

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA STANKOVIĆ

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA STANKOVIĆ

**OPTIMIZACIJA PRIPRAVE HITOSANSKIH MIKROSFER
ZA APLIKACIJO V SEČNI MEHUR**

OPTIMIZATION OF CHITOSAN MICROSPHERES FOR APPLICATION
INTO URINARY BLADDER

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom doc. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Mojci Kerec Kos za mentorstvo in vso pomoč pri izdelavi magistrske naloge ter vsem na Katedri, ki so mi nesebično pomagali, kadar sem jih potrebovala.

Velika zahvala gre vsekakor obema staršema in bratu, ki so mi med študijem potrpežljivo stali ob strani, me vzpodbujali in vame verjeli tudi v najtežjih trenutkih.

Nazadnje pa hvala tudi tebi, Andraž, za razumevanje in vso izkazano podporo med izdelavo magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Mojce Kerec Kos, mag. farm.

Kristina Stanković

Vsebina

1	Uvod.....	1
1.1	Okužba sečil.....	1
1.2	Izbira protimikrobnega zdravila.....	1
1.3	Mikrosfere.....	2
1.3.1	Mikrosfere kot farmacevtska oblika	2
1.3.2	Metode izdelave mikrosfer	4
1.3.3	Mukoadhezivne mikrosfere	6
1.3.4	Polimerne mikrosfere z nadzorovanim sproščanjem.....	8
1.4	Ciprofloksacin.....	10
1.4.1	Fizikalno-kemijske lastnosti	10
1.4.2	Mehanizem delovanja.....	10
1.4.3	Farmakokinetične lastnosti	11
1.4.4	Terapevtske indikacije	11
1.4.5	Neželeni učinki	12
1.5	Hitosan	12
1.5.1	Splošne značilnosti	12
1.5.2	Vpliv hitosana na sluznico sečnega mehurja.....	13
2	Namen dela.....	16
3	Materiali in metode	17
3.1	Materiali.....	17
3.1.1	Polimeri	17
3.1.2	Topila in raztopine.....	17
3.1.3	Naprave in pribori.....	19
3.2	Metode	20
3.2.1	Priprava pufrov in raztopin.....	20
3.2.2	Priprava in analiza mikrosfer.....	21
4	Rezultati	28
4.1	Sejalna analiza	28

4.2	Vsebnost ciprofloksacina	32
4.3	Sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer po metodi USP XXIII.....	35
4.4	Pregled mikrosfer s stereo mikroskopom	37
4.5	Pregled mikrosfer z elektronskim mikroskopom.....	40
5	Razprava	43
5.1	Raztapljanje in količina zdravilne učinkovine	43
5.2	Vpliv volumna in vrste topila	44
5.3	Vpliv zdravilne učinkovine na velikost metanolnih mikrosfer.....	47
5.4	Sproščanje etilacetatnih mikrosfer.....	47
5.5	Vpliv količine in vrste polimera	48
5.6	Vpliv Mg-stearata	53
5.7	Vpliv začetne temperature	55
5.8	Vpliv hitrosti mešanja	57
5.9	Vpliv tehnološkega postopka.....	59
6	Sklep	61
7	Literatura.....	62

Povzetek

Razrast mikroorganizmov znotraj sečnega mehurja povzroča vnetje, ki je lahko akutno ali kronično. Lažje oblike vnetja zdravimo večinoma s sistemskimi protimikrobnimi zdravili. V primeru hujših, hospitaliziranih primerov vnetij sečnega mehurja pa bi bila lahko uspešnejša intravezikalna aplikacija protimikrobnih zdravilnih učinkovin v sečni mehur. Z intravezikalno aplikacijo mikrosfer z vgrajeno protimikrobno zdravilno učinkovino bi se izognili predsistemskemu metabolizmu ter omogočili ciljno dostavo zdravilne učinkovine in nadzorovano sproščanje skozi daljše časovno obdobje.

Na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko že vrsto let proučujejo polimer hitosan, kateremu pripisujejo bioadhezivne lastnosti in povečanje permeabilnosti številnih sluznic.

Osnovni namen magistrske naloge je bila optimizacija sestave in izdelave hitosanskih mikrosfer, namenjenih aplikaciji v sečni mehur. Mikrosfere, v katere smo vgradili fluorokinolonski kemoterapevtik ciprofloksacin, smo pripravili z metodo odparevanja topila. Ovrednotili smo vplive različnih parametrov, kot so vrsta in količina uporabljenih topil in polimerov, temperatura priprave, hitrost mešanja, dodatek drsila itd. Želeli smo optimizirati obliko in velikost mikrosfer ter doseči podaljšano sproščanje vgrajene učinkovine.

Ugotovili smo, da je za izdelavo mikrosfer najbolj primerno topilo aceton, saj pri uporabi metanola in etanola nastanejo zelo velike mikrosfere, z etilacetatom pa nastanejo kristalinične mikrosfere. Vrsta ogrodnega polimera delno prispeva k upočasnjemu sproščanju učinkovine, kjer je najboljše rezultate izkazoval polimer Eudragit®RS. Za optimalno želeno velikost mikrosfer (do 200 μm) mora količina ogrodnega polimera predstavljati približno 60 % celotne polimerne zmesi. Dodatek Mg-stearata kot drsila vpliva na nastanek manjših in sferičnih mikrosfer, na drugi strani pa previsoka vsebnost pospeši sproščanje učinkovine. Z naraščanjem hitrosti mešanja polimerne zmesi velikost mikrosfer pada, posledično pa se pospeši sproščanje učinkovine. Pri pregledu mikrosfer z elektronskim mikroskopom smo ugotovili, da se je večji delež zdravilne učinkovine vgradil v notranjost mikrosfer, del učinkovine pa še vedno ostaja na površini v obliki majhnih kristalov.

Najbolj optimalna serija (K46) izkazuje zadovoljive rezultate s stališča oblike in velikosti, sproščanje pa bi želeli še nekoliko upočasniti.

Abstract

Microorganisms within urinary bladder causes inflammations, which can be acute or chronic. Mild inflammations are mostly treated with systemic antimicrobial drugs. For severe inflammations of urinary bladder that require hospitalization, intravesical application of microspheres containing antimicrobial drug could be more effective. In this way, we could avoid a presystemic drug metabolism, deliver the drug to the right place and controlled release of the drug.

At the Chair of Biopharmacy and Pharmacokinetics, chitosan has been included in the researches as a component of pharmaceutical forms, suitable for intravesical application. Chitosan has bioadhesive properties and ability to enhance the absorption of drugs.

The aim of this research work was to optimize the composition and the preparation procedure of microspheres for application into urinary bladder. Fluoroquinolone ciprofloxacin was incorporated in microspheres, which we prepared with solvent evaporation method. We evaluated the influence of different parameters such as type and amount of the solvent and polymers, preparation temperature, stirring rate, addition of Mg-stearate, etc. We wanted to optimize the form and the size of microspheres and achieve a controlled drug release.

We found out, that the most suitable solvent to prepare microspheres was acetone. When methanol or ethanol was used, enormous microspheres were produced, while with ethyl acetate they become crystalline. A type of the matrix polymer partly contributed to slower drug release and the best results were obtained with the polymer Eudragit®RS. For optimal size of microspheres (to 200 μm) the amount of matrix polymer had to be about 60% of all polymers (matrix and mucoadhesive polymer). In the presence of Mg-stearate, smaller and more spherical microspheres were formed, while the excessive content of Mg-stearate accelerated drug release. Scanning electronic microscopy revealed that the drug was mainly incorporated into microspheres, but a small amount of the drug remained on the surface of microspheres in a form of small crystals.

The most optimal series (K46) of the microspheres shows satisfactory results regarding their shape and size, but the drug release should be slower.

1 Uvod

1.1 Okužba sečil

Okužba sečil z mikroorganizmi, kot so bakterije, virusi, glive ali paraziti, povzroči vnetje, ki ga glede na mesto okužbe lahko opredelimo kot:

- okužba spodnjih sečil (okužba sečnega mehurja ali okužba sečnice),
- okužba zgornjih sečil (okužba ledvic, ledvični ognojek).

Glede na čas trajanja okužbe, je le-ta lahko kronična ali akutna, natančneje pa jo opredelimo kot nezapleteno ali zapleteno okužbo sečil.

Okužbe, ki so nezapletene, se najbolj pogosto pojavljajo pri ženskah, ki so v rodnem obdobju in predstavljajo največji delež oseb z okužbami sečil. Med nezapletene okužbe spada akutno vnetje sečnega mehurja, ki ga zdravimo tri dni in akutno gnojno vnetje ledvičnega tkiva, ki ga zdravimo približno dva tedna.

Okužbe sečil, ki so zapletene, se pogosteje pojavljajo pri nosečnicah, moških, starostnikih, sladkornih in ledvičnih bolnikih ter imunsko oslabljenih bolnikih (transplantacija, kemoterapija). Med pogostejšimi vzroki so trajni urinski kateter, anatomske in funkcijske nepravilnosti sečil, urološka preiskava z endoskopom, zdravljenje s protimikrobnimi zdravili.

Pred uvedbo protimikrobnega zdravljenja je potrebno pogledati klinično sliko okužb spodnjih in/ali zgornjih sečil (1).

1.2 Izbira protimikrobnega zdravila

Izbira protimikrobnega zdravila in čas zdravljenja sta odvisna predvsem od stopnje zapletenosti okužbe in mesta, pomembna dejavnika pa sta tudi starosti in spol bolnika. Pri okužbi v predelu spodnjih sečil (sečnica, mehur) je pomembno, da zdravilo doseže primerno koncentracijo v urinu, pri okužbah zgornjih sečil (sečevod, ledvice) pa je pomembna predvsem koncentracija učinkovine v plazmi. Za učinkovine, ki jih uporabljamo pri zdravljenju bolezni prostate, je predvsem pomembno, da dobro prehajajo

v tkivo. Trimetoprim s sulfametoksazolom in fluorokinoloni so najpogostejše uporabljene učinkovine v terapiji vnetja sečil, saj dosegajo visoke koncentracije tako v urinu kot tkivih urinarnega trakta, poleg tega pa uspešno odstranjujejo uropatogene in imajo minimalen vpliv na pojav kandidoze nožnice v primerjavi z betalaktami. Prvo zdravilo izbora je kombinacija trimetoprima in sulfametoksazola, pri alergijah na le-te pa se kot alternativa predpisuje fluorokinolone (ciprofloksacin, pefloksacin, ofloksacin, norfloksacin). Sistemske fluorokinolone uporabljamo pri zdravljenju okužb zgornjih in spodnjih sečil, norfloksacin pa največkrat pri okužbah spodnjih sečil. Fluorokinoloni tretje in četrte generacije, kot sta npr. sparfloksacin in trovafloksacin, se ne priporoča v terapiji zapletenih okužb spodnjih sečil, saj ne dosegajo dovolj visoke koncentracije v urinu (1).

1.3 Mikrosfere

1.3.1 Mikrosfere kot farmacevtska oblika

Mikrosfere so večkomponentni dostavni sistemi, ki omogočajo podaljšano oz. nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine ter zagotavljajo boljšo biorazpoložljivost, stabilnost in ciljno dostavo učinkovine. V literaturi pogosto najdemo mikrosfere v podskupini mikrokapsul. Slednje namreč pokrivajo tako področje mikrosfer, mikrodelcev kot mikrokapsul. Vsem trem je skupno to, da so mikrometerske velikost ter so sestavljene iz snovi, ki jo mikrokapsuliramo in ogrodne snovi. Natančnejša definicija mikrosfer je podana v diplomskem delu T. Kovačiča (2), citiram: »Mikrosfere so ogrodni tip mikrokapsul; majhni, trdni delci okroglih oblik, katerih velikost se giblje med 10^{-6} m in 10^{-3} m. Mikrokapsulirana in ogrodna oz. nosilna snov sta enakomerno razporejeni po celotnem volumnu mikrodelca.«, konec citata. Sestava mikrosfere je prikazana na sliki 1.

Pri izdelavi mikrosfer je zelo pomembna izbira nosilnih oz. ogrodnih snovi, saj so navadno polprepustne in omogočajo nadzorovano sproščanje zdravilne učinkovine (2).



Slika 1: Shematski prikaz sestave mikrosfere (2).

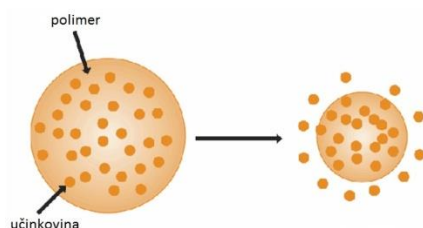
Izdelava in uporaba mikrodelcev je v farmaciji vedno bolj pogosta, saj farmacevtska oblika združuje številne prednosti tako s stališča tehnologije kot uporabe:

- združevanje med seboj več nekompatibilnih komponent v enem sistemu;
- zaščita učinkovine;
- izboljšanje topnosti učinkovin, ki so slabo topne;
- nadzorovano sproščanje;
- povečanje biološke uporabnosti;
- manjše nihanje koncentracij znotraj terapijskega območja ter posledično manj neželenih učinkov.

V osnovi lahko sproščanje učinkovine iz mikrodelcev opišemo kot tristopenjski sistem, in sicer v prvi stopnji voda penetrira v sistem ter s tem povzroča nabrekanje polimernega ogrodja. Temu sledi pretvorba krhkega polimera v prožni matriks sistem, v zadnji stopnji pa učinkovina difundira iz nabreklih sistema (3).

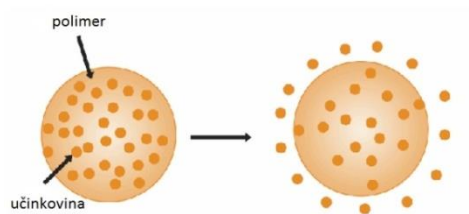
Glede na tehnološki postopek izdelave in sestavo mikrodelca pa ločimo več mehanizmov sproščanja učinkovine (4):

- Z razgradnjo nadzorovano sproščanje iz monolitčnega sistema, prikazano na sliki 2; sproščanje učinkovine je pogojeno s hitrostjo razgradnje polimernega ogrodnega sistema.



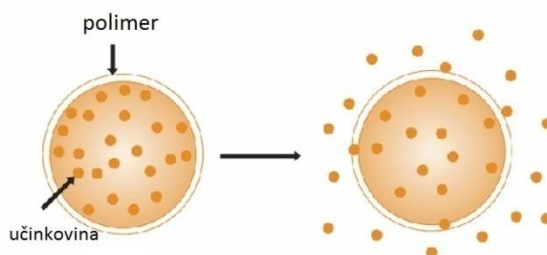
Slika 2: Z razgradnjo nadzorovano sproščanje učinkovine (4).

– Z difuzijo nadzorovano sproščanje iz monolitčnega sistema, prikazano na sliki 3; hitrost sproščanja učinkovine je pogojena s hitrostjo difuzije iz polimernega ogrodnega sistema. Polimeri, ki gradijo ogrodni sistem, se ne razgrajujejo (kot je to prikazano v zgornjem primeru), pač pa učinkovina difundira skozi pore.



Slika 3: Z difuzijo nadzorovano sproščanje učinkovine (4).

– Z difuzijo nadzorovano sproščanje iz rezervoarnega sistema (depo oblike), prikazano na sliki 4. Polimeri, ki gradijo rezervoarni sistem, omogočajo enakomerno sproščanje učinkovine skozi daljše časovno obdobje.



Slika 4: Z difuzijo nadzorovano sproščanje iz rezervoarnega sistema (4).

1.3.2 Metode izdelave mikrosfer

V splošnem lahko tehnološki postopek izdelave mikrosfer, ne glede na tip postopka, opredelimo s tristopenjskim procesom, ki zajema naslednje stopnje (5):

- prva stopnja vključuje dispergiranje polimerne raztopine v oljni medij oz. organsko topilo in nadaljnje mešanje pri ustrezni hitrosti, glede na željeno velikost mikrosfer,
- v drugi stopnji sledi strjevanje kapljic polimera in oblikovanje mikrosfer,
- v tretji stopnji pa izolacija, čiščenje in sušenje nastalih mikrosfer.

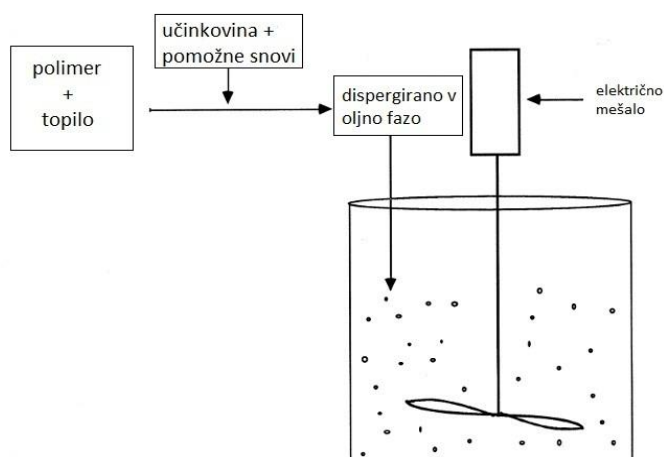
Mikrosfere lahko izdelamo po različnih tehnoloških postopkih, od samega postopka pa so odvisne lastnosti izdelanih mikrosfer (6):

- metoda z odparevanjem topila (fizikalno-kemijska metoda);
- metoda koacervacije (fizikalno-kemijska metoda) – je metoda, kjer gre za ločitev dveh faz in sicer se faza bogata s koloidom loči od faze revne s koloidom, če raztopina miruje. Pojav koacervacije lahko izzovemo na različne načine, in sicer z zmanjševanjem topnosti polimera-tako, da dodamo visoko koncentrirano raztopino soli; z zniževanjem temperature; z dodatkom inkompatibilnega polimera ali organskega topila. Splošni tehnološki postopek mikrokapsuliranja obsega dispergiranje učinkovine v polimerno zmes in nato zmanjšujemo topnost do stopnje koacervacije.
- metoda sušenja z razprševanjem (mehanska metoda) – predhodno dispergirano substanco razpršujemo skozi šobo v komori z vročim zrakom, ki odpari topilo;
- polimerizacijske metode (kemijske metode) – ločimo medpovršinsko ter *in situ* metodo polimerizacije, prvo uporabljamo za kapsuliranje tekočin, drugo pa za tekoča ali trdna jedra;

Metoda z odparevanjem topila

Ta metoda je ena izmed najbolj enostavnih in uporabljenih metod. Omogoča nadzor nad velikostjo delcev v nano in mikrometerskem območju. Na sliki 5 je shematski prikaz zaporednih stopenj izdelave mikrosfer po metodi z odparevanjem topila.

Osnovna emulzija je sestavljena iz notranje in zunanje faze. Notranja faza vključuje polimer, emulgirano učinkovino in pomožne substance. Zunanjo fazo pa predstavlja topilo, v katerem ne sme biti topna nobena od uporabljenih komponent, saj jo sicer med postopkom izgubljamo. Topilo notranje faze nato odstranimo, kar lahko storimo na različne načine, npr. z odparevanjem topila pri višji temperaturi ali pa z dodajanjem netopila. Komponente notranje faze se med seboj povežejo in dobimo mikrosfere, suspendirane v zunanji fazi. Na koncu mikrosfere še izloriamo, speremo in posušimo (7).



Slika 5: Shematski prikaz metode z odparevanjem topila (7).

Metode izdelave mikrosfer se razlikujejo glede na način odstranjevanja topila notranje faze. Najbolj pogosto uporabljena je metoda z odparevanjem topila, kjer se topilo notranje faze odpari pod vplivom povišane temperature, pogosto pa tudi metoda z dodajanjem netopila, kjer je ključen dodatek topilo, ki se deloma meša z notranjo fazo in v katerem polimer ni topen. Polimer preide v netopno obliko, ko netopilo odtegne topilo notranje faze (6).

Natančno je potrebno načrtovati pogoje tehnološkega postopka ter izbiro vhodnih komponent, saj le tako dosežemo visoko stopnjo enkapsulacije in nizek zaostanek topila.

Izziv, s katerim se srečamo pri izdelavi mikrosfer, je zagotoviti optimalni profil sproščanja vgrajene učinkovine. Sprememba enega parametra (npr. vrste topila, volumna topila, pripravljalne temperature, vrste polimera) v korist boljšega profila sproščanja, lahko slabo vpliva na velikost ali obliko mikrosfer in obratno. Tako je potrebno s številnimi kompromisi izbrati optimalne pogoje, s katerimi zagotovimo ugoden profil sproščanja, primerno velikost in obliko mikrosfer ter stopnjo enkapsulacije.

1.3.3 Mukoadhezivne mikrosfere

Mukoadhezivne mikrosfere so mikrosfere, ki bodisi vsebujejo mukoadhezivni polimer v notranjosti (ogrodni sistem) ali pa so z njim zunanje obložene. Mukoadhezija omogoča zadrževanje učinkovine skozi daljše časovno obdobje na mestu aplikacije. Ob uporabi

primerne polimera in tehnološkega postopka omogočajo adhezijo na skoraj vse sluznice, celo v očesno in nosno ter urinarni in prebavni trakt. Aplikacija mukoadhezivnih mikrosfer na očesno sluznico ter sluznico prebavnega trakta se uporablja za dostavo učinkovin z lokalnim delovanjem. Bistveni prednosti takšnih farmacevtskih oblik pri očesni aplikaciji sta podaljšano sproščanje ter manj pogosto apliciranje (biološka uporabnost učinkovin, ki jih apliciramo v oko je namreč precej nizka, saj se učinkovina zaradi prisotne solzne tekočine hitro odstranjuje z mesta aplikacije) (8).

Mukoadhezivni polimeri:

Mukoadhezivni polimeri so po kemijski strukturi hidrofilne makromolekule, ki z glikoproteini na površini sluznice tvorijo vodikove, ionske in van der Waalsove vezi. Polimeri, ki omogočajo mukoadhezijo, so lahko topni ali netopni, biorazgradljivi ali nerazgradljivi. V grobem jih lahko razdelimo v tri skupine:

- hidrofilni polimeri – vodotopni polimeri, kot npr. metilceluloza, hidroksipropilmetil celuloza, hitosan;
- hidrogeli – premreženi polimeri, ki v vodi nabrekajo, npr. poliakrilati, natrijev alginat;
- termoplastični polimeri – polimeri, ki vsebujejo nerazgradljiv polistiren in semi kristaliničen biorazgradljiv polimer, kot npr. polivinil alkohol (PVA), poliamidi, polikarbonati (8).

