

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie



**Vliv rozpouštědla na dobu rozpadu liquisolid
systémů v podobě tobolek**

The effect of solvent on disintegration time of liquisolid
systems in the form of capsules

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Barbora Vraníková, Ph.D.

Konzultant: MSc. Andreas Niederquell

Hradec Králové, 2023

Ladislava Helerová

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Ladislava Helerová

.....

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala doc. PharmDr. Barboře Vraníkové, Ph.D. za její odborné vedení, poskytnutí cenných rad, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnovala během zpracování této diplomové práce. Poděkování patří také doc. PharmDr. Andreji Kováčikovi, Ph.D. za analýzu vzorků pomocí infračervené spektroskopie, paní laborantce Lence Svobodové za analýzu vzorků pomocí DSC a MSc. Andreasi Niederquellovi za konzultace. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu během celého studia.

V neposlední řadě děkuji i za finanční příspěvek Grantové agentury Univerzity Karlovy (337622/2022).

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract	7
Cíle diplomové práce	8
Seznam symbolů a zkratk.....	9
1 Úvod	11
2 Teoretická část.....	12
2.1 Systémy kapalina v pevné fázi (LSS)	12
2.1.1 Příprava LSS	12
2.1.2 Mechanismy zvyšování biologické dostupnosti LSS.....	13
2.1.3 Výhody a nevýhody LSS	14
2.1.3.1 Výhody	14
2.1.3.2 Nevýhody	14
2.1.4 Pomocné látky pro přípravu LSS	15
2.1.4.1 Netěkavá rozpouštědla	15
2.1.4.2 Nosiče.....	15
2.1.4.3 Obalovací materiály	17
2.2 Tobolky	18
2.2.1 Měkké želatinové tobolky	18
2.2.1.1 Příprava měkkých želatinových tobolek	19
2.2.2 Tvrdé želatinové tobolky	20
2.2.2.1 Plnění a uzavírání tvrdých želatinových tobolek	21
2.2.3 Interakce v tvrdých želatinových tobolkách	23
2.2.3.1 Účinky vlhkosti	24
2.2.3.2 Rozpustnost polymeru použitého pro přípravu tobolky	24
2.2.3.3 Fyzikální vlastnosti náplně (teplota, viskozita).....	24

2.2.3.4	Kompatibilita.....	25
3	Experimentální část	28
3.1	Použité suroviny.....	28
3.2	Použité přístroje	28
3.3	Použité metody.....	30
3.3.1	Příprava liquisolid prášků	30
3.3.2	Příprava liquisolid tobolek.....	31
3.3.3	Příprava disolučních médií.....	31
3.3.4	Stanovení doby rozpadu tobolek.....	33
3.3.5	Diferenciální skenovací kalorimetrie	33
3.3.6	Infračervená spektroskopie	33
3.3.7	Statistické vyhodnocení	34
4	Výsledky a diskuse	35
4.1	Vliv propylenglykolu na vlastnosti tvrdých želatinových tobolek ..	36
4.2	Vliv disperze léčiva v propylenglykolu na vlastnosti tvrdých želatinových tobolek	39
4.3	Vliv polysorbátu 80 na vlastnosti tvrdých želatinových tobolek	43
4.4	Vliv disperze léčiva v polysorbátu 80 na vlastnosti tvrdých želatinových tobolek	47
4.5	Hodnocení IČ a DSC.....	52
5	Závěr.....	57
6	Seznam použité literatury	58

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: doc. PharmDr. Barbora Vraníková, Ph.D.

Konzultant: MSc. Andreas Niederquell

Posluchač: Ladislava Helerová

Název diplomové práce: Vliv rozpouštědla na dobu rozpadu liquisolid systémů v podobě tobolek

Podle literatury mohou být liquisolid (LS) prášky formulovány do podoby tablet, pelet nebo tvrdých želatinových tobolek. Dostupné zdroje o liquisolid systémech však nezvažují možné interakce mezi použitým nosičem a/nebo rozpouštědlem a obalem tobolky. Nosiče mohou adsorbovat vodu z želatinového obalu tobolky, a tím způsobit její křehnutí. Na druhou stranu rozpouštědlo může pronikat do obalu tobolky a ovlivnit tak její celistvost a vlastnosti. Z těchto důvodů byly připraveny a následně testovány LS tobolky obsahující směsi složené z nosiče Neusilinu® US2 (NUS2) a různých množství propylenglykolu (PG), polysorbátu 80 (PS 80) nebo disperzí cyklosporinu A (CysA) v těchto rozpouštědlech. Ke studiu změn vlastností byla u připravených tobolek hodnocena doba rozpadu ve třech médiích, diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a infračervená spektroskopie (IČ).

Získané výsledky ukázaly, že doba rozpadu LS tobolek byla prodloužena ve srovnání s tobolkami obsahujícími pouze NUS2. Přídavek PG a PS 80 mírně prodloužil dobu rozpadu, ale u PG bylo prodloužení výraznější, avšak vliv množství rozpouštědla na dobu rozpadu zde nebyl pozorován. Přidání CysA způsobilo další prodloužení doby rozpadu tobolky, kdy účinek modelového léčiva byl patrnější u disperzí s PG. Navíc tobolky obsahující PG nebo disperzi léčiva v PG vykazovaly během skladování změnu struktury (měknutí), což bylo pravděpodobně způsobeno penetrací rozpouštědla do těla tobolky. Tyto změny byly také potvrzeny na IČ a DSC. Přestože zde byl pozorován jistý vliv rozpouštědla a skladování na vlastnosti tobolek, všechny testované tobolky splnily lékopisný limit pro dobu rozpadu (30 minut).

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology

Mentor: doc. PharmDr. Barbora Vraníková, Ph.D.

Consultant: MSc. Andreas Niederquell

Student: Ladislava Helerová

Title of Thesis: The effect of solvent on disintegration time of liquisolid systems in the form of capsules

According to the literature, the resulting liquisolid (LS) powders may be formulated into the form of tablets, pellets or hard gelatine capsules. However, the available resources about liquisolid systems do not consider possible interactions between the used excipients and capsule shell. Carriers can adsorb the water from the gelatine capsule and hence cause its brittleness, while the solvent can penetrate the capsule shell and thereby affects its integrity and properties. For these reasons, LS capsules containing mixtures of the carrier Neusilin[®] US2 (NUS2) with different amounts of propylene glycol (PG), polysorbate 80 (PS 80) or the cyclosporine A (CysA) dispersions in these solvents were prepared and tested. The disintegration time in three dissolution media, differential scanning calorimetry (DSC) and infrared spectroscopy (IR) were evaluated to study the changes in the capsule properties.

The obtained results showed that the disintegration time of LS capsules was prolonged compared to the capsules containing only NUS2. The addition of PG and PS 80 increased the disintegration time, that was more pronounced for PG. However, the solvent amount did not affect the disintegration time. The addition of CysA caused further prolongation in capsule disintegration, whereas the effect of the model drug was more evident for the dispersions with PG. In addition, capsules containing PG or PG dispersions showed a change in the structure (softening) during the storing, which was probably caused by solvent absorption. These changes were also confirmed by IR and DSC. Even though the effect of storage on the capsules was observed, all tested capsules fulfilled the pharmacopeial limit for the disintegration time (30 minutes).

Cíle diplomové práce

Tato práce vznikla na základě výsledků hodnocení rychlosti uvolňování léčiva cyklosporinu A z liquisolid systémů v podobě tvrdých želatinových tobolek v biorelevantním médiu simulujícím prostředí tenkého střeva na lačno (FaSSiF). Liquisolid systémy byly připraveny za použití různých rozpouštědel (Transcutol® HP, polysorbát 80, propylenglykol a makrogoly 200 a 400), přičemž disoluční zkouška odhalila výrazné rozdíly v uvolňování modelového léčiva s ohledem na použité rozpouštědlo. Z tohoto důvodu je cílem experimentální části této diplomové práce zjistit, jak koncentrace a typ rozpouštědla, následně i přídavek léčiva cyklosporinu A ovlivní dobu rozpadu tobolek naplněných liquisolid práškovou směsí. Liquisolid prášky se vytvoří smísením nosiče Neusilinu® US2 s propylenglykolem, polysorbátem 80 nebo disperzí cyklosporinu A v těchto rozpouštědlech. Součástí práce je i vyhodnocení vlivu skladování liquisolid tobolek na dobu rozpadu, která bude hodnocena ve třech médiích (čištěné vodě, biorelevantním médiu simulujícím prostředí žaludku a biorelevantním médiu simulujícím prostřední tenkého střeva). K vyhodnocení vzniku případných interakcí mezi liquisolid práškem a tělem tobolky se využije infračervená spektroskopie a diferenciální skenovací kalorimetrie.

S ohledem na zaměření experimentální části práce, se teoretická část zabývá popisem liquisolid systémů a jejich přípravou, mechanismy zvyšování biologické dostupnosti u těchto systémů, jejich výhodami a nevýhodami a pomocnými látkami, které se během přípravy používají (netěkavá rozpouštědla, nosiče, obalovací materiál). Jedna kapitola je věnována také želatinovým tobolkám, jejich přípravě a možnostem interakcí mezi obalem tobolky, rozpouštědlem a nosičem.

Seznam symbolů a zkratk

CysA	Cyklosporin A
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
FaSSGF	Umělá žaludeční šťáva simulující prostředí „nalačno“ (z anglického Fasted State Simulated Gastric Fluid)
FaSSIF	Umělá střevní šťáva simulující prostředí „nalačno“ (z anglického Fasted State Simulated Intestinal Fluid)
HPMC	Hypromelosa (hydroxypropylmethylcelulóza)
IČ	Infračervená spektroskopie
LČ	Léčivo, léčiva
LF	Léková forma
LS	Liquisolid
LSPS	Liquisolid práškové směsi
LSS	Liquisolid systémy, systémy kapalina v pevné fázi
M _w	Molekulární hmotnost (z anglického molecular weight)
NUS2	Neusilin [®] US2
PEG	Makrogol (polyethylenglykol)
PG	Propylenglykol
PL	Pomocná látka

PS 80	Polysorbát 80
SEM	Elektronová skenovací mikroskopie (z anglického scanning electron microscopy)
SSA	Specifický měrný povrch (z anglického specific surface area)
Tg	Teplota skelného přechodu (z anglického the glass transition temperature)

1 Úvod

Pro pacienty je nejvíce vyhovující a pohodlné přijímat léčiva ústy. Z tohoto důvodu je perorální cesta nejsnazším a hlavním způsobem podávání LČ do organismu. Biologická dostupnost řady léčiv (LČ) po perorálním podání je však často limitována jejich nízkou rozpustností ve vodném prostředí.^{1,2}

Existují však různé technologické metody a finální lékové formy (LF), které mohou v konečném důsledku urychlovat rozpouštění takovýchto LČ, popřípadě zlepšovat jejich absorpci. K těmto metodám se řadí například příprava samoemulgujících systémů, mikronizace léčiva, formulace liquisolid systémů (LSS, systémy kapalina v pevné fázi), příprava pevných disperzí, využití kosolventů, vznik cyklodextrinových komplexů, změna pH a řada dalších. Díky těmto metodám, popřípadě LF můžeme dosáhnout požadované koncentrace LČ v systémovém oběhu, čímž dochází k nástupu samotného farmakologického účinku.³

Příprava LSS je nová, moderní a slibná metoda, která může pozměnit rychlost rozpouštění LČ nerozpustných či omezeně rozpustných ve vodném prostředí, a tím ovlivnit jejich biologickou dostupnost. Principem LSS je nasorbování LČ v kapalné podobě (roztok, suspenze nebo emulze) na porézní nosič. Převedení LČ do kapalné formy probíhá jeho smísením s rozpouštědlem s požadovanými vlastnostmi. Použité netěkavé, zpravidla hydrofilní rozpouštědlo snižuje povrchové napětí mezi disolučním médiem a povrchem lékové formy (LF), čímž dojde ke zrychlenému uvolňování LČ z LF a následně ke zvýšení jeho biologické dostupnosti.^{1,3}

2 Teoretická část

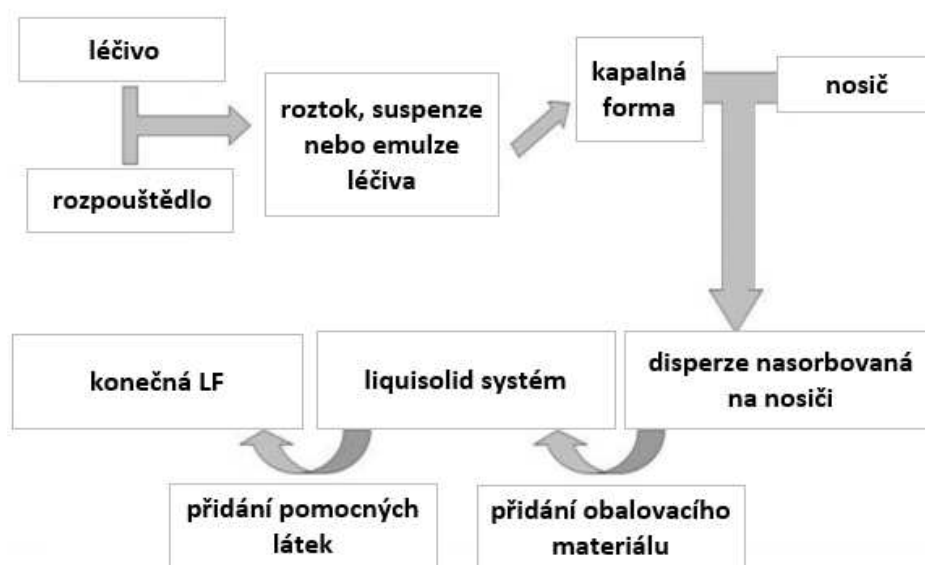
2.1 Systémy kapalina v pevné fázi (LSS)

Liquisolid systémy jsou charakterizovány tím, že se v nich léčivo nachází v kapalně fázi (disperze LČ v rozpouštědle), která je navázaná na porézní pevné částice nosiče (například mikrokrytalická celulóza, oxid křemičitý) za vzniku suchého a volně tekoucího prášku.^{2,4}

Předchůdcem LSS byly tzv. práškové roztoky, které se připravovaly inkorporací roztoků LČ v netěkavých rozpouštědlech mísitelných s vodou do struktury nosiče s velkým povrchem částic. Limitací však byla nemožnost jejich přeměny do jiné než práškové podoby, jelikož vlastnosti práškových roztoků neumožňovaly jejich lisování do tablet. Z tohoto důvodu se vyvinula nová a vylepšená technika v podobě přípravy LSS, která díky vzniku suchého, volně tekoucího, nepřilnavého, a především lisovatelného prášku další zpracování do LF (plnění do tobolek, lisování do tablet) umožnila.^{1,5}

2.1.1 Příprava LSS

Příprava LSS probíhá v několika krocích, které jsou schematicky zobrazené na *Obrázku 1*. Nejprve se LČ rozpustí nebo disperguje ve vhodném netěkavém rozpouštědle, čímž dochází ke vzniku roztoku, suspenze či emulze LČ o požadované koncentraci. Poté se připravená disperze sorbuje na přesně vypočítané množství nosiče. Nosič by měl být ideálně vysoce porézní s velkým povrchem a disponovat dostatečnými absorpčními vlastnostmi. Výsledná, často ještě vlhká směs je přeměněna přidáním obalovacího materiálu na suchý, nepřilnavý, volně tekoucí a snadno stlačitelný prášek. K tomuto liquisolid prášku je dále možné přidat ostatní pomocné látky jako jsou mazadla, rozvolňovadla, pojiva a další v závislosti na požadované konečné LF, kterou mohou být tablety, tvrdé želatinové tobolky nebo pelety.^{2,3,6}



Obrázek 1: Schematické znázornění přípravy liquisolid systémů⁷

2.1.2 Mechanismy zvyšování biologické dostupnosti LSS

Pro LČ formulovaná do podoby LSS existuje několik základních mechanismů, které vysvětlují zvýšení biologické dostupnosti léčiv. Prvním z nich je, že se rozpuštěné LČ ve formě disperze nasorbuje na celý povrch nosiče. Tím dojde k jeho snazšímu uvolňování z LF. Navíc, díky použití hydrofilního rozpouštědla, které převede LČ do rozpuštěné formy, dochází ke zvýšení smáčivosti finální LF hydrofilním disolučním médiem, popřípadě hydrofilními tekutinami gastrointestinálního traktu. Avšak nejzásadnější pro zvyšování biologické dostupnosti pomocí LSS je přítomnost LČ ve zpravidla rozpuštěné formě, díky které se po podání nemusí v organismu rozpouštět, čímž je LČ ihned dostupné k absorpci skrze sliznice gastrointestinálního traktu do systémového oběhu.^{3,5}

2.1.3 Výhody a nevýhody LSS

2.1.3.1 Výhody

Pro liquisolid systémy byla popsána řada výhod, mezi které patří:

- Jednoduchost metody, relativně nízké výrobní náklady a potenciál využití ve farmaceutickém průmyslu.²
- Minimalizace vlivu pH na rychlost uvolňování LČ.³
- Lze je použít pro řízené, konvenční i zrychlené uvolňování LČ.^{3,8} Prodlouženého uvolňování je možné dosáhnout použitím hydrofobního nosiče jako je např. Eudragit®RL a RS nebo pomocí retardační pomocné látky jako je např. hypromelosa (HPMC).⁶
- Koncové zpracování je podobné jako u konvenčních LF (lisování tablet, plnění do tvrdých želatinových tobolek).⁸

