	9,82	6,86	0,4622
c10	5,17	8,97	9,80	6,84	0,4652
c11	5,14	8,96	9,78	6,86	0,4642
c12	5,06	8,98	9,80	6,71	0,4571
c13	5,10	8,99	9,82	6,82	0,4615
c14	5,08	8,92	9,80	6,80	0,4634
c15	5,23	8,96	9,77	6,80	0,4603
c16	5,33	8,94	9,79	6,83	0,4610
c17	5,14	8,92	9,83	6,78	0,4642
c18	5,10	8,94	9,84	6,77	0,4643
c19	5,07	8,98	9,82	6,80	0,4640
c20	5,09	9,00	9,82	6,82	0,4627
PRŮMĚR	5,17	8,96	9,80	6,80	0,4611
SMĚR.ODCHYLKA	0,09	0,06	0,04	0,06	0,0048
MINIMUM	5,06	8,84	9,67	6,66	0,4490
MEDIÁN	5,15	8,97	9,80	6,81	0,4625
MAXIMUM	5,33	9,11	9,84	6,90	0,4665

Tabulka 13: Rozměrová analýza pro těla tobolek (formulace C).

Těla formulace C (85 % Affinisol™ + 10 % citrusový pektin + 5 % PEG)				
Číslo těla	d₃ [mm]	d₄ [mm]	h₃ [mm]	m [g]
C1	5,17	9,24	18,99	0,9146
C2	5,21	9,18	19,00	0,8798
C3	5,30	9,14	18,89	0,8689
C4	5,15	9,27	18,90	0,9133
C5	5,17	9,26	18,96	0,9196
C6	5,14	9,32	18,90	0,9725
C7	5,13	9,23	18,93	0,9419
C8	5,41	9,23	18,90	0,8937
C9	5,24	9,19	18,94	0,9069
C10	5,16	9,28	18,96	0,9106
C11	5,12	9,25	18,90	0,9491
C12	5,40	9,17	18,86	0,8978
C13	5,24	9,07	18,83	0,9463
C14	5,11	9,26	18,95	0,9580
C15	5,40	9,17	18,83	0,9365
C16	5,12	9,27	18,95	0,9594
C17	5,25	9,12	18,91	0,9317
C18	5,45	9,31	18,79	0,9608
C19	5,21	9,17	18,94	0,9470
C20	5,24	9,32	18,91	0,9571
PRŮMĚR	5,23	9,22	18,91	0,9283
SMĚR.ODCHYLKA	0,11	0,07	0,05	0,0293
MINIMUM	5,11	9,07	18,79	0,8689
MEDIÁN	5,21	9,24	18,91	0,9341
MAXIMUM	5,45	9,32	19,00	0,9725

Tabulka 14: Rozměrová analýza pro víčka tobolek (formulace D)

Víčka formulace D (85 % Affinisol™ + 10 % alginát sodný + 5 % PEG)					
Číslo víčka	d₁ [mm]	d₂ [mm]	h₁ [mm]	h₂ [mm]	m [g]
d1	6,01	9,33	10,31	6,60	0,5227
d2	5,90	9,33	10,22	6,70	0,4707
d3	6,02	9,29	10,30	6,66	0,5163
d4	5,84	9,11	10,03	6,52	0,4145
d5	6,00	9,18	10,30	6,56	0,5109
d6	6,01	9,40	10,23	6,64	0,5410
d7	5,91	9,18	10,27	6,66	0,5106
d8	6,02	9,27	10,25	6,72	0,5043
d9	5,60	9,03	10,09	6,56	0,4099
d10	5,86	9,07	10,08	6,64	0,4251
d11	5,56	9,06	10,07	6,65	0,4163
d12	5,81	9,06	10,12	6,63	0,4219
d13	5,57	9,04	10,07	6,57	0,4000
d14	5,58	9,03	10,10	6,56	0,4145
d15	5,76	8,97	10,04	6,60	0,4357
d16	5,64	9,08	10,18	6,76	0,4493
d17	5,64	9,13	10,11	6,70	0,4209
d18	5,62	9,06	10,04	6,60	0,4091
d19	5,83	9,09	10,03	6,65	0,4172
d20	5,85	9,06	10,11	6,68	0,4271
PRŮMĚR	5,80	9,14	10,15	6,63	0,4519
SMĚR.ODCHYLKA	0,17	0,12	0,10	0,06	0,05
MINIMUM	5,56	8,97	10,03	6,52	0,40
MEDIÁN	5,84	9,08	10,11	6,64	0,43
MAXIMUM	6,02	9,40	10,31	6,76	0,54

Tabulka 15: Rozměrová analýza pro těla tobolek (formulace D).