Lastnosti idealnega mukoadhezivnega polimera:

Pri izbiri polimera moramo biti najprej pozorni na to, da so tako polimer kot razgradni produkti netoksični ter ne dražijo mukoze. Snovi, ki omogočajo adhezijo učinkovine na sluznico sečnega mehurja, morajo ustrezati trem glavnim kriterijem, in sicer morajo po aplikaciji v sečni mehur omogočati hitro adhezijo na biološki material, ne smejo vplivati na pretok urina ali katerokoli drugo funkcijo sečnega mehurja ter omogočati adhezijo in zadrževanje učinkovine tudi pri prehodu urina skozi sečni mehur (9).

Pomembno je, da mukoadhezivni polimer zlahka prehaja do izbranega tarčnega tkiva ter omogoča nekovalentno vezavo na specifična izbrana mesta (polimer mora vsebovati primerne funkcionalne skupine, ki bodo omogočale vezavo s specifičnimi komponentami mukoze). Polimer mora omogočati enostavno vgradnjo učinkovine v farmacevtsko obliko,

ne nazadnje pa je z ekonomskega stališča pomembno ugodno razmerje med ceno in učinkovitostjo polimera (10).

1.3.4 Polimerne mikrosfere z nadzorovanim sproščanjem

Med najpogostejše uporabljene aplikacije je še vedno peroralna, ki pa nam pogosto ne omogoča nadzorovanega sproščanja učinkovine, predvsem zaradi otežene izdelave in izbire komponent, ki bi ustrezale vsem pogojem skozi celotni prebavni trakt (različne pH vrednosti prebavnih sokov, mehanske ovire itd.). V nekaterih primerih lahko hitro in nenadzorovano sproščanje učinkovine povzroči toksične učinke. Pogosto se zgodi, da koncentracija učinkovine pred ponovno aplikacijo, prav zaradi prehitrega sproščanja, pade pod vrednost minimalne inhibitorne koncentracije. Novejše metode omogočajo boljši nadzor nad sproščanjem učinkovine, ki ga dosežemo bodisi z uporabo posebnih membran ali pa biorazgradljivih polimerov.

V preteklih tridesetih letih so bile izvedene številne raziskave na področju mikrosfer z razgradljivimi polimeri. Aplikacija učinkovine v teh dostavnih sistemih ima številne prednosti, saj jo lahko tako zaužijemo kot injiciramo, dosežemo želeno nadzorovano sproščanje in v nekaterih primerih celo ciljano dostavo učinkovine.

Biokompatibilnost zagotovimo z uporabo naravnih polimerov, npr. celuloze, hitina in hitosana, ali pa s polimeri narejenimi iz naravnih monomerov, kot sta mlečna in glikolna kislina. Tudi številni sintetični polimeri zagotavljajo enake rezultate, vendar se jim zaradi morebitne toksičnosti raje izognemo.

Številni faktorji vplivajo na sproščanje učinkovine in z nadzorom le-teh lahko dosežemo želene rezultate. Velik vpliv imata predvsem polimer, v katerega je vgrajena učinkovina ter kemijske lastnosti učinkovine. Vgradnja učinkovine v slabo razgradljiv ogrodni sistem sicer upočasni sproščanje, vendar razgradnja polimera ni edini mehanizem sproščanja učinkovine. Le-ta lahko namreč prehaja tudi skozi pore, ki nastanejo pri oblikovanju mikrosfere. V nekaterih primerih lahko učinkovine z nukleofilnimi skupinami pospešijo razgradnjo verige polimernega ogrodnega sistema in posledično sproščanje učinkovine. Molekulska masa polimera, distribucija učinkovine, mešanje polimerov in kristaliničnost so nekateri faktorji, s katerim lahko vplivamo na profil sproščanja (11).

Faktorji, ki vplivajo na sproščanje učinkovine

- Molekulska masa polimera

Mikrosfere z visoko molekularnimi polimeri zagotavljajo ugodnejši profil sproščanja, saj se učinkovina sprošča konstantno skozi daljše časovno obdobje. Razlog temu je verjetno dejstvo, da je zmes visoko molekularnih polimerov viskoznejša in posledično tudi sproščanje učinkovine upočasnjeno (11).

- Kristaliničnost polimernega matriksa

Hitrost sproščanja učinkovine je pogojena tudi s kristaliničnostjo polimernega ogrodnega sistema, ki je odvisna predvsem od pogojev odparevanja topila. Odparevanje topila pri atmosferskem tlaku naj bi povzročilo nastanek kristalinične matriks strukture, medtem ko naj bi hitrejše odparevanje pri nižjem tlaku povzročilo nastanek amorfnega polimernega sistema. Kristaliničnost je tesno povezana z morfologijo in fizikalnimi lastnostmi mikrosfer, in sicer imajo mikrosfere z amorfn strukturo hrapavo in veliko specifično površino, ki prispeva k hitrejšemu sproščanju učinkovine. Ravno nasprotno pa imajo mikrosfere s kristaliničnimi polimeri gladko in majhno specifično površino, posledično pa upočasnjeno sproščanje (12).

- Poroznost

Poroznost nastane pri oblikovanju mikrosfere, natančneje pri odparevanju organskega topila in prehodu tekoče v trdno fazo. Tako lahko poroznost uravnavamo predvsem z izbiro primerne tehnološkega postopka oz. pogojev, kot so npr. začetna in pripravljalna temperatura, hitrost in čas odparevanja topila. Številne predhodne raziskave so pokazale, da je sproščanje učinkovine iz bolj poroznih mikrosfer pospešeno, saj je poleg mehanizma razgradnje prisotna tudi difuzija, s katero učinkovina prehaja skozi pore v medij (11).

- Distribucija velikosti

Hitrost sproščanja učinkovine pada z naraščajočo velikostjo mikrosfer. Faktorji, ki vplivajo na velikost, so predvsem hitrost mešanja suspenzije, količina dodanega polimera in volumen topila (11).

- Vpliv pH vrednosti

Topnost učinkovine in pomožnih snovi pri različnih pH vrednostih medija ima pomembno vlogo pri nadzorovanem sproščanju. Potrebno je izbrati takšen polimer, ki je pri pH

vrednosti tarčnega organa slabo topen, saj na takšen način zagotovimo upočasnjeno sproščanje.

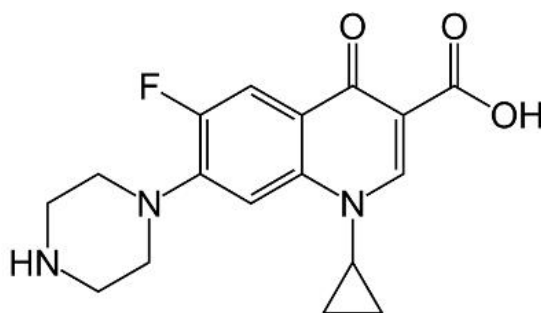
V pretekli raziskavi (11), kjer so preučevali vpliv pH medija na sproščanje učinkovine, so hitosanske mikrosfere prekrili z Eudragit®-om. Sproščanje je bilo nadzorovano, dokler se zunanji polimer ni raztopil, čeprav je hitosan pri pH 7,4 dobro topen (hitosan s 40 % stopnjo deacetilacije je topen v vodnih raztopinah do pH 9, medtem ko je hitosan s 85 % stopnjo deacetilacije topen le do pH 6,5).

1.4 Ciprofloksacin

1.4.1 Fizikalno-kemijske lastnosti

Ciprofloksacin, katerega strukturna formula je prikazana na sliki 6, uvrščamo med kemoterapevtike, in sicer v drugo generacijo fluorokinolonov. Nahaja se v obliki belega do blede rumenega kristaliničnega prahu. V svoji strukturi ima kisle in bazične centre, zato je dobro topen tako pri nizkih kot visokih pH vrednostih, medtem ko je pri pH 6–9 slabo topen (13).

V farmacevtskih oblikah se pojavlja v obliki ciprofloksacinijevega klorida, klorid monohidrata (peroralno) ali laktata (intravensko).



Slika 6: Struktura ciprofloksacina (14).

1.4.2 Mehanizem delovanja

Ciprofloksacin inhibira bakterijska encima, topoizomerozo II (DNK giraza) in IV, s tem pa preprečuje podvajanje, popravljanje in rekombinacijo bakterijske DNK. Spekter delovanja je usmerjen predvsem proti bakterijam, ki povzročajo urološke, respiratorne,

gastrointestinalne in abdominalne infekcije. Deluje tako proti Gram negativnim bakterijam (npr. *Escherichia coli*, *Legionella Pneumophila*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* itd.), kakor tudi proti Gram pozitivnim (npr. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* itd.) (15, 16).

1.4.3 Farmakokinetične lastnosti

Vezava ciprofloksacina na plazemske beljakovine je majhna (20–30 %). V plazmi je prisoten predvsem v neionizirani obliki in ima v stanju dinamičnega ravnovesja velik volumen porazdelitve. Ciprofloksacin doseže visoko koncentracijo v različnih tkivih, npr. v pljučih, sinusih, vnetnih spremembah in v urogenitalnem traktu, kjer so koncentracije višje kot v plazmi.

Pri presnovi nastanejo štirje produkti, ki so v *in vitro* študijah sicer izkazali protimikrobno delovanje, a je bila ta precej nižja kot pri matični spojini.

Ciprofloksacin zmerno zavira encim *CYP 1A2*, zato je potrebna previdnost pri sočasni uporabi nekaterih učinkovin, ki se presnavljajo preko tega encima.

V veliki meri se v nespremenjeni obliki izloča z urinom, v manjši meri pa z blatom (17).

1.4.4 Terapevtske indikacije

Uporablja se za zdravljenje nezapletenih in zapletenih okužb, ki jih povzročajo za ciprofloksacin občutljivi mikroorganizmi. Tako je uporaben pri okužbi dihal (hujše oblike pljučnice, poslabšanje kronične obstruktivne pljučne bolezni), kroničnem gnojnem vnetju srednjega ušesa in obnosnih sinusov, oči, ledvic in sečil (prostatitis, zapleteni in nezapleteni pielonefritis), trebušne votline, kože, kosti in sklepov ter pri sepsi (17).

Pri otrocih in mladostnikih se uporablja med 5. in 17. letom starosti le za zdravljenje akutnega pljučnega poslabšanja cistične fibroze ter za zdravljenje inhalacijskega vraničnega prisada (17).

1.4.5 Neželeni učinki

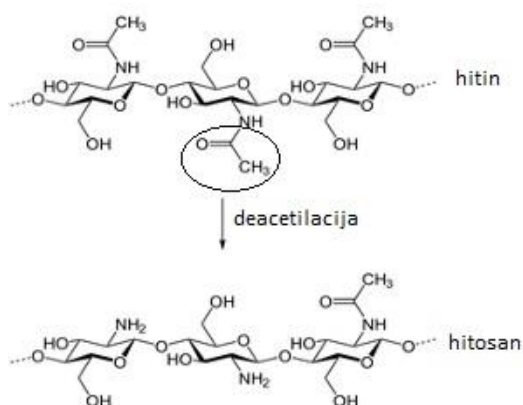
Med pogoste neželene učinke spadajo predvsem težave povezane s prebavnim traktom, kot sta slabost in driska, občasno pa se lahko pojavljajo okužbe s kandido, eozinofilija, anoreksija, psihomotorična hiperaktivnost/agitacija, glavobol, omotica, motnje spanja, bruhanje, bolečine v trebuhu, izpuščaji, ledvične okvare.

Poročali so tudi o primerih kristalurije ciprofloksacina, zato morajo biti bolniki, ki prejema to zdravilo, dobro hidrirani. Paziti je potrebno, da urin ni čezmerno alkalen (17).

1.5 Hitosan

1.5.1 Splošne značilnosti

Hitosan je kemijsko kopolimer $\beta(1-4)$ povezanih enot glukoamina in N-acetilglukoamina. Na sliki 7 je prikazan proces industrijskega pridobivanja hitosana z alkalno hidrolizo aminoacetilnih skupin hitina, ki ga najdemo v oklepih rakov ter v celični steni nekaterih insektov in gob.



Slika 7: Kemijska pretvorba hitina v hitosan (18).

Monomer hitosana vsebuje primarno amino skupino ter dve prosti hidroksilni skupini. Zaradi proste amino skupine ima lahko pozitivni naboj in zlahka interagira z negativno nabitimi spojinami.

V kislih vodnih raztopinah ($\text{pH} < 6,5$) je dobro topen, medtem ko je v bazičnem in nevtralnem pH praktično netopen. Glede na postopek pridobivanja, ločimo več vrst

hitosana z različno molekulsko maso, viskoznostjo in stopnjo deacetilacije, ki vpliva na topnost v vodnih raztopinah pri različnih pH vrednostih.

Je biokompatibilen, biorazgradljiv in netoksičen kationski polimer. Deluje tudi kot pospeševalec absorpcije ter ima bioadhezivne lastnosti. Poleg tega naj bi zmanjševal krvno koncentracijo holesterola in trigliceridov, deloval protimikrobno in pospeševal celjenje ran. Toksičnost hitosana je odvisna od stopnje deacetilacije, molekulske mase, čistote in načina aplikacije. Za humano uporabo se priporoča le najvišja stopnja čistote (19).

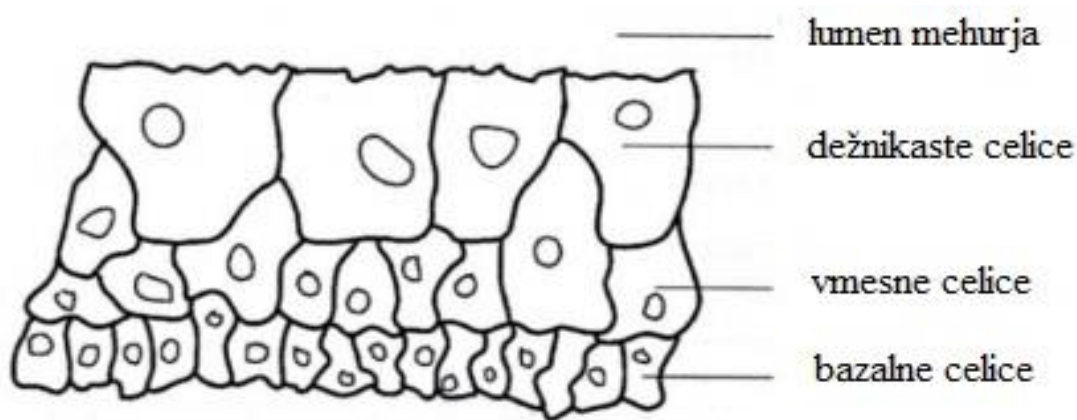
1.5.2 Vpliv hitosana na sluznico sečnega mehurja

Povečanje permeabilnosti sluznice sečnega mehurja

Sluznica sečnega mehurja:

Sečni mehur in ostala sečila na notranji strani pokriva urotelij, katerega funkcija je preprečevanje adsorpcije škodljivih komponent urina ter ohranjanje sestave in koncentracije urina kot so ga izločile ledvice. Urotelij je prehodni epitelij, ki leži na lamini proprii. Sestavljajo ga trije sloji celic, in sicer **bazalne**, **vmesne** in **dežnikaste celice** (slika 8), ki si po velikosti sledijo v enakem zaporedju:

- **bazalne celice** so nediferencirane in so kubične ali stebričaste oblike. Na bazalno lamino so pritrjene s hemidezmosomi in tvorijo zarodno plast, ki služi kot prekurzor za ostale plasti celic;
- **vmesne celice** so delno diferencirane in so med seboj povezane z dezmosomi;
- **dežnikaste ali površinske celice** so velike ploščate celice s heksagonalno obliko. Med seboj se povezujejo z dezmosomi, adherentnimi in tesnimi stiki.



Slika 8: Sestava urotelija, slika prirejena po (20).

Površina urotelija je prekrita s plastjo glikozaminoglikanov, ki imajo zaradi velikega števila sulfatnih skupin močan negativen površinski naboj, so pa naravi hidrofilni in tvorijo tanek hidratacijski sloj.

Sluznica sečnega mehurja je v osnovi zelo slabo permeabilna. Nepropustna je za snovi, ki se nahajajo v urinu, kar je za normalno delovanje organizma zelo pozitivno. Prav zaradi tega pa je intravezikalno zdravljenje okužb precej oteženo, hkrati pa zdravilna učinkovina ostaja zelo kratek čas na površini sluznice. V ta namen se poslužujemo uporabe različnih polimerov, ki povečajo permeabilnost sluznice (20).

Mehanizem povečanja permeabilnost:

Hitosan učinkovito poveča permeabilnost različnih sluznic, vendar pa je mehanizem povečanja permeabilnosti sečne sluznice nekoliko drugačen. Z uporabo vrstične in transmisijske elektronske mikroskopije so ugotovili, da v koncentracijah, ki značilno povečajo prehod modelnih učinkovin v steno prašičjega sečnega mehurja, hitosan povzroči luščenje zgornjih dežnikastih celic urotelija. Tako se odstrani permeabilnostna bariera, ki sicer ovira prehod snovi iz urina v mehur (21).

Mukoadhezivne lastnosti

Bioadhezija je izraz, ki v splošnem označuje sposobnost materiala za vezavo na biološko površino. V kolikor je ta biološka površina mukozna plast, govorimo o mukoadheziji.

Intravezikalna aplikacija učinkovine v sečni mehur je učinkovitejša ob uporabi mukoadhezivnega polimera, kot je hitosan, saj je omogočena ciljana dostava zdravilne učinkovine ter preprečeno odplavljanje učinkovine z urinom iz sečnega mehurja.

Mukoadhezivne lastnosti hitosana so posledica tvorbe ionskih in vodikovih vezi med pozitivno nabitimi amino skupinami polimera ter negativno nabito sialično kislino, ki je prisotna v glikoproteinih na površini sluznice (19).

Na sluznici sečnega mehurja ima hitosan v obliki klorida večjo jakost mukoadhezije kot npr. anionska polimera polikarbofil in natrijeva karboksimetil celuloza. To je najverjetneje posledica večjega odboja med negativno nabitimi polimeri in glikozaminoglikani na površini sluznice (8).

Pomen hitosana pri sproščanju zdravilne učinkovine so dokazali že pri eni izmed raziskav (22), ki je bila izvedena na Fakulteti za farmacijo. Kot modelno učinkovino so uporabili pipemidno kislino, ogrodni polimer mikrosfer je bil Eudragit®RS, testirali pa so tri

različne mukoadhezivne polimere – hitosanijev klorid (CH), natrijevo sol karboksimetil celuloze (CMC) in polikarbofil (PC). Ko so aplicirali posamezne mikrosfere na sluznico sečnega mehurja, so spremljali tri različne parametre, in sicer delež sproščene zdravilne učinkovine, stopnjo mukoadhezije ter hitrost nabrekanja polimera. Ugotovili so, da ima CH precej višjo stopnjo mukoadhezije glede na CMC in PC. Rezultate so interpretirali z dejstvom, da CH kot kationski polimer vstopa v interakcije med amino skupinami hitosana ter negativno nabitimi karboksi in sulfatnimi skupinami mukoze sečnega mehurja. Polimera CMC in PC ne vstopata v takšne interakcije, saj sodita med anionske polimere. Rezultati sproščanja učinkovine so pokazali, da so najvišji delež sproščene učinkovine izkazovale PC mikrosfere, najmanj učinkovine pa se je sprostilo pri CH mikrosferah. Glede na rezultate študije mukoadhezije, je bil takšen izid logično pričakovan, saj z naraščanjem jakosti mukoadhezije hitrost sproščanja učinkovine pada.

V mikrosferah vgrajeni hitosan omogoča predvsem sproščanje učinkovine na mestu adhezije skozi daljše časovno obdobje ter tesnejši stik mikrosfer s sluznico sečnega mehurja. Biološka uporabnost učinkovin je v sečnem mehurju zaradi prisotnega urina in posledičnega izplavljanja učinkovine precej nizka, zato je mukoadhezija tu še posebej pomembna.

Prednosti mukoadhezivnih sistemov (8):

- omogočajo ciljano dostavo zdravilne učinkovine in s tem boljšo ter večjo biorazpoložljivost;
- izboljšajo stik med dostavnim sistemom in absorpcijsko površino, posledično se izboljša permeabilnost tkiva, kar je predvsem pomembno za makromolekule, peptide in proteine;
- podaljšujejo čas zadrževanja učinkovine na mestu aplikacije in s tem zmanjšajo pogostost apliciranja.

2 Namen dela

Vnetje sečil in sečnega mehurja je ena izmed pogostejših težav, ki se pojavlja v sodobnem času. Do sedaj dobro uveljavljeni način zdravljenja, predvsem za blage oblike infekcij sečnega mehurja, je peroralna aplikacija protimikrobnih učinkovin. Ker sistemska aplikacija včasih ne zadostuje za zdravljenje hujših oblik infekcij, se poskuša najti nove načine aplikacije, s katerimi bi zagotovili ciljno dostavo farmacevtske oblike na želeno mesto ter vzdrževanje želene koncentracije učinkovine skozi daljše časovno obdobje, posledično pa zmanjšali pojav neželenih sistemskih učinkov. To bi nam omogočila intravezikalna aplikacija mukoadhezivnih mikrosfer z vgrajeno protimikrobno učinkovino.

Namen naše magistrske naloge je optimizirati postopek priprave hitosanskih mikrosfer, namenjenih aplikaciji v sečni mehur. V mikrosfere bomo vgradili ciprofloksacin, fluorokinolonski kemoterapevtik. Ogrodni sistem bo sestavljen iz dveh vrst polimerov, in sicer hitosana ter eksperimentalno izbranega polimera, ki bo zagotavljal podaljšano sproščanje učinkovine. Vgradnja hitosana v ogrodni sistem nam bo, glede na dosedanje študije in poznane lastnosti tega polimera, omogočila bioadhezijo in posledično podaljšano sproščanje. Hitosan poveča permeabilnost sluznice ter posledično olajša prehod zdravilne učinkovine v steno sečnega mehurja.