2.1.3.2 Nevýhody

Mezi hlavní limitace této metody patří:

- Požadavek na vysokou rozpustnost LČ v netěkavém rozpouštědle v případě, že je použit roztok léčiva.³
- Během lisování LS (liquisolid) prášků do podoby tablet může docházet k vytlačování kapaliny (tzv. liquid squeezing-out fenomén), čímž tablety získají nevyhovující vzhled a nedostatečnou mechanickou odolnost (pevnost, oděr).³
- Hlavní limitací je použití vysoké dávky nerozpustného LČ.⁹ Vyšší dávky léčiv vyžadují pro převedení léčiva do kapalné formy větší množství rozpouštědla, což se promítne i do vyššího množství pevných pomocných látek (nosiče, obalovacího materiálu). To následně vede ke zvýšení hmotnosti tablety nad limit, kdy je možné LF bezproblémově spolknout. Tento problém lze do jisté míry vyřešit použitím nosičů s velkým povrchem a vysokou sorpční schopností (např. mezoporezních silikátů).^{3,6,9}

2.1.4 Pomocné látky pro přípravu LSS

Hlavními pomocnými látkami při přípravě LSS jsou: netěkavá rozpouštědla, nosiče a obalovací materiály. Kromě těchto specifických pomocných se využívají také klasické pomocné látky, které jsou běžně používány u konvenčních LF, jako například plniva, pojiva, kluzné látky, mazadla, antiadhezivní látky, rozvolňovadla a další.³

2.1.4.1 Netěkavá rozpouštědla

Při přípravě LSS se zpravidla využívají inertní rozpouštědla, která jsou hydrofilní povahy a jsou tudíž velmi dobře mísitelná s vodou, mají vysoký bod varu a dostatečnou schopnost solubilizovat léčivo.^{2,10} Mezi netěkavá rozpouštědla, která se nejvíce využívají při přípravě LSS patří kapalně makrogoly (PEG 200–600), polysorbáty (oxyethylenované estery vyšších mastných kyselin, tweeny), propylenglykol (PG), poloxamery či glycerol.³

Rychlost uvolňování LČ z výsledného LSS závisí z velké části na volbě konkrétního rozpouštědla^{3,11}, jak dokazuje např. studie Gubi et al.¹² V této studii byla zkoumána možnost zvýšení rozpustnosti ve vodě špatně rozpustného bromhexinu hydrochloridu pomocí LSS. LSS byly připraveny za použití rozpouštědel PG a PEG 400. LSS s PG vykazoval rychlejší uvolňování léčiva než LSS s obsahem PEG 400. Vliv by na to mohla mít rozdílná rozpustnost bromhexinu v různých rozpouštědlech, která je v PEG 400 nižší než v PG.¹² Vliv typu rozpouštědla na rychlost uvolňování léčiva byl prokázán také ve studii Mahajan et al.¹³, kde byla zkoumána netěkavá rozpouštědla PG, PEG 200 a PEG 400. Snahou bylo zjistit, které z rozpouštědel je nejlepší volbou pro zrychlení uvolňování léčiva glipizidu z LS tablet. Výsledky ukázaly, že příprava LSS obecně vedla k rychlejšímu uvolňování léčiva, nicméně rychlost se zvyšovala v pořadí PEG 400 > PEG 200 > PG.¹³

2.1.4.2 Nosiče

Pro získání suchého prášku z kapalně formy LČ hraje hlavní roli volba nosiče. Nosiče disponují svými jedinečnými vlastnostmi, avšak každý z nich by měl mít určité shodné vlastnosti jako jsou: vhodná porozita, dostatečná sorpční kapacita a snadnost zpracování běžnými postupy do výsledné LF. Dále by nosiče měly být bez

negativního dopadu na stabilitu LČ, a to i během skladování. Nosiče by neměly bránit kompletnímu uvolňování LČ v organismu. V neposlední řadě by měly mít nulovou toxicitu.^{1,8,14}

Výběr vhodného nosiče pro přípravu konkrétních LSS pak závisí především na stlačitelnosti, tokových vlastnostech, sorpční kapacitě a na velikosti specifického měrného povrchu (SSA, z anglického specific surface area). Čím vyšší má nosič SSA, tím vyšší je faktor zatížení kapalinou.^{1,8,14,15}

Na základě chemické struktury lze nosiče rozdělit do čtyř kategorií:⁸

- 1) celulóza a deriváty celulózy (mikrokrytalická celulóza, HPMC),
- 2) sacharidy (laktóza, škrob) a cukerné alkoholy (sorbitol),
- 3) silikáty (oxid křemičitý, magnesium aluminometasilikát, kaolin, diosmektit a mezoporézní silikáty),
- 4) ostatní (bezvodý hydrogenfosforečnan vápenatý, polymethakryláty, uhličitan hořečnatý).

Ve studii Hentzschel et al.¹⁵ byly zkoumány nosiče mikrokrytalická celulóza, magnesium aluminometasilikát, granulovaný bezvodý hydrogenfosforečnan vápenatý, koloidní oxid křemičitý a křemičitan vápenatý. V této studii bylo zjištěno, že SSA a struktura zkoumaných látek se od sebe významně liší. Například SSA hydrogenfosforečnanu vápenatého ($32 \pm 1 \text{ m}^2/\text{g}$) je 32x vyšší než u mikrokrytalické celulózy ($1 \pm 0 \text{ m}^2/\text{g}$). Sférický, granulovaný hydrogenfosforečnan vápenatý vykazuje vysokou poréznost, zatímco mikrokrytalická celulóza má hladký povrch. Silikáty poskytují nejvyšší SSA ze všech zkoumaných látek. Křemičitan vápenatý svojí krytalickou strukturou a velkými mikropóry má SSA $142 \pm 7 \text{ m}^2/\text{g}$, zatímco koloidní oxid křemičitý s volnými aglomeráty tvořenými částicemi o velikosti nanometrů odpovídá SSA $201 \pm 7 \text{ m}^2/\text{g}$. Zdaleka nejvyšší hodnotu SSA má magnesium aluminometasilikát ($339 \pm 1 \text{ m}^2/\text{g}$), který se připravuje sprejovým sušením, jehož výsledkem jsou sféricky tvarované, porézní a ultralehké granule. Přidáním kapalného léčiva (tokoferol acetát) se u mikrokrytalické celulózy, hydrogenfosforečnanu vápenatého a magnesia aluminometasilikátu zlepšily tokové vlastnosti. Kapalně LČ je zpočátku adsorbováno na povrch nosiče, kde je následně pokryto koloidním oxidem

křemičitým jako obalovacím materiálem, což vede k částicím s lepšími tokovými vlastnostmi díky snížení mezičásticových sil.¹⁵

2.1.4.3 Obalovací materiály

Obalovací materiály mají velmi jemné, v průměru 10 až 5 000 nm velké částice, které absorpcí přebytečné kapaliny z povrchu nosiče vedou ke vzniku suchého, nepřilnavého a volně tekoucího prášku.²

Nejběžněji používaným obalovacím materiálem je koloidní oxid křemičitý (Aerosil[®]200, Cab-O-Sil[®] M5), dále amorfní silikagel (Syloid[®], Sylysia[®]), granulovaný oxid křemičitý (Aeroperl[®]), aerogel oxidu křemičitého, prášková forma magnesia aluminometasilikátu (hlinitokřemičitan hořečnatý, Neusilin[®], Pharmsorb[®], Veegum[®]) a křemičitan vápenatý (Florite[®]).^{6,8}

Ve studii podle Hentzschel et al.¹⁵ byly zkoumány obalovací materiály koloidní oxid křemičitý, magnesium aluminometasilikát a křemičitan vápenatý. Nahradí-li se koloidní oxid křemičitý za magnesium aluminometasilikát nebo křemičitan vápenatý dochází k navýšení tzv. absorpčního faktoru, tedy množství kapalného léčiva, které je možné do LSS zpracovat. Obsah kapaliny lze pak zvýšit až o 55 %, kdy zůstane zachována přijatelná pevnost (dobré tabletové vlastnosti).¹⁵

2.2 Tobolky

Tobolky lze na základě fyzikálních vlastností rozdělit na dva hlavní typy: tvrdé a měkké tobolky. Tvrdé i měkké tobolky jsou zpravidla vyráběny z gelujících látek např. živočišných proteinů (želatina), rostlinných polysacharidů a jejich derivátů (karagenan, alginát, modifikované formy škrobu a celulózy (HPMC)) a dalších polymerních látek např. polyvinylalkoholu.^{16,17}

Mezi výhody použití tobolek patří:¹⁷

- maskování nepříjemné chuti a zápachu,
- jednoduchost podávání do organismu,
- snadná polykatelnost, díky tomu, že se při kontaktu se slinami stávají kluzkými,
- v porovnání s tabletami se používá méně pomocných látek,
- tobolka je fyziologicky inertní a rychle se tráví v gastrointestinálním traktu,
- manipulace s nimi je lehká a nabízí možnost použít pomocné látky, které obal tobolek zakalí, popřípadě zbarví, a tím poskytovat ochranu před světlem.

Mezi nevýhody tobolek patří problematika hygroskopických léčiv a pomocných látek (PL), které absorbují vodu z tobolky, což způsobí její křehkost, taková léčiva a PL nejsou pro plnění do tobolek vhodná, dále také nejsou vhodné koncentrované roztoky léčiv, které vyžadují předchozí ředění, protože při perorálním podávání vedou k podráždění žaludku.¹⁷

2.2.1 Měkké želatinové tobolky

Měkké želatinové tobolky jsou jedinečnou lékovou formou, která byla původně vytvořena k maskování nepříjemné chuti a zápachu léčivých látek. Jedná se o tobolky, které se skládají ze dvou hlavních komponent, a to želatinového obalu a náplně. Jsou průmyslově plněny nevodnými kapalnými, popřípadě polotuhými látkami či zcela ojediněle suchými prášky a následně jsou hermeticky uzavřeny. Želatinový obal je primárně složen z želatiny, změkčovadla a vody. Jako změkčovadlo se používají polyoly s vysokým bodem varu, jako je glycerol a sorbitol. Kromě toho může také

obsahovat stabilizátory (např. agar, arabskou klovatinu, karagenan, tragant¹⁸), barviva (např. syntetická barviva – sluneční žluť, chinolinová žluť, erythrosin, tartrazin, indigo, dále pigmenty – oxid železa, oxid titaničitý a přírodní barviva – beta-karoten, riboflavin, kurkumin^{19,20}), konzervanty (např. benzoan sodný, chlorhexidin-diacetát, parabeny¹⁸), látky způsobující zakalený vzhled tobolek (např. oxid titaničitý¹⁹), případně chuťová korigencia (např. mátovou, skořicovou či pomerančovou silici²¹) a sladidla (např. mannitol, sorbitol, xylitol, sacharin sodnou sůl¹⁸, steviosid, aspartam²¹). V porovnání s tvrdými želatinovými tobolkami mají obvykle silnější obal a typicky vykazují i vyšší stupeň elasticity, kvůli většímu množství přidaného změkčovadla vzhledem k obsahu želatiny. Želatinový obal může být dále potažen vhodným obalovacím materiálem jako je například celulóza acetát ftalát, která zajistí řízené enterální uvolňování.^{16,17,22,23}

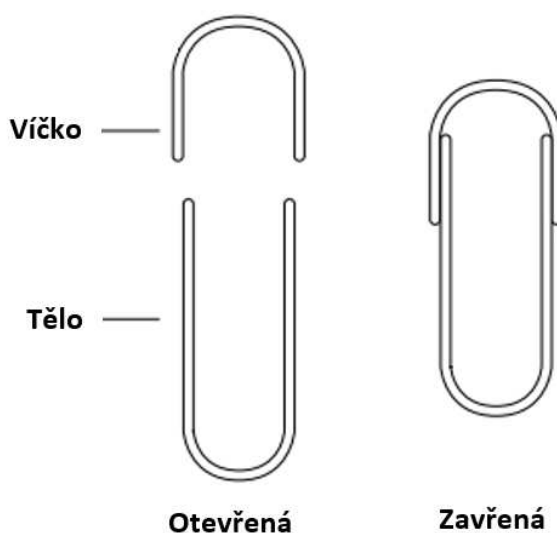
2.2.1.1 Příprava měkkých želatinových tobolek

Měkké tobolky jsou vytvořeny, plněny a uzavřeny současně v jedné operaci, což je z důvodu přípravy gelové hmoty a následnému sušení časově velmi náročný proces, který může trvat 2 až 5 dní. Pro přípravu měkkých želatinových tobolek existuje několik postupů, a to deskový, rotační matricový a reciproční lisovací proces. Nejvíce se v průmyslu využívá rotačního matricového procesu, kdy se dva želatinové pásy, které jsou na rotačních válkách, postupně k sobě přibližují. V okamžiku, kdy dojde ke spojení obou pásů želatiny dojde ke vstříknutí náplně do kapsy, která se z pásů vytvořila. Následně je kapsa tlakem a teplem vytvořeným z otáčejících se válců uzavřena. Vytvořené tobolky mohou být shromažďovány v chladicí lázni, aby se zabránilo vzájemnému přichycení tobolek. Poté, co jsou tobolky vytvořeny, dochází k jejich sušení, kdy je odstraněna většina vody, to vede k tobolkám s obsahem vlhkosti okolo 4-10 %. Deskový proces spočívá v umístění želatinového plátu na desku obsahující kapsy (z anglického pockets). Kapsy jsou naplněné kapalinou nebo pastou. Přes naplněné kapsy se přidá další želatinový plát a pod lisem se vytvarují a vystříhnou tobolky. Reciproční lisovací proces využívá třech součástí, a to měřicího válce, lisovacího válce matrice a uzavíracího válce. Jak se měřicí válec a lisovací válec matrice otáčejí, jsou odměřené dávky želatiny přeneseny do kapes v matici lisovacího válce. Pokračuje rotace naplněné matrice lisovacího válce, která se postupně sbíhá

s rotujícím uzavíracím válcem, kde je nanesen druhý plát želatiny k vytvoření druhé poloviny tobolky. Tlak vyvinutý mezi lisovacím válcem a uzavíracím válcem utěsňuje a vyřízne tobolky.^{17,22-25}

2.2.2 Tvrdé želatinové tobolky

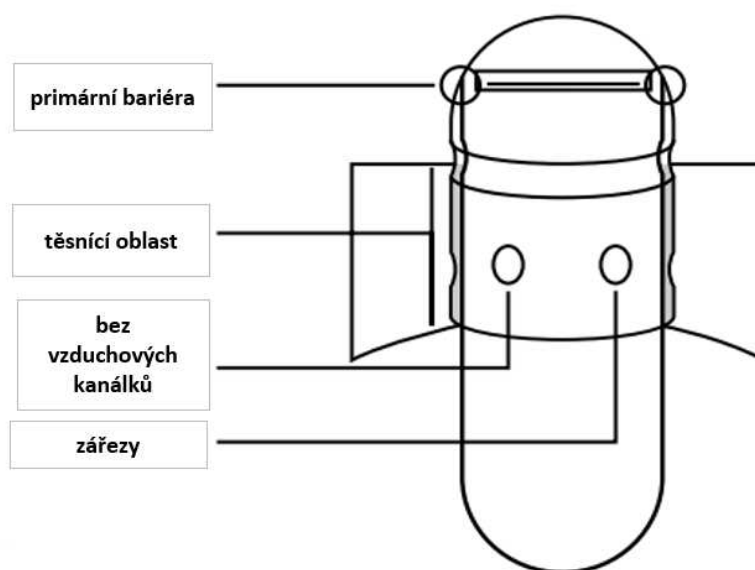
Tvrdé želatinové tobolky jsou obvykle čiré, bezbarvé a v podstatě bez chuti. Jsou k dispozici v mnoha velikostech a stejně jako měkké tobolky jsou schopny maskovat nepříjemnou chuť či zápach léčivých látek. Jedná se o tobolky, které jsou složeny ze dvou dílů válcovitého tvaru, které jsou na jednom konci uzavřeny. Kratší díl se nazývá „víčko“ a nasazuje se přes otevřený konec delšího dílu, který se označuje jako „tělo“ tobolky (Obrázek 2).^{16,17,26}



Obrázek 2: Víčko a tělo tobolky²⁶

Želatinová tobolka je primárně složena ze směsi želatiny, glycerolu a vody. Kromě toho může také obsahovat barviva a látky způsobující zakalený vzhled tobolek. V porovnání s měkkými želatinovými tobolkami mají obvykle tenčí obal a jsou typicky tužší. Jako změkčovadlo zde působí voda a obvykle obsahují 13-16 % vlhkosti. Poté, co jsou tobolky vyrobeny je důležité, za jakých podmínek jsou skladovány. Pokud jsou v prostředí s vysokou relativní vlhkostí, může dojít k deformaci tvrdého obalu tobolky. V opačném případě, kdy je prostředí extrémně suché, mohou tobolky příliš křehnout a během manipulace se mohou rozpadnout.^{16,17,22,26}

