

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Extruze a 3D tisk filamentů s API  
Diplomová práce

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

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jitka Půšová**  
Osobní číslo: **C22413**  
Studijní program: **N0531A130035 Fyzikální chemie**  
Téma práce: **Extruze a 3D tisk filamentů s API**  
Téma práce anglicky: **Extrusion and 3D printing of filaments with API**  
Zadávací katedra: **Katedra fyzikální chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma "3D tisk s API". Zaměřte se především na % zatížení filamentů léčivem, převedení léčiva na amorfni formu a zvýšení rozpustnosti.
2. Metodou extruze připravte filameny s vybranou API s různým % zatížením a charakterizujte pomocí vhodných metod.
3. Metodou 3D tisku vytiskněte z připravených filamentů tablety a charakterizujte pomocí vhodných metod.
4. Proveďte disoluční test připravených tablet ve vybraných disolučních médiích, získané disoluční profily kvantitativně vyhodnoťte pomocí vhodných matematických modelů.
5. 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. Marie Nevyhoštěná**

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 „Extruze a 3D tisk filamentů s API“ 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 směrnici 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

Jitka Půšová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych zde poděkovala mé vedoucí diplomové práce, již je doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D., která mi věnovala svůj čas, poskytla cenné rady a důležité připomínky k vypracování diplomové práce. Dále děkuji Ing. Marii Nevyhoštěné za vstřícný přístup a ochotnou pomoc při práci v laboratoři a při zpracování výsledků. Také bych ráda poděkovala své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Diplomová práce popisuje možnost přípravy tablet s inkorporovaným léčivem metodou 3D tisku v kombinaci s holt melt extruzí (HME). Teoretická část zahrnuje popis 3D tisku, jeho metod a jeho využití především ve farmacii. Zaobírá se zlepšením rozpustnosti léčiv vlivem jejich amorfizace prostřednictvím extruze a 3D tisku. Dále popisuje přípravu filamentů s možností různého zatížení léčivem. Součástí je popis disoluční zkoušky pevných lékových forem, průběh metody DSC a Ramanovy spektroskopie. Experimentální část se věnuje přípravě tablet pomocí metody FDM 3D tisku a k tomu potřebné extruzi filamentů s API na bázi vybraných sulfonamidů. Zahrnuje disoluční testy, vyhodnocení získaných disolučních profilů a ověření procesu amorfizace metodou DSC a Ramanovou spektroskopií.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

FDM 3D tisk, metoda HME, disoluční zkouška, amorfizace, API, tableta, filament

## **TITLE**

Extrusion and 3D printing of filaments with API

## **ANNOTATION**

The thesis describes the possibility of producing solid pharmaceutical forms by 3D printing in combination with hot melt extrusion (HME). The theoretical part includes a description of 3D printing and its methods and use mainly in pharmaceuticals. It deals with the improvement of the solubility of drugs due to their amorphization by extrusion and 3D printing. It also describes the preparation of filaments with the possibility of different drug content. A description of the dissolution test of solid pharmaceutical forms, the course of the DSC method and Raman spectroscopy are included. The experimental part is devoted to the preparation of tablets using FDM 3D printing method and the extrusion of filaments with APIs based on selected sulfonamides. It includes dissolution tests, evaluation of the obtained dissolution profiles and verification of the amorphization process by DSC and Raman spectroscopy.

## **KEYWORDS**

FDM 3D printing, HME method, dissolution test, amorphization, API, tablet, filament

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ .....	11
SEZNAM TABULEK .....	12
SEZNAM GRAFŮ .....	13
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	14
<b>ÚVOD</b> .....	15
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	16
1.1 3D tisk ve farmacii .....	16
1.1.1 Metody 3D tisku .....	17
1.2 Zvýšení rozpustnosti API .....	17
1.2.2 Zvýšení rozpustnosti API vlivem geometrie lékové formy .....	19
1.2.1 Zvýšení rozpustnosti API vlivem amorfizace .....	20
1.3 Proces amorfizace .....	20
1.3.1 Amorfni léčiva .....	22
1.3.2 Amorfni pevná disperze (ASD) .....	23
1.3.3 Charakterizace amorfni fáze a ASD .....	24
1.4 Filamenty s API .....	25
1.4.1 Polymery používané pro HME .....	25
1.4.2 Zatížení filamentů připravených metodou HME .....	26
1.4.3 Stanovení obsahu léčiva ve vláknech .....	27
1.4.4 Stabilita filamentů .....	28
1.5 Metody použité v experimentální části .....	28
1.5.1 Holt melt extruze (HME) .....	28
1.5.2 Fused deposition modeling (FDM) .....	30
1.5.3 Disoluční zkouška .....	32
1.5.4 Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) .....	34
1.5.5 Ramanova spektroskopie .....	36



2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
2.1 Cíle práce .....	37
2.2 Syntéza vybraných sulfonamidů .....	38
2.3 Holt melt extruze (HME) .....	39
2.3.1 Laboratorní přístroje a pomůcky .....	39
2.3.2 Použité chemikálie .....	39
2.3.3 Příprava fyzikálních směsí pro HME.....	39
2.3.4 Extruze filamentů .....	40
2.4 Fused deposition modeling (FDM).....	41
2.4.1 Laboratorní přístroje a software .....	41
2.4.2 Návrh tablet pro 3D tisk.....	41
2.4.3 Průběh FDM 3D tisku .....	41
2.5 Disoluční zkouška .....	42
2.5.1 Laboratorní přístroje, pomůcky a software .....	42
2.5.2 Použité chemikálie a roztoky .....	42
2.5.3 Příprava disolučních médií.....	43
2.5.4 Průběh disoluční zkoušky .....	43
2.5.5 UV/VIS spektrometrie .....	44
2.5.6 Kalibrační křivka.....	45
2.6 DSC a Ramanova spektroskopie.....	46
2.6.1 Laboratorní přístroje .....	46
2.6.2 DSC .....	46
2.6.3 Ramanova spektroskopie .....	46
3 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	47
3.1 Extruze filamentů.....	47
3.2 3D tisk tablet .....	48
3.3 Disoluční zkouška tištěných tablet.....	48

3.3.1 Disoluční profily .....	49
3.3.2 Regresní analýza .....	56
3.4 Vyhodnocení DSC .....	59
3.5 Vyhodnocení Ramanovy spektroskopie .....	60
<b>4 ZÁVĚR</b> .....	<b>62</b>
5 PŘÍLOHY .....	64
POUŽITÁ LITERATURA .....	66

## SEZNAM ILUSTRACÍ

<b>Obrázek 1:</b> Schématické rozdělení kategorií BCS .....	18
<b>Obrázek 2:</b> Grafické znázornění procesu amorfizace.....	21
<b>Obrázek 3:</b> Rozdílná struktura krystalické a amorfní fáze .....	22
<b>Obrázek 4:</b> Konstrukce a průběh procesu HME.....	29
<b>Obrázek 5:</b> Konstrukční schéma FDM 3D tiskárny .....	31
<b>Obrázek 6:</b> Konstrukční rozdíl mezi heat flux a kompenzační DSC.....	35
<b>Obrázek 7:</b> Schéma syntézy vybraných sulfonamidů.....	38
<b>Obrázek 8:</b> Extrudér Noztek Touch.....	40
<b>Obrázek 9:</b> Návrh tablety v programu Prusa slicer .....	41
<b>Obrázek 10:</b> FDM 3D tiskárna Original Prusa i3 MK3S+ .....	42
<b>Obrázek 11:</b> Disoluční aparatura Sotax AT 7 Smart.....	44
<b>Obrázek 12:</b> Vlákna formulací a) 10 % API I, b) 10 % API II a c) 10 % API III .....	47
<b>Obrázek 13:</b> Optimalizace tisku .....	48
<b>Obrázek 14:</b> Průběh disoluce tablet 10 % API I v pH 6,8; a) 1 minuta po spuštění; b) 20 minut po spuštění; c) 4 hodiny po spuštění.....	50
<b>Obrázek 15:</b> Zbytky nerozpuštěných tablet 10 % API I po disoluci v pH 6,8 .....	50
<b>Obrázek 16:</b> a) disoluční profily 3D tištěných tablet látky API I; b) disoluční profily lisovaných tablet látky API I (hydrofilní matrice) (40); c) disoluční profily lisovaných tablet látky API I (lipofilní matrice) (40).....	55

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Složení extrudovaných směsí (v gramech na jeden cyklus extruze) .....	40
<b>Tabulka 2:</b> Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API I pomocí modelu Weibull.....	56
<b>Tabulka 3:</b> Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API I pomocí modelu I. řádu.....	56
<b>Tabulka 4:</b> Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API II pomocí modelu Weibull .....	56
<b>Tabulka 5:</b> Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 API II pomocí modelu I. řád.....	57
<b>Tabulka 6:</b> Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API III pomocí modelu Weibull ....	57
<b>Tabulka 7:</b> Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API III pomocí modelu I. řád .....	57
<b>Tabulka 8:</b> Vyhodnocení disolučních profilů tablet 20 % API I pomocí modelu Weibull.....	57
<b>Tabulka 9:</b> Vyhodnocení disolučních profilů tablet 20 % API I pomocí modelu I. řád.....	58
<b>Tabulka 10:</b> Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % a 20 % API I pomocí modelu Korsmeyer-Peppas .....	58
<b>Tabulka 11:</b> Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API II a 10 % API III pomocí modelu Korsmeyer-Peppas .....	58

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Disoluční profily formulace tablet 10 % API I v pH 1,2; 4,5 a 6,8 proložené modelem Weibull a I. řád.....	49
<b>Graf 2:</b> Disoluční profily formulace tablet 10 % API II v pH 1,2 a 6,8 proložené modelem Weibull a I. řád.....	51
<b>Graf 3:</b> Disoluční profily formulace tablet 10 % API III v pH 1,2 a 6,8 proložené modelem Weibull a I. řád.....	51
<b>Graf 4:</b> Disoluční profily formulace tablet 20 % API I v pH 1,2 a 6,8 proložené modelem Weibull a I. řád.....	52
<b>Graf 5:</b> Disoluční profily formulací tablet 10 % API I a 20 % API I v pH 1,2; 4,5 a 6,8 proložené modelem Korsmeyer-Peppas .....	53
<b>Graf 6:</b> Disoluční profily formulací tablet 10 % API II a 10 % API III v pH 1,2 a 6,8 proložené modelem Korsmeyer-Peppas .....	54
<b>Graf 7:</b> DSC záznam vzorků filamentů a tablet formulací blank, 10 % a 20 % API I včetně vzorků čistých krystalických látek AFF a API I. ....	59
<b>Graf 8:</b> Ramanovo spektrum měřených vzorků filamentů a tablet formulací blank, 10 % a 20 % API včetně vzorků čistých krystalických látek AFF a API.....	60

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ABS	akrylonitrilbutadienstyren
AFF	Affinisol™
API	aktivní farmaceutická složka (active pharmaceutical ingredient)
ASD	amorfní pevná disperze
BCS	biofarmaceutický klasifikační systém
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
DSE	dvoušnekové extrudéry
EC	ethylcelulóza
FDM	fused deposition modeling
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GIT	gastrointestinální trakt
HME	holt melt extruzion
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPMC	hydroxypropylmethylcelulóza
KIR	Kollicoat IR
MSE	vícešnekové extrudéry
NFD	nifedipin
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAM	pressure-assisted microsyringes
PEO	polyethylenoxid
PLA	kyselina polyléčná
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidon
SLA	stereolitografie
SLP	Soluplus
SLS	selektivní laserové sintrování
SSE	extruze polotuhých materiálů (semi-solid extrusion)
SSE	jednošnekové extrudéry
TGA	termogravimetrická analýza
UV/VIS	ultrafialová oblast/ viditelná oblast
XRD	rentgenová difrakční analýza

## ÚVOD

V posledních letech prochází medikamentózní léčba radikální změnou, charakterizovanou snahou o efektivní využití léčiv, redukcí jejich spotřeby a zjednodušení aplikace. Před farmaceutickým průmyslem tak stojí nové výzvy, vyhovět nejen individuálním potřebám medikace jednotlivých pacientů, ale také poskytnout možnost účinné a případně i multifunkční aplikace léků.

Z těchto důvodů jde farmaceutický vývoj stále kupředu a jeden z trendů je rozvoj personalizované medicíny, která je také částečně přiblížena v následujícím textu práce. Jednou z metod, která se v současnosti využívá pro přípravu personalizovaných lékových forem, je technologie (FDM) 3D tisku, což je hlavním tématem této práce.

Metodou FDM 3D tisku je možné rychle připravit různé pevné lékové formy s různou koncentrací účinné látky (API), ale také s obsahem více druhů API. Do FDM 3D tiskárny se zavádí filamenty na bázi polymerů připravené metodou holt melt extruze, ve kterých je zakomponováno různé množství/typ léčiva. Při procesu extruze a 3D tisku dochází k amorfizaci léčiva, čímž je ovlivněno jeho uvolňování z tištěné lékové formy. Témata jako je zatížení filamentů léčivem, proces amorfizace nebo rozpustnost a uvolňování účinné látky jsou popsána v několika kapitolách teoretické části práce.

Experimentální část diplomové práce se zabývá možností inkorporace aktivních farmaceutických složek (API), konkrétně sulfonamidů, do filamentů na bázi HPMC připravených metodou holt melt extruze. Takto připravené filamenty s API byly následně použity pro 3D tisk tablet. K charakterizaci připravených vláken a tablet byla použita Ramanova mikroskopie a DSC, uvolňování API z tablet bylo studováno pomocí disolučního testu. V závěru práce jsou shrnuty a diskutovány získané výsledky.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 3D tisk ve farmacii

Jedná se o techniku aditivní výroby trojrozměrných objektů, jejíž princip spočívá v postupném přidávání po sobě jdoucích pravidelných vrstev materiálu pro reprodukci 3D digitálního modelu vytvořeného pomocí speciálního softwaru. Od svého vzniku v 80. letech 20. století se tato technologie aditivní výroby exponenciálně vyvíjela díky svým jedinečným vlastnostem, a to především unikátní schopnosti konstruovat komplikované geometrické tvary. Metoda trojrozměrného tisku se využívá nejen ve farmaceutickém průmyslu, ale i v automobilovém, leteckém, lékařském, potravinářském, elektrotechnickém a stavebním průmyslu. (1,2)

Mnoho pacientů totiž po užívání běžných lékových forem trpí nežádoucími účinky způsobenými používáním hromadně vyráběných komerčně dostupných léků systémem „jedna velikost pro všechny“, přičemž bohužel nedostávají speciální léky nebo dávkování přizpůsobené jejich specifickým potřebám. 3D tisk se stal alternativní, všestrannou a efektivní technologií pro výrobu lékových forem, protože metodou 3D tisku je možné připravit produkty na míru přizpůsobené individuálním potřebám všech pacientů. (3,4)

Personalizovaná medicína, jak se tento individuální přístup k aplikaci léčiv označuje, obecně spočívá v přizpůsobení lékařské léčby profilu pacienta, tedy věku, hmotnosti, genetickému a farmakokinetickému profilu, charakteristikám onemocnění, potřebám a preferencím každého jednotlivého pacienta, a zahrnuje záměrné provádění diagnostiky, terapie a sledování (5,6). Personalizovanou medicínu lze definovat jako „poskytování správné léčby správnému pacientovi, ve správné dávce a ve správný čas“ (7,8). Cílem je předem rozlišit pacienty, u nichž je největší pravděpodobnost, že budou mít z dané léčby prospěch, od těch, u nichž by vznikaly náklady a vedlejší účinky, aniž by získali ekvivalentní přínos. Personalizace dávek je velkým přínosem pro řadu pacientů, jako jsou například děti, lidé s chronickým onemocněním, s cukrovkou, hypertenzí nebo hypercholesterolemií, kteří vyžadují každodenní polymedikaci. 3D tiskem je možné připravit produkty s fixní kombinací dávek, které obsahují dvě nebo více aktivních farmaceutických složek. (4, 5, 9)

Oproti tradičně využívaným farmaceutickým výrobním procesům není zatím možné využít 3D tisk pro hromadnou výrobu, ale již probíhá několik klinických studií, které mají prokázat úspěšnou implementaci 3D tištěných léků v nemocničním prostředí. (4, 5)



### 1.1.1 Metody 3D tisku

V současné době probíhá nejen ve farmacii poměrně rozsáhlý aplikovaný výzkum několika technik 3D tisku, které řadíme do kategorií tryskání pojiva, fotopolymerizace, včetně stereolitografie a digitálního zpracování světla, procesy vytlačování materiálu i extruze polotuhých materiálů (SSE). Z popsaných metod jsou nejslibnější systémy založené na vytlačování roztaveného materiálu přes trysky, jako je Fused deposition modeling (FDM) a pressure-assisted microsyringes (PAM), dále systémy využívající laserové záření, kam patří stereolitografie (SLA) a techniky fúze práškového lože, tedy například selektivní laserové sintrování (SLS). Další využitelnou metodou může být drop-on-powder tisk, který je součástí práškových technik 3D tisku. Principem této metody je vstříkávání kapiček inkoustu na práškové vrstvy. Polymerní pojiva a API mohou být součástí jak práškové vrstvy, tak inkoustu. (5, 10, 11, 12)

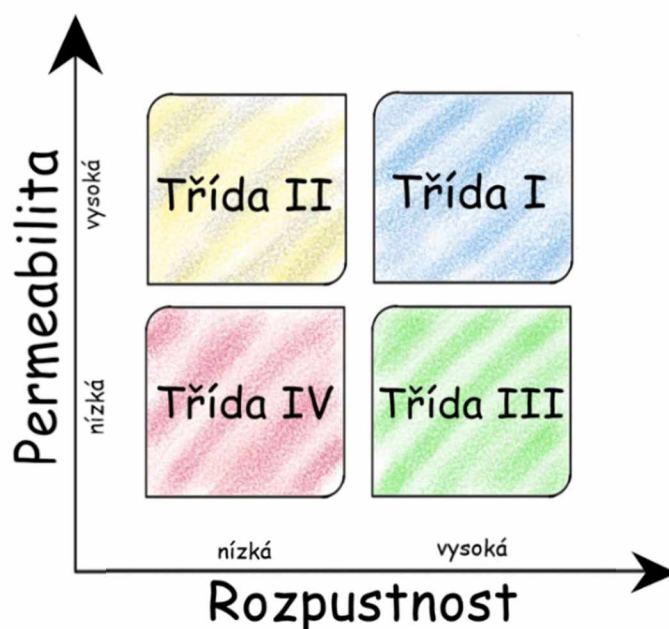
Jednotlivé typy výše popsaných tiskových technologií umožňují 3D tisk různých materiálů, jako jsou kapaliny, vosky, prášky a pevné látky. Techniky 3D tisku se vzájemně velmi liší, co se týká především zpracování a vlastností tablet, a existuje tedy flexibilita při výběru vhodného typu tiskárny a materiálu podle konkrétního požadavku při dané léčebném postupu. Výhodou FDM oproti laserovým technikám je možnost použití různých pomocných látek farmaceutické kvality, na rozdíl od fotopolymerních pryskyřic a fotoinicíatorů potřebných pro SLA a SLS, u kterých musí být primárně provedena toxikologická studie, aby byla zaručena bezpečnost jejich použití. FDM také poskytuje vysokou mechanickou pevnost, kterou může být jinak obtížné získat u tablet vyrobených metodou PAM. Nevýhodou FDM může být použití vysokých teplot potřebných k roztavení polymerů a pomocných látek, které mohou způsobit degradaci termolabilních léčiv. I přesto se ukázalo, že nejuniverzálnější metodou pro tištěné lékové formy je právě metoda FDM 3D tisku ve spojení s extruzí za tepla (HME), a to z důvodu možnosti inkorporace vysokého množství API do vlákna, vynikajících mechanických vlastností a neomezených geometrií, které lze tisknout. (3, 5, 13)

## 1.2 Zvýšení rozpustnosti API

Preferovaným způsobem podávání léčiv je klasická perorální cesta, a to díky jednoduché aplikaci příslušné lékové formy a compliance pacienta. Perorální lékové formy jsou nejběžnější léky na předpis i volný prodej užívané prakticky po celém světě. Po perorálním podání musí být aktivní farmaceutická složka (API) v dané části

gastrointestinálního traktu (GITu) pokud možno dokonale rozpuštěna, aby se dostala do systémového oběhu. Je velmi důležité rozpoznat fyziologická a anatomická omezení celého gastrointestinálního traktu a také veškeré jeho vlastnosti, které lze využít k maximální efektivitě absorpce podávaných léčiv. Přítomnost enzymů a měnící se pH GITu představuje neustálé výzvy a příležitosti, jak docílit úspěšného uvolňování API z tablet vytištěných FDM 3D tiskem. (1, 2)

Rozpustnost je obecně vnímána, jako schopnost látek (ať už pevných, kapalných či plyných, v dále popisovaném případě pevných API) rozpustit se v kapalném rozpouštědle (např. ve vodném prostředí GITu) za vzniku homogenního roztoku. Mírou rozpustnosti je maximální koncentrace rozpuštěné látky v rozpouštědle, které lze dosáhnout. Na základě rozdělení API dle rozpustnosti a vstřebatelnosti vznikl biofarmaceutický klasifikační systém (BCS), který se využívá zejména během vývoje léčivé formy a k predikci biodostupnosti API. Podle BCS jsou léčiva rozřazena do čtyř kategorií. I. třídu tvoří látky s vysokou rozpustností a vysokou permeabilitou, II. třídu vyznačuje nízká rozpustnost a vysoká permeabilita, III. třída obsahuje látky s vysokou rozpustností ale nízkou permeabilitou a poslední IV. třída je charakterizována nízkou rozpustností i nízkou permeabilitou (14). Rozdělení tříd BCS je znázorněno schématem na **obrázku 1**.