Mikrosfere bomo pripravili z metodo odparevanja topila, s spreminjanjem pogojev tehnološkega postopka; kot so pripravljalna temperatura, volumen in vrsta topila, količina in vrsta polimera, količina učinkovine, razmerje med učinkovino in polimerom ter količina in vrsta pomožnih snovi; pa bomo poskušali izboljšati obliko, velikost in notranjo strukturo mikrosfer. Prav tako si želimo čim bolj podaljšati sproščanje zdravilne učinkovine iz mikrosfer. Glede na rezultate *in vitro* sproščanja ter pregleda mikrosfer s stereo mikroskopom bomo izbrane serije mikrosfer podrobneje ovrednotili še z elektronskim vrstičnim mikroskopom.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Polimeri:

- Hitosanijev hidroklorid, Kraeber & Co. CMBH, Nemčija (stopnja deacetliranja 88,8 %, viskoznost: 1 % raztopina v vodi, 20 °C; 3,7 mPas);
- Eudragit®RL PO, Evonik Industries, Essen, Nemčija;
- Eudragit®RS PO, Evonik Industries, Essen, Nemčija;
- Eudragit®E 100, Evonik Industries, Essen, Nemčija.

3.1.2 Topila in raztopine:

- Aceton (reag. po Ph.Eur.), Panreac, Barcelona, Španija;
- Etil acetat (reag. po Ph. Eur.), Panreac, Barcelona, Španija;
- Metanol (reag. po Ph. Eur.), Panreac, Barcelona, Španija;
- Etanol (reag. po Ph. Eur.), Panreac, Barcelona, Španija;
- Tekoči parafin (reag. po Ph. Eur.), S. Pharmachem s.p., Ljubljana, Slovenija;
- Heksan (pro analysi), Marck, Darmstadt, Nemčija;
- Klorovodikova kislina Trisol® za pripravo 1M HCl, Merck, Darmstadt, Nemčija;
- Puferska raztopina pH 7, Kefolab, Ljubljana, Slovenija.

Ostalo:

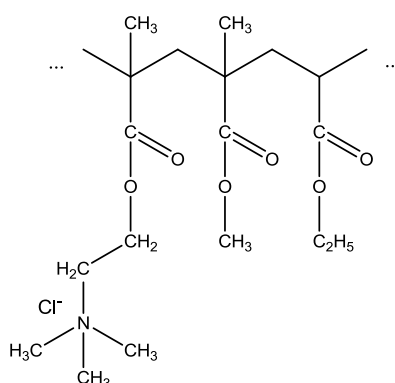
- Natrijev klorid, Emsure®, Merck, Darmstadt, Nemčija;
- Kalijev dihidrogenfosfat, Emsure®, Merck, Darmstadt, Nemčija;
- Natrijev hidrogenfosfat, Emsure®, Merck, Darmstadt, Nemčija;
- Ciprofloksacin (Fluka analytical), Sigma Aldrich, Šanghaj, Kitajska;
- kemikalje pri pripravi preparatov za vrstično elektronsko mikroskopijo: ketamin hidroklorid, ksilazin, 4 % paraformaldehid, 2 % glutaraldehid, 0,1 M kakodilatni puffer;
- Magnezijev stearat, Lex d.o.o. (po Ph. Eur. VI.), Koper, Slovenija.

Lastnosti uporabljenih polimerov:

– Eudragit®RS in Eudragit®RL

Sta kopolimera etilakrilata, metilmetakrilata in estra metakrilne kisline s kvarternimi amonijevimi skupinami (slika 9). Pri Eudragitu®RL so omenjene komponente v razmerju 1:2:0,2; pri Eudragitu®RS pa 1:2:0,1.

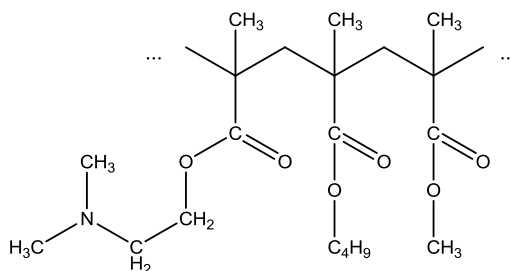
Nahajata se v obliki belega prahu, z vonjem po amonijaku. Amonijeve skupine so v obliki soli, od količine le-teh pa je odvisna permeabilnost. Tako ima RS nizko, RL pa visoko permeabilnost. Za oba je značilno, da sta netopna v vodnih medijih, vendar permeabilna in nabrekata neodvisno od pH vrednosti topila (23).



Slika 9: Kemijska struktura Eudragit®RS in Eudragit®RL, prirejeno po (23).

– Eudragit®E PO

Je kationski kopolimer dimetilaminoetil metakrilata, butil metakrilata in metil metakrilata, ki so v razmerju 1:2:1 (slika 10). Nahaja se v obliki belega prahu z vonjem po amonijaku. Topen je v raztopinah do pH 5, nad pH 5 pa nabreka (23).



Slika 10: Kemijska struktura Eudragit®E PO, prirejeno po (23).

3.1.3 Naprave in pribori

Sistem za pripravo mikrosfer:

- električno mešalo z veslom, Eurostar digital, IKA Labortechnik, Staufen, Nemčija;
- vodna kopel z grelnim sistemom in kontaktnim termometrom;
- magnetno mešalo, Rotamix, 550MMH, Hanna instruments.



Slika 11: Naš sistem za pripravo mikrosfer.

Sistem za testiranje sproščanja:

- aparatura za testiranje sproščanja, VanKel 7000, VanKel Technology Group, Cary, NC, ZDA;
- filtri za vzorčevalnik aparature za sproščanje 35 in 70 μm (Full Flow Filters), VanKel Technology Group, Cary, NC, ZDA.

Optični mikroskop:

- Motic, B1 series.

Stereo mikroskop:

- stereomikroskop Olympus SZX12, Olympus, Tokio, Japonska;
- kamera Olympus XC50, Tokio, Japonska;
- programska oprema: Cellsens Dimension, Olympus.

Vrstični elektronski mikroskop:

- JSM-840A, Joel, Tokio, Japonska;
- stresalnik za sita, F. Kurt Retsch GmbH & Co.KG, Haan, Nemčija;
- analitska tehtnica AG 245, Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica;
- analitska tehtnica Excellence Plus, Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica;
- pH meter MP 220, Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica;
- ultrazvočna kadička Sonis 4, Iskra, Kranj, Slovenija;
- vakumski sušilnik VS-50S, Kambič Anton, Semič, Slovenija.

Pribor:

- filter papir 589 black ribbon (Ø 70 mm), Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Nemčija;
- celulozni acetatni membranski filtri, pore 0,45 µm, Sartorius AG, Nemčija;
- polavtomatske pipete (200–1000 µm, 500–5000 µm, 1–10 mL), Eppendorf research, Hamburg, Nemčija;
- vakuumaska črpalka, nuča;
- merilne bučke, čaše, tehtiči, spatule, nastavki za pipete, plastične brizge, magneti, termometer, štoparica.

3.2 Metode

3.2.1 Priprava pufrov in raztopin

- Izotonični fosfatni pufer pH=6 (PBS 6)

2,38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

0,19 g KH_2PO_4

8 g NaCl

do 1,0 L H_2O

Raztopino smo umerili na pH 6 z 1 M HCl.

- 0,01 M HCl

Pripravljeno 1 M raztopino HCl smo ustrezno redčili, in sicer v razmerju 1:100; npr. za pripravo 100 mL 0,01 M HCl smo odpipetirali 1 mL 1M HCl in z destilirano vodo dopolnili do 100 mL.

3.2.2 Priprava in analiza mikrosfer

Priprava mikrosfer

Mikrosfere smo pripravili po metodi z odparevanjem topila. Zunanjo fazo je predstavljal tekoči parafin, notranjo pa topilo aceton, metanol, absolutni etanol ali etil acetat (odvisno od serije mikrosfer). Pogoji tehnološkega postopka so povzeti po doktorski nalogi Matejke Burjak (24) oz. magistrski nalogi Ane Preglav (25), kjer je osnovna receptura vključevala 0,9 g Eudragit®RS; 0,6 g mukoadhezivnega polimera hitosana; 0,5 g zdravilne učinkovine in različne količine Mg-stearata ter 6 mL acetona. Najprej smo izdelali mikrosfere po enaki recepturi (K1), nadalje pa glede na rezultate spreminjali določene parametre. Natančna sestava posameznih serij je prikazana v preglednici I.

Predvidevali smo, da bo vrsta topila odločilno vplivala na velikost in izgled mikrosfer, zato smo najprej začeli z variacijo tega parametra. Glede na rezultate smo se odločili za nadaljnjo sestavo mikrosfer.

Preglednica II: Sestava mikrosfer v preliminarnih poskusih.

Sestava	K1	K2	
Aceton (mL)	6	6	
Eudragit®RL (g)	1,4	1,4	
Hitosan (g)	0,9	0,9	
Ciprofloksacin (g)	0,5	0,5	
	K3	K6	
Etanol (mL)	6	8	
Eudragit®RL (g)	1,4	1,4	
Hitosan (g)	0,9	0,9	
Ciprofloksacin (g)	0,5	0,1	
	K4	K32	K7
Metanol (mL)	6	6	8
Eudragit®RL (g)	1,4	1,4	1,4
Hitosan (g)	0,9	0,9	0,9
Ciprofloksacin (g)	0,5	0,1	0,1
	K5	K8	K10
Etilacetat (mL)	9	8	7
Eudragit®RL (g)	1,4	1,4	1,4
Hitosan (g)	0,9	0,9	0,9
Ciprofloksacin (g)	0,5	0,1	0,1

* K1 se od K2 razlikuje le v tem, da smo pri seriji K1 v polimerno zmes hkrati dodali učinkovino in hitosan, pri K2 pa smo najprej raztopili učinkovino v polimerni zmesi in šele nato dodali hitosan.

Izdelane mikrosfere smo pogledali pod svetlobnim mikroskopom in se odločili, da delo nadaljujemo z mikrosferami izdelanimi iz acetona, etilacetata in metanola. V nadaljevanju je v preglednici II natančneje prikazana sestava posameznih serij mikrosfer, kjer smo spreminjali različne parametre, kot topilo pa uporabili aceton, v preglednici III metanol, v preglednici IV pa etilacetat.

Mikrosfere iz acetona in etilacetata so ustrezale zahtevani velikosti (do 200 μm) in smo jih zato v nadaljnjem delu tudi uporabili. Kljub neustrezni velikosti metanolnih mikrosfer, smo nekaj serij izdelali tudi v nadaljevanju, v upanju, da bodo variacije ostalih parametrov pripomogle k izboljšanim rezultatom. Postopoma smo spreminjali sestavo in nekatere parametre tehnološkega postopka, npr. količino Eudragita® in mukoadhezivnega polimera hitosana, volumen topila, vrsto topila, količino Mg-stearata, pripravljalno temperaturo in hitrost mešanja električnega mešala. Količino zdravilne učinkovine smo zmanjšali na 0,1 g, saj smo glede na preračunane terapevtske koncentracije, ki jih želimo doseči v urinu, ugotovili, da je prvotna količina (0,5 g) previsoka.

Pregled sestave in pogojev izdelave posamezne serije:

Preglednica III: Sestava in pogoji izdelave posameznih serij mikrosfer z acetonom.

Sestava	K9	K12	K13	K23	K24	K25	K29
Aceton (mL)	7	7	6	6	5	5	5
Eudragit®RL (g)	1,4	1,6	1,6	1,8	1,4	1,4	1,4
Eudragit®RS (g)	/	/	/	/	/	/	/
Hitosan (g)	0,9	0,7	0,7	0,5	0,9	0,9	0,9
Ciprofloksacin (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Mg stearat (g)	/	/	/	/	/	/	/
Tzačetna (°C)	5	5	5	5	5	10	15
obrati (/min)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Predhodno hlajene	/	/	/	/	/	/	/
Sestava	K26	K27	K28	K31	K30	K36	K38
Aceton (mL)	5	5	5	5	5	12	12
Eudragit®RL (g)	/	/	1,8	1,7	1,6	/	/
Eudragit®E100 (g)	/	1,4	/	/	/	/	/
Eudragit®RS (g)	1,4	/	/	/	/	0,9	0,9
Hitosan (g)	0,9	0,9	0,5	0,6	0,7	0,6	0,6
Ciprofloksacin (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,5
Mg stearat (g)	/	/	/	/	/	0,3	0,3
Tzačetna (°C)	5	5	5	5	5	5	5
obrati (/min)	1000	1000	1250	1250	1250	1000	1000
Predhodno hlajene	/	/	/	/	/	/	*

Nadaljevanje preglednice II : Sestava in pogoji izdelave posameznih serij mikrosfer z acetonom.

Sestava	K41	K43	K45	K44	K46	K48	K50	K49
Aceton (mL)	12	12	12	12	9	9	8	8
Eudragit®RL (g)	0,45	/	/	/	/	/	/	/
Eudragit®RS (g)	0,45	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Hitosan (g)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Ciprofloksacin (g)	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Mg stearat (g)	0,3	0,3	0,2	0,15	0,2	0,3	0,2	0,3
Tzačetna (°C)	5	5	5	5	5	5	5	5
obrati (/min)	1000	1000	1000	1000	1250	1250	1250	1250
Predhodno hlajene	*	*	*	*	*	*	*	*

Preglednica III: Sestava in pogoji izdelave posameznih serij mikrosfer z metanolom.

Sestava	K33	K34	K35	K37
Metanol (mL)	7	7	7	7
Eudragit®RL (g)	1,4	1,4	1,4	1,4
Hitosan (g)	0,9	0,6	0,9	0,9
Ciprofloksacin (g)	0,1	0,1	0,1	/
Mg-stearat (g)	0,05	0,05	0,2	0,2
Tzačetna (°C)	5	5	5	5
Obrati (/min)	1250	1250	1250	1250
Predhodno hlajene	/	/	/	/

Preglednica IV: Sestava in pogoji izdelave posameznih serij mikrosfer z etilacetatom.

Sestava	K11	K14	K15	K17	K16	K18	K19	K21	K20
Etilacetat (mL)	7	3	9	9	9	9	9	3	9
Aceton (mL)	/	3	/	/	/	/	/	4	/
Eudragit®RL (g)	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,8	1,6	1,6	1,6
Hitosan (g)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,5	0,7	0,7	0,7
Ciprofloksacin (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Mg-stearat (g)	/	/	/	/	/	/	0,05	0,05	0,05
Tzačetna (°C)	5	5	5	10	15	10	10	10	40
Obrati (/min)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Predhodno hlajene	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Osnovni tehnološki postopek izdelave:

V določenem volumnu izbranega topila smo na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi **raztopili Eudragit®**. Medtem smo pripravili **vodno kopel s temperaturo 5 °C** in v vpeto čašo z merilnim valjem odmerili 80 mL parafina ter mešali z elektronskim mešalom z

veslom na 60 obratov/min. Ko se je Eudragit® popolnoma raztopil (pri uporabi etilacetata je trajalo približno 45 minut, pri acetonu in metanolu pa približno 15 minut), smo k disperziji najprej **dodali učinkovino**, da se je dobro raztopila in porazdelila v polimer. Ko se je učinkovina dobro razmešala, smo **dodali še hitosan**, da se je vsa zmes homogenizirala. V nekaterih serijah smo na koncu dodali tudi **Mg-stearat**, vse skupaj še dve minuti mešali in **suspenzijo vlili v ohlajeni parafin**. Preden smo vlili suspenzijo, smo elektronsko mešalo nastavili na 1000 obratov/min, saj bi se sicer zmes sprijela skupaj. Po zlitju smo vključili elektronski grelec in **vodno kopel segreli na 40 °C**. Ko je kopel dosegla izbrano temperaturo, smo **mešali** pri 1000 obratih/min **še 40 minut**, da je izhlapelo vso topilo. Po 40 minutah smo elektronsko mešalo nastavili na 250 obratov/min in v zmes **vlili 40 mL heksana** ter mešali dve minuti. Z vakumsko črpalko smo nastale mikrosfere izolirali, jih sprali s heksanom in jih čez noč posušili v vakumskem sušilniku.

Od serije K38 dalje smo **postopek** še nekoliko spremenili, in sicer smo ga izvedli s **predhodnim hlajenjem**. To pomeni, da smo tudi Eudragit® raztapljali pri temperaturi 5 °C, mu nato dodali hitosan in dobro premešali, da je nastala homogena zmes. V drugi čaši smo na magnetnem mešalu v 2 mL topila raztopili Mg-stearat in mešali tri minute, vzporedno pa v polimerno zmes dodali učinkovino. Po treh minutah smo raztopljeni Mg-stearat vlili v predhodno pripravljeno polimerno zmes in čašo sprali še z 1 mL topila. Vse skupaj smo mešali še dve minuti, nato pa suspenzijo po enakem postopku vlili v ohlajeni parafin. Od tu dalje je tehnološki postopek enak prvotnemu. Za takšno modifikacijo smo se odločili, ker smo v literaturi (22) zasledili, da daje številne prednosti s stališča oblike, strukture in sproščanja.

3.2.2.1 Sejalna analiza

Izdelane mikrosfere smo ovrednotili s sejalno analizo, saj smo bili z velikostjo precej omejeni, glede na to da so mikrosfere namenjene aplikaciji v sečni mehur. V nadaljevanju raziskave bi bilo potrebno ovrednotiti mikrosfere v *in vivo* študiji na živalih (miši, podgane), kjer bi mikrosfere s pomočjo katetra intravezikalno aplicirali v sečni mehur. Kateter za intravezikalno aplikacijo pri teh živalih ima premer 250 µm, pri čemer moramo upoštevati, da pred aplikacijo pripravimo suspenzijo mikrosfer, kjer lahko le-te še nekoliko nabreknejo. Zgornja meja uporabne frakcije mikrosfer je bila zato 200 µm.

Serijo mikrosfer smo s sejanjem ločili na naslednje velikostne frakcije: večje od 250 µm, 200–250 µm, 160–200 µm, 125–160 µm, 100–125 µm, 80–100 µm in manjše od 80 µm. Pogoji stresanja: 30 min pri 60 amplitudah.

3.2.2.2 Vsebnost ciprofloksacina

Vsaki seriji mikrosfer smo določili vsebnost ciprofloksacina. Za natančne rezultate sproščanja in nadaljnjo uporabo mikrosfer je ta podatek zelo pomemben. Vsebnost smo določevali v 0,01 M HCl. Natančno smo natehtali približno 10 ali 20 mg mikrosfer v dveh paralelkah vsake serije. Mikrosfere smo kvantitativno prenesli v 25 ali 50 mL merilno bučko in do oznake dopolnili z 0,01 M HCl. Natehta mikrosfer in volumen topila sta odvisna od vsebnosti ciprofloksacina v seriji (0,5 ali 0,1 g). Na magnetnem mešalu smo disperzijo mešali 24 ur, da se je sprostil ves ciprofloksacin. Vzorec smo nato filtrirali skozi celulozni membranski filter velikosti 0,45 µm in ga primerno redčili, da je izmerjena absorbanca ležala v intervalu umeritvene premice. Redčenemu filtratu smo izmerili absorbanco pri 277 nm.

Za umeritveno premico smo natehtali natančno približno 5 mg standarda ciprofloksacina in ga raztopili v 125 mL 0,01 M HCl. Naredili smo dve osnovni raztopini (A in B), nato pa z ustreznim redčenjem pripravili standardne raztopine v določenem koncentracijskem območju, tako da smo enkrat vzorčili iz osnovne raztopine A in drugič iz B. Navzkrižna priprava iz dveh osnovnih raztopin poda natančnejše končne rezultate. Absorbance pripravljenih vzorcev smo izmerili pri 277 nm. Ob predpostavljajanju linearne odvisnosti absorbance od koncentracije ciprofloksacina smo izrisali umeritveno premico.

Izračun vsebnosti ciprofloksacina:

Enačba 1: Izračun vsebnosti ciprofloksacina v gramih.

$$m = (C_u * r) * V_v$$

m = masa učinkovine v vzorcu (mg)

C_u = koncentracija učinkovine iz umeritvene krivulje (mg/L)

r = redčitev

V_v = volumen vzorca (L)

Enačba 2: Izračun vsebnosti ciprofloksacina v odstotkih.

$$\text{vsebnost \%} = (C_e / C_t) * 100 \%$$

C_t = teoretična koncentracija

C_e = eksperimentalno določena koncentracija

3.2.2.3 Sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer po metodi USP XXIII

V vsaki seriji mikrosfer smo izvedli preizkus sproščanja, saj je bil eden od naših ciljev upočasni sproščanje učinkovine iz mikrosfer oz. omogočiti sproščanje skozi daljše časovno obdobje. Sproščanje smo izvedli po metodi USPXXIII na aparaturi z veslastimi mešali. Kot medij smo uporabili fosfatni pufer s pH 6 (PBS 6), saj glede na to, da pH vrednost urina variira od 4 do 8, predstavlja pH 6 ravno srednjo vrednost. Natančno smo natehtali približno 70–150 mg mikrosfer (odvisno od vsebnosti učinkovine v posamezni seriji ter od mase uporabne frakcije) ter jih kvantitativno prenesli v 600 mL PBS 6, ki smo ga predhodno ogreli na 37 °C. Temperatura je bila ves čas poskusa enaka, hitrost mešal pa nastavljena na 100 obratov/min. Zaradi manjšega volumna medija smo morali uporabiti še podaljške za vzorčevalnik (sicer ne bi dosegli medija) ter nanje namestiti filtre, ki preprečujejo zamašitev vzorčevalnih cevk. 90 minut smo v 15-minutnih časovnih intervalih vzorčili posamezne vzorce ter koncentracijo določili s pomočjo merjenja absorbance vzorčnih raztopin pri 274 nm in umeritvene krivulje ciprofloksacina v PBS 6. Pri vsakem vzorčenju se volumen medija zmanjšuje, zato je potrebno izračunati korigirane vrednosti koncentracije:

Enačba 3: Izračun korigirane koncentracije sproščene učinkovine v določenem časovnem intervalu.

$$C' = [C_n * (V_z - ((n-1) * V_{vz})) + V_{vz} * (C_1 + C_2 + \dots + C_{n-1})] / V_z$$

C' = korigirana konc. (mg/L)

C_n = izmerjena konc. (mg/L)

V_{vz} = volumen vzorca (5 mL)

V_z = začetni volumen medija (600 mL)

n = število vzorcev

Za umeritveno premico smo natehtali natančno približno 10 mg ciprofloksacina in ga kvantitativno prenesli v 250 mL bučko ter s PBS 6 dopolnili do oznake. Naredili smo dve osnovni raztopini (A in B), nato pa z ustreznim redčenjem pripravili raztopine znanih koncentracij, tako da smo enkrat vzorčili iz osnovne raztopine A in drugič iz B. Pripravljenim raztopinam smo izmerili absorbanco pri 274 nm in s pomočjo umeritvene premice določili koncentracijo ciprofloksacina v vzorcih.