Těla formulace D (85 % Affinisol™ + 10 % alginát sodný + 5 % PEG)				
Číslo těla	d₃ [mm]	d₄ [mm]	h₃ [mm]	m [g]
D1	5,92	9,26	19,07	0,8513
D2	5,98	9,17	19,02	0,7500
D3	5,97	9,10	18,89	0,7165
D4	5,89	9,26	19,11	0,8515
D5	5,95	9,21	18,99	0,7141
D6	6,01	9,12	19,16	0,6942
D7	5,89	9,29	18,98	0,8743
D8	6,09	9,09	18,92	0,7013
D9	5,99	9,13	18,64	0,6883
D10	6,00	9,11	18,89	0,7058
D11	5,87	9,25	18,97	0,7955
D12	5,87	9,31	18,98	0,7828
D13	5,81	9,31	18,45	0,7829
D14	5,92	9,21	18,95	0,8009
D15	5,88	9,23	19,05	0,8351
D16	5,90	9,20	19,04	0,7824
D17	5,98	9,09	18,90	0,6978
D18	5,93	9,24	19,03	0,8791
D19	5,92	9,21	18,99	0,7648
D20	6,08	9,10	18,91	0,6585
PRŮMĚR	5,94	9,19	18,95	0,7664
SMĚR.ODCHYLKA	0,07	0,08	0,16	0,0678
MINIMUM	5,81	9,09	18,45	0,6585
MEDIÁN	5,93	9,21	18,98	0,7736
MAXIMUM	6,09	9,31	19,16	0,8791

Tabulka 16: Rozměrová analýza pro víčka tobolek (formulace E).

Víčka formulace E (75 % Affinisol™ + 20 % citrusový pektin + 5 % PEG)					
Číslo víčka	d₁ [mm]	d₂ [mm]	h₁ [mm]	h₂ [mm]	m [g]
e1	5,76	8,77	9,90	6,84	0,3650
e2	5,83	8,82	9,86	6,88	0,3721
e3	5,78	8,83	9,79	6,77	0,3775
e4	5,53	8,87	10,01	6,66	0,3428
e5	5,55	8,79	9,93	6,57	0,3457
e6	5,83	8,75	9,87	6,75	0,3661
e7	5,78	8,82	9,88	6,74	0,3732
e8	5,75	8,77	9,84	6,69	0,3740
e9	5,74	8,77	9,90	6,76	0,3931
e10	5,76	8,76	9,87	6,75	0,3823
e11	5,85	8,84	9,93	6,87	0,3984
e12	5,76	8,79	9,85	6,68	0,3802
e13	5,71	8,79	9,84	6,78	0,3919
e14	5,72	8,77	9,90	6,76	0,3810
e15	5,82	8,73	9,92	6,78	0,3765
e16	5,74	8,75	9,91	6,82	0,3642
e17	5,59	8,81	9,87	6,75	0,3921
e18	5,74	8,79	9,96	6,82	0,3862
e19	5,73	8,84	9,89	6,88	0,3733
e20	5,81	8,78	9,84	6,71	0,3880
PRŮMĚR	5,74	8,79	9,89	6,76	0,3762
SMĚR.ODCHYLKA	0,09	0,04	0,05	0,08	0,0146
MINIMUM	5,53	8,73	9,79	6,57	0,3428
MEDIÁN	5,75	8,79	9,89	6,76	0,3770
MAXIMUM	5,85	8,87	10,01	6,88	0,3984

Tabulka 17: Rozměrová analýza pro těla tobolek (formulace E).

Těla formulace E (75 % Affinisol™ + 20 % citrusový pektin + 5 % PEG)				
Číslo těla	d₃ [mm]	d₄ [mm]	h₃ [mm]	m [g]
E1	5,82	8,82	18,78	0,5974
E2	5,97	9,21	18,88	0,6563
E3	5,78	8,87	18,83	0,5986
E4	5,82	8,94	18,92	0,6663
E5	5,77	8,86	18,89	0,6360
E6	5,97	9,21	18,89	0,6062
E7	5,98	8,85	18,95	0,5909
E8	5,81	8,92	18,87	0,6437
E9	5,75	8,96	18,81	0,6810
E10	5,81	8,95	18,91	0,6571
E11	5,72	8,81	18,94	0,6108
E12	5,82	8,86	18,76	0,6055
E13	5,83	8,81	18,87	0,6436
E14	5,85	8,89	18,76	0,6480
E15	5,89	8,88	18,86	0,6437
E16	5,77	8,91	18,88	0,6711
E17	5,78	8,92	18,91	0,6581
E18	5,86	8,88	18,89	0,6208
E19	5,84	8,92	18,91	0,6102
E20	5,85	8,87	18,87	0,6358
PRŮMĚR	5,83	8,92	18,87	0,6341
SMĚR.ODCHYLKA	0,07	0,11	0,06	0,0272
MINIMUM	5,72	8,81	18,76	0,5909
MEDIÁN	5,82	8,89	18,88	0,6398
MAXIMUM	5,98	9,21	18,95	0,6810