**Obrázek 1:** Schématické rozdělení kategorií BCS

V rámci různých průzkumů bylo zjištěno, že 40 % API uvedených na trh a až 90 % molekul API ve fázi vývoje je špatně rozpustných ve vodě (1). Z tohoto důvodu byla zahájena řada studií s cílem nalézt vhodnou strategii pro zlepšení rozpustnosti málo rozpustných API. V současné době se využívá řada metod ke zvýšení rozpustnosti API. Mezi nejúčinnější strategie pro zlepšení rozpustnosti špatně rozpustných API patří: přidání solubilizátorů (povrchově aktivní látky, komplexotvorná činidla), použití léčiva ve formě soli, lékové formulace na bázi lipidů, využití nanočástic, micelární systémy, pevná disperze a zejména amorfní pevná disperze (ASD) (1).

### **1.2.2 Zvýšení rozpustnosti API vlivem geometrie lékové formy**

I přesto, že složení lékové formy má nejvýznamnější vliv na její rozpouštění, uvolnění léčiva zásadně ovlivňují i další významné parametry, např. geometrie lékové formy. V tomto ohledu je využití moderních technologií, např. 3D tisku, ve farmaceutickém vývoji značným benefitem, protože umožňuje rychlou a snadnou změnu nejen geometrie lékové formy, ale také změnu povrchu nebo hustoty výplně tištěných produktů. Proces vývoje lékové formy klasickými postupy i s využitím inovativních technologií vyžaduje nadstandardní lidskou kreativitu, vynalézavost a hluboké znalosti. Právě z tohoto důvodu celkem logicky vznikla myšlenka využití umělé inteligence k vytváření nových formulací léčiv pomocí 3D tisku. Další navazující výzkum přinesl pozitivní výsledky a potenciál umělé inteligence zlepšit technologii 3D tisku ve farmaceutické výrobě je čím dál více uznáván. (15)

Jednou z aplikovatelných technologických možností, jak vhodně upravit rychlost rozpouštění aktivní farmaceutické složky z tištěné lékové formy, je tedy úprava hustoty její výplně. Správně zvolenou modifikací hustoty výplně tablety dosáhneme změny poměru jejího povrchu k objemu, tedy změny rychlosti rozpouštění. Bylo experimentálně zjištěno, že silnější a hustší struktury vedou k pomalejšímu uvolňování léčiva. (3, 16, 17)

Změny poměru velikosti povrchu a objemu můžeme docílit také samotnou geometrií lékové formy. Tablety mohou být tištěny např. na základě voštinové struktury připomínající svým geometrickým tvarem včelí plástve. Produkt je tak složen z jednotlivých voštinových buněk ve tvaru šestiúhelníků, jejichž velikost, a tím i celkový povrch, je možné nastavit a díky tomu kontrolovat profily uvolňování léčiva bez další nutnosti měnit formulaci. K posouzení byl vyvinut analytický model využívající popis Fickovy difúze, který umožňuje predikci uvolňování léčiva. Porovnání experimentálních a předpokládaných dat o uvolňování léčiv

jasně ukázalo, že kromě plochy povrchu je třeba při praktickém návrhu lékové formy vzít v úvahu i další faktory, jako je průměr buňky v případě voštinové geometrie a smáčivost materiálu. (18)

### 1.2.1 Zvýšení rozpustnosti API vlivem amorfizace

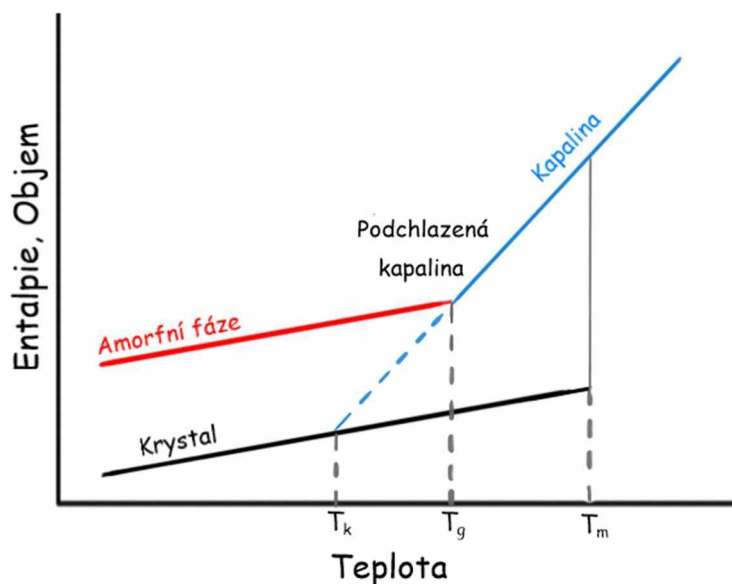
V důsledku molekulární konformace mají krystalické a amorfní účinné látky odlišné profily rozpustnosti. Krystalická struktura je charakterizována vysokým stupněm uspořádanosti molekul. Oproti tomu amorfní látky vykazují uspořádání atomů pouze na kratší vzdálenost. V průběhu rozpouštění takové látky není potřeba dodávat energii na rozbití krystalové mřížky, proto dojde ke zvýšení zdánlivé rozpustnosti a vznikne přesycený stav. Díky vyšší molekulární mobilitě a Gibbsově energii je ale amorfní forma metastabilní, a má tendenci vracet se do svého stabilního krystalického stavu. Rekrystalizaci API se dá zabránit např. tvorbou ASD. (1)

Riziko krystalizace API hrozí jak během výroby léčiva (mechanické namáhání), tak vlivem nevhodného skladování (teplota, vlhkost) či následně během disoluce. Z tohoto důvodu důležitým faktorem při vývoji nových API je studium krystalizace a stability amorfní fáze. Zájem o amorfní API přesto v posledních letech stoupá, protože výhody spojené se zvýšenou rozpustností jsou značným benefitem při vývoji nových léčiv. (1)

## 1.3 Proces amorfizace

Procesem amorfizace se rozumí převedení látky (léčiva) z krystalické formy do amorfního stavu. Transformace z krystalické do amorfní formy vyžaduje, aby molekuly opustily své místo v dobře uspořádané krystalové struktuře, jedná se tedy o proces, který vyžaduje záměrný vstup vnější energie. Amorfizaci lze vysvětlit pomocí schématického grafu závislosti entalpie (nebo objemu) na teplotě, jak můžeme vidět na **obrázku 2**. U krystalického materiálu vidíme malý nárůst entalpie a objemu v závislosti na teplotě, což svědčí o určité tepelné kapacitě a koeficientu tepelné roztažnosti. Při dosažení teploty tání ( $T_m$ ) dochází ke skokové změně entalpie způsobené fázovým přechodem prvního řádu do kapalného stavu. V případě rychlého chlazení se hodnota entalpie snižuje podle rovnovážné linie křivky v grafu až do stavu podchlazené kapaliny. Při dalším ochlazování dojde k patrné změně sklonu křivky v charakteristickém bodě, který nazýváme teplota skelného přechodu ( $T_g$ ). Rovnovážné

vlastnosti kapaliny se při teplotě  $T_g$  odchyľují a vzniká sklovitý materiál neboli amorfni fáze.  $T_k$  je kritická teplota známá jako Kauzmannova teplota, označuje dolní hranici experimentálního skelného přechodu. (19, 20, 21)



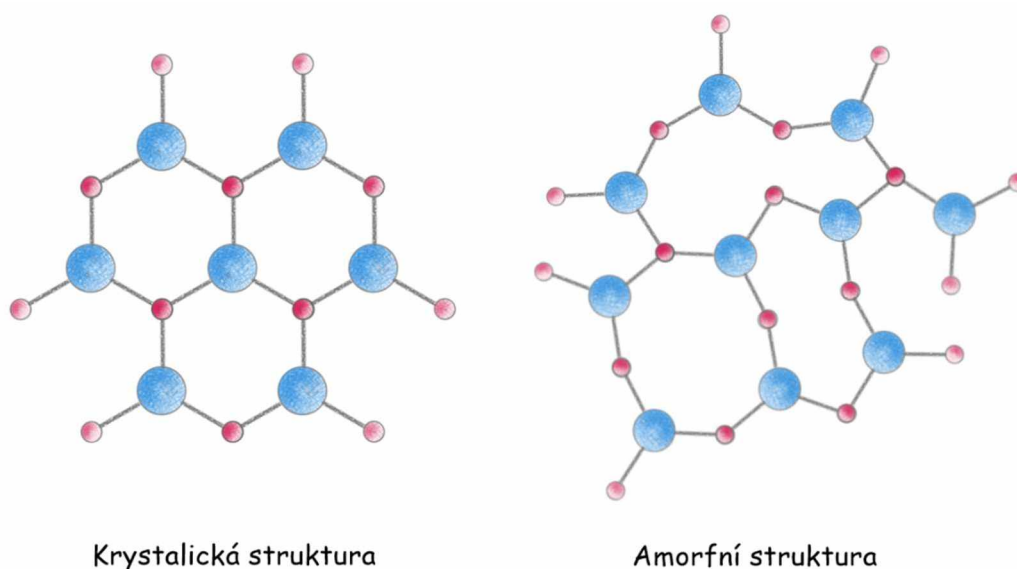
**Obrázek 2:** Grafické znázornění procesu amorfizace

Kromě metody HME a FDM 3D tisku, kterými se zabývá tato diplomová práce, existuje několik technik pro přípravu amorfniích forem ve farmaceutických systémech. Techniky můžeme rozdělit do dvou kategorií podle hlavních transformačních mechanismů. Ve většině případů se krystalický materiál zprostředkovaně přeměňuje na termodynamicky nestabilní nekystalickou formu, buď taveninu nebo roztok. Termodynamicky nestabilní amorfni pevný materiál je možné připravit ochlazením taveniny nebo rychlým vysrážením z roztoku např. sprejovým sušením, jehož principem je rychlé vysoušení kapaliny pomocí horkého plynu. Druhý mechanismus transformace zahrnuje přímou přeměnu pevné krystalické látky na amorfni. Příkladem je mechanická aktivace mletím, která ale nemusí způsobit úplné narušení molekulárního uspořádání, nebo přeměna prostřednictvím fázových přechodů, tzn. látku buď roztavit, rozpustit nebo odpařit. (19, 21)

Je třeba ovšem poznamenat, že různě připravená amorfni forma vykazuje různé vlastnosti. Rozdíly amorfniích forem nejsou pouze ve stabilitě, ale také na molekulární úrovni, což je možné zjistit pomocí spektroskopických metod nebo nukleární magnetické rezonance (NMR). K popisu existence odlišných amorfniích fází se používá termín polymorfismus. (22)

### 1.3.1 Amorfni léčiva

Amorfni forma farmaceutickych materiálů představuje nejenergičtější pevné skupenství, jež poskytuje výhody, pokud jde o rychlost rozpouštění a dobrou biologickou dostupnost. Existence léčiv a pomocných látek ve více fyzikálních formách umožňuje volbu preferované formy materiálu při výrobě lékových forem. Amorfni stav látky je charakterizován konformační dezorientací molekul, na rozdíl od krystalických látek, ve kterých jsou molekuly uspořádány do symetrických krystalických mřížek. Struktura látky je popisována jako molekulární uspořádání krátkého dosahu, postrádá jakoukoli translačně orientační symetrii dlouhého dosahu, která charakterizuje krystal. Rozdíl v uspořádání molekul je graficky znázorněn na **obrázku 3**. Dále jsou amorfni materiály charakterizovány teplotou skelného přechodu ( $T_g$ ), na které závisí jejich přechod z krystalické do amorfni formy, zvýšenou Gibbsovou volnou energií a molekulární mobilitou (1, 21)



**Obrázek 3:** Rozdílná struktura krystalické a amorfni fáze

Protože je krystalická forma stabilnější než amorfni stav, může docházet ke vzniku nukleárních zárodků vlivem příliš vysoké teploty a dojde k rekrystalizaci, k čemuž přispívá i nadměrná entropie, entalpie a volná energie. Jak již bylo uvedeno, procesu rekrystalizace lze zabránit tvorbou amorfni pevné disperze (ASD) pomocí několika výrobních procesů, mezi které patří právě již zmíněný 3D tisk. (1)

### 1.3.2 Amorfnní pevná disperze (ASD)

Tvorba ASD je preferovanou metodou pro stabilizaci amorfnních léčiv. Při této metodě se fyzikální stabilita zvyšuje přidáním polymerů s vysokým  $T_g$ , protože polymery snižují pohyblivost nepolymerních složek celého systému. ASD vzniká zahříváním polymeru, API a dalších pomocných látek na teplotu blízkou teplotě tání  $T_m$  a teplotě skelného přechodu  $T_g$  polymeru. Při běžném výrobním procesu vláken pomocí HME může dojít k úplné amorfizaci API, ale také může vlivem fyzikálních a mechanických omezení dojít pouze k částečné amorfizaci léčiva, a to v závislosti na použité teplotě. Je tomu tak proto, že viskozita roztavených směsí nesmí být příliš nízká, aby si vlákno zachovalo svůj tvar a konstantní průměr, a proto se používá teplota o něco nižší než  $T_m$  API. V dalším kroku, kdy se filament zavádí do 3D tiskárny, se tvorba ASD dokončí použitím vyšší teploty nad  $T_m$  API. U citlivých API musí být teploty používané během všech zahřívacích procesů nižší než teploty způsobující degradace léčiv. (1)

Kromě správně zvolené teploty musíme brát v úvahu rovněž mísitelnost mezi API, polymerem a dalšími přísadami. Mezimolekulární interakce mezi API a matricí na bázi polymeru jsou totiž zásadní pro přeměnu léčiva z krystalické do amorfnní formy. Mísitelnost složek také zajistí stabilitu pevné disperze tím, že zabrání fázové separaci a rekrystalizaci.

Lze tedy dovodit, že úspěšná tvorba ASD pomocí FDM 3D tisku závisí na různých faktorech, mezi které patří tepelné vlastnosti vybraného polymeru, jeho viskozita, tepelné a plastifikační vlastnosti API, rychlost teplotního zatěžování a také nastavení samotného procesu. (1)

Optimalizace procesu extruze a příprava vlákna použitelného pro 3D tisk je náročný proces, který je možno eliminovat použitím alternativní metody 3D tisku, tzv. drop-on-powder metodou. Principem je vstřikování kapiček inkoustu na práškové vrstvy. Kapalina taví částice prášku, což vede k porézním systémům. Tableta ve formě ASD je vyrobena v jediném kroku, ale kvůli možné rekrystalizaci API je spolehlivější metoda FDM. (2)

### 1.3.3 Charakterizace amorfní fáze a ASD

Amorfizaci léčiva a jeho disperzi v polymerní matrici získanou pomocí FDM 3D tisku je potřeba prokázat za použití vhodných technik. Efektivní charakterizace amorfních farmaceutických produktů vyžaduje multidisciplinární přístup s využitím komplementárních analytických metod. V běžné praxi velmi často používanými metodami jsou termické analýzy, jako je diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), nebo termogravimetrická analýza (TGA). (1)

DSC umožňuje určit fázové přechody měřením rozdílu tepelného toku mezi vzorkem a referencí. V rámci fázového přechodu dochází k absorbování nebo uvolnění energie, což je označováno jako endotermní či exotermní reakce. Pokud pozorujeme v získaném záznamu exotermní reakci jedná se o proces krystalizace, zatímco endotermní reakce ukazuje právě na požadovanou amorfizaci léčiva. (1)

TGA se obecně používá k měření kritických teplot, v tomto případě se jedná především o degradační teplotu vzorku API, která je zásadním parametrem při nastavení procesních teplot. Metoda spočívá v měření úbytku hmoty v závislosti na čase při konstantní rychlosti ohřevu. Často se jako doplnění používá rentgenová difrakční analýza (XRD), která ukáže, zda bylo dosaženo amorfního stavu. Získaným záznamem z XRD je difraktogram se specifickými vrcholy znázorňujícími krystalický materiál. Pokud bylo dosaženo amorfního stavu, rentgenové záření nedifraktuje, ale difunduje, takže se na difraktogramu neobjeví žádné píky. Možnou metodou je také prášková rentgenová difrakční analýza (pXRD), která prostřednictvím Braggových píků odhalí krystalinitu produktů. Látky v amorfním stavu nevykazují žádné Braggovy píky. (1, 3)

K dalšímu popisu ASD je možné využít spektrometrické analýzy, které zvýrazní interakce mezi polymerem a API. Jednou z možných technik je infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR), která je široce využívaným nástrojem. Dále lze použít Ramanovu spektroskopii nebo nukleární magnetickou rezonanci (NMR), které studují vzorek také na molekulární úrovni. (1, 21)



## 1.4 Filamenty s API

Vlákna (filamenty) s API je možné připravit několika způsoby. Jednou z možností je pasivní difúze, což znamená ponoření komerčně dostupných vláken do nasyceného roztoku obsahujícího léčivo. Metoda je snadná, ale použitelná pouze pro API s vysokým terapeutickým efektem, kde je adekvátní nízká dávka léčiva. Takto připravená vlákna dosahují nízkých procent obsahu léčiva, což je jistou nevýhodou pro jeho dávkování, zatížení léčivem obvykle nepřesahuje 2 %. Nicméně některé studie řeší kombinaci polymerů a rozpouštědel, které umožňují získat vlákno s vyšším obsahem léčiva, podle literatury dosahovaly nejvyšší výsledky 4 %. Ve studii Ayyoubi et al. (3) z roku 2021 byla připravena pasivní difúzí vlákna s obsahem nifedipinu (NFD), který má dobrou permeabilitu a nízkou rozpustnost ve vodě. Hydrofilní vlákno bylo zcela ponořeno do nasyceného roztoku NDF po dobu 8 hodin při pokojové teplotě, aby NDF mohl pasivně difundovat do vlákna. Poté byl filament sušen v sušárně při teplotě 40 °C přes noc, aby se zajistilo odpaření rozpouštědla, a před tiskem se vlákno sušilo další hodinu při 100 °C kvůli zvýšení mechanické pevnosti. Bylo získáno vlákno se zatížením NDF 4 % s hladkým povrchem, dobrou fyzikální pevností a homogenitou. (3)