3.2.2.4 Pregled mikrosfer s stereo mikroskopom

Mikrosfere posameznih serij smo pregledali pod svetlobnim mikroskopom. S pomočjo kamere in programske opreme smo posneli slike pri različnih povečavah, premerili premer ter pri največji povečavi ocenili obliko in površino mikrosfer.

3.2.2.5 Pregled mikrosfer z elektronskim mikroskopom

Podrobneje smo z elektronskim mikroskopom pregledali seriji K46, 49 in 50, saj so izkazovale najbolj obetavne rezultate. Mikroskopijo smo izvedli na Inštitutu za biologijo celice (MF, Univerza v Ljubljani).

Za konico spatule mikrosfer, velikosti 160–200 μm , smo nanegli na nosilec, na katerega smo predhodno pritrdili obojestranski lepilni trak. Popršili smo jih z zlatom in posušili na zraku, nato pa jih opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom pri različnih povečavah.

4 Rezultati

4.1 Sejalna analiza

Izkoristki so se glede na uporabljeno topilo razlikovali, gibali so se v območju med 65–100 %, delež uporabne frakcije pa je precej variiral, in sicer od 0 do 63 %. Takšno variiranje je posledica uporabe različnih topil, ki prispevajo k bodisi večji ali manjši gostoti in viskoznosti polimerne zmesi. Na osnovi tega podatka smo se odločili, da delo nadaljujemo z mikrosferami izdelanimi iz acetona, etilacetata in metanola. V preglednici V je prikazana sejalna analiza preliminarne vzorcev.

Preglednica V: Sejalna analiza preliminarne vzorcev. Prikazani so deleži posameznih frakcij v %, delež uporabne frakcije (% up.) ter izkoristek serije (η).

Serija K2		Serija K3		Serija K6		Serija K4	
Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%
>250	30,4	>250	97,8	>250	98,9	>250	98,0
200–250	7,6	200–250	0,4	200–250	0,4	200–250	0,7
160–200	17,7	160–200	0,7	160–200	0,4	160–200	0,7
125–160	20,3	125–160	0,0	125–160	0,4	125–160	0,0
100–125	8,9	100–125	0,9	100–125	0,0	100–125	0,7
80–100	12,0	80–100	0,0	80–100	0,0	80–100	0,0
<80	3,2	<80	0,0	<80	0,0	<80	0,0
η	0,8	η	0,8	η	1,1	η	0,5
% up.	58,9	% up.	2,2	% up.	1,1	% up.	2,0

Serija K32		Serija K7		Serija K5		Serija K8		Serija K10	
Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%
>250	99,6	>250	99,2	>250	20,9	>250	26,9	>250	45,4
200–250	0,4	200–250	0,2	200–250	5,9	200–250	6,1	200–250	8,7
160–200	0,0	160–200	0,3	160–200	9,2	160–200	11,4	160–200	12,7
125–160	0,0	125–160	0,2	125–160	20,9	125–160	17,3	125–160	11,8
100–125	0,0	100–125	0,1	100–125	15,1	100–125	9,5	100–125	9,2
80–100	0,0	80–100	0,1	80–100	18,0	80–100	22,9	80–100	9,4
<80	0,0	<80	0,0	<80	10,0	<80	5,9	<80	2,9
η	0,8	η	0,8	η	0,9	η	1,0	η	0,7
% up.	0	% up.	0,8	% up.	63,2	% up.	61,2	% up.	43,0

V preglednici VI je prikazana sejalna analiza mikrosfer, kjer smo kot topilo uporabili **acetone**. Tudi tu se deleži uporabne frakcije mikrosfer med serijami precej razlikujejo (od

0,2 do 61 %), saj se tako sestava kot pogoji tehnološkega postopka razlikujejo v posamezni seriji.

Preglednica VI: Sejalna analiza mikrosfer izdelanih z acetonom. Prikazani so deleži posameznih frakcij v %, delež uporabne frakcije (% up.) ter izkoristek serije (η).

Serija K9		Serija K12		Serija K13		Serija K23		Serija K24	
Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%
>250	22,8	>250	99	>250	84,6	>250	98,0	>250	39,7
200–250	9,9	200–250	0,9	200–250	9,0	200–250	1,0	200–250	11,8
160–200	11,9	160–200	0,1	160–200	3,2	160–200	0,5	160–200	17,1
125–160	23,1	125–160	0,0	125–160	2,1	125–160	0,5	125–160	17,8
100–125	15,0	100–125	0	100–125	0,8	100–125	0,0	100–125	7,9
80–100	11,5	80–100	0	80–100	0,3	80–100	0,0	80–100	5,3
<80	5,8	<80	0	<80	0,0	<80	0,0	<80	0,7
η	0,9	η	1,0	η	0,9	η	0,8	η	0,7
% up.	61,6	% up.	0,2	% up.	6,4	% up.	1,0	% up.	48,0
Serija K25		Serija K29		Serija K26		Serija K27		Serija K28	
Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%
>250	40,9	>250	55,3	>250	27,4	>250	30,5	>250	65,4
200–250	12,8	200–250	12,4	200–250	12,4	200–250	15,2	200–250	16,1
160–200	10,7	160–200	11,8	160–200	19,4	160–200	17,9	160–200	9,3
125–160	16,8	125–160	10,6	125–160	16,9	125–160	23,8	125–160	6,8
100–125	9,4	100–125	5,0	100–125	8,5	100–125	8,6	100–125	1,2
80–100	4,7	80–100	2,5	80–100	6,5	80–100	2,0	80–100	0,6
<80	4,7	<80	2,5	<80	9,0	<80	2,0	<80	0,6
η	0,7	η	0,7	η	0,9	η	0,7	η	72,1
% up.	41,6	% up.	29,8	% up.	51,2	% up.	52,3	% up.	17,9
Serija K31		Serija K30		Serija K36		Serija K38		Serija K41	
Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%
>250	58,8	>250	28,3	>250	91,1	>250	48,3	>250	30,0
200–250	18,1	200–250	17,1	200–250	4,9	200–250	25,9	200–250	34,7
160–200	11,3	160–200	18,4	160–200	2,0	160–200	14,5	160–200	31,5
125–160	8,1	125–160	22,4	125–160	1,2	125–160	9,7	125–160	2,4
100–125	1,9	100–125	9,2	100–125	0,4	100–125	0,9	100–125	0,5
80–100	1,3	80–100	2,6	80–100	0,4	80–100	0,4	80–100	0,5
<80	0,6	<80	2,0	<80	0,0	<80	0,4	<80	0,5
η	0,7	η	0,7	η	1,1	η	1,1	η	1,0
% up.	22,5	% up.	52,6	% up.	4,1	% up.	25,4	% up.	17,9

Nadaljevanje preglednice VI: Sejalna analiza mikrosfer izdelanih z acetonom. Prikazani so deleži posameznih frakcij v %, delež uporabne frakcije (% up.) ter izkoristek serije (η).

Serija K43		Serija K45		Serija K44		Serija K46		Serija K48	
Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%
>250	57,5	>250	89,0	>250	90,4	>250	48,5	>250	43,5
200–250	21,9	200–250	8,4	200–250	7,1	200–250	22,4	200–250	20,6
160–200	16,9	160–200	2,1	160–200	2,0	160–200	24,6	160–200	12,2
125–160	1,9	125–160	0,7	125–160	0,5	125–160	3,0	125–160	20,6
100–125	0,6	100–125	0,0	100–125	0,0	100–125	0,8	100–125	2,3
80–100	0,6	80–100	0,0	80–100	0,0	80–100	0,8	80–100	0,8
<80	0,6	<80	0,0	<80	0,0	<80	0,0	<80	0,0
η	0,9	η	1,0	η	1,2	η	1,0	η	0,9
% up.	20,0	% up.	2,7	% up.	2,5	% up.	29,1	% up.	35,9
Serija K50		Serija K49							
Sito (μm)	%	Sito (μm)	%						
>250	57,3	>250	67,8						
200–250	13,3	200–250	21,5						
160–200	9,1	160–200	4,7						
125–160	18,2	125–160	4,7						
100–125	1,4	100–125	0,7						
80–100	0,7	80–100	0,7						
<80	0,0	<80	0,0						
η	1,0	η	1,0						
% up.	29,4	% up.	10,7						

V preglednici VII je prikazana sejalna analiza mikrosfer, kjer smo kot topilo uporabili **metanol**. Izkoristki posameznih serij so se gibali med 0,6 in 0,7; v nobeni od serij pa nismo dobili uporabne frakcije, saj so bile mikrosfere zelo velike.

Preglednica VII: Sejalna analiza mikrosfer izdelanih z metanolom. Prikazani so deleži posameznih frakcij v %, delež uporabne frakcije (% up.) ter izkoristek serije (η).

Serija K33		Serija K34		Serija K35		Serija K37	
Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%
>400	80,6	>400	76,0	>400	/	>400	/
315–400	19,4	315–400	24,0	315–400	98,8	315–400	89,9
250–315	0,0	250–315	0,0	250–315	0,6	250–315	8,9
200–250	0,0	200–250	0,0	200–250	0,6	200–250	0,6
160–200	0,0	160–200	0,0	160–200	0,0	160–200	0,6

Nadaljevanje preglednice VII: Sejalna analiza mikrosfer izdelanih z metanolom. Prikazani so deleži posameznih frakcij v %, delež uporabne frakcije (% up.) ter izkoristek serije (η).

<160	0,0	<160	0,0	<160	0,0	<160	0,0
η	0,7	η	0,7	η	0,7	η	0,6
% up.	0,0	% up.	0,0	% up.	0,0	% up.	0,0

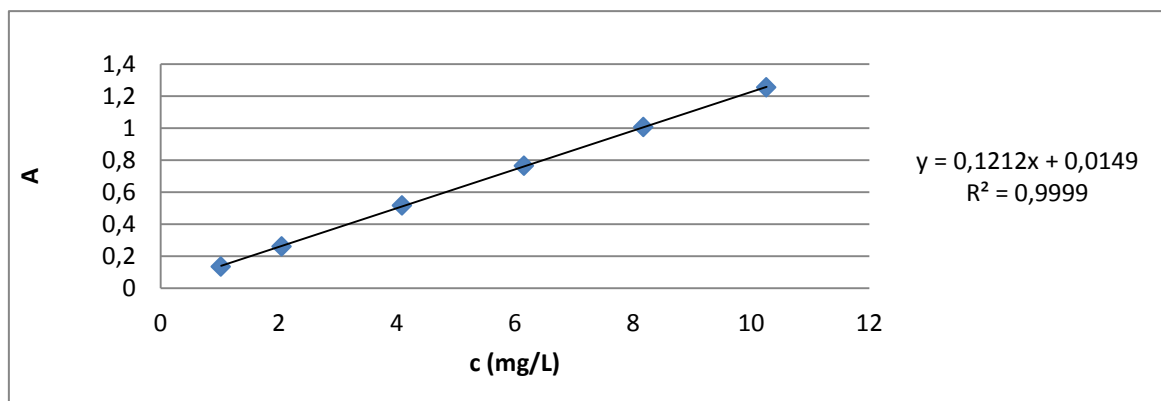
V preglednici VIII je prikazana sejalna analiza mikrosfer, kjer smo kot topilo uporabili **etilacetat**. Izkoristki posameznih serij so se gibal med 0,6 in 1,0; deleži uporabnih frakcij pa med 29 in 56 %.

Preglednica VIII: Sejalna analiza mikrosfer izdelanih z etilacetatom. Prikazani so deleži posameznih frakcij v %, delež uporabne frakcije (% up.) ter izkoristek serije (η).

Serija K11		Serija K14		Serija K15		Serija K17		Serija K16	
Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%
>250	52,2	>250	30,3	>250	35,1	>250	33,0	>250	43,1
200–250	9,8	200–250	17,1	200–250	9,7	200–250	10,1	200–250	17,6
160–200	8,9	160–200	18,2	160–200	30,8	160–200	12,0	160–200	13,4
125–160	19,6	125–160	21,1	125–160	13,0	125–160	29,0	125–160	16,7
100–125	2,7	100–125	7,4	100–125	7,6	100–125	9,0	100–125	6,0
80–100	6,1	80–100	4,3	80–100	2,7	80–100	5,5	80–100	2,8
<80	0,7	<80	1,5	<80	1,1	<80	1,0	<80	0,5
η	0,6	η	0,9	η	0,9	η	0,9	η	0,9
% up.	37,4	% up.	51,1	% up.	54,1	% up.	55,5	% up.	38,9
Serija K18		Serija K19		Serija K21		Serija K20			
Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%	Sito (μm)	%		
>250	52,2	>250	40,5	>250	53,6	>250	40,3		
200–250	18,7	200–250	17,7	200–250	23,0	200–250	18,0		
160–200	14,8	160–200	22,2	160–200	17,9	160–200	33,5		
125–160	11,5	125–160	14,0	125–160	5,1	125–160	6,4		
100–125	1,4	100–125	4,4	100–125	0,4	100–125	0,9		
80–100	1,0	80–100	0,6	80–100	0,0	80–100	0,4		
<80	0,5	<80	0,6	<80	0,0	<80	0,4		
η	1,0	η	1,0	η	1,0	η	1,1		
% up.	28,7	% up.	41,2	% up.	23,4	% up.	41,2		

4.2 Vsebnost ciprofloksacina

Vsaki izmed serij smo določili vsebnost ciprofloksacina v frakciji mikrosfer, katero smo nato nadalje uporabili tudi pri testiranju sproščanja. Vsebnost smo izračunali s pomočjo umeritvene premice, ki je prikazana na grafu 1.



Graf 1: Umeritvena premica za določanje vsebnosti ciprofloksacina v 0,01 M HCl.

V preglednicah IX, X in XI so prikazane vsebnosti ciprofloksacina v posameznih serijah mikrosfer. Vsebnost smo določili le tistim serijam, katere smo nadalje tudi sproščali.

Preglednica IX: Vsebnost ciprofloksacina v preliminarnem vzorcu. Podana je frakcija (velikostni razred) znotraj katere smo določali vsebnost; dejanska vsebnost ciprofloksacina v 100 mg vzorca (mp), teoretična vsebnost ciprofloksacina v 100 mg vzorca (mt) ter delež vsebnosti v %. Vsi rezultati so podani kot povprečje dveh paralelek iste serije.

vzorec	frakcija (μm)	mp (mg)	mt (mg)	vsebnost (%)
K10	80–250	4,3	4,2	102,9

Preglednica X: Vsebnost ciprofloksacina v vzorcih z acetonom. Podana je frakcija (velikostni razred) znotraj katere smo določali vsebnost; dejanska vsebnost ciprofloksacina v 100 mg vzorca (m_p), teoretična vsebnost ciprofloksacina v 100 mg vzorca (m_t) ter delež vsebnosti v %. Vsi rezultati so podani kot povprečje dveh paralelk iste serije.

vzorec	frakcija (μm)	mp (mg)	mt (mg)	vsebnost (%)
K9	802–50	4,7	4,2	111,8
K13	200–250	4,3	4,2	102,8
K24	80–200	4,1	4,2	99,0
K25	80–200	4,2	4,2	99,9

Nadaljevanje preglednice X: Vsebnost ciprofloksacina v vzorcih z acetonom. Podana je frakcija (velikostni razred) znotraj katere smo določali vsebnost; dejanska vsebnost ciprofloksacina v 100 mg vzorca (mp), teoretična vsebnost ciprofloksacina v 100 mg vzorca (mt) ter delež vsebnosti v %. Vsi rezultati so podani kot povprečje dveh paralelek iste serije.

K29	80–200	3,8	4,2	92,2
K26	80–200	4,2	4,2	101,6
K27	80–200	4,5	4,2	109,1
K28	80–200	4,3	4,2	102,1
K31	80–200	4,3	4,2	102,5
K30	80–200	4,6	4,2	109,8
K38	80–200	18,0	21,7	82,6
K41	80–200	20,7	21,7	95,4
K43	80–200	5,2	5,3	99,7
K46	160–200	7,7	5,6	139,0
K48	160–200	6,5	5,3	123,5
K50	160–200	6,7	5,6	120,0
K49	160–200	5,5	5,3	104,1

Preglednica XI: Vsebnost ciprofloksacina v vzorcih z etilacetatom. Podana je frakcija (velikostni razred) znotraj katere smo določali vsebnost; dejanska vsebnost ciprofloksacina v 100 mg vzorca (mp), teoretična vsebnost ciprofloksacina v 100 mg vzorca (mt) ter delež vsebnosti v %. Vsi rezultati so podani kot povprečje dveh paralelek iste serije.

vzorec	frakcija (μm)	mp (mg)	mt (mg)	vsebnost (%)
K11	80–200	4,0	4,2	96,6
K14	80–200	4,8	4,2	114,6
K15	80–200	4,3	4,2	104,3
K17	80–200	4,2	4,2	101,2
K16	80–200	4,2	4,2	100,5
K18	80–200	3,7	4,2	88,6
K19	80–200	3,8	4,1	92,6
K21	80–200	4,0	4,1	98,6
K20	80–200	3,7	4,1	89,9

Ker so rezultati določanja vsebnosti skoraj pri vseh serijah presegali teoretično vsebnost, smo pri dveh serijah z enako recepturo preverili še vsebnost ciprofloksacina v ostalih frakcijah mikrosfer (preglednica XII) ter izračunali celokupno vsebnost ciprofloksacina v celotni masi mikrosfer.

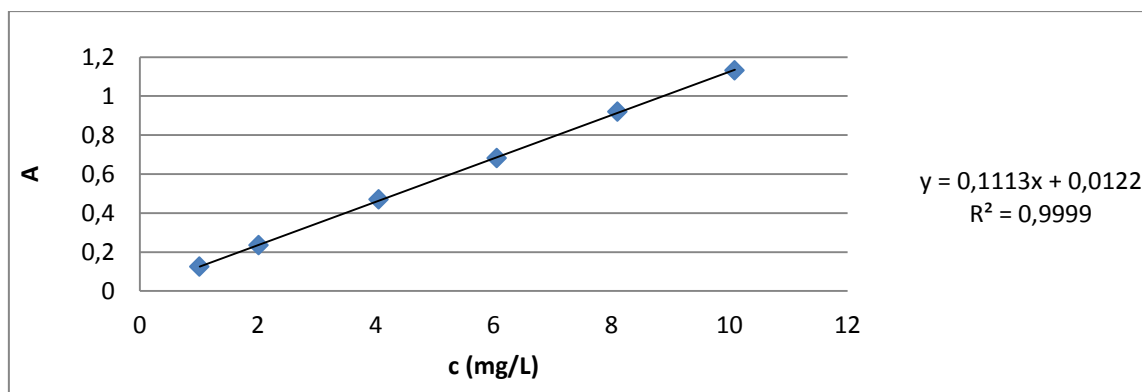
Preglednica XII: Preglednica vsebnosti ciprofloksacina v vseh frakcijah celotne serije K46 in K47 (enaki paralelni seriji). Mp označuje praktično maso ciprofloksacina v 100 mg določene frakcije, mt označuje teoretično maso ciprofloksacina v 100 mg določene frakcije, mf pa maso ciprofloksacina v celotni masi določene frakcije.

K46	mp (mg)	mt (mg)	vsebnost (%)	mf (mg)
0–160 μm	6,5	5,6	116,5	2,5
160–200 μm	7,7	5,6	139,0	25,5
>200 μm	3,8	5,6	68,0	35,8
				63,8
vsebnost (%)				85,7
K47	mp (mg)	mt (mg)	vsebnost (%)	mf (mg)
0–160 μm	6,3	5,6	113,4	0,6
160–200 μm	8,2	5,6	146,9	26,1
>200 μm	4,7	5,6	85,2	48,3
				75,1
vsebnost (%)				97,9

Iz rezultatov je razvidno, da je vsebnost učinkovine v posameznih velikostnih frakcijah mikrosfer med serijami primerljiva. V obeh serijah je bila praktična vsebnost učinkovine v frakcijah do 200 μm višja glede na pričakovano teoretično vsebnost, v mikrosferah večjih od 200 μm pa nižja. Vsebnost ciprofloksacina je v vseh frakcijah serije K46 za približno 10 % nižja kot v seriji K47, vzrok temu so verjetno večje izgube med tehnološkim postopkom.

4.3 Sproščanje ciprofloksacina iz mikrosfer po metodi USP XXIII

Sproščanje učinkovine iz mikrosfer smo izvajali po metodi USP XXIII, ki je natančneje opisana v poglavju »Metode dela«. Koncentracijo učinkovine smo določili s pomočjo umeritvene premice, ki je prikazana na grafu 2.



Graf 2: Umeritvena premica za določanje vsebnosti ciprofloksacina v PBS6.

Sproščanje smo izvedli le pri tistih serijah, ki so že v sejalnem preizkusu pokazale zadovoljive rezultate. Sproščanje je večinoma trajalo 90 minut, tako iz acetonskih (preglednica XIII) kot etilacetatnih mikrosfer (preglednica XV), le pri serijah K48, K49 in K50 smo izvedli 4-urno sproščanje (preglednica XIV).

Preglednica XIII: 90-minutno sproščanje ciprofloksacina iz acetonskih mikrosfer.