Tvrde želatinové tobolky se zpravidla dodávají prázdné, připravené k plnění nejčastěji suchými prášky či peletami. Díky vývoji a novým možnostem technického vybavení v posledních letech, se speciální želatinové tobolky (LICAPSTM, *Obrázek 3*) mohou používat i pro plnění kapalnými či polotuhými látkami. Tvrdá želatinová tobolka využívaná pro plnění kapalinami je složením shodná s tobolkou používanou pro plnění prášky.^{22,24,26}

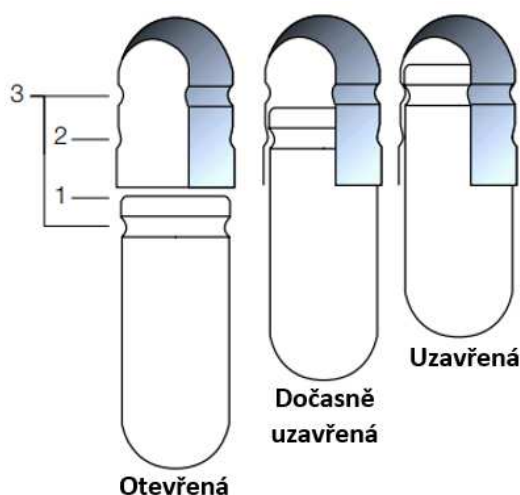


Obrázek 3: tobolka LICAPSTM 26

2.2.2.1 Plnění a uzavírání tvrdých želatinových tobolek

Tvrde želatinové tobolky se vyrábí v samostatné operaci a jsou dodávány prázdné, určené k dalšímu použití (naplnění). Tím se proces od samotného plnění, uzavírání až po zabalení tobolek stává mnohem kratší, zpravidla pouze 6 až 8 hodin, oproti přípravě měkkých tobolek. V současnosti se používají moderní automatické stroje na plnění tvrdých želatinových tobolek, které dokážou naplnit až 200 000 tobolek za hodinu a jsou také schopny plnit několik různých látek během jednoho procesu. V jedné operaci stroje na plnění tvrdých tobolek seřadí a upraví tobolky, oddělí tělo a víčko, tobolku naplní a opětovně spojí obě části dohromady. Vysokorychlostní plnicí stroje pro pevné látky používají dva hlavní principy plnění označované jako typ dávkovače a typ dávkovacího disku (pěchování).^{22,24,26}

Typ dávkovače využívá dávkovací trubici, která se ponoří do práškového lože a přenáší náplň do těla tobolky. Typ dávkovacího disku je založen na plnicích komorách, které jsou vyvrtány do dávkovacího disku. Prášek proudí do plnicích komor, kde následuje mírné stlačení prášku pěchovadlem, které se opakuje pětkrát, než je náplň přenesena do těla tobolky otvorem pěchovacího disku. Během výroby a balení se obecně zvyšuje tlak uvnitř tobolek v důsledku rychlosti uzavírání a mechanického namáhání, což často vede k tobolkám různé délky a nebezpečí prasknutí po naplnění. Z tohoto důvodu byly u tobolek zavedeny dvě obvodové drážky (*Obrázek 4, bod 3*), jedna umístěná kolem těla těsně pod jeho okrajem a další kolem víčka těsně pod horní částí, aby došlo při stlačení víčka a těla tobolky k zablokování jejich polohy, což zajistí pevné uzavření naplněných tobolek a zároveň i jejich stejnou délku. Tyto drážky však nevyřeší problém přepravy prázdných tobolek, kdy může dojít k otevření tobolky. Tento problém vyžadoval vynález zářezu na víčku (*Obrázek 4, bod 2*), který umožňuje dočasné uzavření obou dílů. Tobolka je tak během přepravy bezpečně zavřená, ale plnicí nástroj ji dokáže snadno otevřít.²⁶



1. Zkosený okraj zabraňuje promáčknutí a rozdělení.
2. Zářez zabraňující předčasnému otevření tobolky.
3. Drážky bezpečně uzavřou naplněnou tobolku.

*Obrázek 4: Uzavření tobolky*²⁶

Jak již bylo řečeno výše, tobolky jsou zpravidla plněny prášky, granuláty či peletami, takto naplněné tobolky stále představují většinu tvrdých želatinových tobolek dostupných na trhu. Avšak historicky byly první tvrdé želatinové tobolky vyvinuty pro kapalná léčiva. Díky želatinové tobolce bylo možné formulovat novou LF pro kapalný balzám copaiuae, který byl užíván během napoleonských válek jako lék na cévní onemocnění. Současné automatické stroje pro plnění tvrdých želatinových tobolek horkými nebo studenými kapalinami, popřípadě polotuhými látkami obvykle dávají náplň objemově. Přístroje pro plnění tobolek vysoce viskózními materiály pracují na principu vytlačování náplně válcem přímo do těla tobolky. Alternativní přístroj pro plnění kapalných látek funguje na principu plnění horkých materiálů vysokým tlakem pomocí časově řízených pneumatických ventilů. Existují dva běžně používané průmyslové způsoby uzavírání tobolek, které jsou plněné kapalinami, popřípadě polotuhými materiály. Prvním a starším z nich je takzvané páskování, ve kterém se použije želatinový pás k překrytí místa mezi víčkem a tělem tobolky. Tobolky se jednou nebo dvakrát přejedou kolečkem, které se točí v želatinové lázni. Vroubkované kolečko nabere množství želatiny a nanese ji na spojení mezi víčkem a tělem. Tobolky poté zůstávají v nosičích k usušení. Jedná se však o poměrně časově a finančně náročný proces. Druhý, novější a snadnější způsob uzavírání spočívá v nanesení hydroalkoholového roztoku mikrosprejem, který rovněž překryje místo mezi víčkem a tělem tobolky. Metoda využívá nízké povrchové napětí roztoku ethanol/voda, které umožňuje rychlé pronikání roztoku do překrytí mezi tělem a víčkem. Roztok ethanol/voda mírně rozpustí želatinu mezi víčkem a tělem, která taje během mírného zahřívání (40-60 °C) po dobu kratší, než je jedna minuta, aby došlo ke spojení obou vrstev želatiny.^{22,24,26}

2.2.3 Interakce v tvrdých želatinových tobolkách

Oblast kontaktu mezi tělem a kapalnou náplní je větší než v případě tvrdé želatinové tobolky, která je plněná pevnou látkou. Z tohoto důvodu je důležité prověřit potenciál pro interakce mezi náplní a tělem tobolky (kompatibilita pomocných a léčivých látek s tvrdou želatinovou tobolkou). K hlavním faktorům, které ovlivňují dlouhodobou stabilitu tobolek patří především účinky vlhkosti, rozpustnost polymeru použitého pro přípravu tobolky (nejčastěji želatina) a fyzikální vlastnosti náplně.^{22,24}

2.2.3.1 Účinky vlhkosti

Tvrdé želatinové tobolky obsahují 14-16 % vody (vlhkosti). Pokud by byl do tobolky naplněn hygroskopický materiál, mohlo by dojít k vyextrahování vody z obalu tobolky, a tím by se vyvolalo její křehnutí. Potenciál k tomuto jevu se kontroluje skladováním 10 tobolek naplněných testovaným materiálem v exsikátoru ve vzpřímené poloze po dobu 1, 2 a 4 týdnů, za různých podmínek relativní vlhkosti, která je v rozmezí od 2,5 do 65 %.^{22,24,27}

2.2.3.2 Rozpustnost polymeru použitého pro přípravu tobolky

Hlídá se i potenciál vzniku interakcí mezi kapalnou náplní a tělem tobolky, které mohou vést až k rozpuštění želatinového obalu. Pomocné látky, jako jsou PEG, polysorbát, hydroxypropylcelulóza nebo polyvinylpyrrolidon nacházející se v kapalně náplni, mohou mít nebo u nich může během skladování vznikat nízká hladina aldehydů.²⁸ Aldehydická funkční skupina má potenciál zesíťovat želatinu, a tím měnit rozpustnost polymeru, což vede ke zpožděnému rozpouštění. Potenciální interakce mezi náplní a želatinovým obalem se dají ověřit tím, že se tobolky naplní testovaným materiálem a jsou skladovány v uzavřených lahvích z polyethylenu o vysoké hustotě při 40 °C a relativní vlhkosti 75 % po dobu až šesti měsíců. Po uplynutí testované doby se tobolky vyprázdní a vyčistí. Pro vyhodnocení se používá acetaminofen, který zde působí jako referenční materiál. Acetaminofen je naplněn do vyprázdněných tobolek, které byly předtím skladovány po testovanou dobu a stanovuje se rychlost uvolňování léčiva. Porovnání profilů rychlosti uvolňování acetaminofenu z tobolek, které předtím obsahovaly testovaný materiál a z referenčních tobolek, může indikovat potenciální interakce mezi náplní a obalem tobolky.^{22,24,29}

2.2.3.3 Fyzikální vlastnosti náplně (teplota, viskozita)

Důležitými faktory, na které je potřeba během plnění tobolek kapalinami myslet, jsou teplota a viskozita. V případě, že je náplní suspenze, je nezbytné sledovat i velikost částic suspendovaného LČ, přičemž doporučená velikost částic je pod 50 μm.^{22,24}

Tvrde želatinové tobolky mohou být plněny newtonskými kapalinami jako jsou oleje, tixotropními či reopektickými gely nebo polotuhými matricemi při zvýšených teplotách, ve kterých je účinná látka buď rozpuštěná nebo suspendována jako jemná disperze. Tyto kapaliny jsou výhodné zejména kvůli tomu, že želatina ve studené vodě bobtná a při zahřátí nad 40 °C se rozpouští. Zároveň je nutné, aby složení formulace plněné do tobolek bylo kompatibilní s želatinou. U tvrdých želatinových tobolek by teplota neměla přesáhnout 70 °C a viskozita by během dávkování měla být mezi 0,1–1 Pa.s. Pokud je viskozita příliš nízká, mohou se během výrobního procesu tobolek při rozstříkávání želatiny objevit kolem dávkovací trysky pouzdra, která by mohla kontaminovat oblast překrytí mezi tělem a víčkem tobolky. Tím by mohlo dojít k zabránění vytvoření dobrého těsnění, popřípadě by mohlo dojít k nesourodému naplnění tobolek. Látky, které se plní tepelně změkčené by měly být v rozmezí 26 – 70 °C, protože tvrdé želatinové tobolky tolerují roztavené látky do 70 °C. Při vyšších teplotách želatina denaturuje.^{18,22,24,30-32}

2.2.3.4 Kompatibilita

Pomocné látky, které lze z hlediska kompatibility s želatinovým obalem považovat za vhodné pro formulaci kapalných a polotuhých látek do tvrdých želatinových tobolek, jsou rozděleny do tří skupin:²⁴

- Lipofilní kapalná vehikula (např. ricinový olej, bavlníkový olej, arašídový olej, kukuřičný olej, olivový olej, sezamový olej, sójový olej a slunečnicový olej)
- Polotuhá lipofilní vehikula (např. hydrogenovaný ricinový, arašídový, bavlníkový, palmový a sójový olej) a modifikátory viskozity pro lipofilní kapalná vehikula (aerosil, cetylstearylalkohol, cetylalkohol, glycerylbehenát, glycerylpalmitostearát a další)
- Solubilizační činidla, povrchově aktivní látky, emulgátory a enhancery absorpce (kapryol 90, lauroglykol 90, PEG (polyethylenglykol) $M_w > 4000$ (molekulární hmotnost), poloxamer 124 nebo 188, polysorbát 80 a další)

Biologickou dostupnost léčiv špatně rozpustných ve vodném prostředí lze zlepšit tím, že se léčivo naplní v kapalné nebo polotuhé formě do měkkých, popřípadě i tvrdých želatinových tobolek. Jak bylo popsáno výše, tvrdé želatinové tobolky mají oproti měkkým želatinovým tobolkám řadu výhod jako například zjednodušený proces výroby, možnost použití vyšších teplot při plnění a není nutný přídavek změkčovadel. V kapalných náplních v komerčně dostupných perorálních přípravcích se často vyskytují běžně používaná solubilizační činidla, jako je např. ethanol, propylenglykol (PG), glycerol či makrogol 400 (PEG 400). Jedná se o nízkomolekulární a polární molekuly, které mohou proniknout z kapalné náplně do obalu tobolky, změkčit ho a tím ovlivnit obsah vlhkosti. Vlhkost pak způsobí narušení fyzikální integrity, konkrétně způsobí křehkost tobolky. Rozpouštědla mohou také zvyšovat schopnost solubilizovat léčiva. Tyto problémy lze vizuálně pozorovat někdy až po několika měsících. Křehkost tobolek se testuje destruktivními metodami na základě odolnosti prázdného želatinového obalu vůči nárazu, popřípadě stlačení mechanickým namáháním. Při tomto testu se tobolky buď rozbijí nebo zůstanou neporušené. Byla popsána nedestruktivní metoda, a to texturní analýza, která se nejčastěji využívá k hodnocení mechanických vlastností LF, zejména se jedná o měření pevnosti nebo elasticity, popřípadě k hodnocení mukoadhezivitu.^{22,27,33-36}

Vlivem nízkomolekulárních rozpouštědel na vlastnosti tobolek se zabývala např. studie Mei et al.³³, která ukázala, že přítomnost ethanolu a PG má za následek změkčení a oslabení tobolek. Alkoholy s malou molekulou totiž mají tendenci migrovat do těla tobolky a nahrazovat zde přítomnou vodu, která stabilizuje trojitou spirálovitou strukturu želatiny. Bylo také prokázáno, že tobolky naplněné PG vykazují mnohem nižší pevnost a sílu v tahu, a tím i kratší prodloužení při přetržení než u tobolek naplněných ethanolem. U tobolek, které byly naplněny PG bylo nutné provést měření do 1 minuty od naplnění, jinak by se tobolky staly příliš křehkými k testování na analyzátoru textury. Tobolky, které obsahují 15 % PG mají podobnou tvrdost jako prázdné tobolky. Avšak pokud je koncentrace PG vyšší než 20 % dochází k významné deformaci tvrdé želatinové tobolky. Na rozdíl od tobolek plněných ethanolem a PG se tobolky plněné PEG 400 staly tvrdšími a odolnějšími. To je způsobeno hygroscopicitou PEG 400, který absorbuje vodu z obalu, což vede ke zkrěhnutí

tvrdých želatinových tobolek. Použitá koncentrace PEG 400 nehraje významnou roli v ovlivnění obalu tobolky.³³

Ve studii Yanez³⁵ byla v tvrdých želatinových tobolkách naplněna nízkomolekulární rozpouštědla, jako je ethanol, PG a glycerol po dobu 3 měsíců. Tobolky s obsahem glycerolu vykazovaly vyšší elasticitu v porovnání s tobolkami, které obsahovaly PG nebo ethanol. Přímá interakce mezi glycerolem a želatinou z těla tobolky může snížit afinitu želatiny vůči vlhkosti, což by mohlo mít za následek vyšší elasticitu želatiny (stejný princip interakce jako při výrobě měkkých želatinových tobolek, kdy se přídatek glycerolu využívá jako změkčovač z důvodu vyšší elasticity tobolek v porovnání s tvrdými želatinovými tobolkami). Glycerol obsahuje z testovaných rozpouštědel nejvyšší počet hydroxylových skupin, čímž může narušit vodíkovou vazbu mezi molekulami želatiny, což usnadňuje mobilitu polarizovaných skupin v želatině související s vyšší elasticitou. PG je také schopen zvyšovat elasticitu, avšak ne v takové míře jako glycerol. Ze všech tří testovaných rozpouštědel má na elasticitu nejmenší vliv ethanol. To bylo potvrzeno i změnou teploty skelného přechodu (T_g), která byla stanovena pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC). DSC metoda potvrdila, že ethanol, PG a glycerol působí jako změkčovač a snižují T_g během skladování. Ethanol, který ze všech tří rozpouštědel obsahuje nejméně hydroxylových skupin, konkrétně jednu, vykazuje nejmenší změnu elasticity. Z čehož vyplývá, že čím více obsahuje látka hydroxylových skupin (tj. rostoucí hydrofilita), tím vyšší je změkčení tvrdé želatinové tobolky. Zároveň i skenovací elektronová mikroskopie (SEM) potvrdila, že pokud jsou jednotlivá rozpouštědla (PG, ethanol, glycerol) v tvrdých želatinových tobolkách podrobena skladování, dojde v jejich vzhledu k mírnému zažloutnutí. Tobolky vystavené PG vykazují největší změnu. Obal tobolky, která obsahovala PG je silnější, čímž nutí tobolku, aby se smrštila a dojde k mírné deformaci.^{22,35,36}

3 Experimentální část

3.1 Použité suroviny

Suroviny použité pro přípravu liquisolid prášku, jejich výrobce, číslo šarže a funkce ve formulaci jsou uvedeny v *tabulce 1*.