Další a využívanější alternativou je výroba extruzí za tepla (HME). Metodou extruze je možné připravit filamenty až s 13krát vyšším obsahem léčiva, byly získány produkty s obsahem 50 až 60 % API (4). Kromě toho umožňuje HME přeměnu krystalické směsi na ASD, která zlepšuje uvolňování a tím i biologickou dostupnost špatně rozpustných léčivých látek. Mezi hlavní problémy při zpracování polymeru a API metodou HME patří tepelná stabilita léčiv a správné mechanické a reologické vlastnosti filamentů zajišťující možnost tisku. Vhodná kombinace API a polymerů s nízkou teplotou skelného přechodu (např. polykaprolakton), může vést ke snížení celkové teploty tání práškové směsi, a tím snížení rizika degradace účinné látky. I v této oblasti se začíná uplatňovat umělá inteligence. Jeden z výzkumů se snaží generovat požadované parametry a mechanické vlastnosti vláken pomocí specializovaného softwaru, který pracuje na základě učení umělé inteligence. (3, 4)

### 1.4.1 Polymery používané pro HME

Základní surovinou pro přípravu filamentů je termoplastický polymer působící jako nosič léčivé látky. V perorálních lékových formách s řízeným uvolňováním se používá hydrofilní polymer hypromelóza, který není možné zpracovat metodou HME kvůli jeho

vysoké  $T_g$ , vysoké viskozitě a nízké teplotě degradace. S rostoucím zájmem o 3D tisk pevných lékových forem byly studovány ve farmacii běžně používané polymery, jako je polyvinylpyrrolidon (PVP), Kollicoat IR (KIR), Soluplus (SLP), hydroxypropylcelulóza, polyuretan, hydroxypropylmethylcelulóza (HPMC), polyethylenoxid (PEO), ethylcelulóza (EC), deriváty kyseliny methakrylové a polyvinylalkohol (PVA), a to s ohledem na možnosti jejich zpracování metodou HME a následnou inkorporaci API. (2, 22, 23)

PVA je ve farmacii běžně využívaný polymer, často využívaný pro přípravu vláken právě metodou HME. I přesto, že je PVA považován za jeden z prvních syntetických polymerů, je mu stále věnována pozornost v řadě průmyslových oblastí, díky jeho jedinečným vlastnostem. Je dobře rozpustný ve vodě, má adhezivní schopnost k různým substrátům, není toxický, je dobře biologicky odbouratelný a biokompatibilní. PVA se v léčivých přípravcích používá již desítky let, a to primárně v perorálních lékových formách. (24)

Mezi běžně používaná vlákna pro FDM 3D tisk připravená metodou HME patří akrylonitrilbutadienstyren (ABS) a kyselina polymléčná (PLA). Termoplastický polymer ABS je vyrobený z ropy kombinací akrylonitrilu, butadienu a styrenu, a vzhledem ke své špatné biologické odbouratelnosti a mírné toxicitě není využíván ve farmacii, ale díky své houževnatosti, pevnosti a odolnosti proti nárazu našel uplatnění v automobilovém průmyslu. Oproti ABS je PLA termoplastickým polymerem, který má dobrou biologickou odbouratelnost a byl schválen pro použití ve farmaceutickém, lékařském a potravinářském průmyslu. (2)

V poslední době byl na trh uveden další polymer na bázi hydroxypropylmethylcelulózy (HPMC) speciálně navržený pro metodu HME nazvaný Affinisol™, který vykazuje jak dobrou tisknutelnost a tepelné vlastnosti, tak rozpustnost ve vodě. Je dostupný ve třech modifikacích, které mají nízkou teplotu skelného přechodu (přibližně 115 °C) a vysokou tepelnou stabilitu až 250 °C, což je jistou výhodou při extruzi. (25)

#### **1.4.2 Zatížení filamentů připravených metodou HME**

Jak již bylo zmíněno, nejvyužívanější metodou přípravy vláken pro farmaceutický průmysl je metoda HME, kterou je možné připravit vlákna s různým obsahem API. Obsah

léčiva má zásadní vliv na mechanické vlastnosti vlákna, především křehkost a elasticitu, a jeho vyšší zastoupení může učinit vlákno netisknutelným. (23)

Ve studii Joana Macedo et al. (23) byly vytvořeny a testovány filamenty s PVA a obsahem paracetamolu 0, 10, 30 a 50 %, přičemž žádné z vláken nevykazovalo povrchové vady, které by mohly negativně ovlivnit proces tisku. Nicméně mechanické testy prokázaly vyšší křehkost, stoupající s rostoucím obsahem paracetamolu. Metoda DSC ukázala, že polymer byl schopen amorfizovat paracetamol při obsahu pod 30 % a při zastoupení nad 30 % zůstala část léčiva v krystalickém stavu (23). Další výzkum testoval filamenty opět na bázi polymeru PVA, ale účinnou látkou byly mezoporézní materiály MMC a MCM-41. Bylo vyextrudováno vlákno s 30% obsahem léčiva, ale jeho vlastnosti neumožnily 3D tisk, a proto byl následně snížen obsah léčiva na 20 %, což umožnilo 3D tisk cylindrických tablet. (26)

Zatížení filamentů různým obsahem léčivé látky může způsobit změnu barvy či průhlednosti připravených vláken, jak je popsáno v publikaci Larsen et al. (25). V této studii bylo zjištěno, že s nárůstem lékové zátěže klesá průhlednost vláken. Změna může být způsobena nerozpuštěnými částicemi léčiva, jejichž heterogenní distribuce může být viditelná, může ovlivnit tisknutelnost filamentů a má vliv na mikrostrukturu tištěných produktů. Dalším problémem může být teplota tání API, která se s rostoucím obsahem léčiva snižuje, což naznačuje významnou mísitelnost mezi léčivem a polymerem. (25)

### **1.4.3 Stanovení obsahu léčiva ve vláknech**

Před extruzí vlákna se připravuje prášková směs všech předem navážených surovin ve vhodném poměru v závislosti na cíleném zatížení filamentů léčivem. V průběhu dávkování směsi do extrudéru může docházet k různým ztrátám, které mohou být způsobeny lepivostí směsi na dávkovací násypku nebo uvnitř extrudéru např. na šroub. Tyto ztráty by měly být co nejvíce omezeny, aby bylo dosaženo homogenního rozptýlení API v celém vlákně a aby byl splněn požadavek na obsahovou stejnoměrnost tištěné lékové formy. Z důvodu těchto ztrát se stanovuje skutečný obsah léčiva v připravených filamentech. Vhodnou metodou pro stanovení obsahu léčiva je vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC nebo Ramanova spektroskopie. (25)

#### 1.4.4 Stabilita filamentů

Jednou z možností využití výroby 3D tištěných lékových forem je zavedení této technologie přímo v lékárnách, které by tak mohly připravovat léky pacientům tzv. na míru, tedy podle jejich konkrétních potřeb. Problémem je však zatím složitost přípravy filamentů. Vhodným způsobem by bylo vyrábět vlákna v samostatném dodavatelském řetězci. Takový postup ale staví před vědce nový úkol, zajistit stabilitu filamentů při delším skladování a přepravě, protože amorfni lékové formy jsou známé jako termodynamicky nestabilní a mají tendenci rekrystalizovat. (17, 23)

Důležitým faktorem pro skladování je teplota a vlhkost ovlivňující plasticitu filamentů, což se projeví změnou jejich tepelných a mechanických vlastností. Tyto faktory mají také zásadní význam pro zachování amorfního stavu API. (23)

### 1.5 Metody použité v experimentální části

#### 1.5.1 Holt melt extruze (HME)

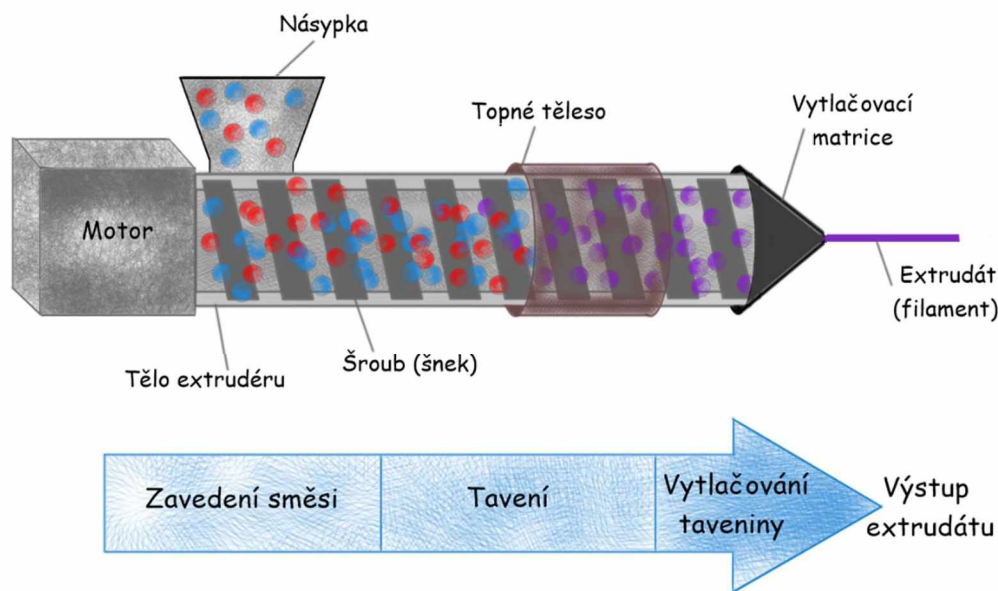
Holt melt extruze je metoda vytlačování taveniny za tepla. Jedná se o tepelné zpracování krystalických směsí složených z aktivní farmaceutické látky (API), polymeru a pomocných látek. Suroviny jsou prostřednictvím násypky dávkovány do extruderu, kde dochází k tavení, mletí, hnětení a promíchávání materiálu na molekulární úrovni. Zahřátím vzniká roztavená hmota, která je vytlačována přes matrici a následným tuhnutím vzniká vlákno neboli filament. (1, 4, 27)

Proces HME lze rozdělit do několika dílčích kroků (**obrázek 4**), kterými jsou: 1. zavedení fyzikální směsi do násypky; 2. posun materiálu do směřovacího prostoru, kde dochází k tavení; 3. vytlačování materiálu přes matrici; 4. výstup extrudátu a jeho následné zpracování. (27)

Samotný extrudér se skládá ze základního těla přístroje, kde dochází k tavení a míchání, dále z pomocných zařízení a kontrolních nástrojů. Mezi pomocná zařízení řadíme ohřívací nebo chladicí systém, který zajišťuje správné roztavení surovin, čerpadlo pro rozpouštědlo s chladicí tekutinou a řezací nebo tvarovací zařízení. Pro kontrolu procesu extruze slouží tepelná čidla, indikátor tlaku nebo regulátor otáček šneku. (1, 27)

Existuje několik druhů extrudérů, které se liší svou konstrukcí a mechanismem mísení směsi. Můžeme je rozdělit na radiální síta, beranidla a válcové nebo šnekové extrudéry. Mezi nejpoužívanější, co se týká farmaceutické technologie, patří extrudéry šnekové, které dále dělíme na jednošnekové (SSE), dvoušnekové (DSE) a vícešnekové (MSE). Rotující šroub neboli šnek pomáhá zajistit energii potřebnou ke změkčení materiálů a zajištění homogenní směsi. Jednošnekové přístroje mají jednoduchou konstrukci a často se využívají díky nízkým nákladům, ale oproti DSE a MSE mají omezenou míchací schopnost. V případě DSE a MSE můžeme rozdělit šneky podle směru otáčení na šrouby s prolínáním, kdy se hřídele točí ve stejném směru, a neprolínající se šrouby, které se otáčí v protisměru. (1, 27, 28)

Metoda HME se ukázala, jako jedna z vhodných technologií pro farmaceutický průmysl a její využití dále přibývá, díky jednotnému procesu, nákladové efektivitě, kontinuální výrobě produktu, možnosti automatizace a průmyslové proveditelnosti. Využívá se především pro vývoj 3D tištěných lékových forem obsahujících špatně rozpustná léčiva se špatnou biologickou dostupností, ale aplikuje se i při maskování chuti, nanotechnologiích, při výrobě tenkých filmů, granulaci práškových směsí a našla uplatnění i při výrobě veterinárních lékových forem. (27)

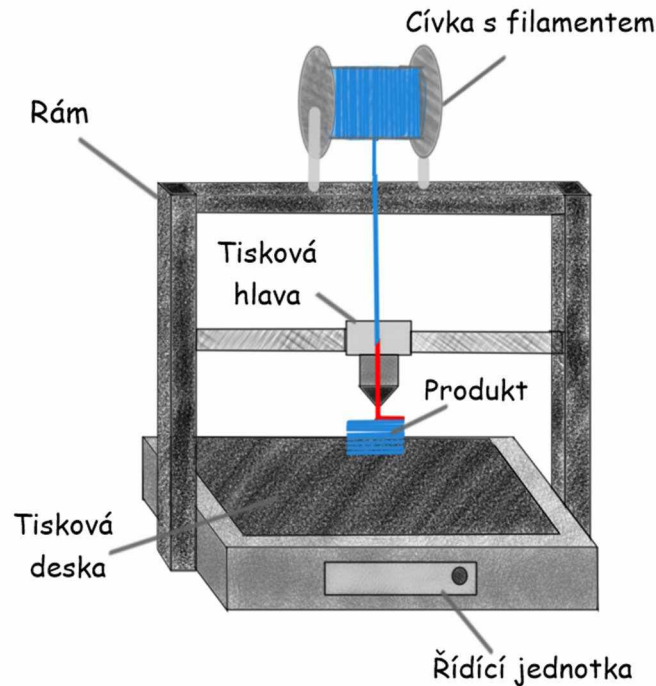


**Obrázek 4:** Konstrukce a průběh procesu HME

### 1.5.2 Fused deposition modeling (FDM)

Pro farmaceutickou výrobu je nejvíce prostudovanou technikou 3D tisku metoda FDM. Tato metoda je ve farmacii nejpoužívanější především díky své ekonomické i technologické dostupnosti, přesnosti při vytváření složitých tvarů a snadné výrobě lékových forem. Technika FDM je založena na extruzi vlákna na bázi polymeru, do kterého je možné zakomponovat API. Vlákno je roztaveno a protlačeno tryskou přesného průměru na topnou tiskovou platformu, kde se podle předem nastaveného programu nanáší po vrstvách do požadovaného tvaru objektu. (1, 4, 29)

FDM 3D tiskárna (**obrázek 5**) se skládá z tiskové hlavy neboli extrudéru, tiskové desky, rámu, motorů a řídicí jednotky. Masivní rám tiskárny je důležitou součástí pro zajištění bezpečné mobility, chrání tiskárnu před poškozením a zabraňuje nežádoucím vibracím při tisku. Do tiskové hlavy se zavádí tuhé vlákno prostřednictvím teflonové trubičky, která ho vede k extrudéru. Filament prochází jednotlivými částmi tiskové hlavy, kterými jsou heat sink (chladič) odvádějící přebytečné teplo, heat break zajišťující roztavení filamentu a heat block obsahující topná tělíska, která určují teplotu extruze. Pro zvýšení účinnosti chladiče je součástí tiskárny také ventilátor. Tisková hlava je zakončena extruzní tryskou, která roztavený materiál vytlačuje na vyhřívanou tiskovou desku. Mechanické pohyby tiskové hlavy a desky jsou zajištěny pomocí motorů, a to ve směrech kartézských souřadnic. Veškeré základní funkce tiskárny zabezpečuje řídicí jednotka, analyzuje a zpracovává tzv. G-kód ve kterém jsou zapsány všechny informace o procesu tisku. (30)



**Obrázek 5:** Konstrukční schéma FDM 3D tiskárny

Hlavním omezením pro tisk požadovaného produktu je správné nastavení parametrů procesu, jako je tloušťka vrstvy, úhel a šířka rastru, orientace sestavení, hustota výplně, rychlost tisku, vzor výplně, teplota vytlačování, průměr trysky, šířka obrysu a vzduchová mezera mezi obrysy. Orientaci na platformě určují tři osy X, Y a Z, přičemž jejich nastavení může mít významný vliv na pevnost produktů. Nanesené množství materiálu podél svislé osy označujeme jako výšku vrstvy, která závisí na průměru hrotu extrudéru a má vliv na ohybové vlastnosti výrobku. Rychlostí tisku se rozumí rychlost pojezdu trysky při ukládání materiálu nanášeného na podložku. Další možností, jak ovlivnit mechanické vlastnosti je změna hustoty výplně udávající objem materiálu dané komponenty a nastavení vzoru výplně, který může být například šestiúhelníkový, lineární nebo kosočtvercový. Pro udržení dobré tekutosti materiálu je velmi důležité nastavení optimální teploty vytlačování a její stabilita. Na těchto parametrech závisí kvalita tištěných produktů a jsou důležité pro efektivitu procesu FDM. (31)

Použití termoplastických polymerů a procesu tavení surovin nabízí možnost výroby amorfních pevných disperzí (ASD), které umožňují zlepšit rozpustnost špatně rozpustných léčiv, spadajících do II a IV. třídy biofarmaceutického klasifikačního systému (BCS). (1)

### 1.5.3 Disoluční zkouška

Jedná se o metodu testování pevných lékových forem, kterou se stanovuje množství uvolněné látky z tablet, tobolek nebo čípků v předepsaných časových intervalech. Lékové formy se v disolučním přístroji rozpouští v kapalných disolučních médiích, které mají předepsané složení. Podmínky provedení disoluční zkoušky jsou dány českým lékopisem, který určuje vhodné složení, objem, teplotu a rychlost proudění disolučních médií. Dále lékopis stanovuje způsob, množství a čas odběrů kapalného vzorku z aparatury. (32, 33)

Disoluční aparatury můžeme rozdělit na přístroje s míchadly nebo košíčky, s průtokovou celou a s vratným válcem. Jednotlivé části jsou vyrobeny z inertních materiálů, aby neadsorbovaly a nereagovaly s měřeným vzorkem, čímž by ovlivňovaly výsledky testů. V případě přístroje s míchadly nebo košíčky se jedná o válcovité nádoby, tzv. žaludky, z borosilikátového průhledného skla o objemu 1000 ml, které jsou přiklopené víkem zamezujícím vypařování média. Skrz víko prochází hnací hřídel, odběrový systém a popřípadě teploměr. Hnací hřídel zajišťuje proudění média, je poháněna motorovou jednotkou, která reguluje rychlost otáčení. Podle použité metody rozlišujeme, zda jsou na hřídeli, 25 mm ode dna nádoby, upevněna míchadla neboli pádélka nebo košíčky, do kterých se vkládá testovaná léková forma. Teplota disolučních médií se udržuje na úrovni  $37 \pm 0,5$  °C pomocí vyhřívané vodní lázně, ve které jsou skleněné žaludky ponořeny. K testování lipofilních lékových forem, jako jsou čípky či měkké želatinové tobolky, se spíše využívá disoluce s průtokovou celou, skrz kterou je hydraulickou pumpou protlačováno médium. Součástí přístroje je filtrační zařízení, které zabraňuje průchodu nerozpuštěných částic. (32, 34)

Před spuštěním disoluční zkoušky, jsou skleněné nádoby naplněny předepsaným objemem média a následně vytemperovány na  $37 \pm 0,5$  °C. Následně aplikujeme lékové formy do přístroje způsobem, který závisí na použitém typu přístroje. Při použití košíčků musí být léková forma vložena dovnitř a až poté je košíček upevněn na hnací hřídel a ponořen do nádoby, naopak v případě míchadel je možné vhodit lékovou formu přímo na dno nádoby. Na závěr před spuštěním je nutno nastavit parametry procesu, jako je frekvence otáček hřídele a časové intervaly, ve kterých jsou odebírány vzorky. Vzorek je odebírán ze středu nádoby přes filtr, aby neprošly nerozpuštěné částice, a následně je ve vzorku vyhodnocen obsah uvolněné API pomocí vhodné metody, např. UV-VIS spektrofotometrie. Výsledkem je závislost



množství uvolněné API na čase, která se kvantitativně vyhodnocuje pomocí vhodných matematických modelů. (32, 33)