	K9	K13	K24	K25	K29	K26	K27
čas (min)	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.
15	82,7	79,7	92,0	93,5	97,8	93,4	94,8
30	87,6	87,1	96,1	96,4	100,3	97,3	96,4
45	89,1	89,6	97,0	97,1	100,7	98,6	97,7
60	90,0	91,7	97,7	97,6	101,5	100,3	101,8
75	90,3	92,5	97,9	97,6	102,0	101,0	102,4
90	90,7	92,5	98,3	98,0	102,2	101,6	103,3
	K28	K31	K30	K38	K41	K43	K46
čas (min)	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.
15	89,8	96,1	90,1	72,8	86,6	89,4	70,2

Nadaljevanje preglednice XIII: 90-minutno sproščanje ciprofloksacina iz acetonskih mikrosfer.

30	97,8	99,7	93,8	81,2	96,7	99,4	78,5
45	100,0	100,9	94,8	89,0	100,2	103,2	81,2
60	100,1	101,2	96,2	94,2	101,1	105,2	82,4
75	100,5	101,9	96,5	97,0	101,8	107,1	84,1
90	101,0	101,9	96,9	97,6	103,7	108,1	84,5

Preglednica XIV: 4-urno sproščanje ciprofloksacina iz acetonskih mikrosfer.

	K48	K50	K49
čas (min)	% spr.	% spr.	% spr.
15	82,8	72,2	69,3
30	89,9	77,0	75,9
45	92,7	78,7	79,6
60	94,2	79,6	82,9
75	94,9	80,8	83,7
90	95,1	81,1	84,1
120	95,4	81,5	84,4
150	95,6	81,8	84,6
180	96,4	82,4	84,9
210	96,4	82,5	85,0
240	96,4	82,9	85,7

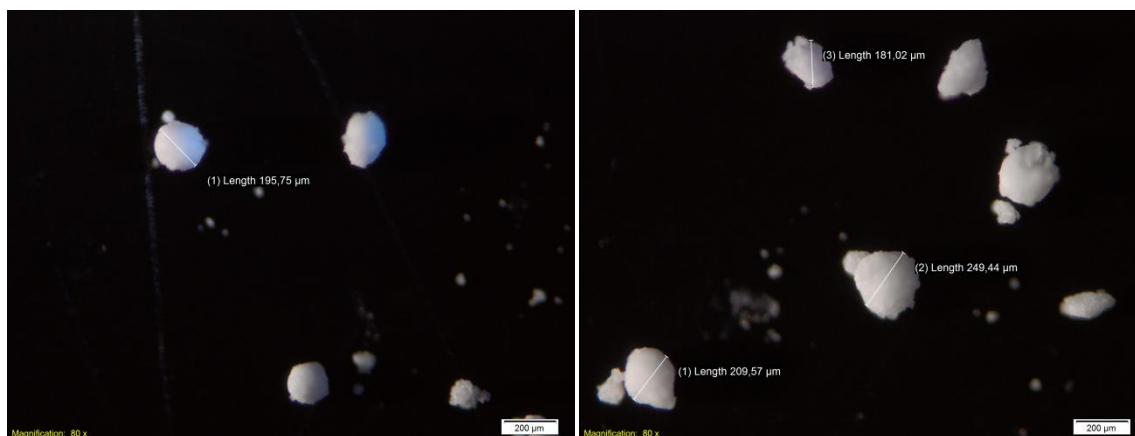
Preglednica XV: 90-minutno sproščanje ciprofloksacina iz etilacetatnih mikrosfer.

	K10	K11	K14	K15	K17	K16
čas (min)	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.
15	78,7	62,0	81,4	22,1	26,1	82,3
30	88,2	93,8	85,3	66,2	65,6	92,0
45	89,9	97,3	86,9	81,5	82,2	93,4
60	90,7	99,0	87,5	91,2	88,8	95,1
75	91,2	100,1	87,9	93,5	90,9	95,6
90	91,3	100,4	88,0	94,4	91,3	95,8
	K18	K18/1	K19	K21	K20	
čas (min)	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.	% spr.	
15	82,6	41,0	84,0	92,3	83,5	
30	92,7	62,6	90,4	96,5	85,4	
45	95,4	75,1	92,3	98,0	87,1	
60	98,7	82,9	92,7	98,4	87,6	
75	99,0	87,9	92,9	99,0	88,1	
90	98,8	88,0	93,1	99,3	88,3	

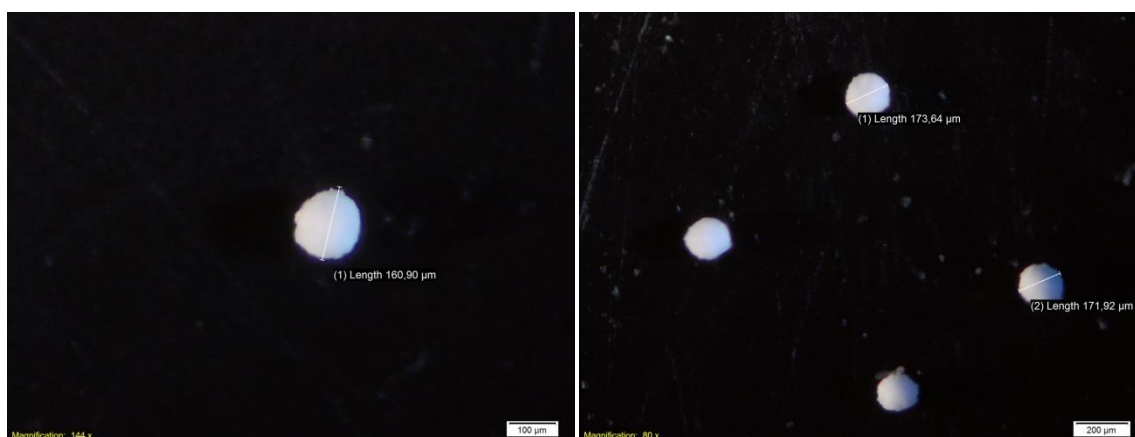
4.4 Pregled mikrosfer s stereo mikroskopom

S stereo mikroskopom smo pod različnimi povečavami (80x, 144x) pogledali mikrosfere izdelane z različnimi topili ter premerili njihov premer. Na slikah 12, 13, 14 in 15 so prikazani vzorci mikrosfer izdelanih z acetonom pri različnih tehnoloških pogojih in sestavi. Na sliki 16 je prikazan vzorec metanolnih mikrosfer, na sliki 17 in 18 pa etilacetatne mikrosfere.

Slike mikrosfer izdelanih z acetonom:



Slika 12: Vzorci K43 – frakcija 80–200 µm (levo) in K44 – frakcija 125–250 µm (desno) pod stereo mikroskopom; K43 vsebuje dvakratno količino Mg-stearata glede na vzorec K44.



Slika 13: Vzorec K46 – frakcija 160–200 µm pod stereo mikroskopom pri 144x povečavi levo in 80x povečavi desno.



Slika 14: Vzorec K48 – frakcija 160–200 µm pod stereo mikroskopom pri 144x povečavi levo in 80x povečavi desno.



Slika 15: Vzorec K50 – frakcija 160–200 µm pod svetlobnim mikroskopom pri 144x povečavi.

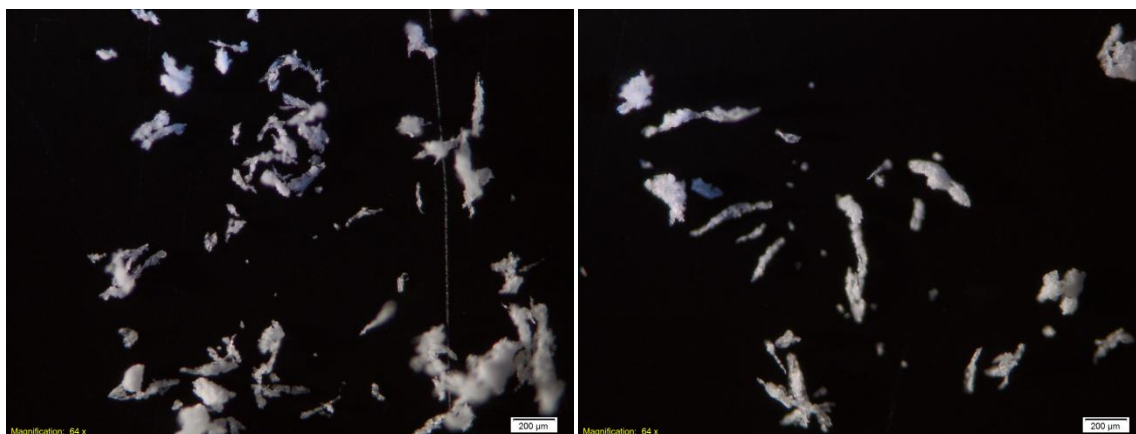
Iz slike 12 je razvidno, da so mikrosfere serije K43 bolj sferične in gladke glede na serijo K44, ki vsebuje precej manj Mg-stearata. Tudi sliki 14 in 15 prikazujeta seriji z različno vsebnostjo Mg-stearata, vendar iz posnetkov s stereo mikroskopom ni opaziti bistvene razlike v velikosti in obliki mikrosgrov (verjetno zato, ker je razlika v vsebnosti Mg-stearata le približno 4 %).

Pri primerjavi velikosti vzorcev K46, na sliki 13, in K43, na sliki 12 levo, opazimo, da so mikrosfere serije K46 manjše, saj je bila hitrost mešanja višja kot pri seriji K43.

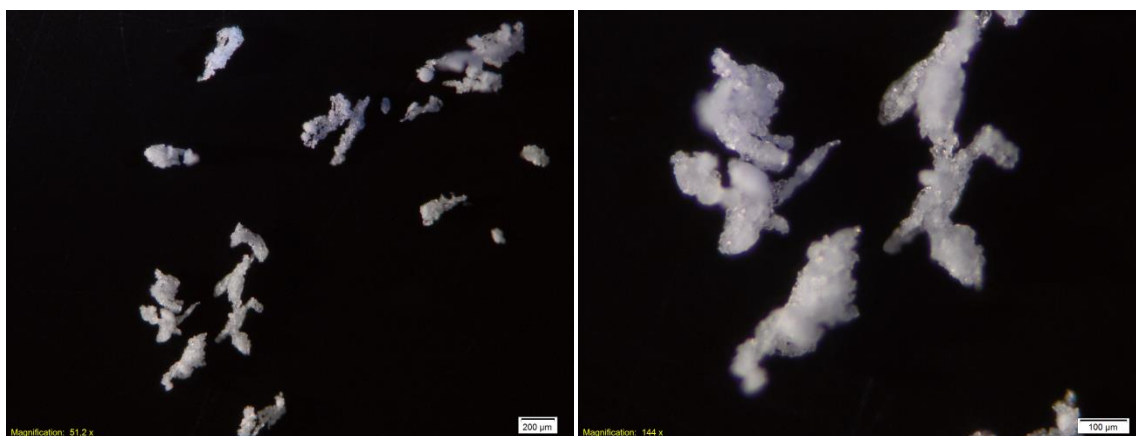
Slika mikrosfer izdelanih z metanolom:

Slika 16: Vzorec K35 – frakcija 200–350 µm pod stereo mikroskopom pri 80x povečavi.

Metanolne mikrosfere so, ne glede na modifikacijo pogojev, enormne velikosti in nepravilnih oblik.

Slike mikrosfer izdelanih z etilacetatom:

Slika 17: Vzorec K15 (levo) in K17 (desno) – frakcije 80–200 µm pod stereo mikroskopom pri 84x povečavi. Vzorec K15 je izdelan pri začetni temperaturi 5 °C, K17 pa pri 10 °C.



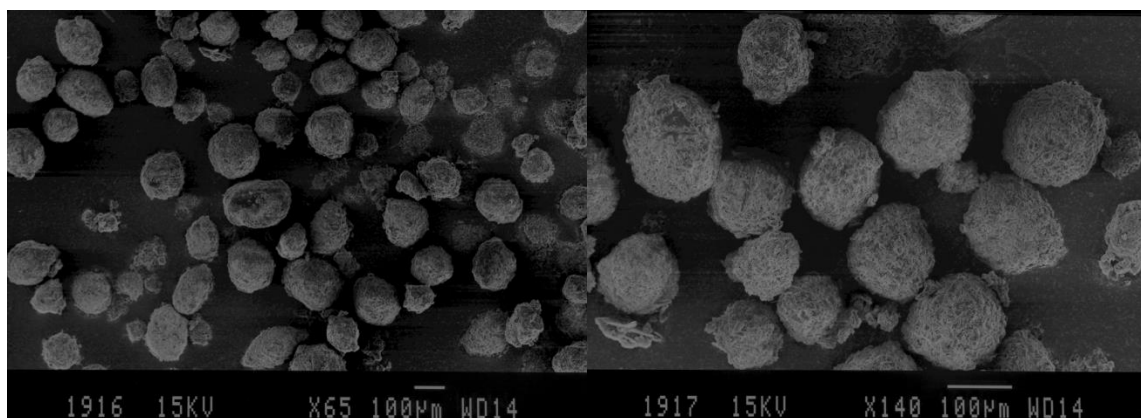
Slika 18: Vzorec K16 – frakcija 80–200 µm pod stereo mikroskopom pri 51,2x povečavi levo in 144x povečavi desno. Vzorec K16 je izdelan pri začetni temperaturi 15 °C.

Mikrosfere z etilacetatom kljub vsem modifikacijam pogojev niso sferične oblike, pač pa ostajajo kristalinične. Na sliki 17 in 18 so prikazane serije izdelane pri različni začetni temperaturi (5, 10, 15 °C). Tudi ta sprememba parametra ni izboljšala oblike, pač pa so serije na pogled skoraj enake.

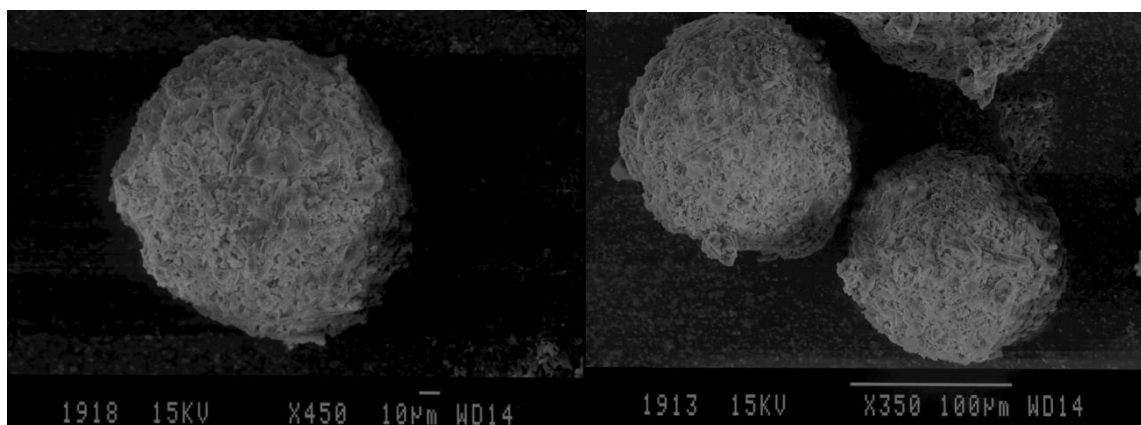
4.5 Pregled mikrosfer z elektronskim mikroskopom

Sliki 19 in 20 prikazujeta mikrosfere serije K46, ki je izkazovala najboljše rezultate s stališča velikosti, oblike in sproščanja. Razvidno je, da so mikrosfere enakomerne oblike in velikosti. Na sliki 21 pa je pri 850x povečavi podrobneje prikazana površina mikrosfere. Preveriti smo želeli, ali se je učinkovina vgradila v notranjost mikrosfere oz. ali je morda ostajala na površini v obliki kristalov. Razvidno je, da na površini ni prisotnih večjih kristalov.

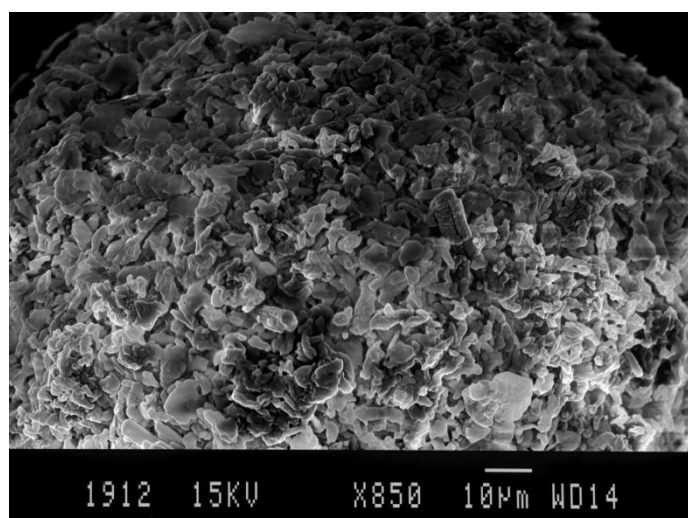
Na sliki 22 in 23 sta prikazani seriji K49 in K50. Opazimo, da sta obe seriji mikrosfer precej različnih velikosti in nepravilnih oblik. K49 sicer vsebuje približno 4 % več Mg-stearata, vendar ni opaziti izboljšanja v velikosti in obliki. Nadalje je na slikah 24 in 25 še podrobneje poslikana serija K50, kjer je še bolj nazorno prikazana nesferičnost mikrosfer.



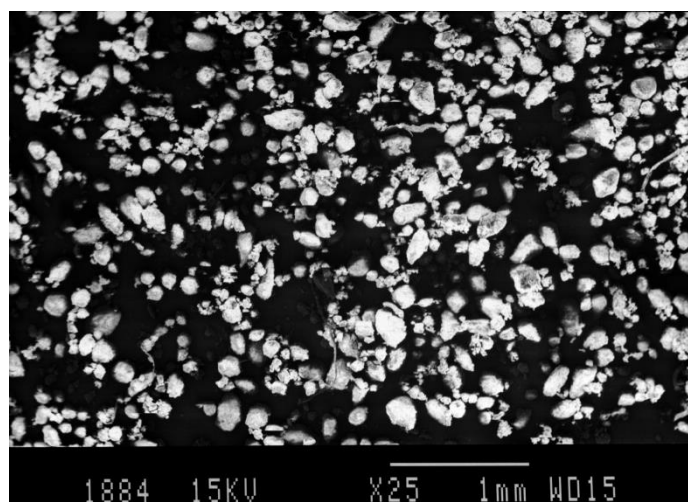
Slika 19: Vzorec K46 – frakcija 160–200 µm pri 65x povečavi (levo) in 140x povečavi (desno).



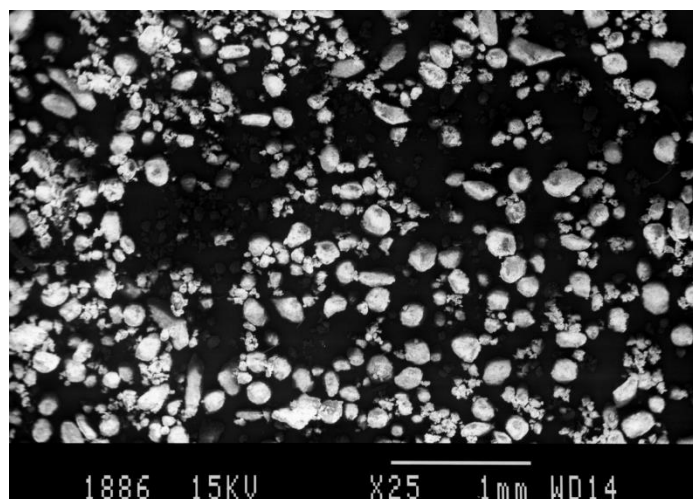
Slika 20: Vzorec K46 – frakcija 160–200 µm pri 450x povečavi levo in pri 350x povečavi desno.



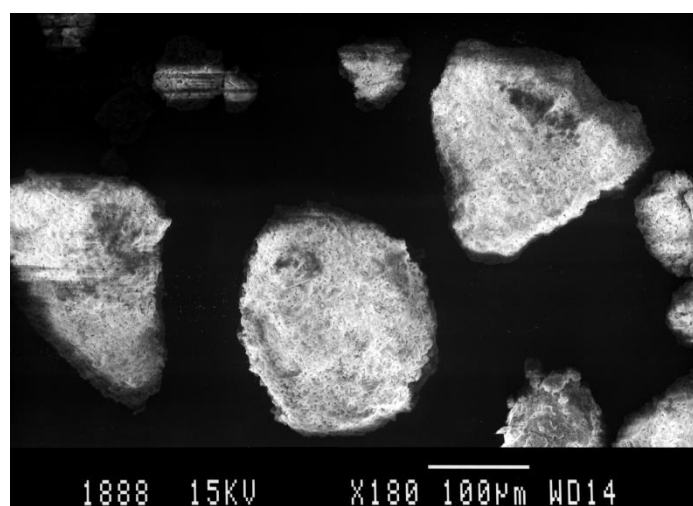
Slika 21: Vzorec K46 – frakcija 160–200 µm pri 850x povečavi.



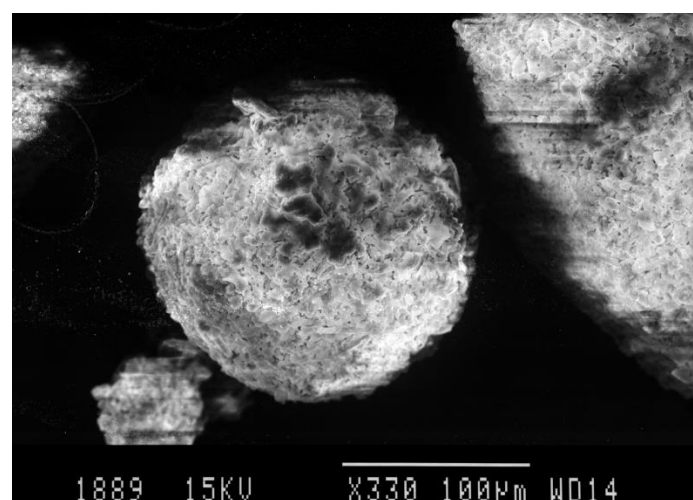
Slika 22: Vzorec K49 – frakcija 160–200µm pri 25x povečavi.



Slika 23: Vzorec K50 – frakcija 160–200 μm pri 25x povečavi.



Slika 24: Vzorec K50 – frakcija 160–200 μm pri 180x povečavi.



Slika 25: Vzorec K50 – frakcija 160–200 μm pri 330x povečavi.