Tabulka 1: Přehled použitých surovin

Surovina	Zkratka	Funkce	Výrobce	Šarže
Neusilin® US2	NUS2	Nosič	Fuji Chemicals Industry Co., Ltd.	610030
Propylenglykol	PG	Rozpouštědlo	Dr. Kulich Pharma, s.r.o.	RB51126S02
Polysorbát 80	PS 80	Rozpouštědlo	Dr. Kulich Pharma, s.r.o.	OE11221X
Cyklosporin A	CysA	Léčivo	Teva Czech Industries s.r.o., Opava – Komárov	74141003317

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy

Typ: Entris 224i-1S

Výrobce: Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Německo/Helago, s.r.o.

DSC

Typ: DSC 200 F3 Maia®

Výrobce: Netzsch Premier Technologies, Německo

IČ

Typ: IR spektrometr Nicolet 6700 s ATR krystalem (ZnSe)

Výrobce: Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Laboratorní váhy

Typ: Kern 440–35N

Výrobce: Kern & Sohn GmbH, Německo

Míchačka

Typ: Cimarec i, Multipoint

Výrobce: Thermo Scientific™

Mísící zařízení

Typ: Wab Turbula® T2F, System Schatz

Výrobce: Willy A. Bachofen Ag Maschinenfabrik Švýcarsko

pH metr

Typ: HI 221

Výrobce: Hanna Instruments, Rumunsko

Přístroj pro stanovení doby rozpadu tobolek

Typ: D–63150, ZT 301

Výrobce: ERWEKA® GmbH, Heusenstamm/Německo

Ultrazvuková lázeň:

Typ: Sonorex Super 10 P

Výrobce: Bandelin electronic GmbH & Co KG, Německo

3.3 Použité metody

3.3.1 Příprava liquisolid prášků

Liquisolid práškové směsi (LSPS) bez léčiva se připravily prostým mísením nosiče (NUS2) a rozpouštědla (PG nebo PS 80) v poměrech 3:1, 2:1, 1:1 a 1:2 (Tabulka 2). Smísení obou složek LSPS probíhalo za pomoci třenky s těrku. Následně se směs přesítovala přes síto s průměrem ok 1 mm, aby došlo k rozbití shluků. Poté se LSPS homogenizovala v mísícím zařízení Turbula, ve kterém se směs mísila po dobu 10 minut rychlostí 34 otáček za minutu, za účelem zajistit rovnoměrné rozložení rozpouštědla ve směsi.

Tabulka 2: Složení LS směsí

Poměr	Neusilin® US2 [g]	Rozpouštědlo/disperze léčiva [g]
3:1	7,5	2,5
2:1	6,0	3,0
1:1	5,0	5,0
1:2	3,0	6,0

V případě přípravy LSPS s léčivem se nejdříve CysA dispergoval v rozpouštědlech (PG nebo PS 80) za vzniku 25% roztoku (PG), popřípadě suspenze (PS 80). Disperze se následně promíchávala po dobu nejméně 12 hodin. V případě použití PS 80 vznikla suspenze, která se dále homogenizovala 6 hodin za využití ultrazvukové lázně. Následně byly připraveny LSPS stejným způsobem jako v případě LSPS bez účinné látky.

3.3.2 Příprava liquisolid tobolek

Připravené LSPS byly plněny do tvrdých želatinových tobolek o velikosti 0. Každá tobolka byla jednotlivě naplněna 100 ± 5 mg práškové směsi a následně důkladně uzavřena. Nevyužitý objem tobolek nebyl vyplněn plnivem, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků přítomností dalších pomocných látek.

Z každé LSPS se připravilo celkem 60 tobolek. Tobolky pro hodnocení vlastností v čase 0 se připravily bezprostředně před jejich hodnocením. Část tobolek se po přípravě vložila do skleněných lékovek dodatečně utěsněných parafilmem a skladovala za laboratorních podmínek po dobu 1 nebo 3 měsíců před samotným stanovením doby rozpadu.

3.3.3 Příprava disolučních médií

Použité suroviny pro přípravu disolučního média FaSSGF (Umělá žaludeční šťáva simulující prostředí „nalačno“, z anglického Fasted State Simulated Gastric Fluid) a média FaSSIF (Umělá střevní šťáva simulující prostředí „nalačno“, z anglického Fasted State Simulated Intestinal Fluid), jejich výrobce a číslo šarže jsou uvedeny v *tabulce 3*.

Tabulka 3: Názvy použitých surovin na přípravu biorelevantního disolučního média FaSSGF a FaSSIF, jejich výrobce a číslo šarže

Surovina	Výrobce	Šarže
Prášek pro přípravu biorelevantního média FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF	Biorelevant.com Ltd, Velká Británie	FFF-0222-A
Hydroxid sodný	Lach-Ner, s.r.o., Neratovice	PP/2020/04491
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Hradec Králové	B03524A
Chlorid sodný	Fagron a.s., Olomouc	13J30-T06-012093
Kyselina chlorovodíková 35% p.a.	Ing. Petr Švec-PENTA s.r.o., Praha 6	1611241111

Pro přípravu 5 000 ml FaSSGF se na analytických vahách navážilo 9,995 g chloridu sodného. Chlorid sodný se kvantitativně převedl do zásobní lahve a přidalo se přibližně 4 800 ml čištěné vody. Po kompletním rozpuštění se zkontrolovala hodnota pH a případně upravila na požadovanou hodnotu 1,6 přidáváním kyseliny chlorovodíkové 1M. Následně se doplnil objem čištěnou vodou na 5 000 ml. Připravený pufr se využil pro přípravu média FaSSGF, kdy pro vznik 5 000 ml tohoto média bylo v pufru rozpuštěno 0,299 g FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF prášku. Médium se mohlo ihned použít, popřípadě skladovat 48 hodin při laboratorní teplotě (22-37 °C).

Pro přípravu 5 000 ml FaSSIF se na analytických vahách navážilo 2,10 g hydroxidu sodného, 22,35 g dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu a 30,93 g chloridu sodného. Po kvantitativním převedení do zásobní láhve se přidalo přibližně 4 800 ml čištěné vody. Po kompletním rozpuštění se zkontrolovala hodnota pH a případně se upravila na požadovanou hodnotu 6,5 postupným přidáváním roztoku kyseliny chlorovodíkové 1M nebo hydroxidu sodného 1M. Následně se doplnil objem čištěnou vodou na 5 000 ml. Připravený pufr se využil pro přípravu média FaSSIF, kdy pro vznik 5 000 ml tohoto média bylo v pufru rozpuštěno 11,2 g FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF prášku. Zásobní láhev se důkladně promíchala a nechala se

odstát 2 hodiny při laboratorní teplotě do vzniku slabé opalescence. Médium se mohlo skladovat 48 hodin při laboratorní teplotě (22–37 °C).

3.3.4 Stanovení doby rozpadu tobolek

Připravené tobolky se podrobily zkoušce na stanovení doby rozpadu. Jako médium byly použity čištěná voda, FaSSGF a FaSSIF vytemperované na teplotu $37,0 \pm 2,0$ °C. Do každé ze šesti trubic závěsného košíčku se vložila jedna tobolka a přidaly se disky, které měly za úkol omezit flotaci tobolek v médiu během zkoušky. Košíček byl následně zavěšen na příslušné místo přístroje měřícího rozpadavost tobolek a spustil se test, během kterého docházelo k vertikálnímu pohybu košíčku s tobolkami v médiu. Stanovoval se čas potřebný ke kompletnímu rozpadu každé ze šesti testovaných tobolek.

3.3.5 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Vyprázdněné a oprášené tobolky byly použity také v rámci diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC). Měření bylo provedeno v dusíkové ochranné atmosféře v rozmezí teplot 0–240 °C s rychlostí ohřevu 10 °C/min, kdy se k hodnocení vlastností využilo prvního ohřevu. Následně byly získané výsledky v podobě difraktogramů vyhodnoceny programem Netzsch Proteus Thermalanalysis.

3.3.6 Infračervená spektroskopie

K hodnocení infračervené spektroskopie (IČ) pomocí přístroje Nicolet 6700 s ATR krystalem (ZnSe) se použily předem vyprázdněné a důkladně odprášené tobolky. Měření, které bylo provedeno při laboratorní teplotě a vlhkosti 25–30 %, se získalo 128 skenů s rozlišením 2 cm^{-1} . Spektra získaná hodnocením těla tobolky byla vyhodnocena programem OPUS.

3.3.7 Statistické vyhodnocení

K vyhodnocení statistické významnosti u získaných výsledků, tj. stanovení jednosměrné ANOVY následované testováním založeném na Tukeyho vícenásobném srovnávání, se využil program GraphPad Prism 9.5.1. Výsledky se považovaly za statisticky významné, pokud byla pravděpodobnost nulové hypotézy dostatečně malá, tzv. hladina významnosti $p < 0,05$.³⁸

4 Výsledky a diskuse

Experimentální část této diplomové práce se zaměřila na sledování vlivu množství a typu použitých rozpouštědel na dobu rozpadu liquisolid systémů (LSS) v podobě tobolek. Studovány byly rovněž potenciální interakce mezi použitým rozpouštědlem a obalem tvrdé želatinové tobolky za použití diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a infračervené (IČ) spektroskopie. Liquisolid (LS) práškové směsi se skládaly z nosiče Neusilinu[®] US2 (NUS2) a rozpouštědel propylenglykolu (PG) či polysorbátu 80 (PS 80), popřípadě disperzí cyklosporinu A (CysA) v těchto rozpouštědlech, v různých poměrech uvedených v *tabulce 2*. Vliv rozpouštědel na vlastnosti tobolek se hodnotil stanovením doby rozpadu ve třech disolučních médiích, a to v čištěné vodě, biorelevantním médiu simulujícím prostředí žaludku na lačno (FaSSGF) a biorelevantním médiu simulujícím prostředí tenkého střeva na lačno (FaSSIF). Za účelem studia vlivu skladování na vlastnosti připravených tobolek, se všechny připravené tobolky hodnotily okamžitě po přípravě a následně po 1 a 3 měsících skladování za laboratorních podmínek.

Referenční tobolky obsahující pouze samotný nosič NUS2 v množství 100 mg se při měření v čase přípravy ve všech použitých médiích rozpadaly do $125,3 \pm 11,6$ s (*Tabulka 4*). Mezi jednotlivými hodnotami nebyly pozorovány signifikantní rozdíly, a proto je možné usuzovat, že médium nemá výrazný vliv na dobu rozpadu tobolek naplněných pouze samotným nosičem NUS2.

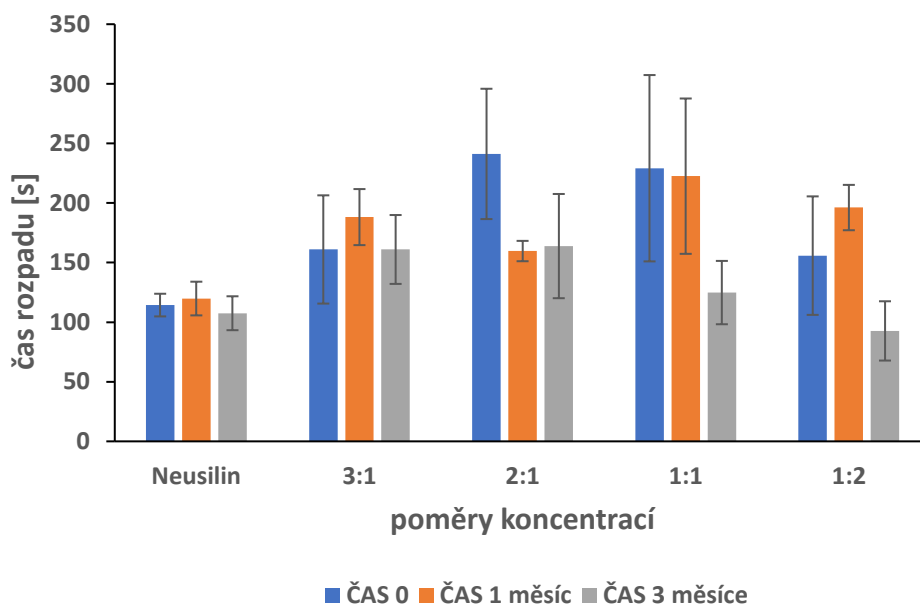
Tabulka 4: Doba rozpadu (sekundy) referenčních tobolek ve třech různých médiích a ve třech testovaných časech

Testovaný čas	Čištěná voda	FaSSGF	FaSSIF
V čase přípravy	$114,3 \pm 9,5$	$116,8 \pm 16,8$	$125,3 \pm 11,6$
1 měsíc	$119,8 \pm 14,1$	$146,0 \pm 29,4$	$137,7 \pm 3,2$
3 měsíce	$107,5 \pm 14,2$	$109,3 \pm 26,3$	$111,5 \pm 11,4$

Skldování tobolek po dobu 1 měsíce mělo mírně negativní vliv na jejich dobu rozpadu ve všech použitých médiích, nicméně ani v tomto případě nebyly rozdíly mezi jednotlivými hodnotami statisticky významné. Tobolky po 3 měsících skladování vykazovaly překvapivě rychlejší dobu rozpadu, kdy se tobolky nejpomaleji rozpadaly v médiu simulujícím prostředí tenkého střeva ($111,5 \pm 11,4$ s). Statistické vyhodnocení výsledků však opět neukázalo vliv doby skladování ani vliv použitého média na dobu rozpadu tobolek obsahujících pouze NUS2.

4.1 Vliv propylenglykolu na vlastnosti tvrdých želatinových tobolek

Výsledky hodnocení doby rozpadu ve **vodě** ukázaly, že se čas potřebný k rozpadu LS tobolek s obsahem PG oproti referenčním tobolekám prodloužil až na $241,2 \pm 54,7$ s (vzorek 2:1) (Obrázek 5). Toto zjištění je v souladu s výsledky studie Yanez³⁵, kde se porovnávala doba rozpadu a následně rychlost uvolňování léčiva u tobolek obsahujících samotný ibuprofen a tobolek s přídavkem PG. U formulace na bázi PG došlo k výraznému zpoždění rozpadu tobolky a k ovlivnění množství uvolněného léčiva v průběhu disoluční zkoušky, které bylo téměř dvojnásobně nižší oproti tobolekám obsahujícím pouze léčivo.³⁵



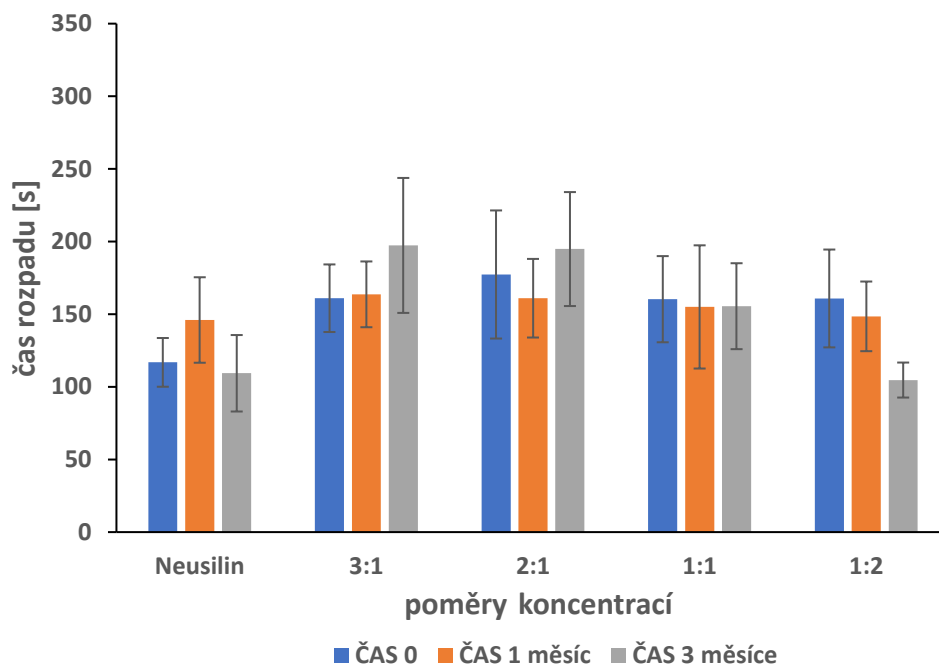
Obrázek 5: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PG (médiu čistěná voda)

Skladování nemělo výrazný vliv na dobu rozpadu tobolek ve vodě s výjimkou směsí 1:1 a 1:2, kde bylo pozorováno významné urychlení rozpadu LS tobolek oproti tobolekám hodnoceným okamžitě po přípravě (*Obrázek 5*). Nicméně skladování tobolek vedlo ke statisticky významným změnám v rozpadu tobolek s různým zastoupením PG, kdy se tobolek s vyšším obsahem PG rozpadaly rychleji než tobolek obsahující LS směs s nižším zastoupením tohoto rozpouštědla. PG, který obsahuje dvě hydroxylové skupiny, je nízkomolekulární polární rozpouštědlo, které způsobuje během skladování změkčení obalu tobolek³⁵, jak bylo pozorováno i v této práci (*obrázek 6*). Z tohoto důvodu je lepší použít PG v nižších koncentracích, aby nedošlo k narušení fyzikální integrity tobolek. Nicméně je nutné podotknout, že oproti referenčním tobolekám s NUS2 nebylo zrychlení rozpadu těchto tobolek statisticky významné.