V této práci byly použity tři následující matematické modely:

### **Model Weibull**

Současný tvar tohoto matematického modelu vznikl úpravou obecného empirického modelu distribuční funkce a pro kvantitativní vyhodnocení disolučních dat lze vyjádřit rovnici:

$$M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_w t^\beta))$$

kde  $M_t$  je uvolněné množství léčiva v čase  $t$ ,  $M_\infty$  je maximální možné množství uvolněného léčiva,  $\beta$  je parametr charakterizující tvar exponenciální křivky, když je  $\beta = 1$  jedná se o model I. řádu, a  $k_w$  je konstanta s rozměrem čas<sup>- $\beta$</sup> . V některých případech může docházet k rychlejšímu uvolňování léčiva na počátku disolučního testu tzv. „burst efektu“ a je vhodnější použít rovnici ve tvaru:

$$M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_w(t-T_l)^\beta))$$

kde  $T_l$  vyjadřuje prodlevu v uvolňování léčiva tzv. „lag time“, je to čas kdy se začne uvolňovat léčivo z lékové formy. Záporná hodnota parametru  $T_l$  značí „burst efekt“. (34)

### **Kinetický model I. řádu**

V případě kinetiky I. řádu dochází ke snižování množství léčiva v lékové formě v závislosti na čase a rychlost uvolňování léčiva s časem klesá, čehož se využívá při léčbě akutních stavů. Model lze psát ve tvaru:

$$M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_1 t))$$

kde  $M_t$  je uvolněné množství léčiva v čase  $t$ ,  $M_\infty$  je maximální možné množství uvolněného léčiva a  $k_1$  je rychlostní konstanta s rozměrem čas<sup>-1</sup>. (34)

### **Model Korsmeyer-Peppas**

Tímto modelem se prokládají data pouze do 60 % uvolněného množství léčiva. Jedná se o semi-empirický model ve tvaru:

$$M_t / M_\infty = k_{KP} t^n$$

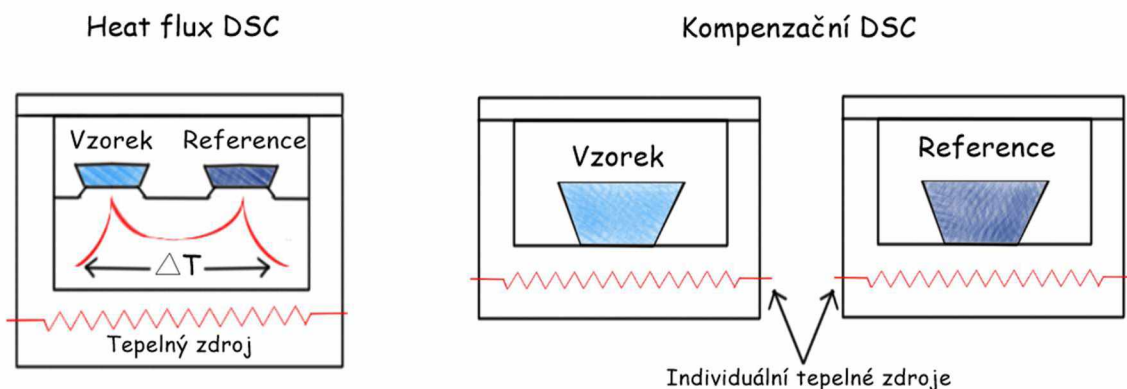
kde  $M_t$  je uvolněné množství léčiva v čase  $t$ ,  $M_\infty$  je maximální možné množství uvolněného léčiva,  $k_{KP}$  je rychlostní konstanta s rozměrem  $\text{čas}^{-n}$  a parametr  $n$  charakterizuje mechanismus uvolňování léčiva z lékové formy. V případě  $n = 0,5$  se jedná o transportní mechanismus „čisté“ difúze a pro  $n = 1$  se používá označení „Case-II transport“ odpovídající kinetice 0. řádu, jehož uvolňování léčiva je na základě bobtnání a relaxace řetězců nosného polymeru. Pokud jsou hodnoty parametru  $n$  mezi 0,5 a 1 mechanismus uvolňování se označuje jako anomální transport. (34)

Disoluční zkoušky jsou uplatňovány jako nástroj při vývoji léčiv, při zajišťování kontroly výrobního procesu, při uvolňování šarží, jako prostředek k odhalení potenciálních problémů s biologickou dostupností a k posouzení potřeby dalších bioekvivalenčních studií. V případě vývoje léčiv se disoluční zkouška používá pro výběr vhodné formulace pro testování v *in vivo*. Testování vyžadují i všechny léčivé přípravky před uvedením na trh, aby byla zajištěna jejich kvalita. Porovnání rozpouštěcích profilů se používá při posouzení stejných účinků již schváleného produktu a produktů, u kterých byly provedeny změny, nebo generických léčiv. (35)

#### 1.5.4 Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)

DSC je termoanalytická metoda používaná v materiálových vědách, kde se využívá k charakterizaci fyzikálních vlastností a identifikaci polymerů. Principem technologie je měření tepelného toku, tedy změny entalpie a tepelné kapacity, při vystavení materiálu řízeným změnám teploty, které iniciují fázové přechody. Získaným záznamem je tedy závislost tepelného toku na teplotě tzv. termogram, který poskytuje informace o charakteristických vlastnostech materiálu, kterými jsou teplota skelného přechodu ( $T_g$ ), nástup tání, teplota tání ( $T_m$ ), entropie a entalpie tání ( $\Delta H$ ), kterou je možné použít k výpočtu krystalinity, tj. podíl krystalického obsahu ve struktuře materiálu. Kalorimetrie zaujímá mezi ostatními metodami zvláštní místo, protože kromě své jednoduchosti a univerzálnosti poskytuje energetické charakteristiky, které mají jasný fyzikální význam, i když někdy může být jejich interpretace obtížná. Tato měření mohou být specifická pro konkrétní materiál a slouží k identifikaci vzorku různých směsí. Kromě toho jsou hodnoty entalpie získané z termogramu úměrné hmotnosti, což umožňuje výpočet procentuálního zastoupení substancí ve směsi. (36)

Metodu DSC můžeme rozdělit na dvě odlišné techniky, a to kompenzační DSC a heat flux DSC. Je třeba zdůraznit, že obě tyto techniky poskytují podobné výsledky, ale mají samozřejmě své výhody a nevýhody. DSC má obvykle dvě polohy vzorku, jednu pro zkoumaný vzorek a druhou pro referenční vzorek, což je často prázdný kelímek nebo kelímek naplněný inertním materiálem. Tepelný tok není měřen přímo, ale je vypočítán z teplotních rozdílů vzniklých mezi vzorkem a referencí. Technologie heat flux je konstrukčně jednodušší, kelímky sloužící pro umístění vzorků jsou na jedné platformě s jedním tepelným zdrojem a systém je uzavřen jedním víkem, na rozdíl od kompenzační DSC (**Obrázek 6**). U této varianty má každý kelímek vlastní tepelný zdroj a oba systémy jsou uzavřeny vlastním víkem. (37, 38)



**Obrázek 6:** Konstrukční rozdíl mezi heat flux a kompenzační DSC

Jednotlivá měření závisí na nastavení teplotního programu. Experiment může probíhat při konstantní rychlosti ohřevu či chlazení, při konstantní teplotě neboli izotermně a při modulovaném teplotním programu, kde je možné nastavit vhodnou kombinaci ohřevu, chlazení a izotermního režimu. (38)

DSC je dobře zavedená technika používaná v oblasti materiálových věd, v oblasti polymerů při vývoji nebo testování plastových výrobků a také ve forenzní analýze. Metodu je možné využít i ve farmaceutickém průmyslu k analýze pevných lékových forem připravených například technologií FDM 3D tisku. (36)

### 1.5.5 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je analytická metoda založená na Ramanově rozptylu světla. Působením světla na molekuly je prostřednictvím fotonů dodána energie způsobující krátkou excitaci atomů. Získaná energie je následně vyzářena v podobě fotonů a dochází k rozptylu. Rozptyl může být pružný (Rayleighův rozptyl), když nedochází ke změně energie, nebo nepružný (Ramanův rozptyl) kdy se energie fotonů mění. Ramanův rozptyl je oproti Rayleighovu rozptylu slabší a je těžší ho zachytit, ale nese analytické informace o atomech a molekulách. (39)

Podle změny energie vyzářeného fotonu a fotonu který excitoval atom rozlišujeme Ramanův rozptyl na Stokesův a Anti-Stokesův. V případě Stokesova rozptylu má vyzářený foton energii nižší a při Anti-Stokesově rozptylu vyšší, ale jedná se o slabší efekt a z toho důvodu je zásadnější rozptyl Stokesův. (40)

Měřením jsou získána spektra, která jsou záznamem Ramanova rozptylu v závislosti na vlnové délce záření. Spektra se zobrazují v grafu, kde na ose x je vynášen Ramanův posun, rozdíl vlnočtů budícího a rozptýleného záření, a na ose y je intenzita záření těchto rozdílů vlnočtů v jednotkách a. u. (arbitrary units). Ve spektrech jsou zachyceny pásy, které jsou charakteristické pro dané látky a slouží k jejich identifikaci. (39)

Jedná se o nedestruktivní metodu, lze měřit organické i anorganické látky všech skupenství, vzorky nemusí být nijak speciálně připraveny a jsou proměřeny během několika sekund. Ramanova spektroskopie se využívá v mnoha odvětvích jako je geologie, umění a renovace památek, výzkum polovodičů, nanotechnologie, biomedicínské aplikace, forenzní vědy a v neposlední řadě farmaceutický průmysl. (39)

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Cíle práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo převedení krystalických forem vybraných biologicky aktivních sulfonamidů (API) do amorfního stavu za účelem zvýšení rozpustnosti.

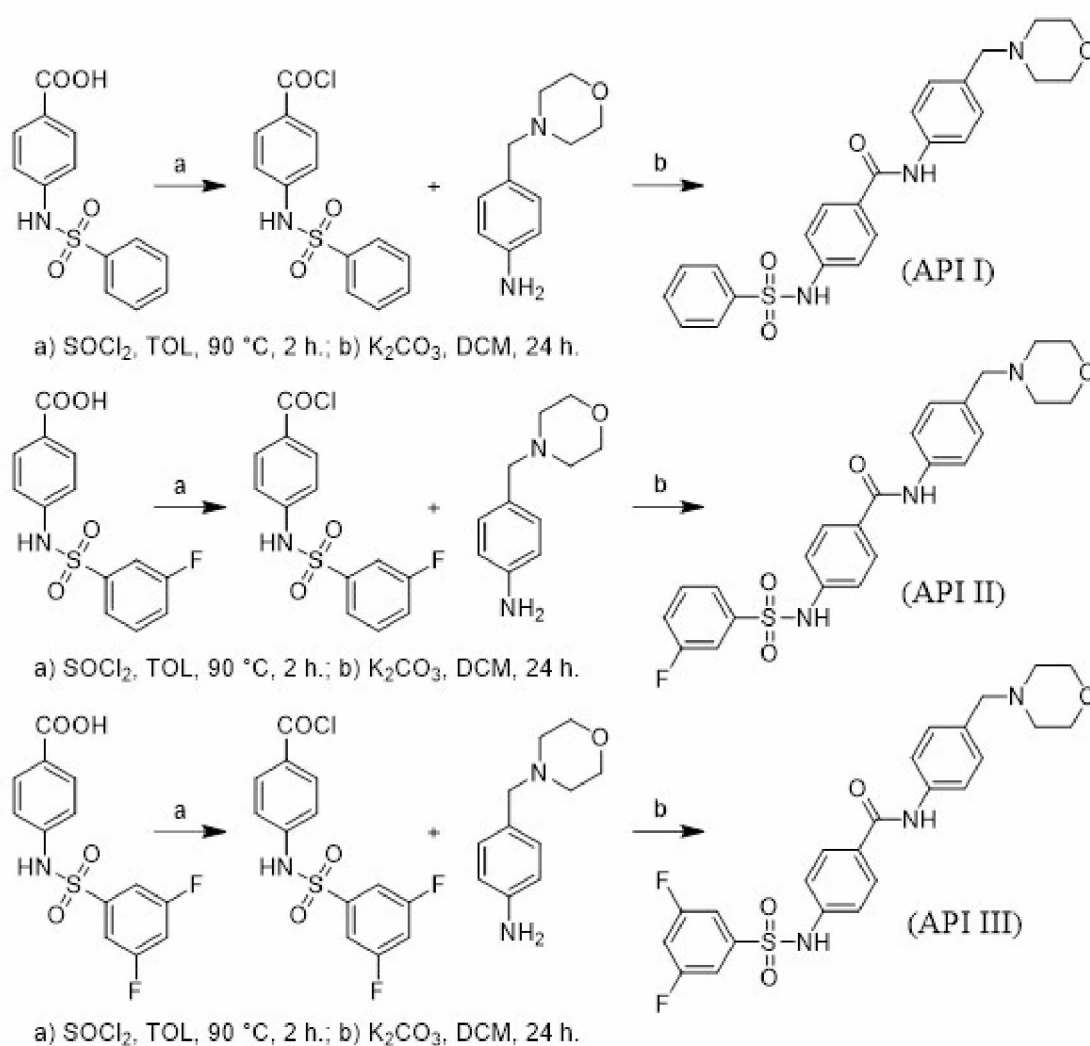
K dosažení tohoto hlavního cíle bylo zapotřebí splnit několik dílčích úkolů:

- optimalizace procesu HME s ohledem na přípravu filamentů na bázi hydroxypropylmethylcelulózy (HPMC) s inkorporovaným léčivem
- optimalizace a následná příprava tablet s inkorporovaným léčivem (sulfonamidy) pomocí FDM 3D tisku
- charakterizace disolučního chování připravených tablet pomocí disolučních testů vyrobených tablet ve vybraných médiích
- vyhodnocení získaných disolučních profilů
- analýza jednotlivých produktů pomocí DSC a Ramanovy spektrometrie

## 2.2 Syntéza vybraných sulfonamidů

Vybrané sulfonamidy použité jako účinné látky pro přípravu filamentů byly syntetizovány ve spolupráci s Ústavem organické chemie a technologie (Ing. Marie Nevyhoštěná) podle následujícího schématu (**obrázek 7**). Jedná se o 3 látky, u nichž byla prokázána biologická aktivita. (40)

- 1: N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)-4-(fenylsulfonamido)benzamid
- 2: 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid
- 3: 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid



**Obrázek 7:** Schéma syntézy vybraných sulfonamidů

### **První reakční krok:**

2 g výchozí látky (kyseliny) byly převedeny na chlorid pomocí 10 ml  $\text{SOCl}_2$ . Reakce probíhala v 60 ml toluenu v kulaté reakční baňce, která byla zahřívána na teplotu 90 °C po dobu 2 hodin. Po zpracování reakční směsi byly produkty (chloridy) použity do dalšího reakčního kroku.

### **Druhý reakční krok:**

Připravené chloridy reagovaly s výchozím aminem za vzniku požadovaných finálních sloučenin. 1 eq. chloridu výchozí kyseliny byl rozpuštěn v 50 ml DCM, k tomu byl přidán 1 eq. výchozího aminu rozpuštěný v 5 ml DCM a 1,15 eq.  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , rozpuštěný v 5 ml destilované vody. Reakční směs byla míchána 1 den ve 100 ml kulaté baňce a následně zpracována. Po zpracování reakční směsi byla provedena rekrystalizace z methanolu.

## **2.3 Holt melt extruze (HME)**

### **2.3.1 Laboratorní přístroje a pomůcky**

- laboratorní váha Sartorius H 120–D (Sartalex s.r.o, Ústí nad Labem)
- Homogenizátor: V-mixér (Filtra Vibracion, Barcelona, Španělsko)
- extrudér Noztek Touch (Noztek, Shoreham, UK)
- běžně používané laboratorní sklo a pomůcky

### **2.3.2 Použité chemikálie**

- Affinisol™ HPMC HME 15 LV (The Dow Chemical Company, Michigan, USA)
- N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)-4-(fenylsulfonamido)benzamid (API I)
- 4-((3-fluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid (API II)
- 4-((3,5-difluorfenyl)sulfonamido)-N-(4-(morfolinomethyl)fenyl)benzamid (API III)

### **2.3.3 Příprava fyzikálních směsí pro HME**

V rámci diplomové práce byla pomocí HME připravována vlákna na bázi HPMC (Affinisol™) s obsahem 10 a 20 % (hm.) vybraných sulfonamidů (API). Na jeden cyklus extruze bylo navažováno na předvážkách vždy celkem 20 g směsi. Složení směsi je uvedeno v Tabulce 1. Homogenizace fyzikálních směsí byla prováděna na V-mixéru po dobu 5 minut rychlostí 20 otáček za minutu. Výše uvedeným postupem byly připraveny 4 druhy směsí dle **Tabulky 1**.

**Tabulka 1:** Složení extrudovaných směsí (v gramech na jeden cyklus extruze)

Formulace	Affinisol™ [g]	(API I) [g]	(API II) [g]	(API III) [g]
Blank	20	-	-	-
10 % API I	18	2	-	-
10 % API II	18	-	2	-
10 % API III	18	-	-	2
20 % API I	16	4	-	-

### 2.3.4 Extruze filamentů

Homogenizované směsi byly postupně dávkovány do extrudéru (**obrázek 8**) prostřednictvím násypky. Pro vytvoření dostatečné délky vlákna (800 cm), byly zapotřebí dvě až tři dávky směsi, jejichž obsah je popsán v kapitole 2.3.3. Extrudér má dvě topná tělesa, horní a dolní, jejichž teploty byly nastaveny v rozmezí 135-145 °C a 140-150 °C. Dále byla nastavena rychlost otáček šroubu na 25 otáček za minutu a byla použita vytlačovací matrice o průměru 1,75 mm. Bylo připraveno 5 formulací filamentů potřebných pro 3D tisk, které byly uloženy ve vzduchotěsných obalech a uschovány před přímým slunečním svitem.



**Obrázek 8:** Extrudér Noztek Touch



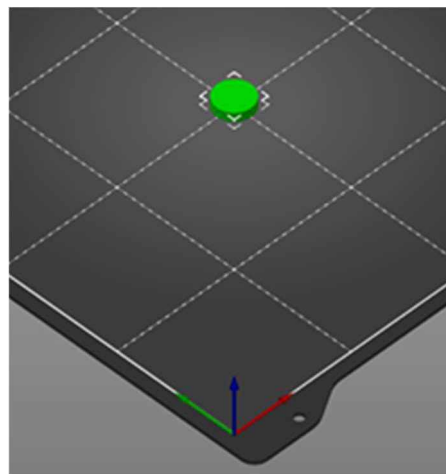
## 2.4 Fused deposition modeling (FDM)

### 2.4.1 Laboratorní přístroje a software

- FDM 3D tiskárna Original Prusa i3 MK3S+ (Prusa Research a.s., Praha, ČR)
- analytické váhy KERN ALT 310-4AM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Prusa slicer – optimalizace podmínek 3DP, export g-kódu (Prusa Research a.s., Praha, ČR)

### 2.4.2 Návrh tablet pro 3D tisk

Tablety byly navrženy v programu Prusa slicer (**obrázek 9**). V programu se vytvoří vizualizace požadovaného objektu, program umožňuje nastavit geometrii, velikost a strukturu tablety. Dále se v programu nastavují procesní parametry, jako je např. teplota 3D tisku. Průměr tištěných tablet byl 13 mm (zvoleno na základě rozměrů běžných komerčně dostupných tablet). Výška tablety a hustota výplně (80 %) byla zvolena tak, aby vytištěná tableta měla požadovanou hmotnost  $500 \pm 5$  mg.