5 Razprava

Osnovni namen naše naloge je bila optimizacija izdelave mukoadhezivnih mikrosfer, namenjenih aplikaciji v sečni mehur. Mikrosfere bi se lahko uporabile za zdravljenje hujših oblik infekcij sečnega mehurja. Izhodišče pri izdelavi mikrosfer je bila predhodno izvedena doktorska naloga Matejke Burjak (24) ter nadaljnja magistrska naloga Ane Preglav (25). S spreminjanjem sestave in parametrov tehnološkega postopka smo poskušali optimizirati izgled in velikost mikrosfer ter hitrost sproščanja učinkovine.

Osnovni tehnološki postopek priprave mikrosfer ter nekatere parametre smo želeli obdržati, saj je za laboratorijsko delo tako s finančnega kot časovnega stališča najbolj primerna metoda z odparevanjem topila, kjer poteka odparevanje 40' pri temperaturi 40 °C. Spreminjali smo naslednje parametre:

- začetno temperaturo polimerne zmesi,
- količino učinkovine in polimera oz. njuno razmerje,
- vrsto ogrodnega polimera,
- vrsto in količino topila,
- hitrost vrtenja električnega mešala,
- količino dodanega drsila.

5.1 Raztapljanje in količina zdravilne učinkovine

– Raztapljanje zdravilne učinkovine

V osnovni recepturi, iz katere smo izhajali (25), je bila predpisana vsebnost učinkovine 0,5 g. Prvi poskusni seriji (K1 in K2) smo izdelali z enako recepturo, po opisanem tehnološkem postopku (povzeto po magistrski nalogi Ane Preglav (25)), le da smo v seriji K2 najprej raztopili zdravilno učinkovino v zmesi topila in polimera, ter šele nato dodali mukoadhezivni polimer hitosan; pri K1 pa smo hkrati dodali učinkovino in hitosan.

V magistrski nalogi (25) zdravilne učinkovine niso predhodno raztapljali, pač pa so v raztopljeno zmes ogrodnega polimera hkrati dodali mukoadhezivni polimer hitosan in učinkovino. Z elektronskim mikroskopom je bilo ugotovljeno, da se učinkovina ne vgrajuje zadostno v notranjost mikrosfer, temveč ostaja v veliki meri na površini. Zato smo

že v začetku tehnološki postopek nekoliko modificirali in učinkovino predhodno raztapljali z namenom, da preprečimo zadrževanje le-te na površini ter jo poskusimo vgraditi v notranjost.

Slika 21 prikazuje strukturo in površino mikrosfere serije K46, ki smo jo posneli z elektronskim mikroskopom pri 850x povečavi. Površino mikrosfere sestavljajo drobni kristali tako polimera kot učinkovine, vendar pa nam je glede na rezultate predhodne magistrske naloge (25) uspelo zmanjšati velikost in količino kristalov učinkovine na površini mikrosfer. Sklepamo, da je to posledica modificiranja tehnološkega postopka, saj smo učinkovino najprej raztopili v polimerni zmesi in šele nato dodali hitosan.

– Količina zdravilne učinkovine

Po izdelavi prve serije mikrosfer smo opazili, da je zmes polimerov in zdravilne učinkovine zelo gosta in so posledično pri prenosu iz ene steklovine v drugo velike izgube. Razmerje med količino zdravilne učinkovine in celotne zmesi je bilo v našem primeru visoko. Glede na literaturni podatek o terapevtski koncentraciji ciprofloksacina smo preračunali potrebno količino učinkovine. Ugotovili smo, da 0,1 g učinkovine zadošča za doseganje terapevtskih koncentracij ciprofloksacina v urinu, zato smo v vseh nadaljnjih serijah uporabili manjšo količino ciprofloksacina.

5.2 Vpliv volumna in vrste topila

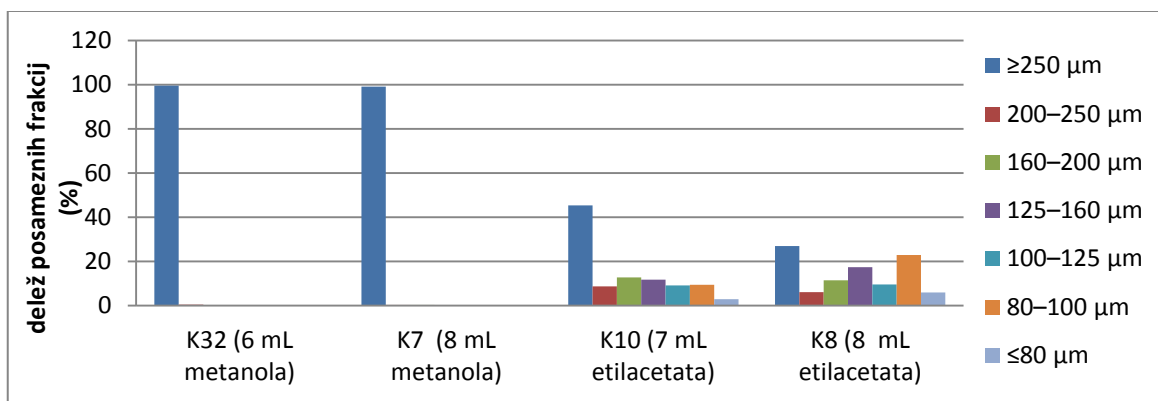
Že v preliminarnih serijah smo poskusili izdelati nekaj serij z različnimi volumni in vrstami topil, in sicer smo uporabili aceton, metanol, absolutni etanol ali etilacetat.

– Vpliv volumna topila na velikost mikrosfer

Vpliv spremembe volumna topila pri preliminarnih serijah (K32 in K7 ter K8 in K10) lahko ovrednotimo iz rezultatov sejalne analize (vsebnosti in sproščanja preliminarnih serij nismo izvajali). Na grafu 3 je prikazan vpliv spremembe volumna topila na velikost nastalih mikrosfer. Primerljivi seriji sta K32 in K7, kjer smo spreminjali volumen metanola ter seriji K10 in K8, kjer smo spreminjali volumen etilacetata.

Pri večji količini etilacetata so nastali nekoliko manjši delci, posledično je višji delež uporabne frakcije, zaradi redkejšje zmesi so manjše izgube in boljši izkoristki. To je

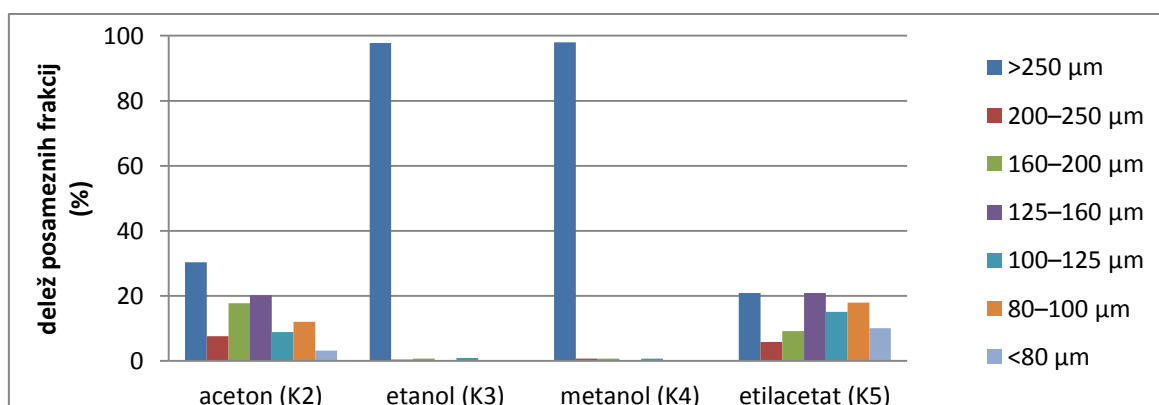
verjetno posledica tega, da se pri gostejši zmesi delci bolj prijemajo skupaj, temu pa bi se vsaj deloma lahko izognili z uporabo večje hitrosti mešanja. Pri metanolnih mikrosferah so, kljub spremembi volumna topila, nastale zelo velike mikrosfere.



Graf 3: Vpliv volumna topila na velikost mikrosfer.

– Vpliv vrste topila na velikost mikrosfer

Sejalna analiza mikrosfer iz preliminarnih poskusov je pokazala, da topilo močno vpliva na velikost nastalih mikrosfer. V preliminarnih poskusih smo izdelali štiri serije mikrosfer (K2, K3, K4, K5) po enakem postopku in enaki recepturi, razlikujejo se le v vrsti topila. Na grafu 4, ki prikazuje vpliv vrste topila na velikost nastalih mikrosfer, je razvidno, da so največje mikrosfere etanolne in metanolne, kjer delež večjih od 250 μm zajema kar 98 %. Tem sledijo mikrosfere izdelane z acetonom, kjer je delež večjih od 250 μm približno 30 %, pri etilacetatu pa dobrih 20 %. Na podlagi rezultatov sejalne analize smo se odločili, da poskusimo optimizirati mikrosfere narejene z acetonom, metanolom in etilacetatom, kljub temu, da sta metanol in etanol dajala primerljive rezultate.

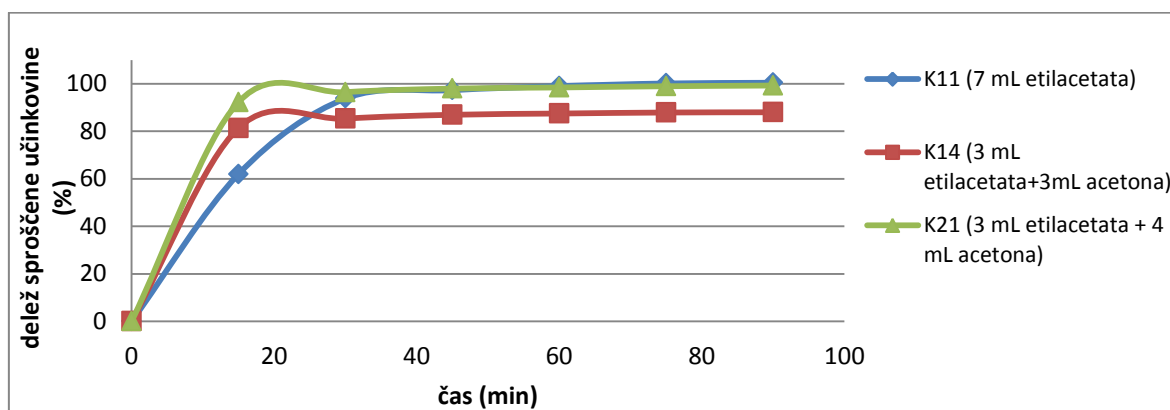


Graf 4: Vpliv vrste topila na velikost mikrosfer. V vseh primerih je bil volumen topila 6 mL.

Mikrosfere, izdelane z acetonom, so po velikosti dajale optimalne rezultate. Tehnološki postopek in pogoji, ki smo jih uporabili za izdelavo mikrosfer (temperatura in čas odparevanja topila), so bili namreč razviti na sistemu, kjer so kot topilo uporabili aceton. Na podlagi tega sklepamo, da pogoji morda niso ustrezni za pripravo etanolnih in metanolnih mikrosfer in bi bilo smiselno spremeniti pripravljano temperaturo, čas odparevanja topila ali obrate. V literaturi (26) smo zasledili kar nekaj raziskav, kjer so izdelali metanolne in etanolne mikrosfere. V enem izmed člankov so pripravili mikrosfere z nitrendipinom z metodo odparevanja topila, kjer so kot topilo uporabili etanol. Pogoji tehnološkega postopka so bili nekoliko drugačni – hitrost mešanja 2000 obratov/min, temperatura 38 °C, čas odparevanja pa 5 ur. Izdelane mikrosfere so bile manjše od 50 µm. Žal takšnih pogojev pri našem delu nismo mogli uporabiti, saj smo bili v tehnološkem postopku omejeni s hitrostjo mešanja električnega mešala na 1250 obratov/minuto.

– Vpliv vrste topila na sproščanje učinkovine

Pri sproščanju smo opazili, da je bilo pogosto močenje mikrosfer narejenih z etilacetatom precej počasnejše kot pri acetonu. Ker smo menili, da je vzrok temu ravno izbira topila, smo se odločili, da naredimo seriji (K14, K21), ki bosta vsebovali tako aceton kot etilacetat v različnih razmerjih ter primerjamo delež sproščene učinkovine s serijo, ki vsebuje le etilacetat (K11). Razmerje med učinkovino in polimerom je bilo v vseh treh serijah (K11, K14 in K21) enako. Na grafu 5 je razvidno, da se je v prvih 15-ih minutah pri seriji K11 sprostil 62 % učinkovine, pri K14 81 %, pri K21 pa 92 %, v nadaljevanju pa je bilo sproščanje v vseh treh serijah primerljivo. Iz podanih rezultatov sklepamo, da aceton izboljša močenje mikrosfer ter posledično v začetku pospeši sproščanje.



Graf 5: Vpliv vrste topila na delež sproščene učinkovine.

– Vpliv vrste topila na izgled mikrosfer

Pri pregledu mikrosfer s svetlobnim in elektronskim mikroskopom (sliki 17 in 18) smo opazili, da mikrosfere, narejene z etilacetatom, niso imele sferične oblike, pač pa so bile na izgled precej »igličaste«. Obliko smo v nadaljevanju poskusili izboljšati z dodatkom drsila (Mg-stearata), vendar kljub temu oblike mikrosfer nismo uspeli popraviti, zato smo nadaljnjo izdelavo mikrosfer z etilacetatom tudi opustili. Mikrosfere izdelane z acetonom so bile po pričakovanjih sferične in pravilne oblike. Tudi metanolne in etanolne mikrosfere po obliki niso izstopale.

5.3 Vpliv zdravilne učinkovine na velikost metanolnih mikrosfer

Velikostni razred etanolnih in metanolnih mikrosfer je skoraj pri vseh serijah, ne glede na spremembo pogojev tehnološkega postopka, vsaj v 90 % presegal velikost 250 μm . Glede na to, da smo pri acetonskih mikrosferah z variacijo pogojev in recepture skoraj pri vseh serijah uspeli narediti ustrezne mikrosfere s stališča velikosti, smo se želeli prepričati o vplivu učinkovine na velikost nastalih metanolnih mikrosfer. V ta namen smo izdelali seriji K35 in K37, kjer slednja ni vsebovala zdravilne učinkovine. Pri seriji K35 je bilo 99 % mikrosfer večjih od 315 μm , pri K37 pa 90 %. Tudi z mikroskopom (slika 16) je razvidna enormna velikost in nesferičnost mikrosfer serije K35. Serije K37 z mikroskopom nismo pogledali, vendar sta bili obe seriji tako po obliki kot velikosti precej podobni.

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da učinkovina nima bistvenega vpliva na enormno velikost metanolnih mikrosfer, pač pa so razlogi verjetno v samem topilu in neustreznem tehnološkem postopku za omenjeno topilo.

5.4 Sproščanje etilacetatnih mikrosfer

Pri sproščanju etilacetatnih mikrosfer smo ugotovili, da način dodajanja vzorca na začetku poskusa sproščanja zelo vpliva na delež sproščene učinkovine. V začetnih serijah smo sproščanje mikrosfer izvajali tako, da smo natehtani vzorec s tehtalnega čolnička stresali v posodo s pufrom. Iz rezultatov prvih serij sproščanja smo ugotovili, da se v prvih 15-ih minutah sprosti le dobrih 20 %, po 30-ih minutah pa že 60–70 %. Glede na to, da so etilacetatne mikrosfere precej manj sipke, smo sklepali, da v začetku potrebujejo več časa

za omočitev in posledično sproščanje učinkovine. V ta namen smo serijo K18 sproščali tako, da smo dve paralelki vsuli direktno v pufer, drugi dve pa predhodno suspendirali in nato sproščali. Pri predhodno suspendiranih mikrosferah se je v prvih 15-ih minutah sprostil 83 % učinkovine, pri vsutih v pufer pa 41 %. Glede na to, da se pri *in vivo* študijah naredi najprej suspenzijo mikrosfer in le-to nato aplicira preko katetra v sečni mehur mišk, bi bili rezultati sproščanja brez predhodnega suspendiranja mikrosfer precej nerealni.

V začetku smo poskusili s suspendiranjem vzorca tik pred sproščanjem, vendar smo imeli težave s kvantitativnim prenosom učinkovine ter lepljenjem le-te na stene epruvete. Zato smo v nadaljevanju način dodajanja vzorca v pufer še nekoliko modificirali za vse nadaljnje serije, in sicer smo pred začetkom sproščanja veslo dvignili do gladine vode, mikrosfere vsuli v pufer in po približno treh sekundah spustili veslo do dna posode. Rezultati sproščanja so bili po tem postopku precej bolj realni.

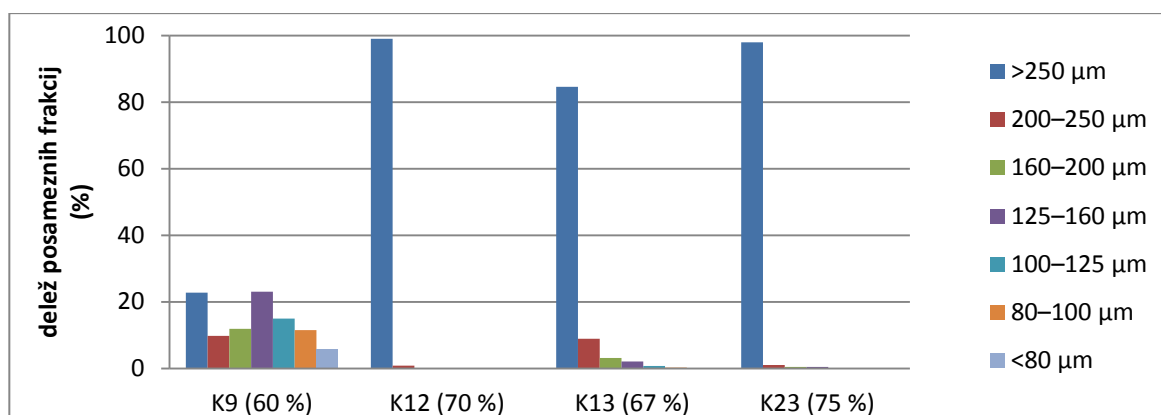
5.5 Vpliv količine in vrste polimera

Mikrosfere smo poskusili optimizirati z dodajanjem različne količine ogrodnega polimera, in sicer smo v začetnih serijah ohranjali maso vseh uporabljenih polimerov (ogrodni in mukoadhezivni polimer), ki je znašala 2,3 g, znotraj le-te pa spreminjali delež ogrodnega ali mukoadhezivnega polimera. Od serije K36 dalje smo spremenili tudi skupno vsoto polimerov, in sicer smo jo zmanjšali na 1,5 g. Kot ogrodni polimer smo uporabili več različnih vrst Eudragit®-ov, in sicer Eudragit®RS, Eudragit®RL ali Eudragit®E100.

– Vpliv količine ogrodnega polimera na velikost mikrosfer

Seriji K9 in K12 smo izdelali po enaki recepturi in postopku, le da je pri seriji K9 količina ogrodnega polimera (Eudragit®RL) znašala dobrih 60 %, pri K12 pa 70 %. Skupna vsota ogrodnega polimera in mukoadhezivnega hitosana je bila pri obeh serijah 2,3 g.

Rezultati sejalne analize so pokazali, da večja količina ogrodnega polimera poveča velikost nastalih mikrosfer. Delež mikrosfer večjih od 250 μm je znašal pri seriji K9 slabih 23 %, pri seriji K12 pa kar 99 %. Iz grafa 6 je razvidno, da lahko podobno primerjavo opazimo tudi pri serijah K13 in K23, kjer je slednja vsebovala večjo količino ogrodnega polimera (Eudragit®RL) in posledično so nastale mikrosfere z večjim povprečnim premerom.



Graf 6: Vpliv količine polimera na velikost mikrosfer. Vse serije so izdelane z acetonom, v oklepaju pa je naveden delež ogrodnega polimera Eudragita®, glede na maso celotne zmesi.

Razlog za takšen vpliv na velikost ni večja količina polimerne zmesi (ogrodnega in mukoadhezivnega), saj skupna količina polimerov ostaja enaka, prav tako ostaja enaka skupna masa vseh uporabljenih vhodnih snovi. Pomembna razlika, ki je verjetno vplivala na rezultate, je razmerje med uporabljenim ogrodnim polimerom (Eudragit®RL) ter mukoadhezivnim hitosanom. Pri serijah K13 in K23 opazimo, da prehod iz 67 % ogrodnega polimera na 75 % ne odraža tako velikih sprememb v velikosti, kot je to možno opaziti pri K9 in K12, kjer smo prešli iz 60 % ogrodnega polimera na 70 %. Očitno je, da vsebnost ogrodnega polimera do 70 % bistveno vpliva na velikost mikrosfer, nad to vrednostjo pa povečanje deleža ogrodnega polimera nima več bistvenega vpliva na velikost mikrosfer.

V raziskavi (26), kjer so izdelali ter ovrednotili mikrosfere z Eudragitom® kot ogrodnim polimerom, so navajali, da razmerje med učinkovino in ogrodnim polimerom pomembno vpliva tako na velikost kot na sferično obliko mikrosfer. Večja količina ogrodnega polimera prispeva k večji viskoznosti disperzije, oblikujejo se večje kapljice in posledično tudi mikrosfere. Naši rezultati so skladni s temi ugotovitvami.