Obrázek 6: Tobolky s nejnižším zastoupením PG (vzorek 3:1; vlevo) a s jeho nejvyšším zastoupením (vzorek 1:2; vpravo) po 3 měsících skladování

Přestože ve studii Gioffrè et al.³⁹ pozorovali, že při hodnotách pH vyšších než 9 a nižších než 5 dochází k výraznému snížení obsahu trojitě spirálovité struktury v želatině, výsledky této práce vliv média **FaSSGF** o pH 1,6 na dobu rozpadu nepotvrdily (*Obrázek 7*). Vzhledem k tomu, že je želatina amfoterní, závisí její chování na pH vodného roztoku, kde se může chovat jako kyselina nebo jako zásada.⁴⁰ Želatina pro výrobu tvrdých želatinových tobolek může být připravena kyselou hydrolyzou (farmaceutická želatina typ A, s pH 4,5-5,5) a želatina vyrobená alkalickou hydrolyzou (farmaceutická želatina typ B, s pH 5,3-7,3).⁴⁰ Želatina musí být rozpustná v gastrointestinálních šťávách, aby se LL mohla snadno uvolnit.³⁷



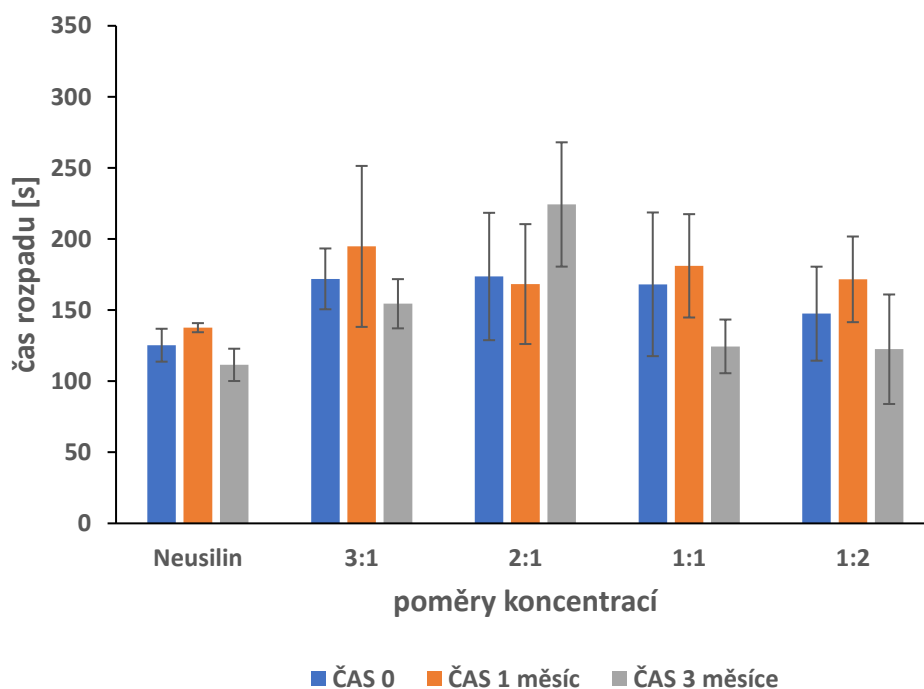
Obrázek 7: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PG (medium FaSSGF)

Obdobně jako v případě použití média vody došlo u tobolek s obsahem směsi NUS2 a PG ihned po přípravě ve všech koncentracích k mírnému statisticky nevýznamnému prodloužení doby rozpadu oproti referenčním tobolekám. Porovnáním dob rozpadu tobolek v obou médiích (voda a FaSSGF) nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.

Jak je možné vidět na *Obrázku 7* skladování nemělo výrazný vliv na dobu rozpadu jednotlivých tobolek v médiu FaSSGF. Nicméně při porovnání LS tobolek s tobolekami referenčními dochází ke statisticky významnému prodloužení doby rozpadu po 3 měsících skladování u tobolek s nižším zastoupením PG, konkrétně u vzorků 3:1 a 2:1.

Z *obrázku 8* je patrné, že ani použití média simulujícího prostředí tenkého střeva na lačno (**FaSSIF**) s pH 6,5 nemělo statisticky významný vliv na dobu rozpadu tobolek s obsahem směsi NUS2 a PG. Stejně tak nebyl v tomto případě pozorován ani statisticky významný vliv doby skladování. Jedinou výjimku tvoří toboleky obsahující směs 2:1 po třech měsících skladování, které v porovnání s referenčními tobolekami

vykazovaly výrazné prodloužení doby rozpadu ze $111,5 \pm 11,4$ s až na $224,3 \pm 43,7$ s. I přes výše zmíněnou studii Gioffrè et al.³⁹, neukázaly získané výsledky vliv použitého média na rozpadavost připravených tobolek, ani žádné statisticky významné rozdíly v době rozpadu mezi použitými médii. Všechny testované tobolky obsahující směs NUS2 s PG se ve všech testovaných médiích rozpadaly v rámci lékopisných limitů, tzn. do 30 minut.⁴¹

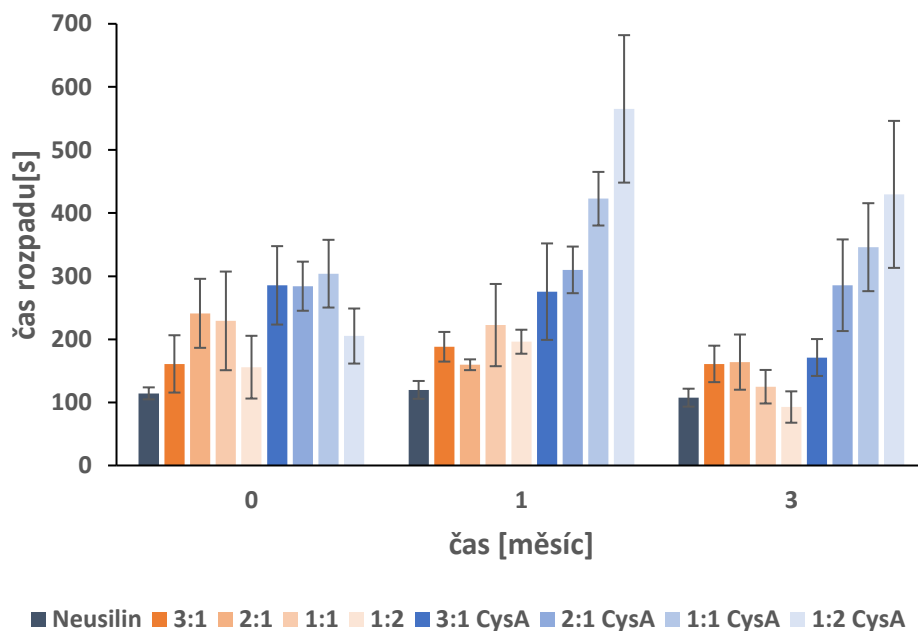


Obrázek 8: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PG (medium FaSSiF)

4.2 Vliv disperze léčiva v propylenglykolu na vlastnosti tvrdých želatinových tobolek

Výsledky hodnocení doby rozpadu u tobolek měřených ihned po přípravě za použití média **vody** (Obrázek 9) ukázaly, že se čas potřebný k rozpadu všech LS tobolek naplněných směsí NUS2 a disperze léčiva CysA v PG výrazně prodloužil oproti referenčním tobolekám. Pozorované rozdíly jsou statisticky významné s výjimkou vzorku 1:2, kde nebyl pozorován statisticky významný vliv disperze léčiva na dobu rozpadu. Důvodem může být vyšší zastoupení kapalné složky ve směsi, která

může penetrovat do tobolky a způsobovat její navlhnutí spojené s rychlejší dobou rozpadu, obdobně jako tomu bylo v případě tobolek bez léčiva. Negativní vliv disperze CysA je pravděpodobně způsoben interakcí tobolky s použitým léčivem, respektive jeho disperzí, která na rozdíl od samotného PG způsobuje zpomalení rozpouštění želatinového obalu. Interakci CysA s tělem tobolky naznačují také výsledky z měření DSC a IČ spektroskopie, které jsou diskutovány níže.



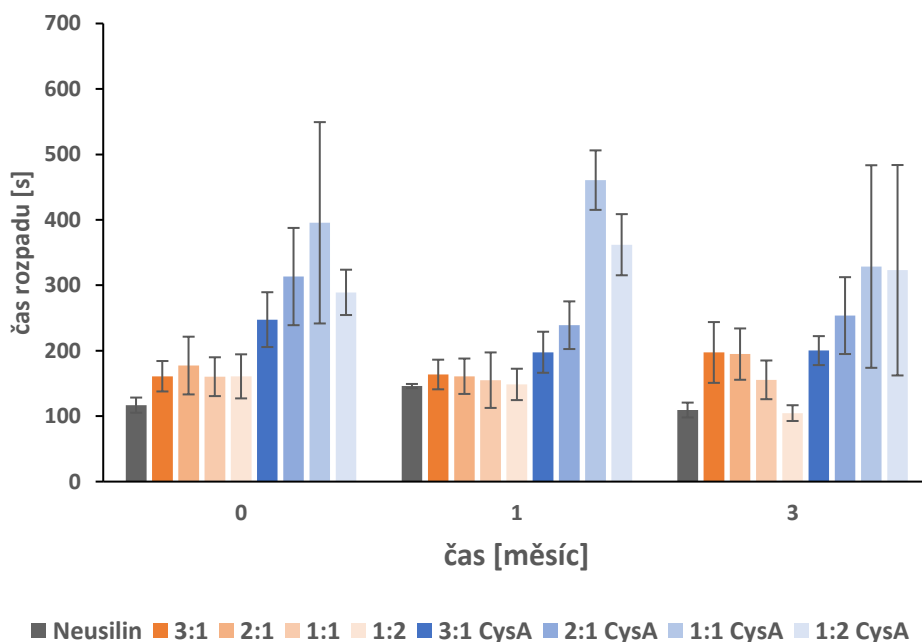
Obrázek 9: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PG (oranžová) a disperze CysA v PG (modrá) v médiu čištěná voda

U tobolek obsahujících disperzi léčiva v PG nebyl pozorován vliv skladování na dobu rozpadu tobolek s výjimkou vzorku 1:2, kdy došlo ke statisticky významnému prodloužení času potřebného k dezintegraci tobolky. Skladování tobolek po dobu 1 měsíce rovněž vedlo ke zvýraznění vlivu množství použité disperze na dobu rozpadu, kdy se zvyšujícím se množstvím disperze v LS směsi docházelo ke zpomalení rozvolňování tobolky. Stejný vliv byl pozorován i po třech měsících uchování tobolek (Obrázek 9).

Při porovnání LS tobolek s PG a tobolek s disperzí CysA v PG bylo u všech tobolek s obsahem léčiva pozorováno prodloužení doby rozpadu v médiu čištěná voda.

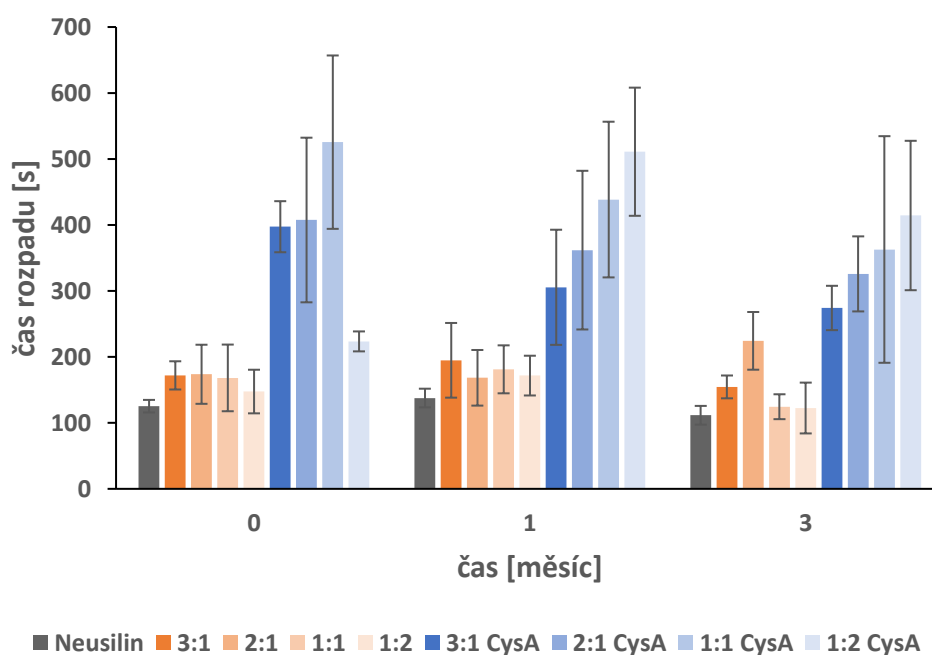
K výraznému (statisticky významnému) prodloužení doby rozpadu u tobolek s léčivem oproti tobolkám bez léčiva ihned po přípravě došlo pouze u koncentrace 3:1, zatímco v průběhu skladování byly signifikantní rozdíly pozorovány u všech zbývajících koncentracích, tedy 2:1, 1:1 a 1:2 (Obrázek 9).

Hodnocení doby rozpadu LS tobolek s obsahem disperze CysA v PG v médiu simulujícím podmínky v žaludku (FaSSGF) ukázalo, že ve všech použitých poměrech nosič/kapalina docházelo k výraznému (minimálně dvojnásobnému) prodloužení doby potřebné k rozpadu tobolky v porovnání s referenčními tobolkami (Obrázek 10). Doba rozpadu tobolek se rovněž prodloužila v porovnání s tobolkami obsahujícími směs nosiče se samotným rozpouštědlem (PG). Tyto výsledky tak podpořily výše popsané závěry z hodnocení rozpadu tobolek v čištěné vodě týkající se interakce CysA disperze s tělem tobolky. Tyto interakce i v případě kyselého média FaSSGF vedly ke staticky významnému prodloužení doby rozpadu, která však stále byla v lékopisném limitu pro rozpad želatinových tobolek. Stejný vliv disperze léčiva na dezintegraci tobolek byl pozorován i v rámci skladování (Obrázek 10).



Obrázek 10: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PG (oranžová) a disperze CysA v PG (modrá) v médiu FaSSGF

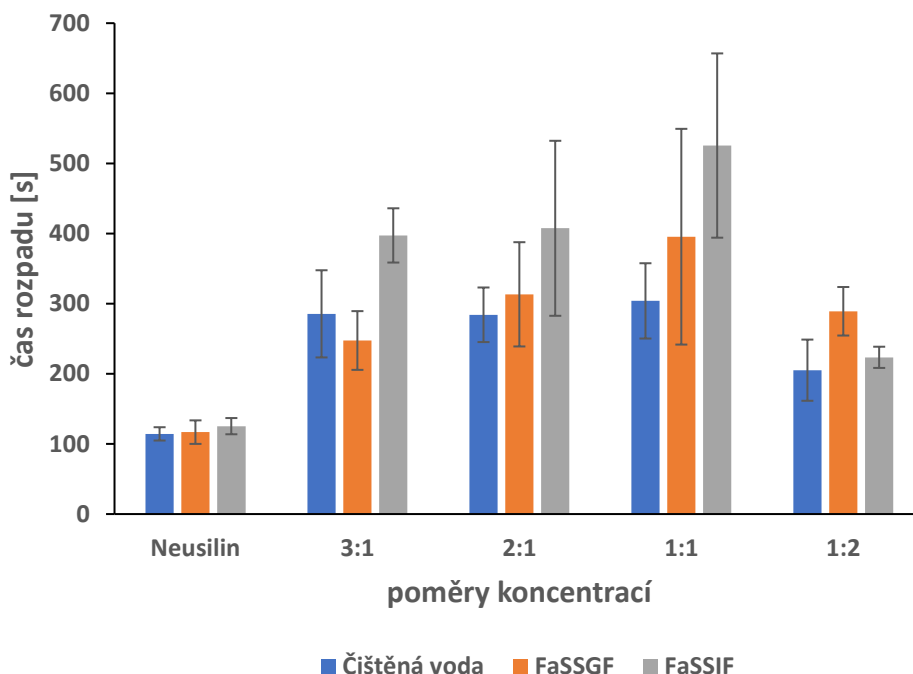
Z obrázku 11 je patrné, že v médiu **FaSSIF** dochází u tobolek s obsahem disperze CysA v PG k výraznému prodloužení doby rozpadu oproti referenčním tobolekám obsahujícím pouze NUS2, a to ve všech testovaných časech (0, 1 i 3 měsíce). Jedinou výjimku představuje směs 1:2, kdy v čase 0 nedošlo ke statisticky významným změnám v době rozpadu. V tomto případě však mělo statisticky významný vliv skladování tobolek, kde došlo k signifikantnímu prodloužení času nezbytného pro kompletní rozpad tobolky z $223,5 \pm 15,1$ s na $511,0 \pm 97,1$ s (Obrázek 11).