**Obrázek 9:** Návrh tablety v programu Prusa slicer

### 2.4.3 Průběh FDM 3D tisku

V prvním kroku byla připravená vlákna vyextrudovaná metodou HME zavedena do 3D tiskárny (**obrázek 10**). Po spuštění tisku prochází tuhý filament tiskovou hlavou, kde se zahřívá, měkne a extruzní tryskou o průměru 0,4 mm je vytlačován na tiskovou podložku. Podložka je zahřívána na teplotu 90 °C, aby se zabránilo příliš rychlému tuhnutí vrstev a bylo zajištěno dobré přilnutí jednotlivých vrstev na sebe. Tisková hlava se pohybuje ve směru tří os dle kartézské soustavy, což umožňuje vrstvení materiálu do zvolené formy tablety. 3D tisk

všech formulací probíhal při teplotě 195 °C a parametr násobič extruze byl nastaven na hodnotu 1. Všechny připravené tablety byly zváženy na analytických vahách pro ověření jejich hmotnosti  $500 \pm 5$  mg.



**Obrázek 10:** FDM 3D tiskárna Original Prusa i3 MK3S+

## 2.5 Disoluční zkouška

### 2.5.1 Laboratorní přístroje, pomůcky a software

- běžně používané laboratorní sklo a pomůcky
- 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) a košíčky pro aparaturu Sotax AT
- UV-Vis spektrometr Aligent 8453 (Aligent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn, Německo) a kyveta z křemenného skla 5 mm
- GraphPad Prism – statistické vyhodnocení dat (GraphPad Software, San Diego, USA)

### 2.5.2 Použité chemikálie a roztoky

- Dihydrogenfosforečnan draselný p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, ČR)
- Hydroxid sodný p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, ČR)

- Chlorid sodný p. a. (Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, ČR)
- Kyselina chlorovodíková 35 % p. a. (PENTA s. r. o., Praha, ČR)
- redestilovaná voda

### 2.5.3 Příprava disolučních médií

Pro disoluční test byla dle požadavků Českého lékopisu (33) připravena různá níže specifikovaná média o pH 1,2; 4,5 a 6,8 simulující specifické části trávicího traktu člověka, tedy prostředí žaludku, dvanáctníku a tlustého střeva.

#### **Disoluční médium o pH 1,2:**

Médium o pH 1,2 bylo připraveno do dvoulitrové odměrné baňky smícháním 500 ml připraveného roztoku chloridu sodného o koncentraci 0,2 mol/l a 850 ml kyseliny chlorovodíkové o stejné koncentraci. Odměrná baňka byla doplněna redestilovanou vodou po rysku do výsledného objemu 2000 ml.

#### **Disoluční médium o pH 4,5:**

Pro přípravu média o pH 4,5 bylo naváženo 27,22 g dihydrogenfosforečnanu draselného, který byl kvantitativně převeden do dvoulitrové odměrné baňky a rozpuštěn v 1500 ml redestilované vody. Pomocí hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/l bylo pH upraveno dle potřeby. Výsledný roztok byl doplněn redestilovanou vodou do výsledného objemu 2000 ml.

#### **Disoluční médium o pH 6,8:**

Médium o pH 6,8 bylo připraveno do dvoulitrové odměrné baňky smícháním 500 ml připraveného roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného o koncentraci 0,2 mol/l a 224 ml připraveného roztoku hydroxidu sodného o stejné koncentraci. Odměrná baňka byla doplněna redestilovanou vodou po rysku do výsledného objemu 2000 ml.

### 2.5.4 Průběh disoluční zkoušky

Disoluční testy probíhaly v aparatuře SOTAX AT7 Smart (**Obrázek 11**) a byly provedeny dle podmínek Českého lékopisu (33) v pádélkovém uspořádání. Před každým testem bylo nejprve odměřeno 900 ml daného disolučního média do jednotlivých nádob umístěných ve vodní lázni v disoluční aparatuře. Disoluční média byla vyhřívána a udržována při teplotě  $37 \pm 0,5$  °C po celou dobu disoluční zkoušky, která probíhala 24 hodin. Frekvence otáčení pádélky, tedy míchání, byla nastavena na 100 rpm.

Disoluční test tablet 10 % API I byl proveden ve třech médiích (pH 1,2; 4,5 a 6,8) simulujících různá prostředí GITu. Ostatní formulace (10 % API II, 10 % API III a 20 % API I) byly testovány pouze ve dvou mediích (pH 1,2 a 6,8).

V daných intervalech probíhal automatický odběr vzorků, jejichž objem byl vždy 3 ml. První tři odběry byly realizovány po 10 minutách, následovaly tři odběry po 30 minutách a poté byly odebírány vzorky každou hodinu. Celkem bylo vždy odebráno 28 vzorků z každé nádoby, což bylo zohledněno při dalších výpočtech (korekce na objem). V odebraných vzorcích pak bylo stanoveno uvolněné množství léčiva pomocí UV/VIS spektrometrie.



**Obrázek 11:** Disoluční aparatura Sotax AT 7 Smart

### 2.5.5 UV/VIS spektrometrie

V odebraných vzorcích bylo pomocí UV/VIS spektrometrie stanoveno uvolněné množství léčiva na základě Lambert-Beerova zákona. Pro měření absorbance byla zjištěna hodnota absorpčního maxima dané látky v příslušném pH. Měření absorbance probíhalo při tříbodové korekci pozadí a její hodnota byla odečítána proti hodnotě absorbance blanku. Naměřené absorbance byly přepočítány na procenta uvolněné účinné látky pomocí metody kalibrační křivky a procenta byla vynesena v závislosti na čase, čímž byl získán disoluční profil léčiva. Disoluční profily byly pomocí matematických modelů kvantitativně vyhodnoceny.

### 2.5.6 Kalibrační křivka

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky účinných látek o koncentraci 100 mg/l, z nichž byly pomocí dvojkového ředění připraveny kalibrační řady roztoků o koncentraci 50, 25, 12,5 a 6,25 mg/l. Pro látku API I byly použity kalibrační řady v disolučních médiích o pH 1,2; 4,5 a 6,8; pro zbylé dvě látky API II a API III pouze v médiích o pH 1,2 a 6,8. Vzorky byly proměřeny pomocí UV/VIS spektrometrie a byly vytvořeny kalibrační grafy (**viz příloha 1-4**), do nichž byla vynesena lineární závislost získané absorbance na koncentraci léčiva. Byly získány následující rovnice lineární regrese, které sloužily pro přepočítání absorbance vzorků z disolučních testů na procenta uvolněného léčiva. Pro látku API I byly kalibrační rovnice převzaty z diplomové práce Marie Nevyhoštěné (40).

#### Látka API I

- pH 1,2:  $A = 0,0156 c - 0,002$  kde  $c$  [mg/l]
- pH 4,5:  $A = 0,0158 c - 0,0012$  kde  $c$  [mg/l]
- pH 6,8:  $A = 0,0124 c - 0,0116$  kde  $c$  [mg/l]

#### Látka API II

- pH 1,2:  $A = 0,0112 c - 0,0006$  kde  $c$  [mg/l]
- pH 6,8:  $A = 0,0018 c + 0,0083$  kde  $c$  [mg/l]

#### Látka API III

- pH 1,2:  $A = 0,0129 c - 0,0046$  kde  $c$  [mg/l]
- pH 6,8:  $A = 0,0011 c - 0,0006$  kde  $c$  [mg/l]

## **2.6 DSC a Ramanova spektroskopie**

### **2.6.1 Laboratorní přístroje**

- Diferenční skenovací kalorimetr DSC Q2000
- DXR2 Raman microscope (Nicolet, Thermo Fisher Scientific)

### **2.6.2 DSC**

Pro ověření amorfizace účinných látek byla provedena termická analýza pomocí diferenční skenovací kalorimetrie. Této analýze bylo podrobena 8 vzorků, kterými jsou čistý krystalický AFF, filament z AFF, tableta z AFF, čistá krystalická látka API I, filament 10 % API I, tableta 10 % API I, filament 20 % API I a tableta 20 % API I. Z každého vzorku bylo naváženo přibližně 5 mg do speciálního pinhole lowmass hliníkového kelímku, který byl následně hermeticky uzavřen studeným svářem. Takto připravené kelímky se vzorky byly vloženy do přístroje. Diferenční skenovací kalorimetr DSC Q2000 byl před měřením kalibrován pomocí standardů In, Zn a Ga. DSC přístroj je vybavený autosamplerm, který zajišťuje automatické proměření všech vložených vzorků. Měření probíhalo neizotermně při rychlosti ohřevu 5 °C/min v atmosféře statického vzduchu. Zpracováním naměřených dat byl získán graf závislosti tepelného toku na teplotě, který byl následně vyhodnocen.

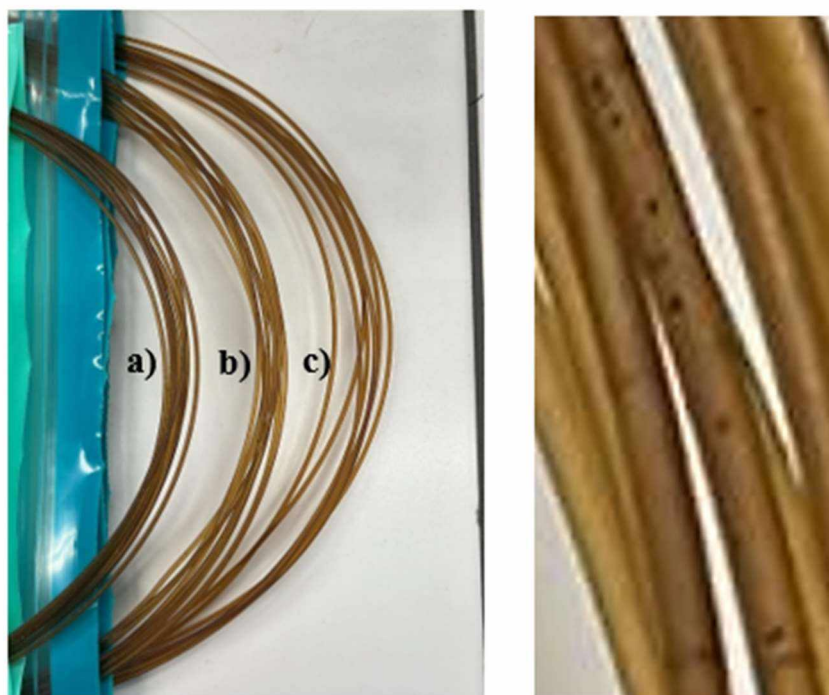
### **2.6.3 Ramanova spektroskopie**

K další charakterizaci studovaných materiálů byla použita Ramanova spektroskopie. Proměřeno a charakterizováno bylo celkem 8 vzorků, kterými jsou čistý krystalický AFF, filament z AFF, tableta z AFF, čistá krystalická látka API I, filament 10 % API I, tableta 10 % API I, filament 20 % API I a tableta 20 % API I. Na rozdíl od DSC nemusely být vzorky před měřením nijak speciálně upravovány. Přístroj byl vybaven CCD detektorem a laserem o vlnové délce 785 nm. Měření probíhalo při síle laseru 25 mW a bylo provedeno 200 scanů do každého spektra, trvání každého scanu bylo 3 s. Získaná spektra byla vložena do jednoho grafu, který byl vyhodnocen.

## 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 3.1 Extruze filamentů

Metodou HME bylo připraveno 5 typů filamentů, jak již bylo popsáno v kapitole 2.3. Všechna připravená vlákna dosahovala přibližné délky 800 cm, byla pružná, hladká a kompatibilní s 3D tiskem. I přes to že při extruzi byla použita vytlačovací matrice o průměru 1,75 mm, vlákna neměla ve všech místech stejný průměr, což mělo vliv pro následný 3D tisk.



**Obrázek 12:** Vlevo – vlákna formulací a) 10 % API I, b) 10 % API II a c) 10 % API III; vpravo – přiblížení vlákna b)

Na **obrázku 12** jsou zobrazena tři vlákna formulací 10 % API I, 10 % API II a 10 % API III. Vlákna mají hnědou barvu, vlákno 10 % API I je o něco tmavší. Filament čisté látky AFF byl o něco světlejší oproti ostatním formulacím a naopak filament 20 % API byl ze všech nejtmavší. Ve vláknech byly pozorovány nehomogenity (tmavé skvrny), které by mohly být způsobeny degradací nosného polymeru (Affinisol™) během teplotního zatížení při extruzi nebo neúplnou amorfizací krystalických účinných látek.



### 3.2 3D tisk tablet

Všechny typy připravených vláken bylo možné bez problémů zavést do 3D tiskárny a vytisknout tablety požadované geometrie a hmotnosti. Proces 3D tisku bylo potřeba optimalizovat s ohledem na požadovanou geometrii tablety. Optimalizace probíhala prostřednictvím zkušebních tisků, z nichž první tableta byla vytištěna z komerčně dodávaného šedého vlákna PLA o průměru 1,75 mm, a poté následoval tisk série tablet z formulace 10 % API I (**Obrázek 13**).



**Obrázek 13:** Optimalizace tisku

Díky optimalizaci parametrů se podařilo vytisknout tablety všech formulací o průměru 13 mm, které byly hladké a pevné, ale kvůli nestálému průměru extrudovaných vláken nebylo možné nastavit jednu výšku všech tablet, tak aby hmotnost tablet byla vždy  $500 \pm 5$  mg. Výška tištěných 3D tablet byla měněna v závislosti na průměru vlákna a pohybovala se mezi 3,55 – 4,2 mm.

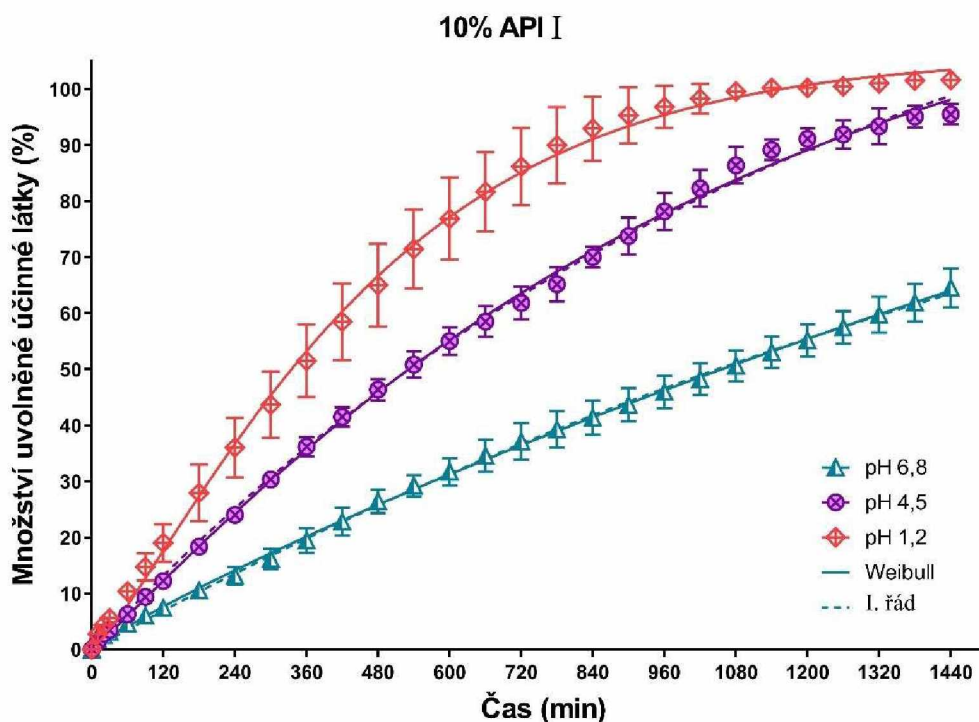
### 3.3 Disoluční zkouška tištěných tablet

Dle podmínek Českého lékopisu (33) byly provedeny disoluční testy všech formulací 3D tištěných tablet (viz kap. 2.5.4). Uvolněné množství účinné látky bylo stanoveno pomocí UV/VIS spektrometrie (viz kap. 2.5.5). S použitím softwaru GraphPad Prism byla statisticky vyhodnocena data a byly vytvořeny grafy disolučních profilů představující procenta uvolněné účinné látky v závislosti na čase. Získané disoluční profily byly pomocí vhodných matematických modelů kvantitativně vyhodnoceny.



### 3.3.1 Disoluční profily

V následujících šesti grafech jsou zobrazeny disoluční profily všech studovaných formulací v daných pH, proložené matematickými modely Weibull, I. řád a Korsmeyer-Peppas. Jejich regresní analýza je shrnuta v následující kapitole 3.3.2.



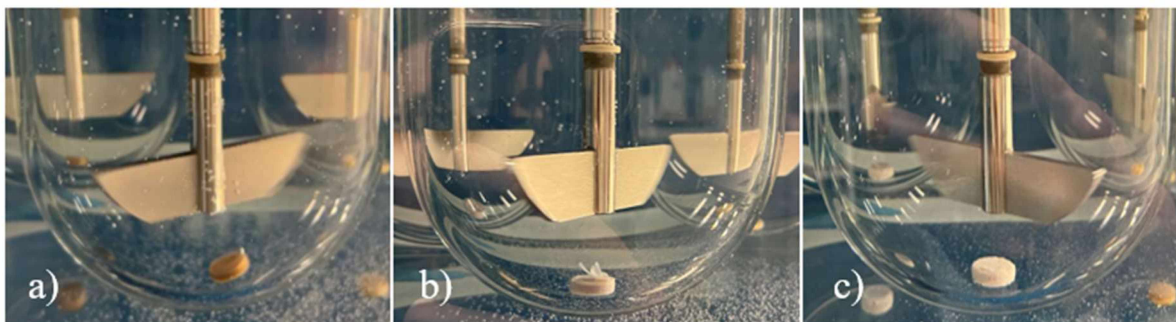
**Graf 1:** Disoluční profily formulace tablet 10 % API I v pH 1,2; 4,5 a 6,8 proložené modelem Weibull a I. řád

V **grafu 1** jsou uvedeny disoluční profily tablet s účinnou látkou API I (10% zatížení léčivem) v pH 1,2; 4,5 a 6,8. U všech získaných disolučních profilů byla provedena regresní analýza (model Weibull a I. řád), přičemž v prostředí o pH 1,2 a 4,5 byly získány vyšší hodnoty koeficientu  $R^2$  pro model Weibull, v prostředí o pH 6,8 bylo nejvyšší hodnoty  $R^2$  dosaženo pro model I. řádu. Souhrn regresní analýzy je uveden v kapitole 3.3.2 (**tabulka 2 a 3**).

Nejlépe se tablety rozpustily v médiu o pH 1,2, kde bylo dosaženo 100 % uvolněné účinné látky. Dobrá rozpustnost byla prokázána také v prostředí o pH 4,5 kde množství uvolněné účinné látky bylo přes 90 %, na rozdíl od pH 6,8, ve kterém se tableta viditelně špatně rozpouštěla a účinné látky bylo uvolněno kolem 60 %.