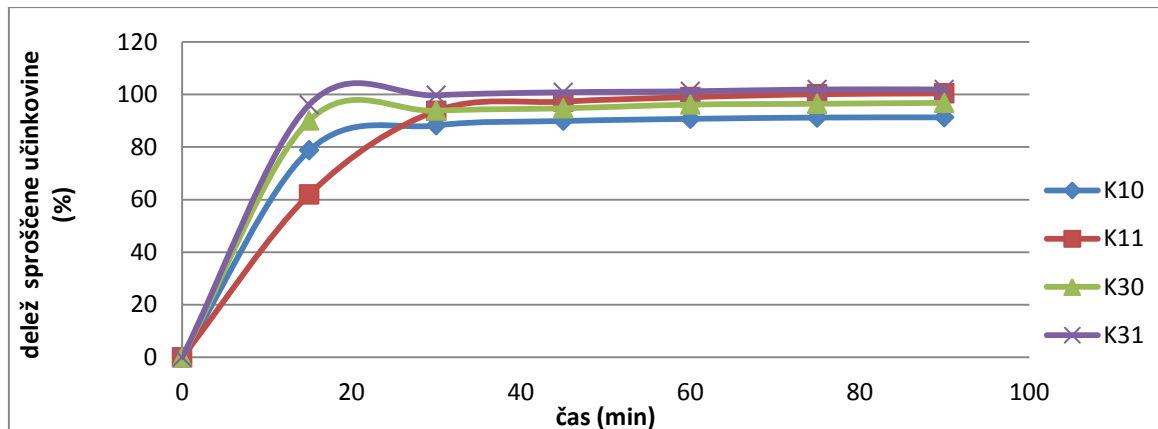
V kolikor je razmerje med ogrodnim polimerom in učinkovino prenizko (npr. 1:1), ne dosežemo sferične oblike, ne glede na hitrost mešanja in vrsto ogrodnega polimera, katerega količina močno vpliva na viskoznost notranje faze. Po drugi strani, pa je potrebno glede na uporabljeno količino ogrodnega polimera in posledično viskoznosti snovi, prilagoditi hitrost mešanja. V kolikor je razmerje med polimerom in učinkovino višje, je potrebno povečati tudi hitrost mešanja, saj se sicer notranja faza ne dispergira v zunanjo in nastanejo mikrosfere nepravilnih oblik (27).

– Vpliv količine ogrodnega polimera na sproščanje učinkovine

Pri seriji K30 je razmerje med Eudragitom®RL in hitosanom 67 %/29 %; pri K31 pa 70 %/25 %. Iz grafa 7 je razvidno, da je bilo sproščanje pri seriji K30 nekoliko upočasnjeno, in sicer se je v prvih 15-ih minutah sprostil 90,13 % učinkovine, pri seriji K31 pa 96,12 %.

Enako primerjavo lahko naredimo tudi pri serijah K10 in K11, ki sta izdelani z etilacetatom. Pri seriji K10 je razmerje med Eudragitom®RL in hitosanom 58 %/38 %; pri K11 pa 67 %/29 %. V prvih 15-ih minutah se pri seriji K11 sprosti nekoliko manj učinkovine kot pri K10, vendar pa se po koncu 90-ih minut iz K10 sprosti manj učinkovine kot iz K11.

Kot smo že predhodno omenili, je sproščanje etilacetatnih mikrosfer v začetku nekoliko upočasnjeno, saj potrebujejo nekaj časa za omočitev. Menimo, da so relevantnejši podatki sproščanja po 15. minuti in od tu dalje dejansko opazimo značilen trend sproščanja, ki nam nakazuje, da večji delež hitosana med polimeri vpliva na nekoliko upočasnjeno sproščanje. Podobne ugotovitve navajajo v preglednem članku iz leta 2004 (28), kjer so zapisali, da višja koncentracija hitosana upočasni sproščanje učinkovine.



Graf 7: Vpliv koncentracije polimera na delež sproščene učinkovine.

V literaturi (27) smo zasledili podatek, da naj bi celokupna večja količina polimera vgrajenega v mikrosfere prispevala k podaljšanemu sproščanju, vendar te ugotovitve z zgoraj navedenimi rezultati ne moremo vrednotiti, saj je bila celokupna količina polimera pri primerjalnih serijah ves čas enaka, spreminjali smo le razmerje med Eudragit® polimerom in hitosanom.

– Vpliv vrste ogrodnega polimera na velikost mikrosfer

Kot ogrodni polimer smo uporabili več vrst Eudragit®-ov, in sicer RS, RL ali E. Bistveni podatek pri uporabi različnih Eudragitov® je pH vrednost nad oz. do katere so topni. Za uporabo Eudragitov®RS, RL smo se odločili predvsem na podlagi naslednjih karakteristik: netopnost, nabrekanje neodvisno od pH vrednosti (širok razpon pH vrednosti urina, od 4 do 8), visoka permeabilnost, matriks struktura.

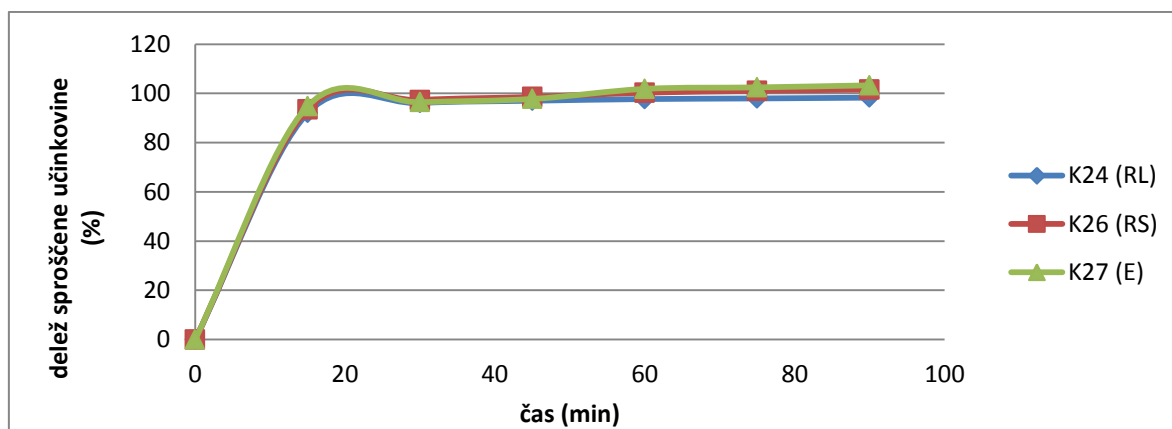
Serije K24, K26 in K27 so bile izdelane po enakem tehnološkem postopku, masna razmerja med sestavinami so bila enaka, razlikovale so se le v vrsti ogrodnega polimera. Kljub temu, pri pregledu rezultatov sejalne analize, nismo ugotovili bistvenega vpliva vrste ogrodnega polimera na velikost nastalih mikrosfer. Delež mikrosfer večjih od 250 µm se je gibal med 30–40 %, delež uporabne frakcije pa je znašal okrog 50 %.

Sklepamo, da uporabljeni Eudragiti® ne vplivajo pomembneje na samo velikost mikrosfer.

– Vpliv vrste ogrodnega polimera na sproščanje učinkovine

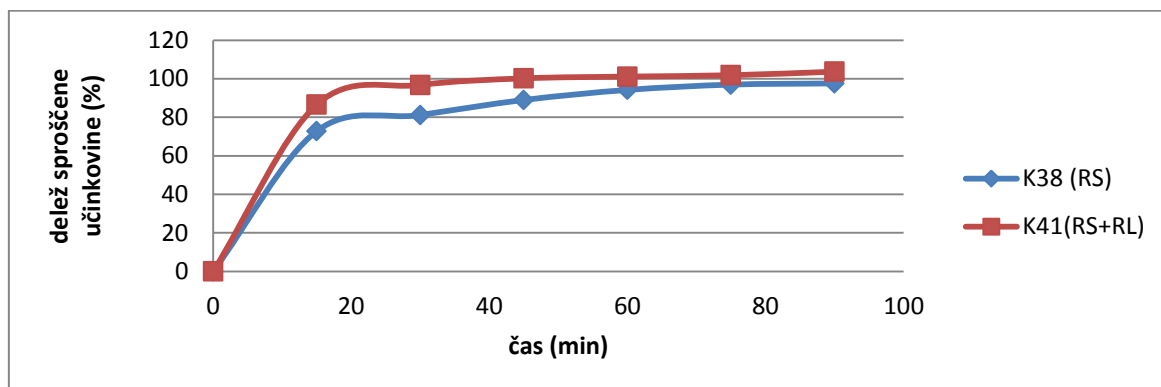
Primerjava serij K24, K26 in K27 nam natančneje prikaže vpliv vrste ogrodnega polimera na sproščanje učinkovine. Eudragit®RL in Eudragit®RS se uporabljata predvsem pri oblikah s prirejenim sproščanjem, saj sta netopna in nabrekata neodvisno od pH vrednosti, medtem ko je Eudragit®E100 topen do vrednosti pH 5, nad to vrednostjo pa nabreka.

Pri serijah K24, K26 in K27 smo spreminjali le vrsto ogrodnega polimera, in sicer K24 vsebuje Eudragita®RL, K26 Eudragit®RS, K27 pa Eudragit®E100. Iz rezultatov sproščanja učinkovine, ki so prikazani na grafu 8, je razvidno, da vrsta polimera ni imela bistvenega vpliva na hitrost sproščanja, saj se je pri seriji K24 v prvih 15-ih minutah sprostil 92 % učinkovine, pri K26 93 %, pri K27 pa 95 %.



Graf 8: Vpliv vrste polimera na delež sproščene učinkovine.

Ker smo želeli ugotoviti, ali bi morebitna kombinacija Eudragita®RL in Eudragita®RS vplivala na rezultate, smo pri seriji K41 dodali enaka deleža obeh polimerov. Primerjava rezultatov serije K41 in K38 (graf 9), kjer slednja vsebuje le polimer RS, je pokazala, da prisotnost polimera RL rahlo pospeši sproščanje. V prvih 15-ih minutah se je namreč iz serije K41 sprostilo 87 % učinkovine, iz K38 pa 73 %. Glede na rezultate smo se odločili, da v nadaljevanju uporabimo le Eudragit®RS, saj si želimo čim bolj upočasnjeno sproščanje.



Graf 9: Vpliv Eudragita® RL na delež sproščene učinkovine.

V študiji (27), kjer so izdelali mikrosfere z Eudragitom®RL in RS ter acetazolamidom kot učinkovino, so med drugim preučevali tudi vpliv vrste Eudragita® na sproščanja učinkovine. Ugotovili so, da je bila količina sproščene učinkovine iz mikrosfer izdelanih z Eudragitom®RL precej večja kot pri Eudragitu®RS. Da bi potrdili slednjo ugotovitev, so izdelali še mikrosfere s kombinacijo RL in RS oblike. Prišli so do podobne ugotovitve, sproščanje je bilo nekoliko pospešeno glede na mikrosfere, ki so vsebovale le RS obliko, vseeno pa upočasnjeno glede na mikrosfere z le RL obliko.

Naši rezultati sproščanja serij K24 in 26 (vsebudeta le RS ali RL polimer) žal ne izkazujejo nazorne razlike v deležu sproščene učinkovine, vzrok temu bi lahko bila prisotnost mukoadhezivnega hitosana. Pri nadaljnji študiji, kjer smo ugotavljali vpliv RL oblike na RS, v kolikor polimera kombiniramo, pa smo ugotovitev potrdili.

Razlog, zakaj je sproščanje iz RL oblike hitrejše, je verjetno v tem, da Eudragit®RL vsebuje več kvarternih amonijevih skupin in je zato bolj prepusten za vodo ter posledično manj zadržuje sproščanje učinkovine.

Pri seriji izdelani z Eudragitom®E100 se je skoraj vsa učinkovina sprostila že v prvih 15-ih minutah. Eudragit®E100 je topen do vrednosti pH 5, nad to vrednostjo pa nabreka.

5.6 Vpliv Mg-stearata

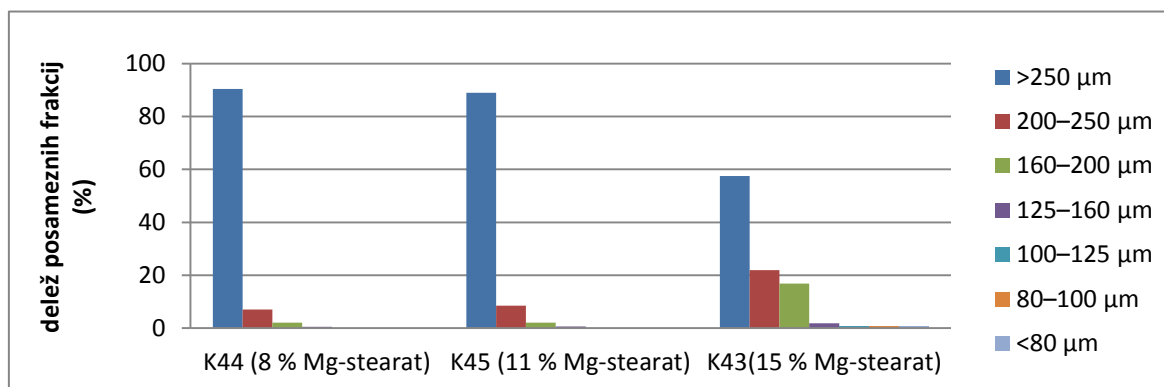
V preliminarinih ter začetnih serijah izdelave mikrosfer Mg-stearata nismo dodajali, saj smo želeli mikrosfere prvotno kar najbolje optimizirati le s spreminjanjem osnovne sestave ter tehnoloških pogojev. Razlog je predvsem v tem, da bi lahko prevelika vsebnost Mg-stearata zmanjšala mukoadhezivne lastnosti hitosana. Ker z velikostjo in obliko preliminarinih ter začetnih serij mikrosfer nismo bili najbolj zadovoljni, smo v nadaljnjih serijah dodajali različne količine Mg-stearata ter pri tem spremljali njegov vpliv na velikost, obliko in sproščanje.

– Vpliv količine Mg-stearata na velikost mikrosfer

V serijah K43, 44 in 45 smo spreminjali vsebnost Mg-stearata, in sicer vsebuje K43 15 %; K44 8 %; K45 pa 11 % Mg-stearata. Rezultati sejalne analize so prikazani na grafu 10, kjer opazimo, da večja kot je vsebnost Mg-stearata, manjši je povprečni premer mikrosfer. Pri seriji K44 je znašal delež večjih od 250 μm 90,4 %, pri K45 88,96 %, pri K43 pa le 57,5 %. Iz slike 12, kjer sta seriji K43 in K44 pod stereo mikroskopom, je lepo razvidno, da so mikrosfere serije K44 nekoliko večje in manj sferične.

Tudi seriji K46 in K48 se razlikujeta v vsebnosti Mg-stearata (K46 vsebuje 11 %; K48 pa 16 %), vendar pri primerjavi posnetkov s stereo mikroskopom slik 13 in 14 ni opaziti bistvene razlike v obliki in velikosti mikrosfer. Pri natančnejšem pregledu vzorcev z elektronskim mikroskopom pa je na slikah 19 in 20 razvidno, da so mikrosfere serije K46 sferične ter enakomerne oblike in velikosti.

Na sliki 24, kjer je prikazan posnetek serije K50, ki vsebuje manj Mg-stearata kot K48, lahko opazimo, da so mikrosfere nekoliko manj sferične oblike. Povzamemo lahko, da večja vsebnost Mg-stearata zmanjša velikost mikrosfer in izboljša sferičnost.



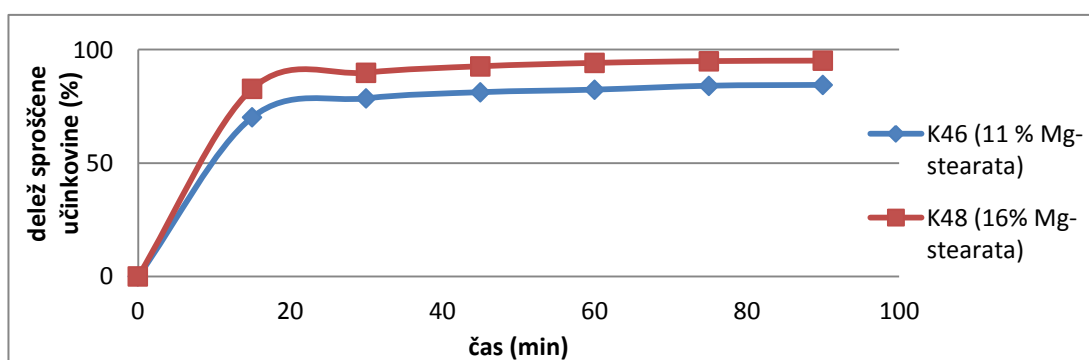
Graf 10: Vpliv deleža Mg-stearata v celotni zmesi na velikost mikrosfer.

Do podobnih ugotovitev so prišli tudi v raziskavi (29), kjer so izdelali več serij mikrosfer z ibuprofenom z različno vsebnostjo Mg-stearata. Večji kot je bil delež vsebnosti Mg-stearata, manjše so bile mikrosfere.

Navedene ugotovitve v literaturi (30) najpogosteje razlagajo z mehanizmom delovanja Mg-stearata. Le-ta se adsorbira na površino kapljic topila, zmanjša medfazno napetost ter stabilizira kapljice. Več kot je Mg-stearata, manjše so kapljice in posledično tudi nastale mikrosfere.

– Vpliv količine Mg-stearata na sproščanje učinkovine

Seriji K46 in K48 se razlikujeta le v vsebnosti Mg-stearata, in sicer K46 vsebuje 11 %, K48 pa 16 %. Rezultati sproščanja so pokazali, da količina Mg-stearata vpliva na hitrost sproščanja učinkovine predvsem na začetku sproščanja, saj se je pri seriji K46 v prvih 15-minutah sprostil približno 70 % učinkovine, pri K48 pa 83 %. Iz grafa 11 je razvidno, da je bila v nadaljevanju hitrost sproščanja učinkovine podobna, vendar se je pri seriji z večjo vsebnostjo Mg-stearata (K48) v enakem časovnem intervalu sprostil več zdravilne učinkovine.



Graf 11: Vpliv Mg-stearata na delež sproščene učinkovine.

Enako primerjavo lahko naredimo tudi med serijama K49 in 50, kjer prva vsebuje 16 % Mg-stearata, druga pa 11 %. Iz rezultatov sproščanja vidimo, da je bilo do 45. minute pri seriji K49, ki je vsebovala več Mg-stearata, sproščanje nekoliko upočasnjeno, po tem času pa se je do konca sprostila večja količina učinkovine kot pri seriji K50. Kljub temu lahko v grobem povzamemo, da večja količina Mg-stearata pospeši sproščanje učinkovine.

Iz rezultatov sproščanja ter pregleda mikrosfer s stereo mikroskopom sklepamo, da Mg-stearat vpliva na obliko in strukturo nastalih mikrosfer. Glede na to, da so bile mikrosfere,

ki so vsebovale večjo količino Mg-stearata bolj sferične in gladke, bi lahko pričakovali, da bodo razpadale postopoma in posledično upočasnile sproščanje učinkovine.

Po drugi strani pa večja količina Mg-stearata vpliva na nastanek manjših mikrosfer z večjo specifično površino in posledično hitrejšim sproščanjem učinkovine (30).

Glede na navedene ugotovitve sklepamo, da je določena količina Mg-stearata potrebna za ustrezno velikost in obliko mikrosfer, prevelika vsebnost pa pospeši sproščanje učinkovine.

– Vpliv Mg-stearata na vsebnost učinkovine

Iz rezultatov serij K46 in K48 ter K49 in K50 lahko povzamemo, da višja količina Mg-stearata zmanjša vsebnost učinkovine, saj je bila tako pri K46 kot K50, ki sta vsebovali 11 % Mg-stearata, le-ta višja kot pri K48 in K49, ki sta vsebovali 16 % Mg-stearata.

Kot že zgoraj navedeno, pri višji vsebnosti Mg-stearata nastanejo manjši delci. Prav na osnovi tega bi lahko sklepali, da bo vsebnost učinkovine nižja, saj v literaturnih podatkih (31) zasledimo, da z naraščanjem velikosti mikrosfer, narašča tudi vsebnost učinkovine, kar je v skladu z našimi rezultati.

V literaturi (29) smo zasledili tudi drugačne ugotovitve, kjer so navajali, da višja vsebnost Mg-stearata poveča vsebnost učinkovine. Večje mikrosfere imajo namreč manjšo specifično površino, posledično pa naj bi manjša količina učinkovine prehajala v tekoči parafin.

5.7 Vpliv začetne temperature

V tehnološkem postopku smo spreminjali tudi začetno temperaturo kopeli, pri kateri smo raztapljali polimerno zmes, ki je bila v osnovnem tehnološkem postopku 5 °C. V nekaterih poskusih smo izdelali mikrosfere z etilacetatom in acetonom pri začetni temperaturi 10 in 15 °C.

– Vpliv začetne temperature na velikost mikrosfer

Primerjava acetonskih serij K24, 25 in 29, pri katerih smo začetno temperaturo vodne kopeli stopnjevali od 5 do 15 °C, kaže, da višja začetna temperatura nima tako bistvenega vpliva na velikost mikrosfer. Delež mikrosfer večjih od 250 µm je pri seriji K24, kjer je bila začetna temperatura 5 °C, znašal približno 40 %, pri K25 z začetno temperaturo 10 °C 41 %, pri K29 s temperaturo 15 °C pa 55 %. Tudi z etilacetatom smo izdelali tri serije

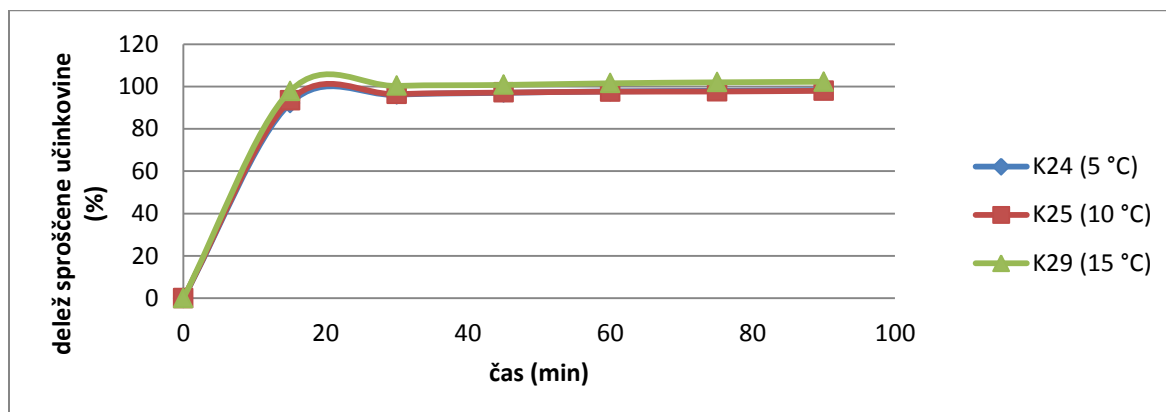
mikrosfer, K15, 16 in 17, vendar je iz mikroskopskih posnetkov slik 19 in 20 razvidno, da tudi s spremembo tega parametra nismo uspeli izboljšati izgleda le-teh, pač pa še vedno ostajajo »igličaste«. Glede na to, da ne dosežemo sferične oblike, ne moremo govoriti o vplivu temperature na velikost mikrosfer.

V eni izmed raziskav (32) so vrednotili vpliv pripravljalne temperature na mikrosfere izdelane z Eudragitom®RS. V raziskavi so, za razliko od nas, mikrosfere pripravljali ves čas postopka pri enaki temperaturi (10, 25, 35 ali 40 °C). Prišli so do zaključkov, da pri višji pripravljalni temperaturi nastanejo večje mikrosfere. Pri višji temperaturi je manjša viskoznost in hitrejša odparevanje topila, posledično pa se kapljice emulzije hitreje strjujejo in združujejo v večje delce.

Naši rezultati so sicer v osnovi skladni s temi ugotovitvami in razlago, vendar vpliv temperature na velikost ni bil tako zelo izrazit oz. celo zanemarljiv. Verjetno zato, ker smo spreminjali le začetno temperaturo, končna pripravljalna temperatura, pri kateri poteka evaporacija naslednjih 40 minut, pa je bila vedno 40 °C.

– Vpliv začetne temperature na sproščanje učinkovine

Vpliv temperature na sproščanje učinkovine je prikazan na grafu 12, kjer je razvidno, da ni bistvenih razlik pri sproščanju med serijami K24, 25 in 29 (mikrosfere z acetonom). Malenkost pospešeno sproščanje je opaziti pri seriji K29, vendar povsem nesignifikantno.



Graf 12: Vpliv začetne temperature na delež sproščene učinkovine.

Glede na rezultate iz poglavja »Vpliv začetne temperature na velikost mikrosfer«, kjer smo ugotovili, da višja začetna temperatura vpliva na povečanje povprečnega premera mikrosfer, bi pričakovali, da bo sproščanje iz serije K29 zaradi večje velikosti delcev najpočasnejše. V našem primeru rezultati ne sledijo temu logičnemu zaključku, pač pa razlike v sproščanju učinkovine med posameznimi serijami skorajda niso opazne. Vpliv

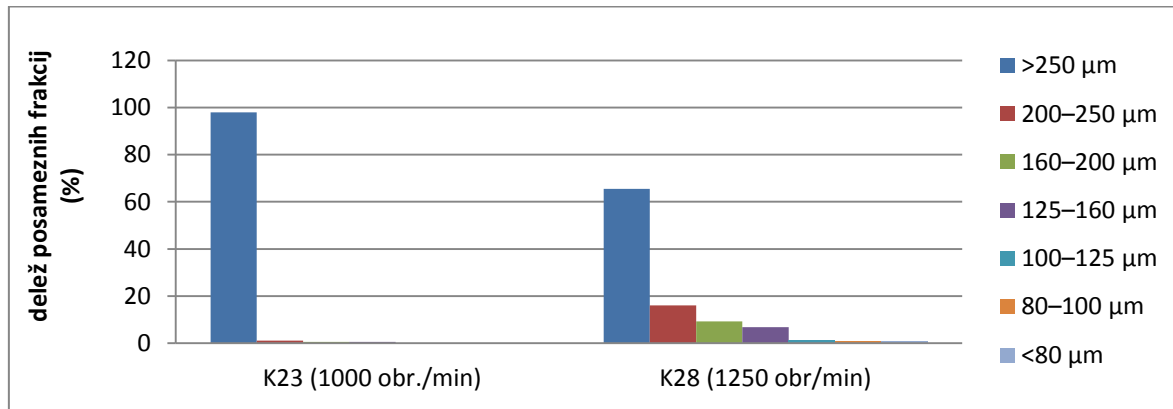
spremembe temperature ni bil tako zelo izrazit in tudi rezultati sejalne analize so med primerjalnimi serijami precej podobni. Na podlagi tega sklepamo, da so posledično tudi rezultati sproščanja med serijami precej podobni.

5.8 Vpliv hitrosti mešanja

V osnovnem tehnološkem postopku je bila uporabljena stopnja mešanja 1000 obratov/min, v nadaljnjih modifikacijah pogojev pa smo pri nekaj serijah stopnjo mešanja povečali na 1250 obratov/min, kar je bila zgornja meja zmogljivosti uporabljenega električnega mešala. Ta sprememba je imela pomemben vpliv na velikost delcev, posledično pa je vplivalo tudi na sproščanje učinkovine.

– Vpliv hitrosti mešanja na velikost mikrosfer

Pri seriji K23 je bila hitrost mešanja 1000, pri K28 pa 1250 obratov/min. Kot pričakovano, je bil delež mikrosfer večjih od 250 μm pri seriji K23 precej višji, in sicer je znašal 98 %, pri K28 pa 65 %, kar je lepo razvidno iz grafa 13.

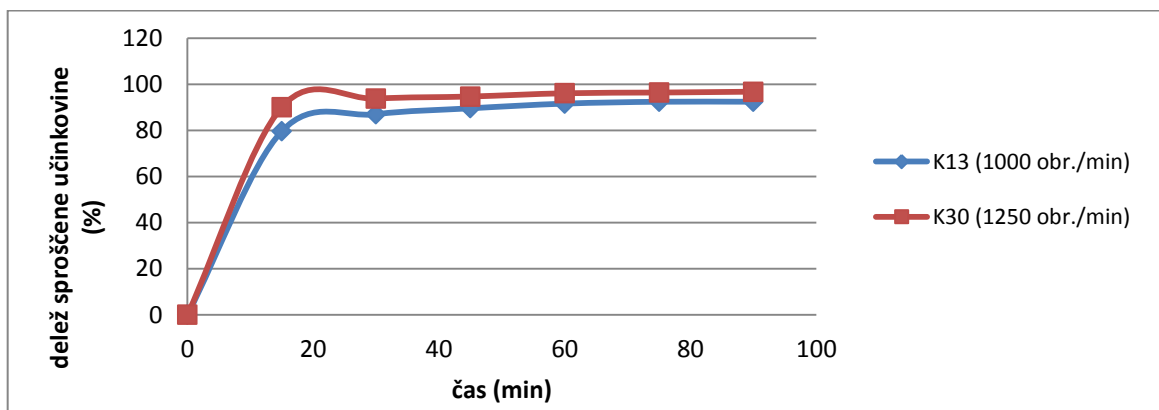


Graf 13: Vpliv hitrosti mešanja na rezultate sejalne analize.

Tudi v literaturi (29, 30, 32) smo zaznali enake rezultate in ugotovitve. Višja stopnja mešanja povzroči »drobljenje« zmesi. Večje število obratov vpliva na manjšo viskoznost zmesi in posledično lahko v večji meri nastanejo manjši delci.

– Vpliv hitrosti mešanja na sproščanje učinkovine

Rezultati sproščanja učinkovine serij K13 in K30, ki se razlikujeta v hitrosti mešanja, nakazujejo, da višja hitrost mešanja pospeši sproščanje učinkovine (graf 14). To je posledica tega, da povprečni premer mikrosfer z naraščanjem hitrosti mešanja pada, hitrost sproščanja učinkovine pa s tem narašča.



Graf 14: Vpliv hitrosti mešanja na delež sproščene učinkovine.

V študiji (31), ki so jo izvajali na naši fakulteti, so ugotavljali vpliv hitrosti mešanja na biofarmacevtske lastnosti mikrosfer, izdelanih z Eudragitom®RS. Rezultati so se sicer glede na našo študijo nekoliko razlikovali, vendar pa so navedli kar nekaj zanimivih ugotovitev. Hitrost sproščanja učinkovine je z naraščajočo velikostno frakcijo mikrosfer naraščala. Pri manjših mikrosferah načeloma pričakujemo višjo hitrost sproščanja, saj imajo delci večjo specifično površino. Toda avtorji navajajo, da so lahko večji delci bolj porozni in imajo posledično večjo efektivno specifično površino. Razliko v poroznosti razlagajo s samim mehanizmom nastanka mikrosfer. Domneva se, da je ekstrakcija topila iz večjih delcev manj homogena. Zaradi površinskega izhlapevanja se najprej strdi polimer na površini, medtem pa še vedno poteka ekstrakcija topila iz notranjosti, ki pa zaradi že nastale zunanje »ovojnice« ne more izhlapeti in posledično nastanejo pore. Po drugi strani pa navajajo, da so mikrosfere, narejene pri večji hitrosti mešanja, pogosto bolj porozne in temu primerno bi hitrost sproščanja z naraščajočo stopnjo mešanja morala naraščati.

Na podlagi rezultatov naše študije in literaturnih podatkov sklepamo, da hitrost mešanja pomembno vpliva na sproščanje učinkovine, kako bo vplivala, pa je odvisno predvsem od poroznosti ter velikosti nastalih delcev.

– Vpliv hitrosti mešanja na vsebnost učinkovine

Vsebnost učinkovine je bila v seriji K13 (1000 obr./min.) 102,8 %, v K30 (1250 obr./min.) pa 109,8 %. Če smo prav natančni je bila v seriji K30 vsebnost nekoliko višja in razlog temu je morda v tem, da višja hitrost mešanja pripomore k boljšemu raztapljanju zdravilne učinkovine in posledično boljšemu vgrajevanju v mikrosfere ter manjšim izgubam.

V zgoraj omenjeni študiji (31) so preučevali tudi vpliv hitrosti mešanja na vsebnost učinkovine. Rezultati so skladni z našimi ugotovitvami.

Zanimivo, da je vsebnost učinkovine naraščala tudi z velikostjo delcev znotraj iste serije. To so poskušali utemeljiti z difuzijo učinkovine iz notranje v zunanjo fazo emulzije med samo pripravo mikrosfer. Glede na to, da imajo manjši delci večjo specifično površino, bo difuzija učinkovine iz notranje v zunanjo fazo hitrejša, posledično se bo izgubilo več učinkovine, nastale pa bodo mikrosfere z nižjo vsebnostjo učinkovine (31).

5.9 Vpliv tehnološkega postopka

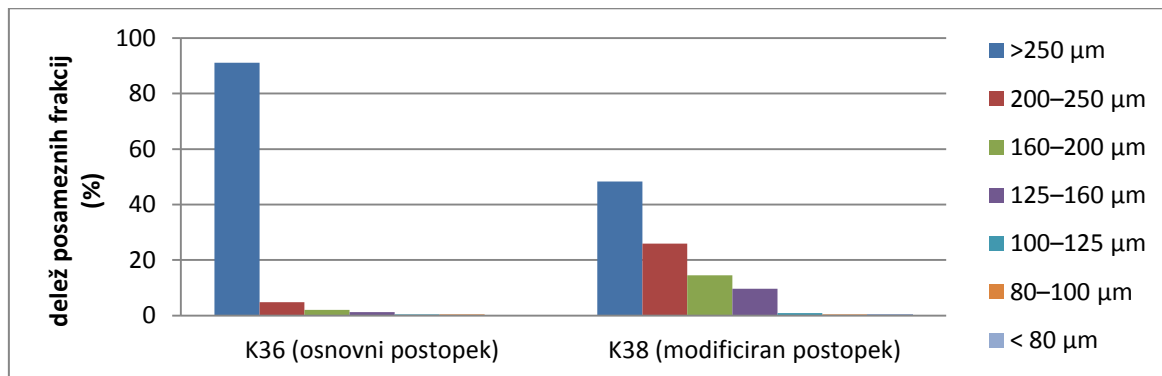
Do serije K38 smo mikrosfere izdelovali po osnovnem tehnološkem postopku, ki smo ga povzeli po doktoratu Matejke Burjak (25) oz. magistrski nalogi Ane Preglav (25). Ker do 38. serije nastale mikrosfere niso izkazovale želenih lastnosti, predvsem z vidika velikosti in sproščanja, smo se odločili tehnološki postopek nekoliko modificirati in prilagoditi postopku, ki so ga uporabili v eni izmed raziskav na Fakulteti za farmacijo (22). Kot učinkovino so sicer uporabili pipemidno kislino, vse ostale sestavine in razmerja pa so bila enaka.

Serijo K36 smo izdelali po osnovnem tehnološkem postopku, K38 pa po modificiranem, opisanem v članku Burjakove in sodelavcev (22). Bistvena razlika med obema postopkoma je v tem, da smo v osnovnem postopku polimer in ostale sestavine raztapljali pri sobni temperaturi (tekoči parafin pa smo ohlajali na vodni kopeli s temperaturo 5 °C), pri modificiranem postopku pa smo tudi polimer in ostale sestavine raztapljali pri temperaturi 5 °C. Dodatno smo pri modificiranem postopku Mg-stearat predhodno raztopili v topilu in šele nato dodali v polimerno zmes.

Vpliv tehnološkega postopka smo ovrednotili le s stališča velikosti oz. sejalne analize, saj serije K36 zaradi prevelike velikosti nastalih mikrosfer nadalje nismo sproščali (približno 96 % mikrosfer je bilo večjih od 200 µm).

– Vpliv tehnološkega postopka na velikost mikrosfer

Iz rezultatov sejalne analize serij K36 in K38 ugotovimo, da predhodno hlajena polimerna zmes vpliva na nastanek manjših mikrosfer. Iz grafa 15 je razvidno, da je delež mikrosfer večjih od 250 μm pri seriji K36 za približno 40 % večji kot pri K38.



Graf 15: Vpliv tehnološkega postopka na velikost mikrosfer.

Razlog za takšen vpliv je morda v preveliki temperaturni razliki, saj pri osnovnem postopku polimerno zmes prenesemo iz temperature 25 v 5 °C. Polimerna zmes se zaradi občutno nižje temperature tako ne vgradi enakomerno v parafin, pač pa se že v začetku oblikujejo večji delci. Pri modificiranem postopku preprečimo temperaturno razliko in s tem omogočimo enakomernejše oblikovanje delcev.

Iz rezultatov celotne raziskave lahko zaključimo, da so najbolj optimalne mikrosfere, tako s stališča velikosti in oblike kot sproščanja, serije K46. Z modifikacijo različnih parametrov nam je le deloma uspelo izboljšati lastnosti mikrosfer, za optimalnejše rezultate pa bi bilo v prihodnje morda smiselno razmisliti o zamenjavi tehnološkega postopka, pogojev in osnovnih komponent.

6 Sklep

Glede na rezultate eksperimentalnega dela ter njihovo obdelavo, smo prišli do naslednjih ugotovitev in zaključkov:

- Predhodno raztapljanje zdravilne učinkovine v polimerni zmesi je izboljšalo vgrajevanje učinkovine v mikrosfere in zmanjšalo tvorbo kristalov na površini mikrosfer.
- Najbolj primerno topilo za izdelavo hitosanskih mikrosfer s stališča oblike, velikosti in sproščanja je aceton. Ob uporabi etilacetata, ne glede na pogoje tehnološkega postopka, nastanejo »igličaste« in kristalinične mikrosfere. Metanol in etanol nista primerni topili s stališča velikosti mikrosfer.
- Vrsta ogrodnega polimera Eudragita® nima bistvenega vpliva na velikost mikrosfer. Eudragit®RS v primerjavi z Eudragitom®RL nekoliko upočasni sproščanje.

Količina ogrodnega polimera Eudragita® vpliva na velikost mikrosfer, in sicer je za optimalno velikost (do 200 μm) potrebno cca. 60 % ogrodnega polimera glede na celotno maso polimerne zmesi (ogrodni in mukoadhezivni polimer). Pri večji količini ogrodnega polimera nastanejo večje mikrosfere.

- Količina Mg-stearata vpliva na velikost in obliko mikrosfer, in sicer večja količina pripomore k nastanku manjših in bolj sferičnih mikrosfer. Mikrosfere, ki vsebujejo večjo količino Mg-stearata, izkazujejo pospešeno sproščanje in imajo manjšo vsebnost zdravilne učinkovine.
- Začetna temperatura tekočega parafina ni imela bistvenega vpliva na velikost mikrosfer in hitrost sproščanja zdravilne učinkovine.
- Z večjo hitrostjo mešanja polimerne zmesi nastanejo manjše mikrosfere, posledično pa je tudi sproščanje učinkovine pospešeno. Hitrost mešanja nima bistvenega vpliva na vsebnost učinkovine.
- Ohlajanje polimerne zmesi, kakor tudi tekočega parafina na vodni kopeli s temperaturo 5 °C, pripomore k nastanku manjših mikrosfer.
- Najbolj optimalne rezultate, tako s stališča velikosti in oblike kot hitrosti sproščanja, izkazuje serija K46.

7 Literatura

1. protimikrobna zdravila:

<http://www.mf.unilj.si/dokumenti/957b02a34d28fa7653072943b75db265.pdf>, dostopano dne 20. 12. 2012.

2. T. Kovačič: Vrednotenje alginatnih mikrosfer izdelanih z metodo ionotropnega geliranja, Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2009.

3. A. Mitra, B. Dey: Chitosan microspheres in novel drug delivery systems. Indian Journal of Pharmaceutical Science, 2011; 73(4): 355–366.

4. slika razgradnje mikrosfer:

<http://www.sigmaaldrich.com/materialsscience/biomaterials/tutorial.html>, dostopano dne 7. 1. 2013.

5. P. Singh, D. Prakash, N. Singh, T. Mani: Biodegradable polymeric microspheres as drug carriers. Indian Journal of Novel Drug Delivery, 2011; 3(2): 70–82.

6. Vaje iz Farmacevtske tehnologije 2, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2002; 20.

7. B. P. O' Donnell, W. J. McGinity: Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997; 28: 25–42.

8. C. P. Choedary, Y. S. Rao: Mucoadhesive microspheres for Controlled Drug Delivery. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2004; 27 (11): 1717–1724.

9. S. GuhaSarker, R. Banerjee: Intravesical drug delivery: Challenges, current status, oppourtunities and novel strategies. Journal of Controlled Release, 2010; 148: 147–159.

10. Formulation considerations in mucosal DDS:

<http://www.drshrutibhat.com/2/category/mucosal%20drug%20delivery%20systems/1.html>, dostopano dne 22. 4. 2013.

11. S. Freiberg, X.X. Zhu: Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004; 282: 1–18.

12. S. Izumikawa, S. Yoshioka, Y. Aso, Y. Takeda: Preparation of poly(*l*-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate. *Journal of Controlled Release*, 1991; 15(2): 133–140.

13. X. Li, Z. Feng, Y. Hub: Investigatin of excipient and processing on solid phase transformation and dissolution of ciprofloxacin. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007; 328: 177–182.

14. slika ciprofloksacina:

<http://www.felleskatalogen.no/medisin/formelregister/J01M>, dostopano dne 10. 12. 2012.

15. lastnosti ciprofloksacina:

<http://aidsinfo.nih.gov/drugs/458/ciprofloxacin/0/professional>, dostopano dne 10. 12. 2012.

16. lastnosti ciprofloksacina:

L. Brunton, J. Lazo, K. Parker: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill Prof Med/Tech. Retrieved 30 October 2012.

17. navodilo za uporabo zdravila Ciprobay:

<http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-003090.pdf&dir=smpc>, dostopano dne 10. 12. 2012.

18. slika hitosana:

http://www.material.chula.ac.th/CCB/enCCB/en_Info_Corner.htm, dostopano dne 11. 12. 2012.

19. M. Kerec Kos: Uporaba hitosana v farmaciji. *Farmacevtski vestnik*, 2006; 57: 287–291.
20. S. A. Lewis: Everything you wanted to know about the bladder epithelium, but were afraid to ask. *American Journal of Physiology- Renal Physiology*, 2000; 278: 867–874.
21. M. Kerec Kos, M. Bogataj, P. Veranič, A. Mrhar: Permeability of Pig Urinary Bladder Wall - Time and Concentrated Dependent Effect of Chitosan. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2006; 29(8): 1685–1691.
22. M. Burjak, M. Bogataj, M. Velnar, I. Grabnar, A. Mrhar: The study of drug release from microspheres adhered on pig vesical mucosa. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001; 224: 123–130.
23. lastnosti Eudragitov®:
<http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit-products/sustained-release-formulations/rl-po/Pages/default.aspx>, dostopano dne 8. 1. 2013.
24. M. Burjak: Mukoadhezivne mikrosfere za intravezikalno aplikacijo, Doktorsko delo. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2002.
25. A. Preglav: Priprava in vrednotenje mikrosfer s hitosanom za povečanje permeabilnosti stene sečnega mehurja, Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2013.
26. T. Mateović-Rojnik, R. Frlan, M. Bogataj, P. Bukovec, A. Mrhar: Effect of preparation temperature in solvent evaporation process on Eudragit RS microsphere properties. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2005; 53(1): 143–1462.
27. S. Haznedar, B. Dortunc: Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamid. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004; 269: 131–140.
28. V. R. Sinha, A. K. Singla, S. Wadhawn, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan: Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004; 274: 1–33.

29. D. Perumal, C. M. Dangor, R. S. Alcock, N. Hurbans, K. R. Moopaner: Effect of formulation variables on in vitro drug release and micrometric properties of modified release ibuprofen microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 1999; 16(4): 475–487.
30. M. Bogataj, A. Mrhar, I. Grabnar, Z. Rajtman, P. Bukovec, S. Srčič, U. Urleb: The influence of magnesium stearate on the characteristics of mucoadhesive microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 2000; 17(4): 499–508.
31. T. Mateović, B. Križnar, M. Bogataj, A. Mrhar: The influence of stirring rate on biopharmaceutical properties of Eudragit RS microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 2002; 19(1): 29–36.
32. T. Mateović-Rojnik, R. Frlan, M. Bogataj, P. Bukovec, A. Mrhar: Effect of preparation temperature in solvent evaporation process on Eudragit RS microsphere properties. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2005; 53(1): 143–146.
33. T. Mateović, M. Ratnik, M. Bogataj, A. Mrhar: Determination of microspheres solidification time in the solvent evaporation process. *Journal of Microencapsulation*, 2005; 22(1): 81–90.