Obrázek 11: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PG (oranžová) a disperze CysA v PG (modrá) v médiu *FaSSIF*

Porovnání doby rozpadu LS tobolek bez a s obsahem léčiva ukázalo stejně jako v případě použití média čištěné vody a FaSSGF prodloužení doby rozpadu (Obrázek 11), které bylo v případě média simulujícího prostředí tenkého střeva statisticky významné. Tyto výsledky ukazují výrazný vliv přítomnosti léčiva a jeho potenciační interakce s tělem tobolky, které mají negativní vliv na dobu rozpadu finálních LS tobolek bez ohledu na typ a vlastnosti použitého média. Nicméně, jak ukazuje Obrázek 12, nejpomaleji se tobolky rozpadaly v médiu *FaSSIF*. To může být způsobeno, tím že médium *FaSSIF* obsahuje oproti médiu *FaSSGF* složky jako NaH_2PO_4 , žlučové soli a

lecithin, které mohou ovlivňovat rozpustnost tvrdé želatinové tobolky, a tím ovlivnit i její dobu rozpadu.⁴² Nicméně ve všech případech docházelo k rozpadu tobolek v rámci lékopisného limitu, tedy do 30 minut.⁴¹

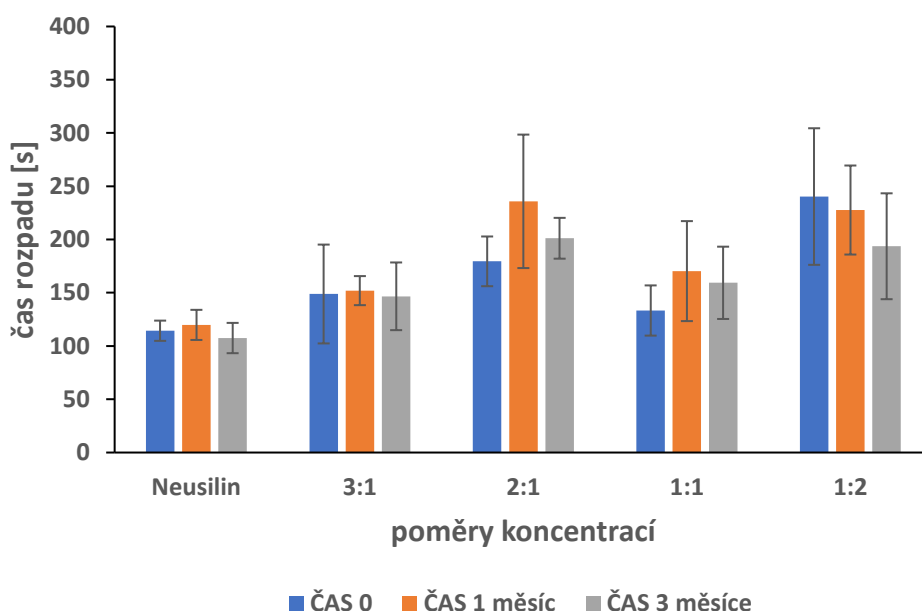


Obrázek 12: Vliv média na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací disperze CysA v PG v čase měření ihned po přípravě

4.3 Vliv polysorbátu 80 na vlastnosti tvrdých želatinových tobolek

Tvrdé želatinové tobolky jsou běžně plněny formulacemi léčiv s rozpouštědlem PS 80, jak dokazuje například studie Joshi et al.⁴⁴, ve které nebylo popsáno ovlivnění chování tobolek (rozpadu tobolek) vlivem rozpouštědla PS 80. Toto pozorování potvrdily i výsledky hodnocení doby rozpadu tobolek obsahujících směs NUS2 s PS 80 v **čištěné vodě**, které ukázaly, že doba rozpadu je srovnatelná s hodnotami naměřenými pro referenční tobolky obsahující pouze nosič NUS2 (Obrázek 13), přestože došlo k mírnému prodloužení naměřených časů rozpadů. Jedinou výjimkou byly tobolky naplněné směsí s nejvyšším zastoupením rozpouštědla (1:2), které vykazovaly statisticky významné prodloužení doby potřebné k rozvolnění tobolky. Tato změna v době rozpadu tobolek může souviset s autooxidací PS 80, během které

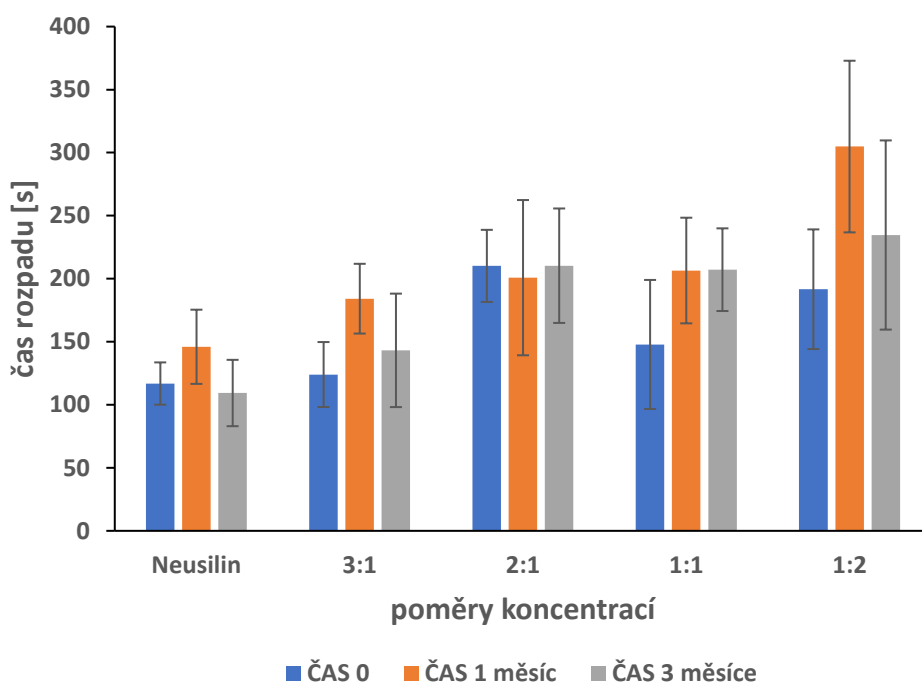
vzniká formaldehyd, přičemž větší pravděpodobnost jeho uvolnění nastává po podrobení tobolek skladování, při použití vyšší koncentrace PS 80, popřípadě vlivem vlhkosti.⁴³ Formaldehyd může denaturovat obal tobolky a následně ovlivnit dobu rozpadu tobolek a s tím související rychlost uvolňování léčiva.⁴³ Skladování těchto tobolek nemělo výrazný vliv na dobu jejich rozpadu v médiu čištěná voda. Statisticky významné rozdíly v dobách rozpadu v porovnání s referenčními tobolkami však byly pozorovány u směsí 2:1 a 1:2, a to jak po 1 tak i 3 měsících skladování (Obrázek 13). Nicméně vlivem skladování nedocházelo ke změknutí obalu tobolek jako u tobolek s obsahem PG (1:2).



Obrázek 13: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PS 80 (médiu čištěná voda)

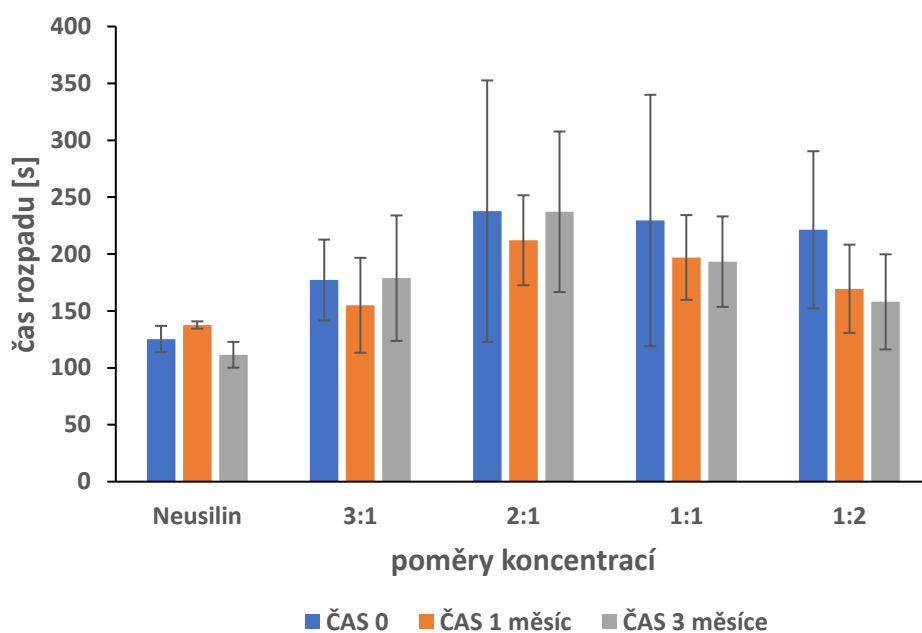
V médiu **FaSSGF** bylo pozorováno při měření v čase 0 u všech tobolek s obsahem směsi NUS2 a PS 80 obdobně jako při použití média čištěná voda mírné prodloužení doby rozpadu oproti referenčním tobolkám. Statisticky významné změny pak byly pozorovány pouze pro vzorky 2:1 a 1:2 (Obrázek 14). Skladování nemělo výrazný vliv na dobu rozpadu tobolek v médiu FaSSGF s výjimkou směsi 1:2 po 1 měsíci skladování, kde bylo pozorováno statisticky významné prodloužení rozpadu oproti hodnocení okamžitě po přípravě (Obrázek 14). Nicméně při porovnání LS

tobolek s tobolkami referenčními dochází ke statisticky významnému prodloužení doby rozpadu po 1 měsíci skladování u vzorku s nejvyšším zastoupením PS 80, konkrétně u koncentrace 1:2 a po 3 měsících také u vzorků 2:1, 1:1 a 1:2. Prodloužení doby rozpadu u tobolek s vyšším zastoupením PS 80 v LS směsi by mohlo odpovídat potenciálnímu vzniku formaldehydu⁴³, jak bylo zmíněno výše.



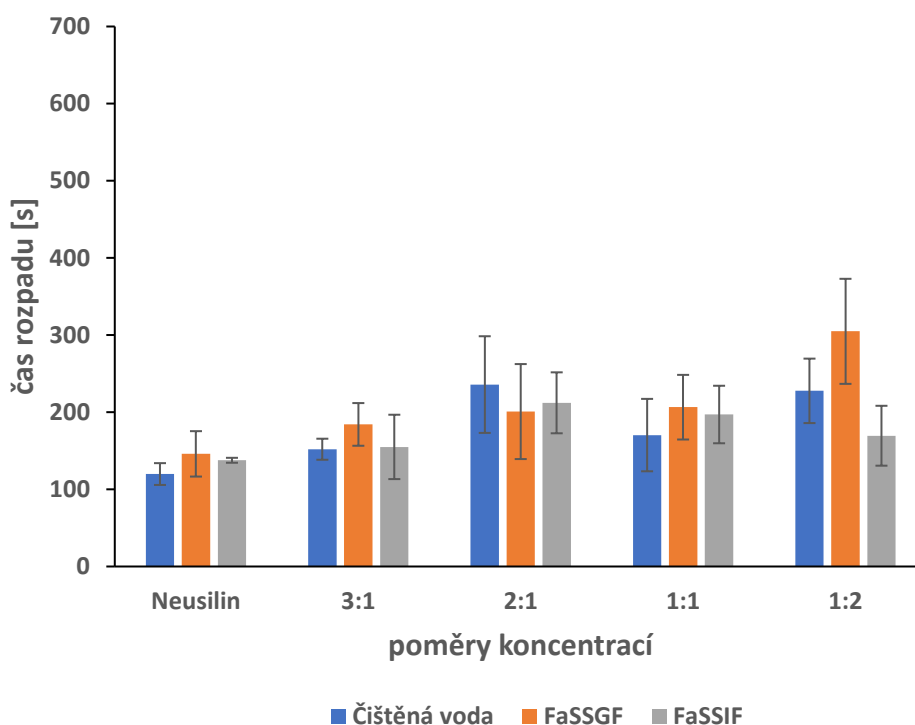
Obrázek 14: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PS 80 (médiu FaSSGF)

Z obrázku 15 je patrné, že použití média **FaSSIF** nemělo statisticky významný vliv na dobu rozpadu u tobolek s obsahem směsi NUS2 a PS 80. Stejně tak nebyl u těchto tobolek pozorován ani statisticky významný vliv doby skladování na dobu nezbytnou k rozvolnění tobolek. Nicméně při porovnání LS tobolek s tobolkami referenčními dochází ke statisticky významnému prodloužení doby rozpadu po 1 měsíci skladování u vzorku 2:1 a po 3 měsících skladování u vzorků 2:1 a 1:1.



Obrázek 15: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PS 80 (médiu FaSSIF)

Porovnání výsledků získaných v různých prostředích neukázalo žádné statisticky významné změny v naměřených dobách rozpadu LS tobolek. Jedinou výjimku představuje vzorek s nejvyšším obsahem PS 80 (1:2), u kterého bylo po 1 měsíci skladování pozorováno statisticky významné zkrácení doby rozpadu v médiu FaSSIF, v porovnání s médiem FaSSGF (Obrázek 16). To by mohlo být způsobeno rozdílným složením média FaSSIF a následným ovlivněním rozpustnosti želatinového obalu, které bylo popsáno výše. Tyto výsledky ovšem nesouhlasí se studií Cole et al.⁴⁵, kde právě ve FaSSIF probíhalo uvolňování léčiva acetaminophenu z želatinové tobolky o trochu pomaleji než v médiu čištěná voda a pufru o pH 1,2. Nicméně všechny testované tobolky se ve všech testovaných médiích rozpadaly v rámci lékopisných limitů, tzn. do 30 minut.⁴¹

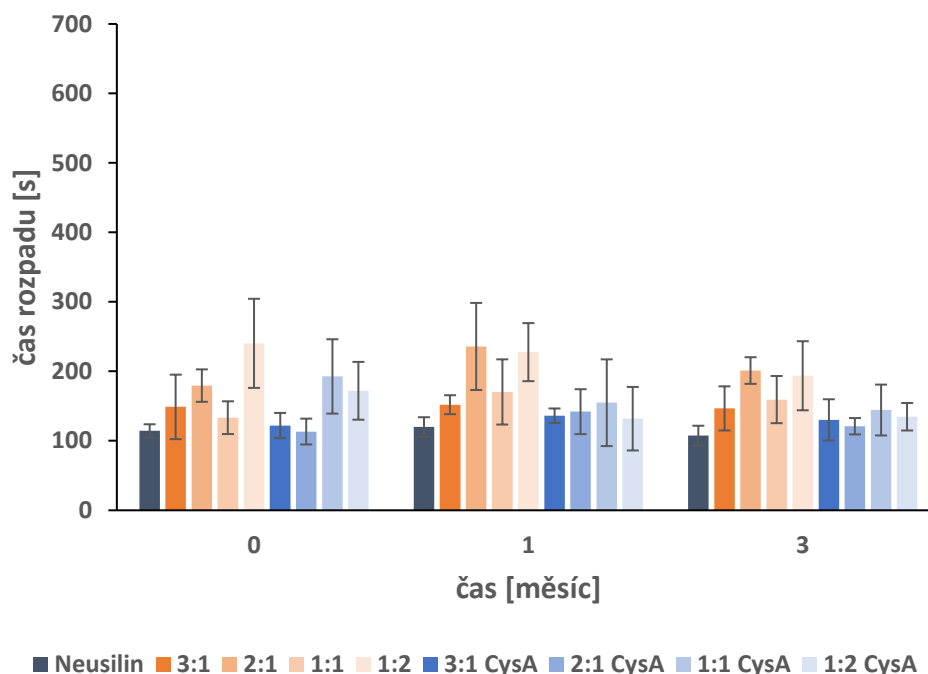


Obrázek 16: Vliv média na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PS 80 skladovaných po dobu 1 měsíce

4.4 Vliv disperze léčiva v polysorbátu 80 na vlastnosti tvrdých želatinových tobolek

Výsledky hodnocení doby rozpadu u tobolek při použití média **čištěná voda** ukázaly, že se čas potřebný k rozpadu LS tobolek naplněných směsí NUS2 a disperze léčiva CysA v PS 80 oproti referenčním tobolekám prodloužil (Obrázek 17). Nejvýraznější a zároveň také statisticky významné prodloužení času nezbytného k rozvolnění LS tobolek bylo pozorováno u vzorků s vyšším zastoupením disperze LČ v PS 80, kdy došlo ke změně doby rozpadu ze $114,3 \pm 9,5$ s (referenční tobolek) až na $172,0 \pm 41,5$ s (vzorek 1:2), respektive $192,7 \pm 53,5$ s (vzorek 1:1). Naopak u vzorku 2:1 bylo zaznamenáno statisticky nevýznamné zrychlení rozpadu na $113,3 \pm 18,6$ s. Stejně jako v případě tobolek se samotným PS 80 však docházelo k rozpadu v rámci lékopisných limitů, což je v souladu se studií Erlich et al.⁴⁶, ve které rovněž nebylo pozorováno ovlivnění chování tobolek s obsahem léčiva a PS 80, nicméně zde byla pozorována vyšší biologická dostupnost léčiva než u běžné formulace s léčivem bez

PS 80. Jak je možné vidět na *Obrázku 17* skladování nemělo výrazný vliv na dobu rozpadu jednotlivých tobolek ve vodě.