Na **obrázku 14** je zachycen průběh disoluce v pH 6,8, kde je patrné, že 20 minut po spuštění disoluce začala tableta měnit barvu z hnědé na bílou a po 4 hodinách už byla zcela

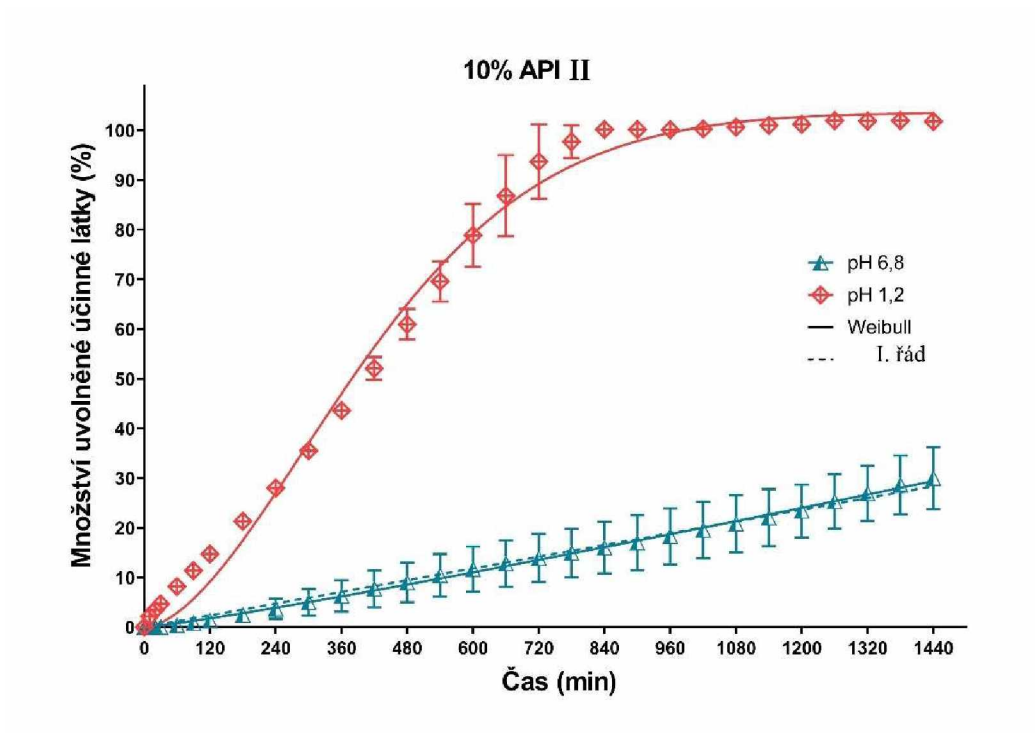
bílá a lehce zvětšila svůj objem. Po 24 hodinách byla disoluční zkouška ukončena a z nádob byly pomocí pinzety vytaženy zbytky nerozpuštěných tablet, které byly bílé a jejich původní pevná forma se proměnila v gumovou lepkavou konzistenci (**obrázek 15**). Analýza nerozpuštěných zbytků tablet bude předmětem další studie.



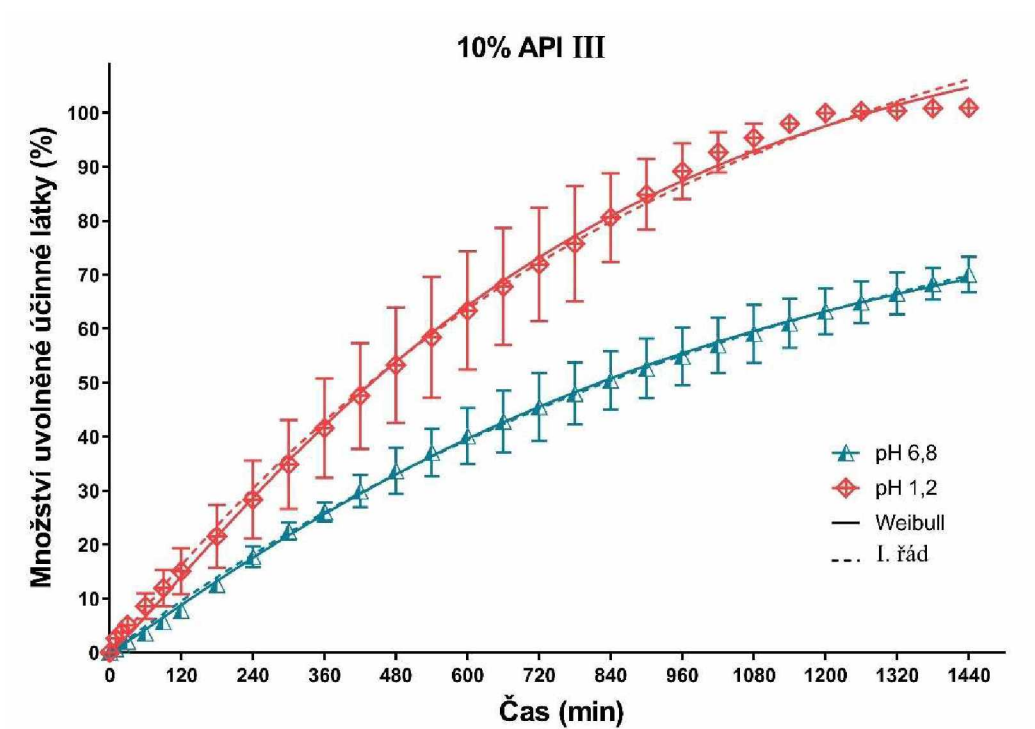
**Obrázek 14:** Průběh disoluce tablet 10 % API I v pH 6,8; a) 1 minuta po spuštění; b) 20 minut po spuštění; c) 4 hodiny po spuštění



**Obrázek 15:** Zbytky nerozpuštěných tablet 10 % API I po disoluci v pH 6,8



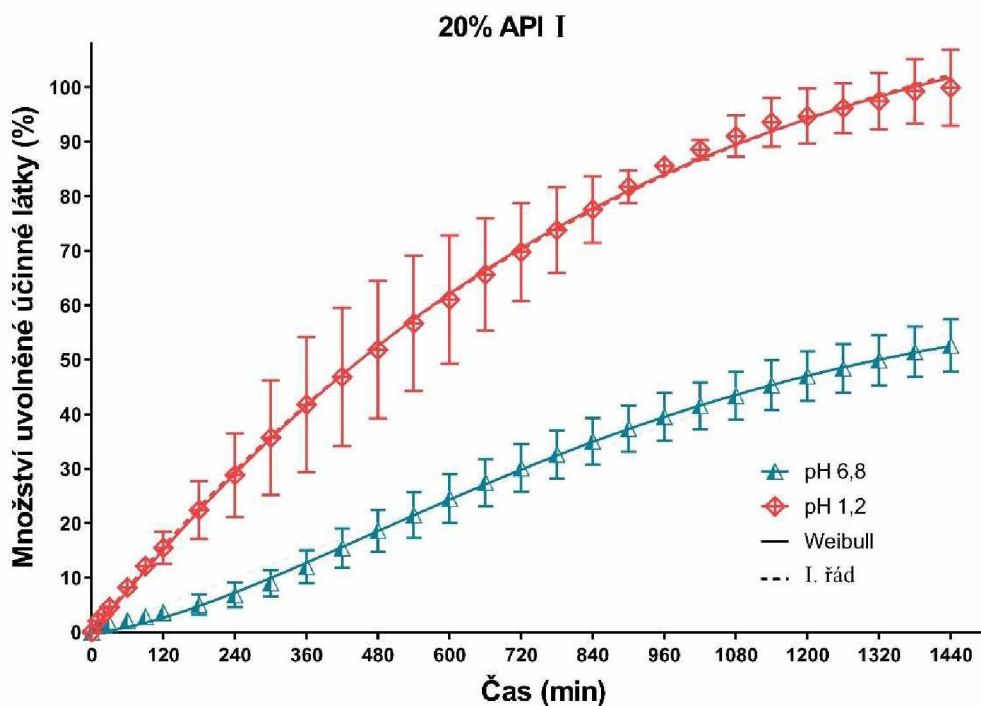
**Graf 2:** Disoluční profily formulace tablet 10 % API II v pH 1,2 a 6,8 proložené modelem Weibull a I. řád



**Graf 3:** Disoluční profily formulace tablet 10 % API III v pH 1,2 a 6,8 proložené modelem Weibull a I. řád

Disoluční profily tablet API II s 10% zatížením léčivem jsou zobrazeny v **grafu 2**. Disoluce proběhla ve dvou disolučních médiích (pH 1,2 a 6,8). Disoluční profily v závislosti na pH jsou výrazně odlišné, jak je patrné z **grafu 2**. Oba profily byly proloženy modelem Weibull a kinetickým modelem I. řádu, ale v obou případech bylo vyšší hodnoty koeficientu  $R^2$  dosaženo pro model Weibull (**tabulka 4 a 5 v kap. 3.3.2**). V pH 1,2 byla rozpuštěna celá tableta a došlo k uvolnění 100 % účinné látky, oproti tomu v pH 6,8 se tableta rozpouštěla špatně, obdobně jako u formulace 10 % API I. V prostředí o pH 6,8 dosahovalo množství uvolněné účinné látky 30 % po 24 hod. disolučního testu. Tablety v průběhu disoluce zbělaly a zgelovatěly.

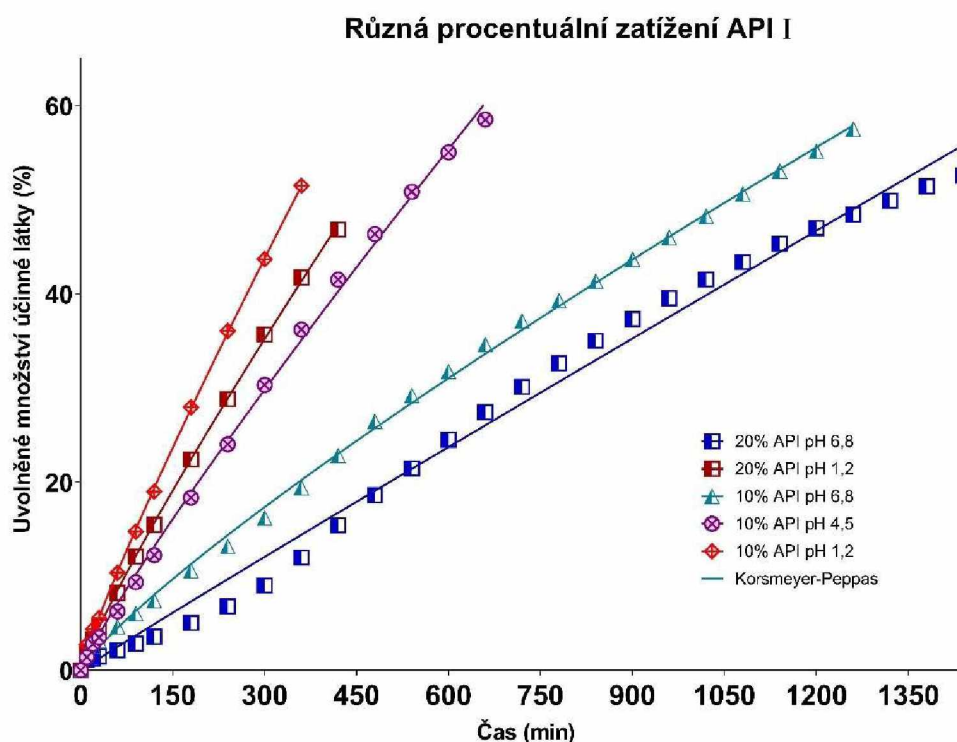
V **grafu 3** jsou zobrazeny disoluční profily tablet API III s 10% zatížením léčivem. Disoluce byla provedena v prostředí o pH 1,2 a 6,8. Profily byly proloženy modelem Weibull a I. řád, přičemž vyšší hodnoty koeficientu  $R^2$  vykazuje model Weibull a to v případě obou profilů, jak ukazuje regresní analýza (**tabulka 6 a 7**). Tablety se v pH 6,8 opět špatně rozpouští a mění svůj vzhled a strukturu stejně jako předchozí formulace 10 % API I a 10 % API II. Množství uvolněné účinné látky v pH 6,8 se pohybuje kolem 70 %. Dobrá rozpustnost tablet se projevila v pH 1,2, kde se uvolnilo 100 % účinné látky.



**Graf 4:** Disoluční profily formulace tablet 20 % API I v pH 1,2 a 6,8 proložené modelem Weibull a I. řád

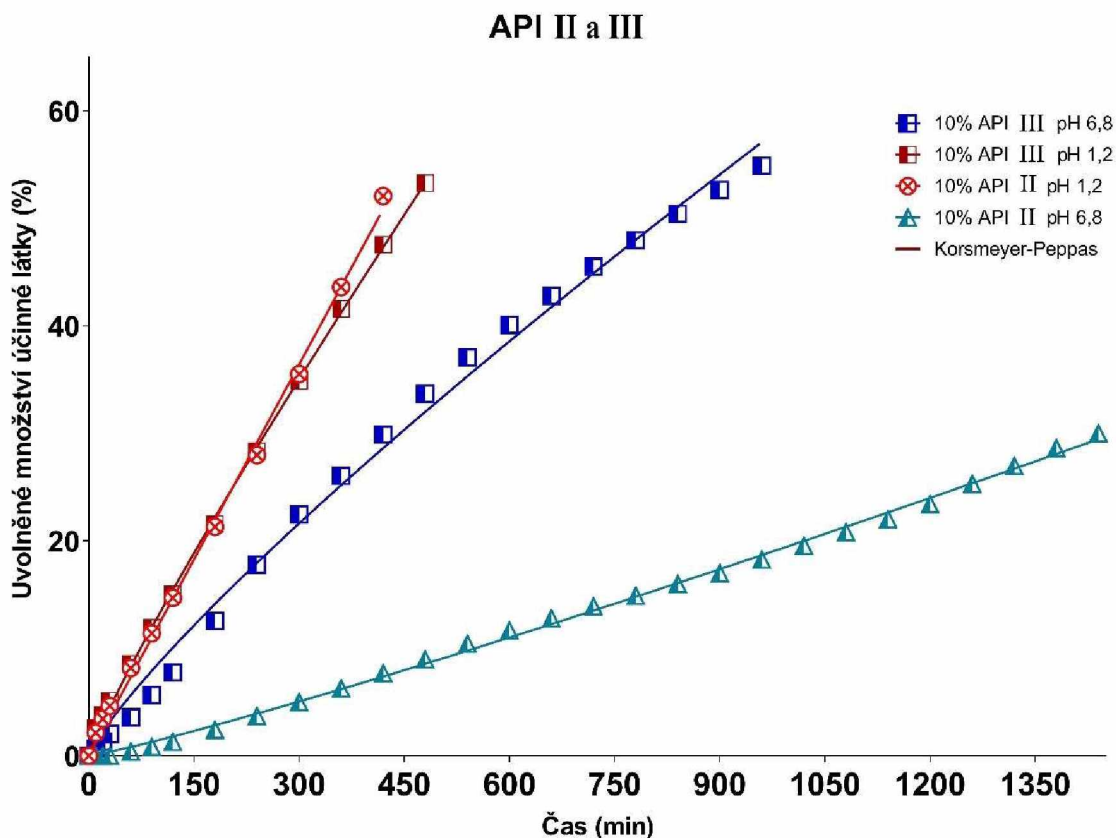
V **grafu 4** jsou zaznamenány disoluční profily tablet API I, s 20% zatížením léčivem. Disoluční test byl proveden v médiích o pH 1,2 a 6,8. Profily byly proloženy modelem Weibull a kinetickým modelem I. řádu. Na základě regresní analýzy (**tabulka 8 a 9**) bylo zjištěno, že v pH 1,2 je koeficient  $R^2$  pro oba modely shodný, ale v pH 6,8 bylo lepšího proložení dosaženo pro model Weibull. V prostředí o pH 1,2 byly tablety zcela rozpuštěny, ale v pH 6,8 se uvolnilo kolem pouze cca 50 % účinné látky, tablety se zcela nerozpustily a jejich zbytky byly bílé s gumovou konzistencí.

Disoluční profily všech studovaných formulací byly do uvolnění 60 % účinné látky proloženy modelem Korsmeyer-Peppas (**grafech 5 a 6**). Kvůli přehlednosti nejsou v grafech zobrazeny chybové úsečky. Na základě regeresní analýzy s využitím modelu Korsmeyer-Peppas je možné určit mechanismus uvolňování léčiva z tablet pomocí parametru  $n$ , jehož hodnoty jsou shrnuty a diskutovány v kap. 3.3.2 (**tabulka 10 a 11**).



**Graf 5:** Disoluční profily formulací tablet 10 % API I a 20 % API I v pH 1,2; 4,5 a 6,8 proložené modelem Korsmeyer-Peppas

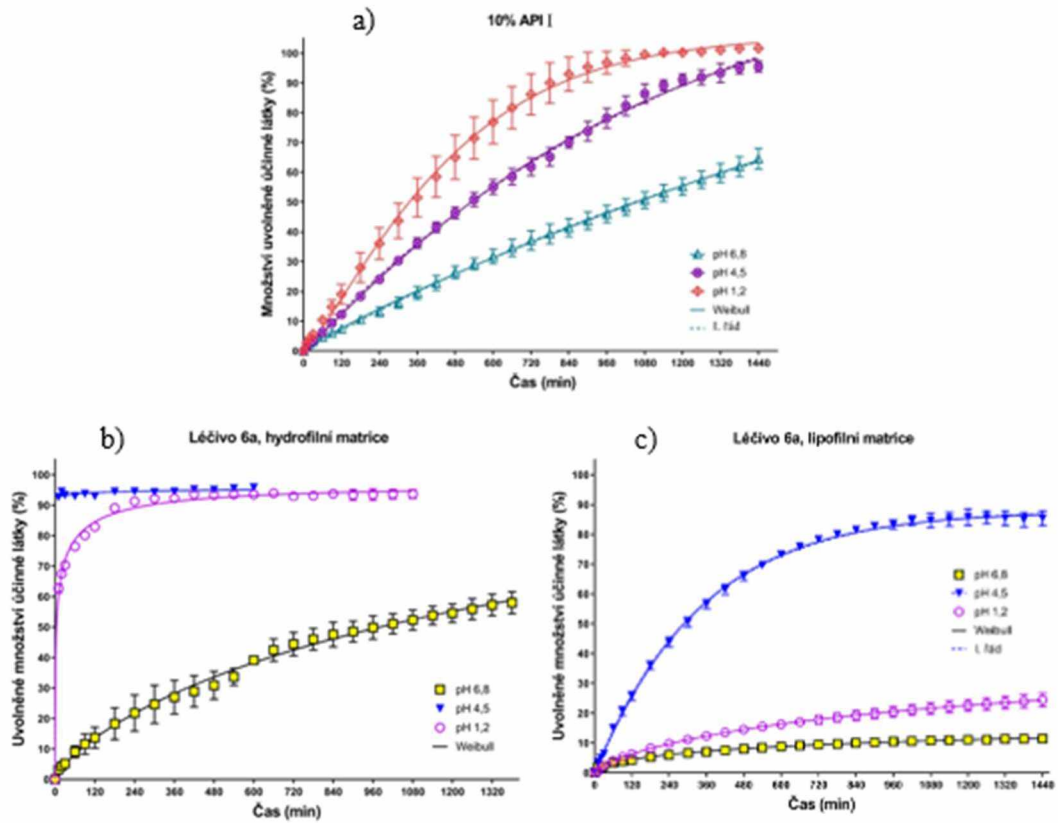




**Graf 6:** Disoluční profily formulací tablet 10 % API II a 10 % API III v pH 1,2 a 6,8 proložené modelem Korsmeyer-Peppas

Disoluční profily tablet 10 % API I byly porovnány s disolučními profily lisovaných matricových tablet (hydrofilní a lipofilní matrice) stejné účinné látky, které byly získány v rámci studie Ing. Marie Nevyhoštěné (40) (**obrázek 16**). Všechny disoluční profily jsou v pH 1,2; 4,5 a 6,8; a všechny byly proloženy modelem Weibull a kinetickým modelem I. řádu. Na první pohled je vidět, že tablety získané metodou 3D tisku dosahují vyšších procent uvolněné účinné látky v rámci daných pH. V případě hydrofilní matrice v pH 1,2 a 4,5 dochází k rychlému nárůstu uvolněného množství léčiva na počátku disolučního testu, což u ostatních druhů tablet není pozorováno. Je to způsobeno rychlým nasátím disolučního média hydrofilní matricí, bobtnáním tablety, rozvolněním polymerních řetězců a následným uvolňováním léčiva na principu difúze (40). V pH 4,5 se přes 90 % léčiva z hydrofilní matrice uvolnilo téměř okamžitě, kdežto z 3D tablet až po 20 hodinách testu a z lipofilní matrice se ani po 24 hodinách takové množství léčiva neuvolnilo. V disolučních médiích o pH 1,2 se nejrychleji rozpouštěly hydrofilní matrice, ale 3D tištěné tablety umožnily uvolnit větší množství účinné látky (100 %). Z lipofilní matrice se léčivo uvolňovalo nejpomaleji a dosáhlo

uvolněného množství kolem 25 %. Všechny tablety se nejhůře rozpouštěly v disolučním médiu o pH 6,8, kde množství uvolněné API bylo více než 60 % u 3D tištěných tablet, necelých 60 % u hydrofilní matrice a lipofilních matric nedosahovalo ani 20 %.



**Obrázek 16:** a) disoluční profily 3D tištěných tablet látky API I; b) disoluční profily lisovaných tablet látky API I (hydrofilní matrice) (40); c) disoluční profily lisovaných tablet látky API I (lipofilní matrice) (40)

### 3.3.2 Regresní analýza

Vyhodnocení disolučních profilů bylo provedeno pomocí matematických modelů Weibull, I. řád a Korsmeyer-Peppas, a veškeré výsledky jsou shrnuty v tabulkách, uvedeny jsou charakteristické parametry příslušných modelů, absolutní suma čtverců (ASS) a koeficient determinace  $R^2$ .

**Tabulka 2:** Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API I pomocí modelu Weibull

<b>Model Weibull: <math>M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_w t^\beta))</math></b>				
	<b><math>(k_w \pm SD) \times 10^3</math></b>	<b><math>\beta \pm SD</math></b>	<b>ASS</b>	<b><math>R^2</math></b>
	<b>[min<sup>-<math>\beta</math>]</sup></b>			
10 % API I (pH 1,2)	0,52 ± 0,12	1,22 ± 0,09	2653	0,9869
10 % API I (pH 4,5)	0,60 ± 0,10	1,07 ± 0,04	211	0,9967
10 % API I (pH 6,8)	0,39 ± 0,06	1,08 ± 0,02	398,7	0,9894

**Tabulka 3:** Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API I pomocí modelu I. řádu

<b>I. řád: <math>M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_1 t))</math></b>			
	<b><math>(k_1 \pm SD) \times 10^3</math></b>	<b>ASS</b>	<b><math>R^2</math></b>
	<b>[min<sup>-1</sup>]</b>		
10 % API I (pH 1,2)	1,77 ± 0,12	3301	0,9837
10 % API I (pH 4,5)	0,80 ± 0,07	224,9	0,9965
10 % API I (pH 6,8)	0,44 ± 0,09	367,6	0,9902

**Tabulka 4:** Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API II pomocí modelu Weibull

<b>Model Weibull: <math>M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_w t^\beta))</math></b>				
	<b><math>(k_w \pm SD) \times 10^3</math></b>	<b><math>\beta \pm SD</math></b>	<b>ASS</b>	<b><math>R^2</math></b>
	<b>[min<sup>-<math>\beta</math>]</sup></b>			
10 % API II (pH 1,2)	0,03 ± 0,01	1,71 ± 0,07	765,4	0,9926
10 % API II (pH 6,8)	0,05 ± 0,02	1,23 ± 0,09	1046	0,8847



**Tabulka 5:** Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 API II pomocí modelu I. řád

<b>I. řád: <math>M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_1 t))</math></b>			
	<b><math>(k_1 \pm \text{SD}) \times 10^3</math></b>	<b>ASS</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
	<b>[min<sup>-1</sup>]</b>		
10 % API II (pH 1,2)	1,52 ± 0,23	2575	0,9750
10 % API II (pH 6,8)	0,22 ± 0,01	1146	0,8738

**Tabulka 6:** Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API III pomocí modelu Weibull

<b>Model Weibull: <math>M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_w t^\beta))</math></b>				
	<b><math>(k_w \pm \text{SD}) \times 10^3</math></b>	<b><math>\beta \pm \text{SD}</math></b>	<b>ASS</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
	<b>[min<sup>-β</sup>]</b>			
10 % API III (pH 1,2)	0,57 ± 0,23	1,13 ± 0,08	1389	0,9839
10 % API III (pH 6,8)	0,60 ± 0,21	1,08 ± 0,07	439,1	0,9872

**Tabulka 7:** Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API III pomocí modelu I. řád

<b>I. řád: <math>M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_1 t))</math></b>			
	<b><math>(k_1 \pm \text{SD}) \times 10^3</math></b>	<b>ASS</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
	<b>[min<sup>-1</sup>]</b>		
10 % API III (pH 1,2)	1,05 ± 0,17	1450	0,9831
10 % API III (pH 6,8)	0,84 ± 0,15	448,8	0,9869

**Tabulka 8:** Vyhodnocení disolučních profilů tablet 20 % API I pomocí modelu Weibull

<b>Model Weibull: <math>M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_w t^\beta))</math></b>				
	<b><math>(k_w \pm \text{SD}) \times 10^3</math></b>	<b><math>\beta \pm \text{SD}</math></b>	<b>ASS</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
	<b>[min<sup>-β</sup>]</b>			
20 % API I (pH 1,2)	0,88 ± 0,35	1,05 ± 0,08	1514	0,9810
20 % API I (pH 6,8)	0,03 ± 0,02	1,51 ± 0,11	769,8	0,9744

**Tabulka 9:** Vyhodnocení disolučních profilů tablet 20 % API I pomocí modelu I. řád

<b>I. řád: <math>M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_1 t))</math></b>			
	<b><math>(k_1 \pm SD) \times 10^3</math></b>	<b>ASS</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
	<b>[min<sup>-1</sup>]</b>		
20 % API I (pH 1,2)	1,08 ± 0,19	1522	0,9810
20 % API I (pH 6,8)	0,50 ± 0,02	1155	0,9615

**Tabulka 10:** Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % a 20 % API I pomocí modelu Korsmeier-Peppas

<b>Korsmeier-Peppas: <math>M_t / M_\infty = k_{KP} t^n</math></b>			
	<b><math>n \pm SD</math></b>	<b>ASS</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
10 % API I (pH 1,2)	0,89 ± 0,04	605,3	0,9629
10 % API I (pH 4,5)	0,89 ± 0,02	53,28	0,9961
10 % API I (pH 6,8)	0,84 ± 0,02	292,9	0,9891
20 % API I (pH 1,2)	0,88 ± 0,10	527,1	0,9181
20 % API I (pH 6,8)	0,98 ± 0,03	976,8	0,9675

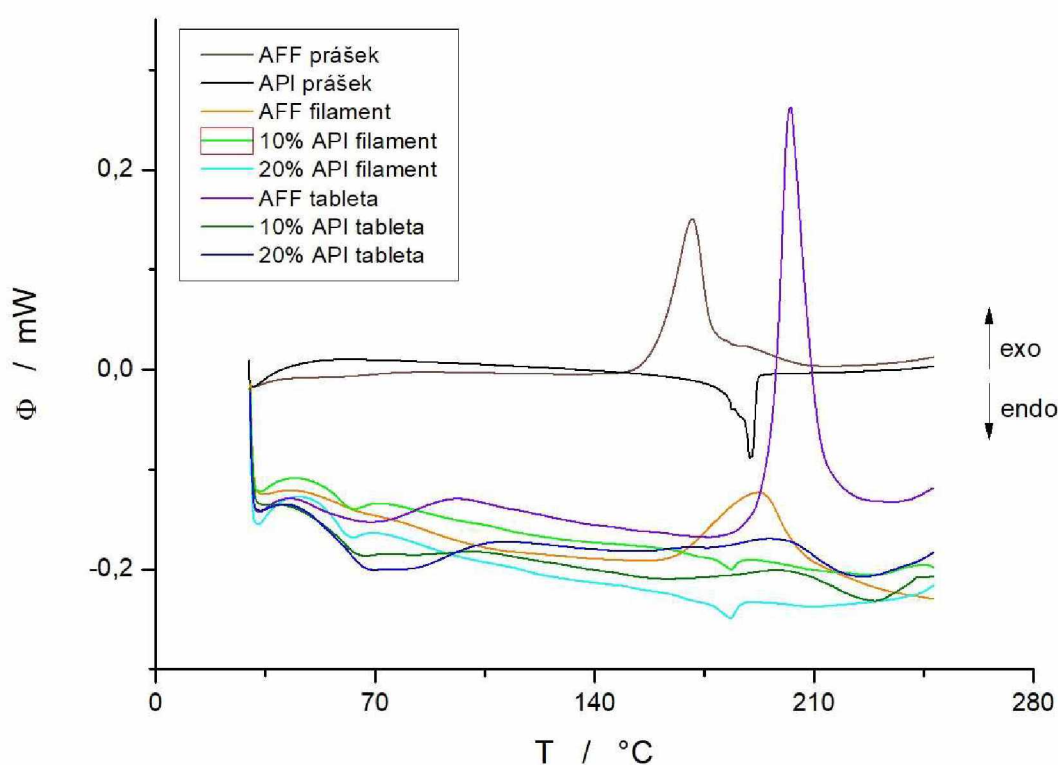
**Tabulka 11:** Vyhodnocení disolučních profilů tablet 10 % API II a 10 % API III pomocí modelu Korsmeier-Peppas

<b>Korsmeier-Peppas: <math>M_t / M_\infty = k_{KP} t^n</math></b>			
	<b><math>n \pm SD</math></b>	<b>ASS</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
10 % API II (pH 1,2)	0,99 ± 0,02	23,07	0,9967
10 % API II (pH 6,8)	1,12 ± 0,08	1043	0,8851
10 % API III (pH 1,2)	0,89 ± 0,08	493,7	0,9421
10 % API III (pH 6,8)	0,83 ± 0,04	359,8	0,9770

Regresní analýza disolučních profilů tablet 10 % API I (tabulka 2 a 3) byla porovnána s výsledky disolučních profilů lisovaných tablet ve studii Ing. Marie Nevyhoštěné (40). Podle hodnot charakteristických parametrů bylo prokázáno zvýšení uvolněného množství léčiva z 3D tištěných tablet oproti lisovaným tabletám, a byla pozorována změna v rychlosti uvolňování léčiva, nejrychleji se rozpouštěla hydrofilní matrice.

V tabulce 10 a 11 je regresní analýza modelu Korsmeyer-Peppas, kterým byly proloženy disoluční profily všech formulací tablet v daném pH. Podle získané hodnoty parametru  $n$  lze usuzovat, že převažujícím mechanismem uvolňování léčiva z tablet je anomální transport, který je superpozicí dvou mechanismů a to „čistě difúze“ a uvolňování na základě bobtnání a relaxace řetězců nosného polymeru.

### 3.4 Vyhodnocení DSC

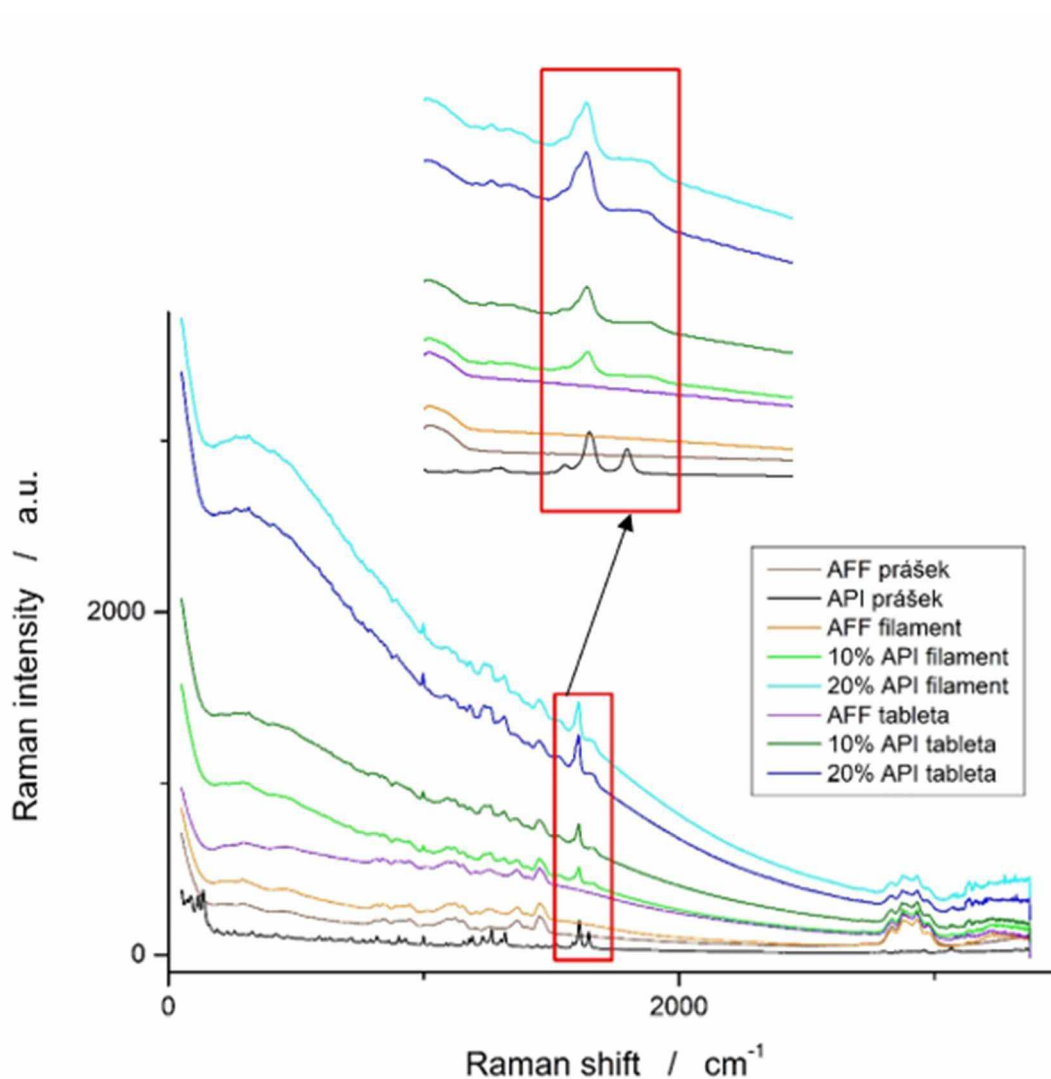


**Graf 7:** DSC záznam vzorků filamentů a tablet formulací blank, 10 % a 20 % API I včetně vzorků čistých krystalických látek AFF a API I.

Z naměřených DSC dat byl vytvořen **graf 7** závislosti tepelného toku na teplotě, kde můžeme pozorovat vliv procesu extruze a 3D tisku na rozklad AFF a tání látky API I. Hnědá křivka představuje čistý prášek AFF a exotermní pík na této křivce značí rozklad AFF. Vlivem extruze a 3D tisku probíhá částečný rozklad AFF, který způsobí posun píků na křivkách AFF filament (oranžová) a AFF tableta (fialová) směrem k vyšším hodnotám teplot. Endotermní pík na černé křivce zobrazuje tání čisté krystalické API I, vlivem extruze dochází k částečné

amorfizaci API, která se vyznačuje zmenšením píků tání na světle zelené a světle modré křivce. V případě 10 % API I filament (světle zelená křivka) odpovídá zbytek krystalické fáze 16ti hm. % API z původního množství, a ve 20% API I filament (světle modrá křivka) je zbytek 12 hm. % z původního množství API I. Na tmavě zelené (10 % API I tableta) a tmavě modré křivce (20% API I tableta) nepozorujeme žádný endotermní pík, což je důkazem úplné amorfizace API v průběhu 3D tisku.

### 3.5 Vyhodnocení Ramanovy spektroskopie



**Graf 8:** Ramanovo spektrum měřených vzorků filamentů a tablet formulací blank, 10 % a 20 % API včetně vzorků čistých krystalických látek AFF a API

Pomocí Ramanovy spektroskopie bylo získáno byly získány spektra zobrazené v grafu 8. V grafu je vyznačen červený rámeček zobrazující vybrané charakteristické pásy studované látky (API I), který je přiblížen v horní části grafu. Černá křivka odpovídá čisté krystalické látce API, na níž jsou pozorovány tři pásy jeden menší ( $1584\text{ cm}^{-1}$ ) a dva větší ( $1610$  a  $1647\text{ cm}^{-1}$ ). Díky procesu extruze a 3D tisku dochází k amorfizaci API, což se projevuje rozostřením pásů a vyhlazováním křivky, jak je patrné na zelených a modrých křivkách znázorňujících zkoumané filamenty a tablety.

## 4 ZÁVĚR

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu pevných lékových forem metodou 3D tisku. Cílem práce bylo zjistit, zda je možné připravit tablety s obsahem vybraných API prostřednictvím FDM 3D tisku a HME. Byly použity tři druhy API, jednalo se o vybrané sulfonamidy, u kterých byl studován proces amorfizace v průběhu přípravy filamentů a tablet, a následně bylo testováno uvolňování těchto sulfonamidů z připravených lékových forem.

První částí práce je literární rešerše shrnující popis a využití metody 3D tisku ve farmacii, popis procesu amorfizace, vzniku ASD a popis jejího vlivu na rozpustnost API. Jedna z kapitol se věnuje možnosti přípravy filamentů s různým zatížením API metodou HME, a zahrnuje přehled využívaných polymerů pro přípravu těchto vláken. Ke konci teoretické části jsou uvedeny a popsány metody využití v experimentální části, mezi které patří holt melt extruze, FDM 3D tisk, disoluční testy, DSC a Ramanova spektroskopie.

Experimentální část je rozdělena do kapitol podle využitých metod popsaných v teoretické části, a jsou zde popsány použité přístroje, chemikálie a pracovní postupy všech metod. Nejdůležitější částí je vyhodnocení získaných dat a shrnutí výsledků v závěrečné části práce.

Na počátku experimentu byly podle reakčního schématu syntetizovány tři sulfonamidy (API I, API II a API III).-Pomocí holt melt extruze bylo připraveno 5 druhů vláken na bázi HPMC (Affinisol<sup>TM</sup>) lišících se typem a obsahem použité API. Z připravených filamentů byly metodou FDM 3D tisku vyrobeny tablety 10% API I, 10% API II, 10% API III a 20% API I, jejichž průměr byl 13 mm a hmotnost  $500 \pm 5$  mg. Dále byly provedeny disoluční testy a získané disoluční profily byly vyhodnoceny pomocí matematických modelů Weibull, kinetický model I. řádu a Korsmeyer-Peppas. S použitím nelineární regrese byly vyhodnoceny charakteristické parametry příslušných modelů, absolutní suma čtverců (ASS) a koeficient determinace  $R^2$ .