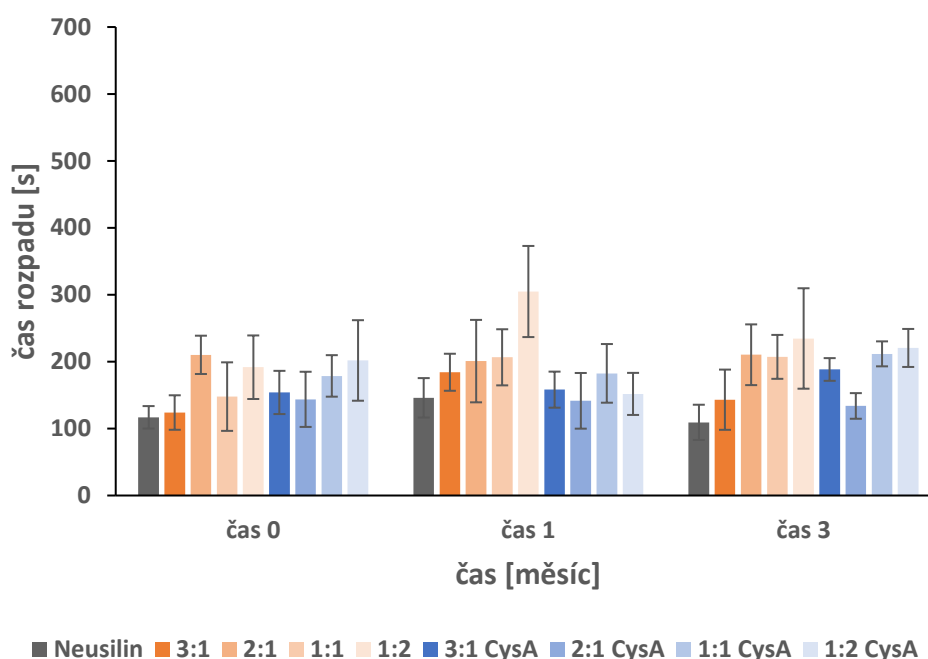


Obrázek 17: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PS 80 (oranžová) a disperze CysA v PS 80 (modrá) v médiu čištěná voda

Při porovnání LS tobolek s PS 80 a tobolek s obsahem disperze CysA v PS 80 bylo u všech tobolek s přidavkem léčiva pozorováno obecně zrychlení doby rozpadu v médiu čištěná voda (*Obrázek 17*), s výjimkou koncentrace 1:1 v čase měření ihned po přípravě. To by mohlo být způsobeno tím, že na rozdíl od rozpouštědla PG nedochází při použití rozpouštědla PS 80 k interakcím mezi tvrdou želatinovou tobolkou a LSS.

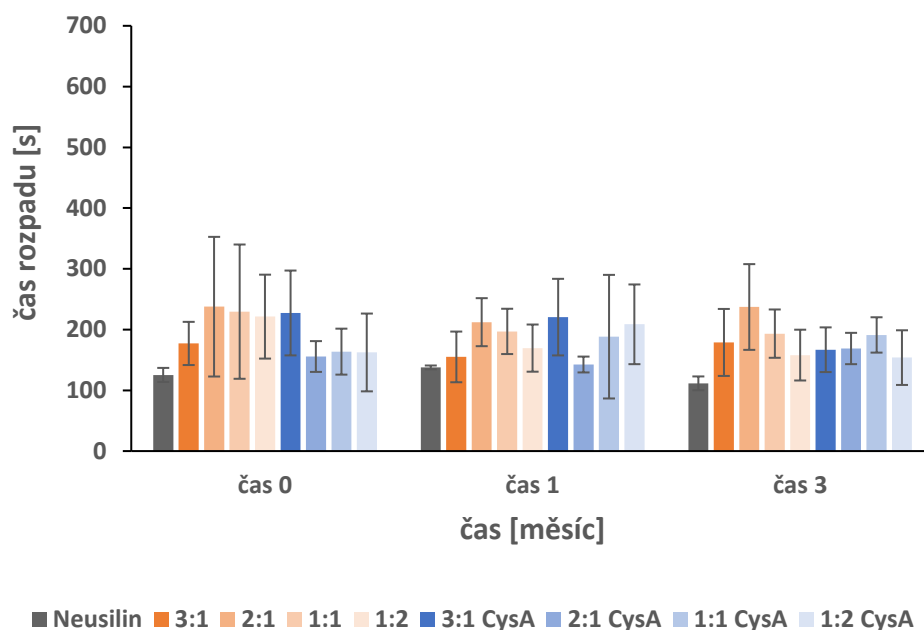
V médiu **FaSSGF** docházelo u všech tobolek s obsahem směsi NUS2 a disperze CysA v PS 80 k prodloužení doby rozpadu oproti tobolkám referenčním (*Obrázek 18*), přičemž statisticky významné prodloužení času rozvolnění tobolek je možné pozorovat u tobolek s nejvyšším zastoupením disperze léčiva v PS 80, tedy u vzorku 1:2. Stejně jako v případě použití média čištěné vody nebyl v případě média simulujícího prostředí žaludku na lačno pozorován vliv skladování na chování

připravených tobolek (Obrázek 18). Nicméně porovnání naměřených hodnot LS tobolek a referenčních tobolek naplněných pouze nosičem NUS2 po 3 měsících skladování ukázalo statisticky významné prodloužení doby rozpadu. Jedinou výjimku představuje vzorek 2:1, kde pozorované prodloužení času rozpadu nebylo statisticky významné. Na rozdíl od média čištěná voda, nebyly v médiu FaSSGF pozorovány statisticky významné rozdíly v čase rozpadu mezi tobočkami s a bez léčiva (Obrázek 18).



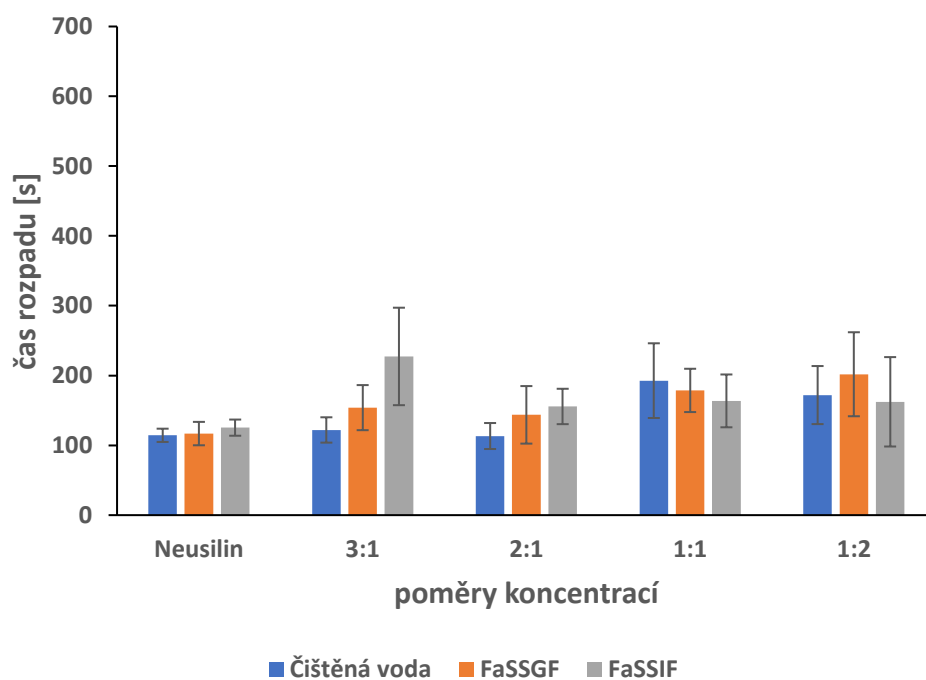
Obrázek 18: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PS 80 (oranžová) a disperze CysA v PS 80 (modrá) v médiu FaSSGF

Z Obrázku 19 je patrné, že použití média **FaSSIF** nemělo statisticky významný vliv na dobu rozpadu u tobolek s obsahem směsi NUS2 a disperze CysA v PS 80 oproti referenčním tobočkám hodnocených ihned po přípravě. Stejně tak nebyl pozorován statisticky významný vliv doby skladování na rozpad vzniklých LS tobolek. Tato zjištění odpovídají výše citovaným studiím^{44,46}, kde rovněž nebyl pozorován vliv PS 80 na chování tvrdé želatinové tobolky.



Obrázek 19: Vliv doby skladování na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací PS 80 (oranžová) a disperze CysA v PS 80 (modrá) v médiu FaSSIF

Při porovnání LS tobolek s PS 80 a tobolek s disperzí CysA v PS 80 nebyly pozorované žádné statisticky významné rozdíly v době potřebné k rozpadu tobolek. Získané výsledky (*Obrázek 20*) neprokázaly ani vliv média na dobu rozpadu. Jedinou výjimku představuje vzorek 3:1 v čase měření ihned po přípravě, kde bylo pozorováno statisticky významné prodloužení doby rozpadu tobolek v médiu FaSSIF oproti médiu čištěná voda. To by mohlo být opět způsobeno výše zmíněným složením média FaSSIF (NaH_2PO_4 , žlučové soli a lecithin), kdy může dojít k ovlivnění rozpustnosti tvrdé želatinové tobolky. Všechny testované tobolky se ve všech testovaných médiích rozpadaly v rámci lékopisných limitů, tzn. do 30 minut.⁴¹



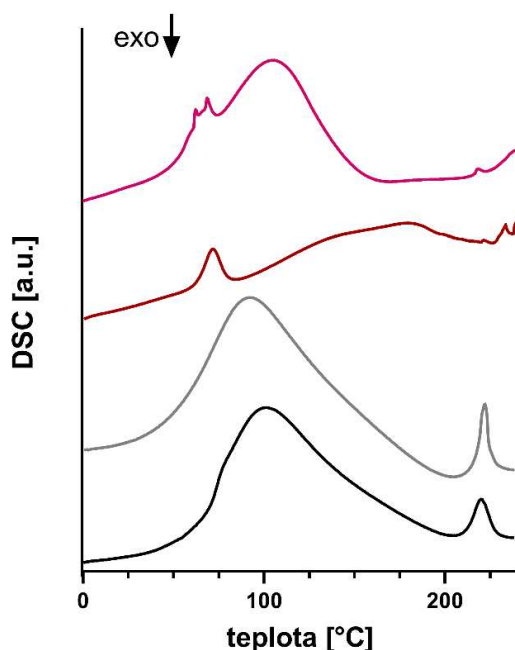
Obrázek 20: Vliv média na dobu rozpadu tobolek obsahujících LS směsi s různou koncentrací disperze CysA v PS 80 v čase ihned po přípravě

4.5 Hodnocení IČ a DSC

Po 1 a 3 měsících uchovávání bylo možné na tobolkách obsahující PG v nejvyšší koncentraci (1:2) pouhým okem pozorovat změny ve struktuře tobolky v podobě jejího změknutí (*Obrázek 6*), které bylo spojeno také s lepením tobolek na stěnu lékovky, ve které byly tobolky uchovávány. Tento jev byl pravděpodobně způsoben absorpcí rozpouštědla a jeho interakcí se složkami tobolky. Tyto změny byly potvrzeny pomocí IČ spektroskopie a DSC a jsou v souladu se studií Mei et al³³, kde se potvrdilo, že přítomnost PG má za následek změkčení a oslabení tobolek. Alkoholy s malou molekulou migrují do obalu tobolky a nahrazují vodu přítomnou v obalu tobolky. Zároveň s rostoucí koncentrací (aspoň 20 % a více obsahu PG) dochází k významné deformaci tobolky. Naopak tobolky obsahující pouze 15 % PG se chovaly stejně jako tobolky prázdné.³³ Stejný vliv PG na vlastnosti tobolek prokázala také studie Yanez³⁵, v níž docházelo v přítomnosti PG ke zvyšování elasticity tobolek.

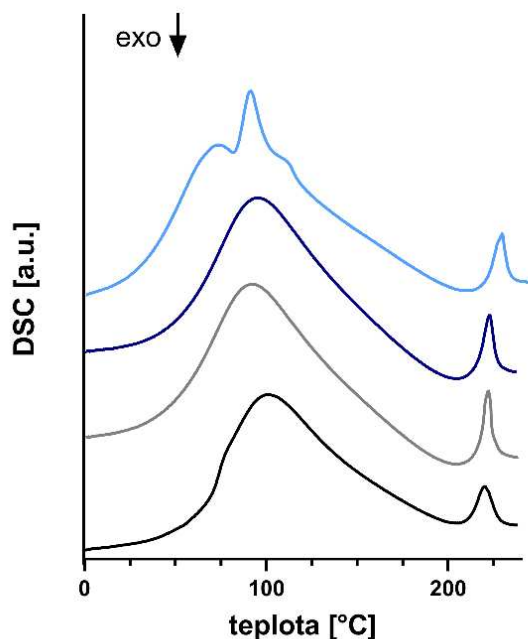
Jak je patrné z *Obrázku 21*, v případě prázdných a referenčních tobolek bylo na DSC křivkách pozorovatelné odpařování vody z želatinové tobolky kolem 100 °C a při teplotě kolem 225 °C docházelo pravděpodobně k odpařování glycerolu z tvrdé želatinové tobolky (teplota varu glycerolu je podle dostupné literatury 290 °C⁴⁷) (*Obrázek 21 a 22*). Po přidání PG k nosiči došlo přibližně při 90 °C k odpaření vody z želatinové tobolky, což se projevilo vznikem peaku v této teplotní oblasti (*Obrázek 21*). Celkový průběh křivky však měl stoupající charakter, což naznačuje, že docházelo k postupnému odpařování PG s vrcholem okolo 190 °C. Tato teplota odpovídá bodu varu PG, která se v literatuře uvádí okolo 189 °C.⁴⁸ U tobolek, které obsahovaly disperzi CysA v PG bylo možné opět pozorovat široký peak odpařování vody podobný nenaplněným a referenčním tobolkám. Vrchol tohoto peaku byl však posunut směrem k vyšším teplotám (přibližně 120 °C), což je pravděpodobně způsobeno přítomností PG. Zároveň bylo možné na tomto peaku pozorovat dva menší endotermní peaky, které se objevily u teploty okolo 85 °C. Tyto peaky však nemohou být přisuzovány CysA, jelikož se jeho teplota tání pohybuje v rozmezí 148-150 °C.⁴⁹ S ohledem na teplotu, ve které se tyto peaky objevily, se může opět jednat o odpaření vody z tobolky, které je následováno doodpařením PG, který v průběhu skladování penetroval z LS prášku do těla tobolky. Výsledky získané z hodnocení DSC pak

naznačují, že penetrace PG do těla tobolky je výraznější v případě LS tobolek s obsahem směsi NUS2 a čistého rozpouštědla PG. Pozorovaný nárůst vlhkosti u tobolek naplněných LS práškem je v souladu se studií Vanin et al.⁵⁰, ve které byl zkoumán vliv změkčovadel (mimo jiné také PG) v různých koncentracích na vlastnosti filmů na bázi želatiny. Výsledky studie ukázaly, že s nárůstem koncentrace změkčovadla dochází k ovlivnění vlhkosti, konkrétně k jejímu zvýšení v želatinovém filmu.



Obrázek 21: DSC křivky prázdných tobolek (černá), referenčních tobolek s NUS2 (šedá), tobolek se směsí PG a NUS2 (1:2, červená) a tobolek obsahujících NUS2 a disperzi CysA v PG (1:2, růžová) po 3 měsících skladování

Z Obrázku 22 je patrné, že přidavek PS 80 neovlivnil chování tobolky, protože vzniklý difraktogram odpovídá prázdné a referenční tobolce. U tobolek, které obsahovaly LS směs NUS2 a disperze léčiva v PS 80 se navíc objevil ostrý endotermní peak kolem 100 °C, který pravděpodobně odpovídá odpařování PS 80 s teplotou varu okolo 100 °C.⁵¹ Přidavek léčiva tudíž způsobil výraznější pronikání rozpouštědla, respektive disperze léčiva do tobolky. Nicméně ovlivnění vlastností tobolky bylo méně výrazné než v případě tobolek s PG, jelikož se zde neprojevovalo změknutí tobolek v průběhu skladování.



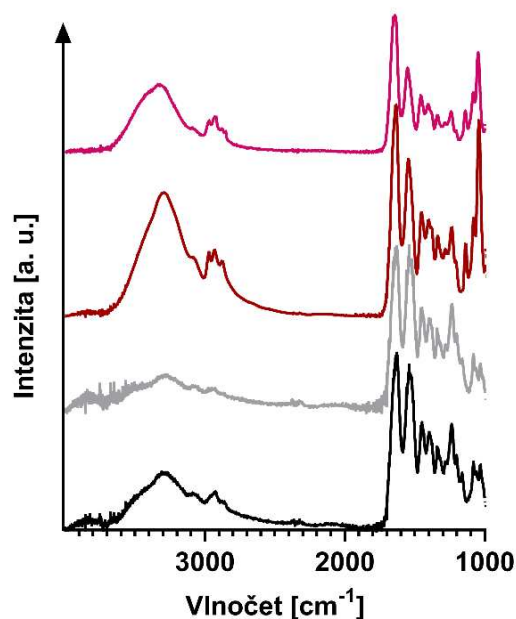
Obrázek 22: DSC křivky prázdných tobolek (černá), referenčních tobolek s NUS2 (šedá), tobolek se směsí PS 80 a NUS2 (1:2, tmavě modrá) a tobolek obsahujících NUS2 a disperzi CysA v PS 80 (1:2, světle modrá) po 3 měsících skladování

U IČ spektroskopie organických sloučenin je možné rozlišovat dvě hlavní oblasti vibrací, a to valenční (stretching) a deformační (bending). Valenční oblast se nachází v rozmezí vlnočtů $4000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ a odpovídá jednotlivým funkčním skupinám. Naopak deformační oblast ($1500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) se často označuje jako oblast tzv. „otisku palce“, jelikož se jedná o oblast jednoduchých vazeb, ve které nemá žádná molekula zcela stejné spektrum s molekulou jinou. Tato oblast je tedy charakteristická pro molekulu jako celek a využívá se k analýze za pomoci spektrálních knihoven.^{52,53}

Jak je patrné z Obrázku 23 a 24 samotné prázdné tobolky vykazují širší vibrační pás v oblasti vlnočtů v rozmezí přibližně $3600\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ odpovídající obsažené vlhkosti/vodě.⁵⁴ V případě referenčních tobolek je možné pozorovat zmenšení intenzity tohoto pásu, což může souviset s absorpcí vody z těla tobolky nosičem NUS2. Naopak v případě tobolek s obsahem LS prášků s rozpouštědlem PG měl tento pás vyšší intenzitu než v případě samotných nenaplněných tobolek, což podporuje výše uvedené závěry týkající se penetrace použitého rozpouštědla do těla

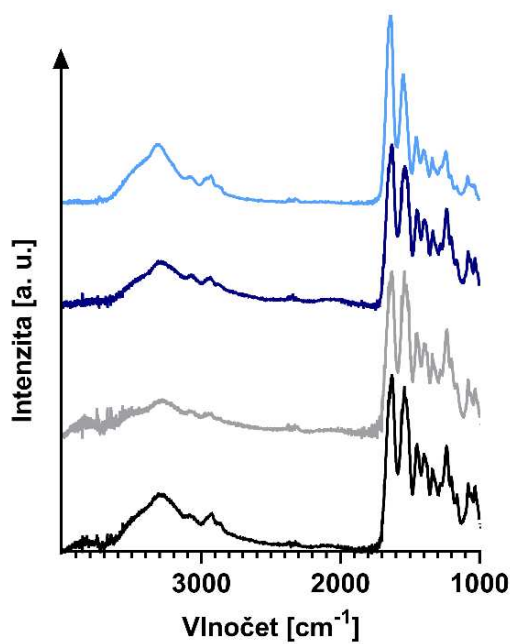
tobolky. Stejně jako v případě DSC je i u IČ spekter možné pozorovat výraznější navlhnutí tobolek bez obsahu léčiva. To může být způsobeno hygroskopičností CysA, díky čemuž rozpouštědlo PG tolik nepenetruje do tobolky, popřípadě ji CysA může vysušovat adsorpcí vody.⁵⁵

U spekter LS tobolek byla navíc pozorována i změna deformační oblasti naznačující strukturální změny tobolky.



Obrázek 23: vyhodnocení IČ prázdných tobolek (černá), referenčních tobolek s NUS2 (šedá), tobolek se směsí PG a NUS2 (1:2, červená) a tobolek obsahujících NUS2 a disperzi CysA v PG (1:2, růžová) po 3 měsících skladování

Na rozdíl od tobolek s PG, tobolky naplněné směsmi na bázi PS 80 vykazují srovnatelný vibrační pás jako tobolky referenční (*Obrázek 24*). Po přidání LČ CysA dochází k menšímu nárůstu množství vody v těle tobolky, ale zdaleka ne tak výraznému jako v případě tobolek s PG. Z tohoto důvodu nejsou v tomto případě pozorovatelné změny v elasticitě tobolek.



Obrázek 24: vyhodnocení IČ prázdných tobolek (černá), referenčních tobolek s NUS2 (šedá), tobolek se směsí PS 80 a NUS2 (1:2, tmavě modrá) a tobolek obsahujících NUS2 a disperzi CysA v PS 80 (1:2, světle modrá) po 3 měsících skladování

5 Závěr

Tato práce se zaměřila na měření doby rozpadu liquisolid tobolek, kdy liquisolid směs byla vytvořena smísením nosiče Neusilinu[®] US2 a různých poměrů netěkavých rozpouštědel propylenglykolu nebo polysorbátu 80 či disperzí léčiva cyklosporinu A v těchto rozpouštědlech. Hodnocení rozpadu vzniklých tobolek probíhalo ihned po přípravě a po 1 a 3 měsících skladování. Sledován byl také vliv rozpouštědla na tvrdou želatinovou tobolku, kdy se k vyhodnocení interakcí použila infračervená spektroskopie a diferenciální skenovací kalorimetrie.

Výsledky hodnocení ukázaly, že všechny připravené liquisolid tobolky splnily lékopisný limit pro dobu rozpadu (30 minut), konkrétně se všechny připravené tobolky rozpadaly do 13 minut. Nicméně naplnění tobolek liquisolid práškovými směsmi mělo vliv na chování tobolek. Doba rozpadu tobolek s rozpouštědly se obecně oproti referenčním tobolkám prodloužila. Výraznější vliv na vlastnosti tobolky měl jednoznačně propylenglykol. Přídavek léčiva cyklosporinu A způsobil v obou případech další prodloužení doby rozpadu, kdy výraznější vliv na rozpadavost tobolek měla opět disperze léčiva s propylenglykolem. Dále bylo zjištěno, že rozpouštědlo propylenglykol ovlivňuje strukturu tobolky ve vyšších koncentracích (zejména u vzorku 1:2). Dochází zde k interakcím mezi propylenglykolem a želatinovou tobolkou, kdy propylenglykol způsobuje nárůst vlhkosti v tobolce, což se projevilo jejím měknutím během skladování. Tyto závěry byly potvrzeny rovněž pomocí infračervené spektroskopie a diferenciální skenovací kalorimetrie.

Nicméně v případě polysorbátu 80 nemělo množství kapaliny v liquisolid směsi, která byla do tobolek naplněna, na rozpad významný vliv. Stejně tak použití různých médií k testování doby rozpadu nemělo významný vliv na získané hodnoty, a to v případě obou použitých rozpouštědel (propylenglykolu i polysorbátu 80).

6 Seznam použité literatury

1. Vraníková, B. et al. Systémy kapalina v pevné fázi jako moderní trend zvyšování biologické dostupnosti léčiva. *Chemické Listy*, **107(9)**, 681–687 (2013). ISSN 0009-2770
2. Kulkarni, A. S. et al. Liquisolid Systems: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology Volume* **3(1)**, 795-802 (2010). ISSN 2320-5148
3. Gajdziok, J. a Vraníková, B. Zvyšování biologické dostupnosti léčiv pomocí formulace liquisolid systémů. *Česká a slovenská farmacie číslo* **3**, 64, 55-66 (2015). ISSN 1803-6597
4. Nilesh, G. et al. Liquisolid compact: A novel approach to enhance solubility and dissolution rate. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis* **3(1)**, 1-10 (2015). ISSN: 0974-3618
5. Vraníková, B. et al. Inovativní lékové formy pro těžce rozpustná léčiva. *Remedia* **24(4)**, 312–314 (2014).
6. Lu, M. et al. Liquisolid technique and its applications in pharmaceutics. *Asian Journal of Pharmaceutical sciences* **12(2)**, 115-123 (2017). DOI: 10.1016/j.ajps.2016.09.007
7. Kala, N. P. et al. Review on Liquisolid Systems. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, **4(3)**, 25–31 (2014). DOI: 10.22270/jddt.v4i3.828
8. Vraníková, B. a Gajdziok, J. Liquisolid systems and aspects influencing their research and development. *Acta Pharm* **63(4)**, 447-465 (2013). DOI: 10.2478/acph-2013-0034
9. Deshmukh, A. S. et al. Liquisolid compact techniques: A Review. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*, **6(3)**, 161 (2014). ISSN : 0975-4377

10. Sahil, M. G. et al. Liquisolid compact: a new technique for enhancement of drug dissolution. *International Journal of Pharmaceutical Research & Development*, **1(3)** (2011). ISSN: 0974 – 9446
11. Chandel P. et al. Liquisolid technique: An approach for enhancement of solubility. *Journal of drug delivery & Therapeutics* **3(4)**, 131–137 (2013). DOI: 10.22270/jddt.v3i4.556
12. Gubbi, S. a Jarag, R. Liquisolid technique for enhancement of dissolution properties of bromhexine hydrochloride. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, **2(2)**, 382-386 (2009). ISSN 0974-3618
13. Mahajan, H. S. et al. Enhanced dissolution rate of glipizide by a liquisolid technique. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology (IJPSN)*, **3(4)**, 1205-1213 (2010). DOI: 10.37285/ijpsn.2010.3.4.5
14. Kutza, C. et al. Toward a detailed characterization of oil adsorbates as “solid liquids”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **84(1)**, 172-182 (2013). DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.12.008
15. Hentzschel, C. M. et al. Suitability of various excipients as carrier and coating materials for liquisolid compacts. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **37(10)**, 1200-1207 (2011). ISSN 0363-9045 DOI: 10.3109/03639045.2011.564184
16. Marques, M. RC, et al. Liquid-filled gelatin capsules. *Pharmacoepial forum*. **35(4)**, 1029-1041 (2009).
17. Srividya, B. et al. Capsules And It’S Technology: An Overview. *International journal of pharmaceutics and drug analysis*, **2(9)**, 727-733 (2014). ISSN: 2348-8948
18. Šnejdrová, E. et al. Přírodní polymery v magistraliter přípravě. *Praktické Lékařství*, **11(5)**, 175-179 (2015).

19. Šuleková, M. et al. Organic colouring agents in the pharmaceutical industry. *Folia Vet*, **61(3)**, 32-46 (2017). DOI: 10.1515/fv-2017-0025
20. Herkert, T. et al. One hundred percent online identity check of pharmaceutical products by near-infrared spectroscopy on the packaging line. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, **51(1)**, 9-16 (2001). DOI: 10.1016/S0939-6411(00)00126-0
21. Gajdziok, J. a Vetchý, D. Postupy maskování chuti využívané ve farmacii. *Chemické listy*, **113(9)**, 522-529 (2019). ISSN:0009-2770
22. Cole, E. T. et al. Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. *Advanced drug delivery reviews*, **60(6)**, 747-756 (2008). DOI: 10.1016/j.addr.2007.09.009
23. Reich, G. Formulation and physical properties of soft capsules, Pharmaceutical Capsules, *Pharmaceutical Press*, London, 201-212 (2004). ISBN: 9780853695684
24. Cole, E. T. Liquid filled and sealed hard gelatin capsules. *Capsugel library*, (1987).
25. Begum, S. G. et al. A review on manufacturing and evaluation of capsules. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, **6(8)**, 98-105 (2018). ISSN: 2321-3086
26. Stegemann, S. a Capsugel, B. Hard gelatin capsules today-and tomorrow. *Capsugel Capsugel Library*, Second edition, BAS 192 E (2002).
27. Cadé, D. a Madit, N. Liquid filling in hard gelatin capsules-preliminary steps. *Bulletin technique-gattefosse, Capsugel*, 15-20 (1996).
28. Zhang, K. et al. Reactive impurities in large and small molecule pharmaceutical excipients—A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **101**, 34-42 (2018). DOI: 10.1016/j.trac.2017.11.003

29. Saleem, J. a McKay, G. Waste HDPE bottles for selective oil sorption. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, **11(4)**, 642-645 (2016).
DOI: 10.1002/apj.1989
30. Niederquell, A. a Kuentz, M. Introduction of a theoretical splashing degree to assess the performance of low-viscosity oils in filling of capsules. *AAPS PharmSciTech*, **12(1)**, 323-330 (2011). DOI: 10.1208/s12249-011-9589-y
31. Bowtle, W. J. Materials, process, and manufacturing considerations for lipid-based hard-capsule formats. In: *Oral Lipid-Based Formulations*. CRC Press, 1st edition, 101-128 (2007). ISBN: 9780429133695
32. Kreller, T. et al. Physico-chemical modification of gelatine for the improvement of 3D printability of oxidized alginate-gelatine hydrogels towards cartilage tissue engineering. *Materials & Design*, **208**, 109877 (2021).
DOI: 10.1016/j.matdes.2021.109877
33. Mei, X. et al. Use of texture analysis to study hydrophilic solvent effects on the mechanical properties of hard gelatin capsules. *International journal of pharmaceutics*, **324(2)**, 128-135 (2006). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.06.017
34. Pechová, V. et al. Texturní analýza jako moderní přístup k hodnocení lékových forem a zdravotnických prostředků. *Chemické listy*, **111(10)**, 622-627 (2017).
ISSN: 1213-7103
35. Yanez, E. G. The Effects of Low Molecular Weight Polar Molecules on the Physical and Chemical Properties of Hard Gelatin Capsule Shells. *PhD Thesis*. University of Kansas, (2017). [cit. 2023-01-03]
Dostupné z: <https://kuscholarworks.ku.edu/handle/1808/27578>
36. Strickley, R. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. *Pharm. Res.* **21(2)** 201- 230 (2004).
DOI: 10.1023/B:PHAM.0000016235.32639.23
37. Komárek, P. et al. Technologie léků 3. přepracované a doplněné vyd, Praha 5: *Galén*, 399 s. (2006). ISBN 8072624327

38. Vraníková, B. et al. Mechanistic aspects of drug loading in liquisolid systems with hydrophilic lipid-based mixtures. *International journal of pharmaceutics*, **578**, 119099 (2020). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119099
39. Gioffrè, M. et al. Role of pH on stability and mechanical properties of gelatin films. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **27(1)**, 67-77 (2012). DOI: 10.1177/0883911511431484
40. Gelatin manufacturers institute of America, inc. Gelatin. 1st edition. *New York: Gelatin manufacturers institute of America, inc.*, 5-24 (1973).
41. ČR, M. zdravotnictví. *Český lékopis 2017 1. Díl* (Grada publishing, a.s., 2017) ISBN 978-80-271-0500-7. 2017.
42. Klofer, B. et al. Study of a standardized taurocholate-lecithin powder for preparing the biorelevant media FeSSIF and FaSSIF. *Dissolution Technol*, **17(3)**, 6-13 (2010). DOI: 10.14227/DT170310P6
43. Chafetz, L. et al. Decrease in the rate of capsule dissolution due to Formaldehyde from Polysorbate 80 autoxidation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **73(8)**, 1186-1188 (1984). DOI: 10.1002/jps.2600730846
44. Joshi, H. N. et al. Bioavailability enhancement of a poorly water-soluble drug by solid dispersion in polyethylene glycol–polysorbate 80 mixture. *International journal of pharmaceutics*, **269(1)**, 251-258 (2004). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2003.09.002
45. Cole, E. T. et al. In vitro and in vivo pharmacoscintigraphic evaluation of ibuprofen hypromellose and gelatin capsules. *Pharmaceutical research*, **21**, 793-798 (2004). DOI: 10.1023/B:PHAM.0000026430.73789.e6
46. Erlich, L. et al. Relative bioavailability of danazol in dogs from liquid-filled hard gelatin capsules. *International journal of pharmaceutics*, **179(1)**, 49-53 (1999). DOI: 10.1016/S0378-5173(98)00386-X

47. Wolfson, A. et al. Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities. *Environmental Chemistry Letters*, **5**, 67-71 (2007). DOI: 10.1007/s10311-006-0080-z
48. Contreras, M. D. et al. The perfection of a method for the determination of the temperature/vapour-pressure function of liquids by differential scanning calorimetry. *Thermochimica acta*, **219**, 167-172 (1993). DOI: 10.1016/0040-6031(93)80494-U
49. Molpeceres, J. et al. Biodegradable nanoparticles as a delivery system for cyclosporine: preparation and characterization. *Journal of microencapsulation*, **17(5)**, 599-614 (2000). DOI: 10.1080/026520400417658
50. Vanin, F. M. et al. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. *Food Hydrocolloids*, **19(5)**, 899-907 (2005). DOI: 10.1016/j.foodhyd.2004.12.003
51. Wang, G. A a Sukumar, S. Characteristics and antitumor activity of polysorbate 80 curcumin micelles preparation by cloud point cooling. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **59**, 101871 (2020). DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101871
52. Izzo, F. et al. External reflectance FTIR dataset (4000–400 cm⁻¹) for the identification of relevant mineralogical phases forming Cultural Heritage materials. *Infrared Physics & Technology*, **106**, 103266 (2020). DOI: 10.1016/j.infrared.2020.103266
53. Korní, R. et al. Liquisolid technique: an approach to enhance the dissolution rate of olanzapine. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **80(6)**, 1003-1010 (2018). DOI: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000450
54. Forrester, S. T. et al. Total petroleum hydrocarbon concentration prediction in soils using diffuse reflectance infrared spectroscopy. *Soil Science Society of America Journal*, **77(2)**, 450-460 (2013). DOI: 10.2136/sssaj2012.0201

55. Djordjevic, N. M. et al. Adsorption of water on cyclosporin A, from zero to finite surface coverage. *International journal of pharmaceutics*, **81(1)**, 21-29 (1992). DOI: 10.1016/0378-5173(92)90039-5