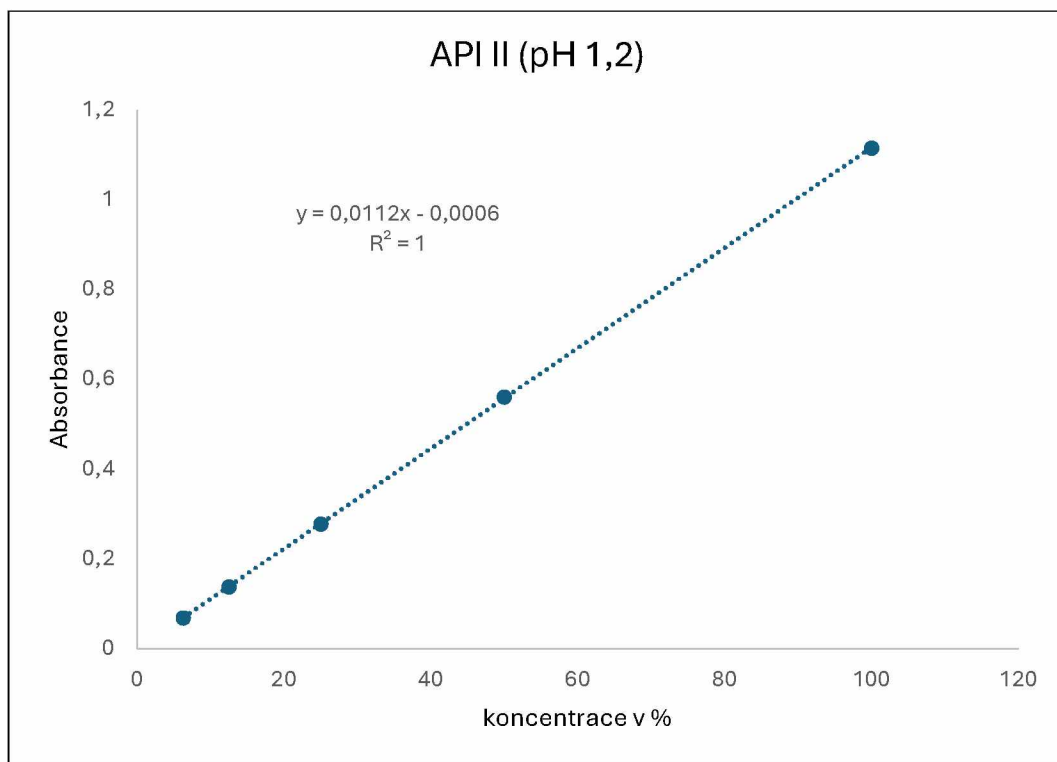
Tablety 10 % API I byly testovány v pH 1,2 (rozpustilo se 100 % léčiva), v pH 4,5 (uvolněno více než 90 % léčiva) a v pH 6,8, ve kterém se tablety zcela nerozpustily a uvolnilo se pouze  $\approx 60$  % účinné látky za 24 hod. Disoluční profily tablet 10 % API I byly porovnány s disolučními profily lisovaných matricových tablet hydrofilního a lipofilního charakteru, které byly předmětem studie Ing. Marie Nevyhoštěné (40). Hydrofilní matrice vykazovaly nejrychlejší uvolňování API, především v pH 1,2 a 4,5, kde bylo uvolněno více než 90 % léčiva, ale i v pH 6,8 ve kterém bylo uvolněno pouze necelých 60 %. Z 3D tištěných tablet se

uvolňovalo léčivo pozvolněji, ale dosahovalo vyšších procent uvolněného množství, v pH 1,2 se uvolnilo 100 % léčiva, v pH 4,5 byly hodnoty srovnatelné s hydrofilní matricí, tedy více než 90 % a v pH 6,8 více než 60 %. Lipofilní matrice se nejlépe rozpouštěla v pH 4,5 (uvolněno  $\approx$  90 % léčiva), ale v pH 1,2 se uvolnilo  $\approx$  30 % a v pH 6,8 nedosahuje uvolněné množství léčiva ani 20 %.

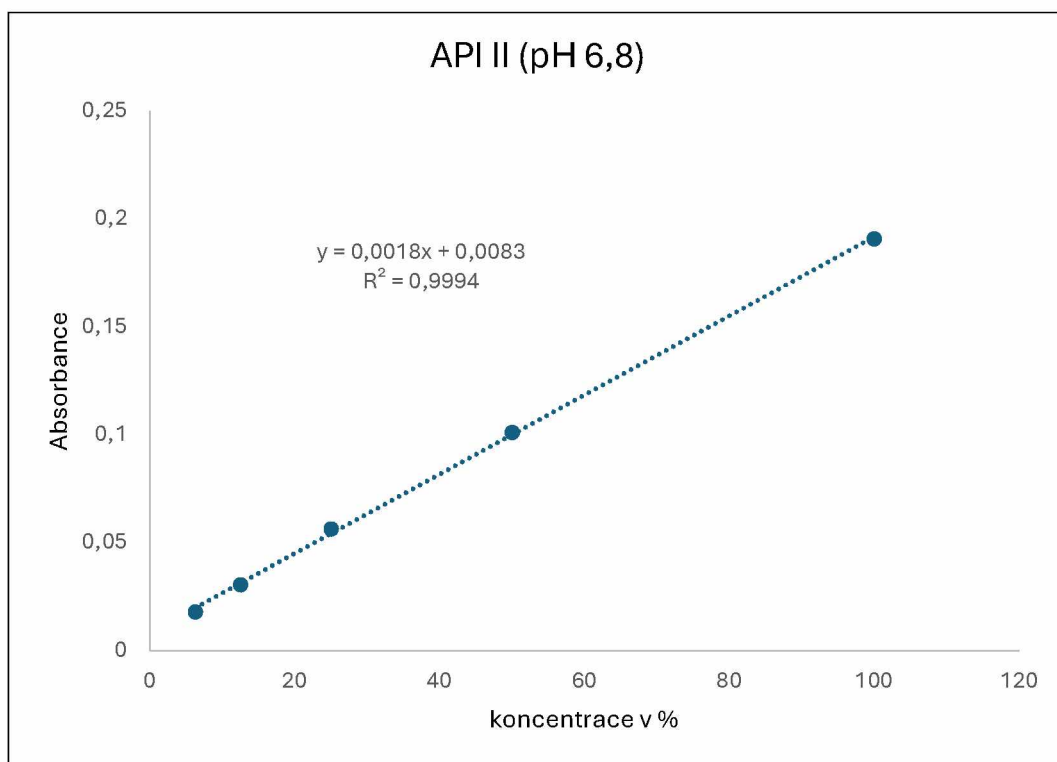
Disoluční testy tablet 10 % API II, 10 % API III a 20 % API I byly provedeny v disolučních médiích o pH 1,2 a 6,8. Disoluční profily ukázaly vyšší hodnoty uvolněného množství účinných látek v pH 1,2, na rozdíl od prostředí o pH 6,8, ve kterém tablety zgelovatěly a úplně se nerozpustily ani po 24 hodinách trvání testu. Pomocí proložení disolučních profilů (do 60 % uvolněného množství API) modelem Korsmeyer-Peppas bylo zjištěno, že převažujícím mechanismem uvolňování léčiva je anomální transport.

V rámci diplomové práce byla pomocí diferenční skenovací kalorimetrie a Ramanovy spektroskopie ověřena úspěšná amorfizace API. Bylo zjištěno, že v průběhu přípravy filamentů metodou hot melt extruze došlo k částečné amorfizaci účinné látky a během FDM 3D tisku tablet došlo k amorfizaci úplné.

## 5 PŘÍLOHY

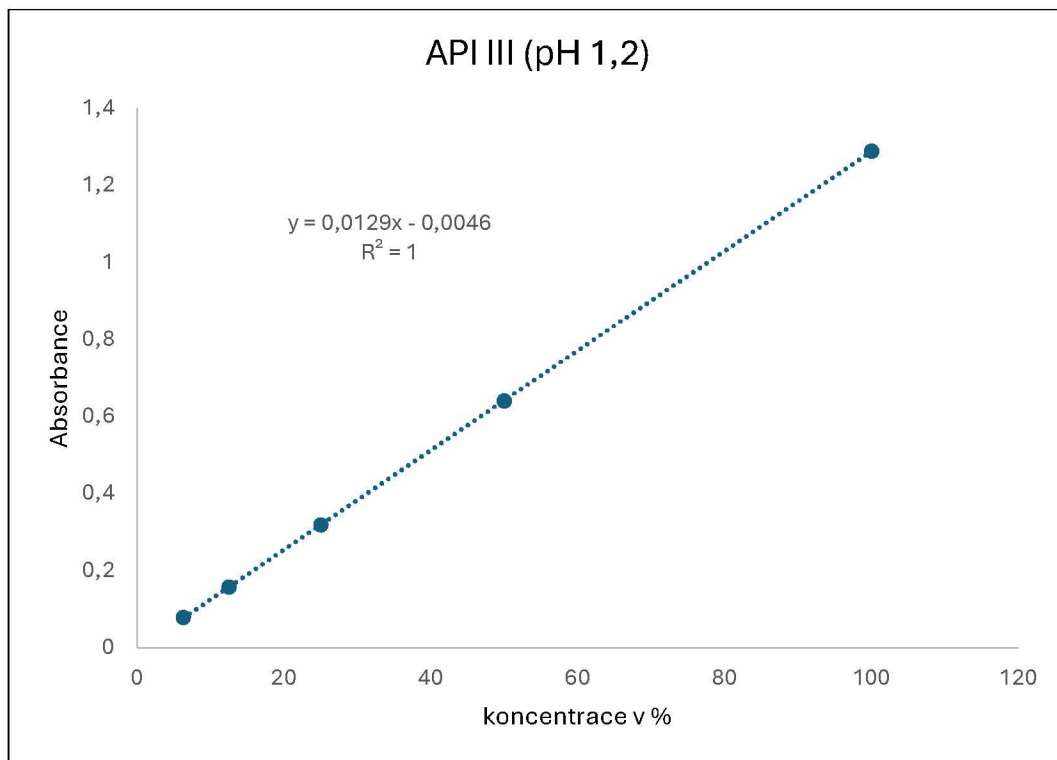


**Příloha 1:** Kalibrační křivka léčiva API II v disolučním médiu o pH 1,2

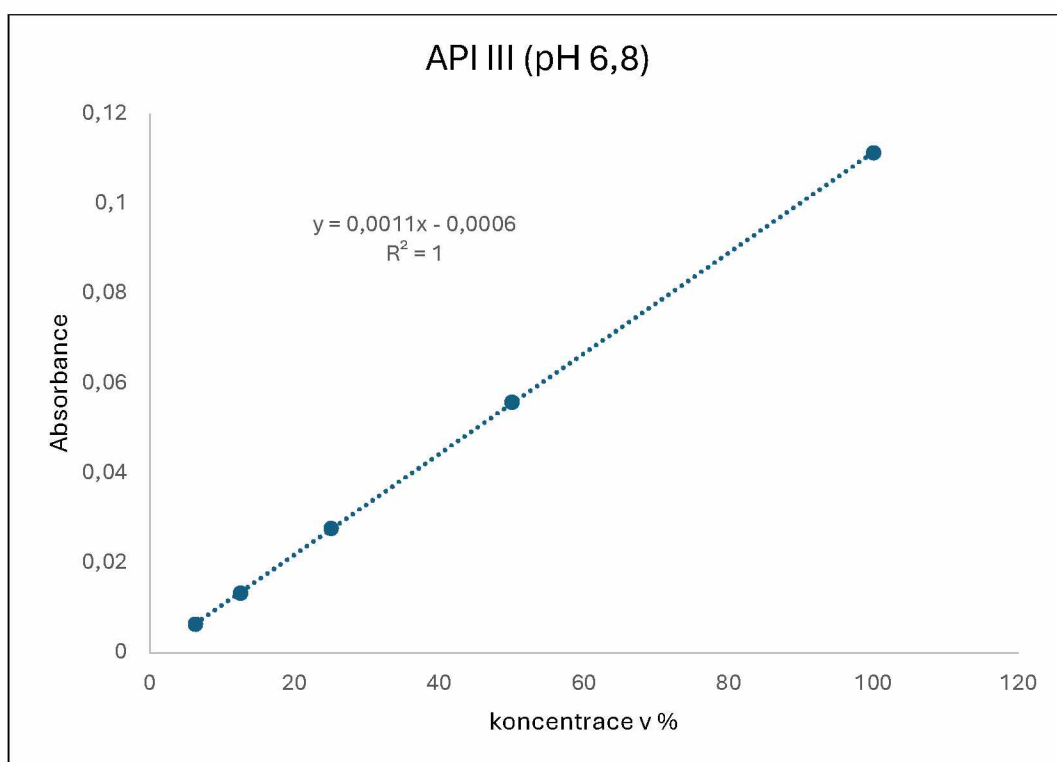


**Příloha 2:** Kalibrační křivka léčiva API II v disolučním médiu o pH 6,8





**Příloha 3:** Kalibrační křivka léčiva API III v disolučním médiu o pH 1,2



**Příloha 4:** Kalibrační křivka léčiva API III v disolučním médiu o pH 6,8

## POUŽITÁ LITERATURA

1. ROCHE, Agnès, et al. Fused Deposition Modelling 3D printing and solubility improvement of BCS II and IV active ingredients—A narrative review. *Journal of Controlled Release*, 2024, 365: 507-520.
2. IQBAL, Heba, et al. Status of Polymer Fused Deposition Modeling (FDM)-Based Three-Dimensional Printing (3DP) in the Pharmaceutical Industry. *Polymers*, 2024, 16.3: 386.
3. AYYOUBI, Sejad, et al. 3D printed spherical mini-tablets: Geometry versus composition effects in controlling dissolution from personalised solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, 597: 120336.
4. CRIŞAN, Andrea Gabriela, et al. QbD guided development of immediate release FDM-3D printed tablets with customizable API doses. *International journal of pharmaceutics*, 2022, 613: 121411.
5. ANAYA, Brayan J., et al. Engineering of 3D printed personalized polypills for the treatment of the metabolic syndrome. *International Journal of Pharmaceutics*, 2023, 642: 123194.
6. ZEMA, Lucia, et al. Three-dimensional printing of medicinal products and the challenge of personalized therapy. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2017, 106.7: 1697-1705.
7. ABRAHAMS, Edward. Right drug—right patient—right time: Personalized Medicine Coalition. *Clinical and Translational Science*, 2008, 1.1: 11.
8. SERRANO, Dolores R.; TERRES, Maria C.; LALATSA, Aikaterini. Applications of 3D printing in cancer. *Journal of 3D printing in medicine*, 2018, 2.3: 115-127.
9. FERNÁNDEZ-GARCÍA, Raquel, et al. Oral fixed-dose combination pharmaceutical products: Industrial manufacturing versus personalized 3D printing. *Pharmaceutical research*, 2020, 37: 1-22.
10. ROBLES-MARTINEZ, Pamela, et al. 3D printing of a multi-layered polypill containing six drugs using a novel stereolithographic method. *Pharmaceutics*, 2019, 11.6: 274.
11. KHALED, Shaban A., et al. 3D printing of five-in-one dose combination polypill with defined immediate and sustained release profiles. *Journal of controlled release*, 2015, 217: 308-314.
12. GOTTSCHALK, Nadine; BOGDAHN, Malte; QUODBACH, Julian. 3D printing of amorphous solid dispersions: A comparison of fused deposition modeling and drop-on-powder printing. *International Journal of Pharmaceutics: X*, 2023, 5: 100179.
13. SERRANO, Dolores R., et al. 3D printing technologies in personalized medicine, nanomedicines, and biopharmaceuticals. *Pharmaceutics*, 2023, 15.2: 313.

14. KAPOOR, Devesh U., et al. Amorphization of Low Soluble Drug with Amino Acids to Improve Its Therapeutic Efficacy: a State-of-Art-Review. *AAPS PharmSciTech*, 2023, 24.8: 253.
15. ELBADAWI, Moe, et al. Artificial intelligence generates novel 3D printing formulations. *Applied Materials Today*, 2024, 36: 102061.
16. PARULSKI, Chloé, et al. Fused deposition modeling 3D printing of solid oral dosage forms containing amorphous solid dispersions: How to elucidate drug dissolution mechanisms through surface spectral analysis techniques?. *International Journal of Pharmaceutics*, 2022, 626: 122157.
17. BUYUKGOZ, Guluzar Gorkem; KOSSOR, Christopher Gordon; DAVÉ, Rajesh N. Enhanced supersaturation via fusion-assisted amorphization during fdm 3d printing of crystalline poorly soluble drug loaded filaments. *Pharmaceutics*, 2021, 13.11: 1857.
18. KYOBULA, Mary, et al. 3D inkjet printing of tablets exploiting bespoke complex geometries for controlled and tuneable drug release. *Journal of Controlled release*, 2017, 261: 207-215.
19. PRIEMEL, P. A.; GROHGANZ, H.; RADES, T. Unintended and in situ amorphisation of pharmaceuticals. *Advanced drug delivery reviews*, 2016, 100: 126-132.
20. HANCOCK, Bruno C.; ZOGRAFI, George. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1997, 86.1: 1-12.
21. EINFALT, Tomaž; PLANINŠEK, Odon; HROVAT, Klemen. Methods of amorphization and investigation of the amorphous state. *Acta pharmaceutica*, 2013, 63.3: 305-334.
22. HUANG, Siyuan, et al. A new extrudable form of hypromellose: AFFINISOL™ HPMC HME. *Aaps Pharmscitech*, 2016, 17: 106-119.
23. MACEDO, Joana, et al. Zpracovatelnost vláken na bázi polyalkoholu s paracetamolem připravených tavnou extruzí pro aditivní výrobu. *Časopis farmaceutických věd*, 2020, 109.12: 3636-3644.
24. COUȚI, Nadine, et al. Polyvinyl Alcohol, a Versatile Excipient for Pharmaceutical 3D Printing. *Polymers*, 2024, 16.4: 517.
25. LARSEN, Bjarke Strøm, et al. Impact of drug load and polymer molecular weight on the 3D microstructure of printed tablets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2024, 192: 106619.
26. KATSIOTIS, Christos S., et al. 3D-tištěný mezoporézní nosný systém pro dodávání špatně rozpustných léčiv. *Farmacie*, 2021, 13.7: 1096.

27. TAMBE, Srushti, et al. Hot-melt extrusion: Highlighting recent advances in pharmaceutical applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021, 63: 102452.
28. WESHOLOWSKI, Jens; BERGHAUS, Andreas; THOMMES, Markus. Inline determination of residence time distribution in hot-melt-extrusion. *Pharmaceutics*, 2018, 10.2: 49.
29. KOLLAMARAM, Gayathri, et al. Low temperature fused deposition modeling (FDM) 3D printing of thermolabile drugs. *International journal of pharmaceutics*, 2018, 545.1-2: 144-152.
30. STRÍTESKÝ, Ondřej. Základy 3D tisku s Josefem Průšou. *Praha: Prusa Research*, 2019, 1: 62.
31. SOLOMON, I. John; SEVVEL, P.; GUNASEKARAN, JJMTP. A review on the various processing parameters in FDM. *Materials Today: Proceedings*, 2021, 37: 509-514.
32. ŠANDA, Martin. Příprava tobolek na bázi hypromelózy metodou FDM 3D tisku. Pardubice, 2023. Bakalářská práce, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.
33. Český lékopis 2023. Ministerstvo zdravotnictví České republiky. *Praha. Grada Publishing a.s. 2023*. ISBN: 978-80-271-5059-5.
34. MUSELÍK, Jan, et al. Regresní analýza disolučního profilu léčiva a odhad mechanismu uvolňování léčiva. *Chemické listy*, 2019, 113.5: 328-336.
35. DRESSMAN, Jennifer B., et al. (ed.). *Pharmaceutical dissolution testing*. Boca Raton, FL 33487-2742. Taylor & Francis, 2005.
36. LYNCH, Jennifer M., et al. Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC): Důležitý nástroj pro identifikaci polymerů a charakterizaci plastového odpadu v mořích. *Znečištění životního prostředí*, 2024, 123607.
37. SCHICK, C. Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2009, 395: 1589-1611.
38. MENCZEL, Joseph D., et al. Differential scanning calorimetry (DSC). *Thermal analysis of polymers: Fundamentals and applications*, 2009, 7-239.
39. VALÁŠEK, Pavel. *Identifikace inkoustů s využitím Ramanovy spektroskopie*. Zlín, 2012. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta aplikované informatiky, Ústav bezpečnostního inženýrství.
40. NEVYHOŠTĚNÁ, Marie. *Syntéza biologicky aktivních sulfonamidových derivátů jako potenciálních léčiv Alzheimerovy nemoci*. Pardubice, 2022. Diplomová práce, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická.