

Ocena właściwości żeli otrzymywanych na bazie termowrażliwych polimerów, jako nośników dla substancji podawanej w postaci iniekcji

BOŻENA KAROLEWICZ, ARTUR OWCZAREK,
JANUSZ PLUTA

Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku
Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie

Celem badań było opracowanie termowrażliwej formulacji ulegającej przemianie fazowej zol-żel w temperaturze zbliżonej do temperatury ciała ludzkiego, stanowiącej nośnik dla substancji podawanej w iniekcji bezpośrednio do miejsca działania. W pracy sporządzono termowrażliwe nośniki na bazie niejonowych polimerów Pluronicu F-127, Pluronicu F-68 oraz anionowo czynnego kwasu hialuronowego. Oceniano właściwości fizykochemiczne otrzymanych formulacji tj. pH, gęstość, osmolarność, temperaturę przejścia fazowego zol-żel, teksturę oraz dostępność farmaceutyczną chlorowodoru wankomycyny, którego użyto jako substancji modelowej.

Przeprowadzone badania *in vitro* wykazały, iż uwalnianie wankomycyny z wybranych nośników przebiegało w sposób przedłużony, a stwierdzone właściwości fizykochemiczne opracowanych nośników, stwarzają możliwość podania ich w formie iniekcji.

Słowa kluczowe: termowrażliwe nośniki leku, temperatura przejścia fazowego zol-żel, vancomycin

In vitro evaluation of the gels properties prepared thermosensitive polymers as vehicles for administration substance by injection

Summary

The aim of this study was to prepare a thermoresponsive formulations, which are a carrier for substance administered directly into site of action and which obtain sol-gel transitions at physiological ranges of temperature. The investigated formulations of liquid consistency at room temperature were obtained in sterile conditions on the basis of nonionic polymers Pluronic F-127, Pluronic F-68 and anionic polymer hyaluronic acid in different concentrations. The sol-gel transition temperature of the formulations was investigated and their physicochemical properties such as pH, density, osmotic pressure, sol-gel transition temperature, texture and release of vancomycin hydrochloride were studied.

In vitro release experiments indicated that the optimised platform was able to prolong vancomycin hydrochloride release and their physico-chemical properties allow for application by injection form.

Key words: thermosensitive drug carriers, sol-gel transition temperature, vancomycin

WPROWADZENIE

Polimery termowrażliwe mogą być wykorzystane jako nośniki substancji leczniczej, które żelują w reakcji na zmiany temperatury. Dzięki takim właściwościom stosowane są do projektowania postaci leku podawanych doustnie, doodbytniczo, postaci stosowanych na skórę, na powierzchnię gałki ocznej lub pozajelitowo. Ich wstrzyknięcie w stanie płynnym

i przejście w formę żelu *in situ* w temperaturze ciała, pozwala na ominięcie inwazyjnej procedury chirurgicznej koniecznej w przypadku podawania stałych implantów, oraz na uzyskanie przedłużonego uwalniania substancji leczniczej w miejscu aplikacji, przy jednoczesnej możliwości ograniczenia działań niepożądanych [1, 2]. Taka forma aplikacji zabezpiecza substancję czynną przed szybką eliminacją z układu krążenia, co następuje po podaniu dożylnym lub podskórnym. Zbyt szybka eliminacja leku z organizmu wpływa na obniżenie jego skuteczności terapeutycznej, czemu można zapobiec jedynie przez wielokrotne wstrzyknięcia lub zastosowanie dużych dawek leku, co jest szczególnie niekorzystne w przypadku substancji leczniczych o wąskim zakresie terapeutycznym.

Wśród badań prowadzonych nad biodostępnością leków z nośników opracowanych na bazie polimerów termowrażliwych, na szczególną uwagę zasługują implanty konstruowane na bazie niejonowego związku wielkocząsteczkowego Pluronicu F-127 [3, 4]. Proponowane w pracy połączenia Pluronicu F-127 i Pluronicu F-68 oraz Pluronicu F-127 i kwasu hialuronowego, zostały zaprojektowane ze względu na ich właściwości termowrażliwe oraz biogodność z tkankami organizmu ludzkiego. Przesłanką skłaniającą do ich użycia jako składowych formacji, jest także ich zdolność do zwiększania lepkości i w rezultacie możliwość uzyskania efektu przedłużonego uwalniania substancji z nośników otrzymanych z ich wykorzystaniem [5].

Jako substancję czynną do badań wybrano chlorowoderek wankomycyny, antybiotyk glikopeptydowy o złożonej budowie chemicznej i masie cząsteczkowej około 1500 daltonów. Pod względem chemicznym wankomycyna stanowi trójpierścieniowy heptapeptyd, połączony glikozydowo z disacharydem wankozaminozyloglukozą. Aglikon zbudowany jest z trzech części, w których wyróżnić można aminokwasy: N-metyloleucynę, kwas asparaginowy, chloro- β -hydroksytyrozynę i fenyloglicynę [6]. Veyries i współ. przygotowali 25% roztwór Pluronicu F-127 zawierający wankomycynę, który po wstrzyknięciu ulegał przemianom w żel pod wpływem wzrastającej temperatury. Wyniki badań wykazały, że taka forma aplikacji antybiotyku gwarantuje przedłużone i kontrolowane uwalnianie leku, co zwiększa jego skuteczność przeciwbakteryjną [7].

MATERIAŁ I METODY

Odczynniki

Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, Niemcy); 10% roztwór Pluronicu F-68 (Sigma-Aldrich, Niemcy);

Kwas hialuronowy (Biocheffa, Polska); Wankomycyny chlorowoderek (Lek Polska Sp. z o. o.); Chlorek sodu PhEur (Fluka Chemie GmbH, Szwajcaria); roztwory kalibracyjne do osmometru o ciśnieniu osmotycznym 0 i 400 mOsm/kg (TridentMed, Polska); błona dializacyjna Membra-Cel® Dialysis Tubing o wielkości porów 3 500 Da (Serva, Niemcy).

W badaniach korzystano z wody podwójnie destylowanej spełniającej wymogi FP VIII.

Aparatura

Waga analityczna Sartorius (Sartorius AG, Goettingen); Waga laboratoryjna techniczna (Radwag, Polska); Łoża z nawiewem laminarnym Lamil (Karstulan Metalli OY, Finlandia); Wielofunkcyjny przyrząd komputerowy Elmetron CX-743 do pomiaru pH z elektrodą zespoloną typu ES AgP-301 (EuroSensor, Gliwice); Osmometr Marcel OS 3000 (Marcel, Warszawa); Spektrofotometr UV-VIS V-650 (Jasco, USA); Komory dyfuzyjne typu Franz'a do badania uwalniania substancji leczniczych o objętości 7 ml z mieszałem typu „Helix” (Hanson Research Corporation, Chatsworth, USA); Sześciopozycyjne mieszało magnetyczne z grzaniem (G. Kisker GbR, Niemcy); Piknometr wg Gay-Lussaca z termometrem o objętości rzeczywistej 10 ml (Polska Grupa Laboratoryjna Sp. z o. o., Polska); Reometr cyfrowy Brookfield DV-III typu stożek – płytka wraz z programem komputerowym „Rheocalc for Windows” (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, USA); Stożek CP-51, o zakresie lepkości 20,48 – 512000 mPa*s (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, USA); Ultratermostat Brookfield TC-101P (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, USA); Analizator tekstury TA.XT Plus z programem komputerowym Exponent Software for the TA.XTPlus 2007 (Stable Micro Systems, Anglia); Przystawka do badania ekstruzji typu A/BE, Stable Micro Systems, Anglia.

METODY

Technologia sporządzania podłoży

Płynne formułacje sporządzano na zimno techniką opisaną przez Schmolka w komorze z nawiewem laminarnym Lamil [8].

Wszystkie serie zawierające kwas hialuronowy przygotowano korzystając z jałowego roztworu zapasowego tej substancji. Roztwór zapasowy kwasu

TABELA 1. Składy badanych formułacji

TABLE 1. Composition of the tested formulations

Lp.	Oznaczenie formułacji/ Version of formulation	Pluronic F127/ Pluronic F127 [%]	Pluronic F68/ Pluronic F68 [%]	Kwas hialuronowy/ Hyaluronic Acid [%]	Chlorowodorek wankomycyny/ Vancomycin hydrochloride [%]
1	1	15	–	–	–
2	2	15	–	0,3	–
3	3	15	–	0,5	–
4	4	10	–	1,0	–
5	5	15	2,0	–	–
6	6	10	2,0	–	–
7	1W	15	–	–	0,5
8	2W	15	–	0,3	0,5
9	3W	15	–	0,5	0,5
10	4W	10	–	1,0	0,5
11	5W	15	2,0	–	0,5
12	6W	10	2,0	–	0,5

hialuronowego oraz otrzymany bezpośrednio przed dodaniem roztwór wankomycyny, wprowadzano kolejno do rozpuszczonego w wodzie do wstrzykiwań o temp. ok. 15°C polimeru. Po zmieszaniu uzyskane roztwory uzupełniano wodą do wstrzykiwań o temp. ok. 15°C do żądanego stężenia. Gotowe formułacje zamykano w jałowych fiolkach szklanych o pojemności 5 ml.

Po sporządzeniu wszystkie formułacje były przechowywane w lodówce w temp. ok. 4°C i badane po upływie 72 godzin. Składy poszczególnych badanych formułacji przedstawiono w tabeli 1.

Oznaczenie pH

Do pomiaru pH podłoży wykorzystano wielofunkcyjny przyrząd komputerowy Elmetron CX-743 z elektrodą zespoloną typu ES AgP-301. Dla każdej formułacji wykonano trzykrotnie pomiar pH w temp. 22°C ± 2°C, a następnie obliczono średnią wartość.

Pomiar osmomolarności

Ciśnienie osmotyczne przygotowanych formułacji wyznaczono przy pomocy osmomietru Marcel OS 3000, który wcześniej kalibrowano przy użyciu roztworów wzorcowych o ciśnieniu osmotycznym równym 0 i

400 mOsm/kg. Do badań pobierano za pomocą pipety automatycznej 100 µl wybranej formułacji. Próbkę każdorazowo umieszczano w aparacie, doprowadzając je do stanu przechłodzenia. Pomiar osmomolarności dla każdej formułacji wykonywano trzykrotnie i obliczono wartość średnią ciśnienia osmotycznego.

Pomiar gęstości

Pomiary gęstości przygotowanych formułacji wykonano według metody przedstawionej w FP VII [9]. W tym celu posłużono się piknometrem o objętości 10 ml. Na wadze analitycznej z dokładnością do 0,001 g zważono piknometr wypełniony wodą, a następnie wypełniony określonym podłożem. Gęstość obliczono według następującego wzoru:

$$d_{20} = \frac{m}{w} \times 0,977 + 0,0012 \left[\frac{g}{ml} \right];$$

gdzie: d_{20} – oznacza gęstość wyrażoną w g/ml w temp. 20°C; m – oznacza masę badanej substancji wyrażoną w g, oznaczoną w powietrzu w temp. 20°C; w – jest masą wyrażoną w g tej samej objętości wody, oznaczoną w temp. 20°C; 0,977 – określa gęstość wody w temp. 20°C, a 0,0012 – jest poprawką na ważenie w powietrzu.

Pomiar gęstości dla każdej próbki wykonywano sześciokrotnie, po czym obliczono wartość średnią.

Wyznaczanie temperatury przejścia fazowego zol-żel na podstawie pomiaru lepkości dynamicznej

Temperaturę przejścia fazowego zol-żel dla poszczególnych formułacji wyznaczono na podstawie rejestrowanych zmian lepkości dynamicznej. W badaniu lepkości wykorzystuje się opór, jaki stawia lepka ciecz lub substancja półstała obrotowi, znanemu w niej ruchomej części przyrządu. W określonych stałych warunkach moment hamowania obrotu jest funkcją lepkości badanej substancji. Wielkością mierzoną bezpośrednio jest kąt obrotu po upływie określonego czasu. Badania temperatury przejścia fazowego zol-żel wykonano przy wykorzystaniu reometru cyfrowego Brookfield typu DV-III. Pomiary wykonano dla każdej formułacji przy wzrastającej o $0,5^{\circ}\text{C}$ na 15 sekund temperaturze w zakresie od $20^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ do $40^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, przy dwóch określonych prędkościach ścinania wynoszących 10 s^{-1} i 100 s^{-1} . Według FP VII żele do iniekcji powinny posiadać odpowiednią lepkość, gwarantującą zmodyfikowane uwalnianie substancji aktywnej w miejscu iniekcji [9].

Do badania lepkości pobierano próbki o objętości $0,5\text{ cm}^3$ i nanoszono strzykawką na płytkę aparatu.

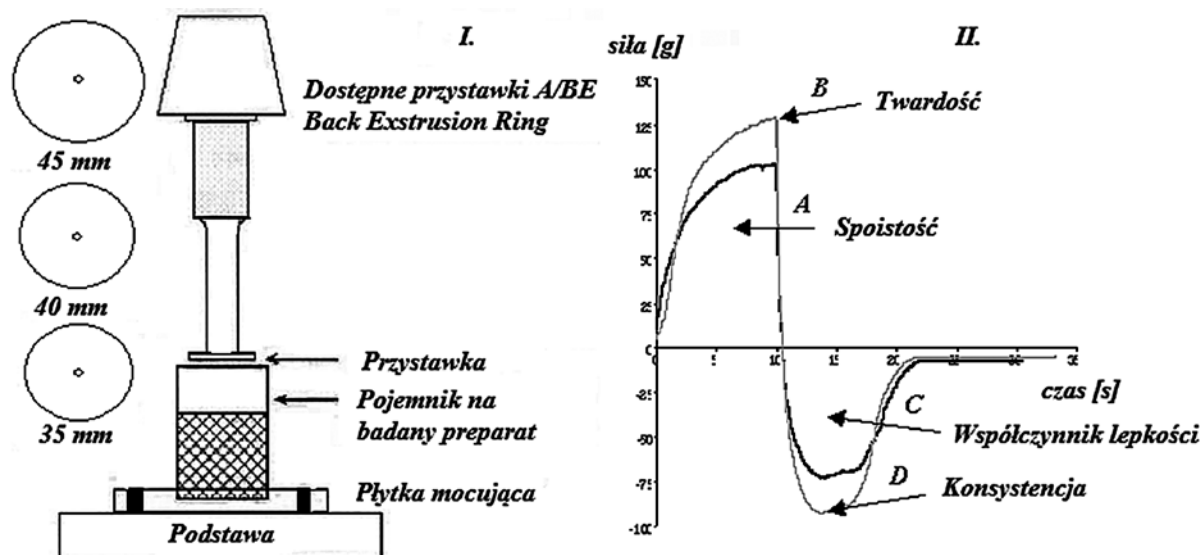
Badanie tekstuometryczne twardości, konsystencji, lepkości i spójności formułacji

Badanie analizy tekstury wykonano przy pomocy tekstuometru TA.XT Plus, z wykorzystaniem przystawki do ekstruzji wstecznej typu A/BE o średnicy 40 mm. Uproszczony schemat aparatu do badania tekstury wraz z przystawką do ekstruzji wstecznej przedstawia rycina 1A. Pomiar wykonano w dwóch temp. 25°C i 37°C . Badane próbki w obu temperaturach były poddane naciskowi 2 g i 5 g na dystansie 5 mm. Do badania użyto formułacji nie zawierających substancji leczniczej w ilościach około 30 g.

Przy wykorzystaniu oprogramowania Exponent Software for the TA.XT Plus 2007, sporządzono wykresy zarejestrowanych zmian siły w czasie pod obciążeniem 2 g i 5 g i obliczono pola powierzchni odpowiadające spójności i współczynnikowi lepkości oraz maksimum i minimum odnoszące się do twardości i konsystencji formułacji. Wyznaczone w badaniu na podstawie zmiany sił w czasie parametry przedstawiono na rycinie 1B [10].

Badanie dostępności farmaceutycznej wankomycyny z formułacji w komorach Franz'a

Blonę półprzepuszczalną do uwalniania Membra-Cel® Dialysis Tubing (Serva, Heidelberg) o wiel-



Ryc. 1. I. Uproszczony schemat aparatu do analizy tekstury z przystawkami do badania ekstruzji wstecznej, II. Wykres zależności zmian siły w czasie i wyznaczone parametry: A – spójność, B – twardość, C – współczynnik lepkości, D – konsystencja [50]

FIG. 1. I. Diagram of a texture analyser by back extrusion cell, II. A dependency diagram of force changes over time and fixed parameters: A – Cohesiveness, B – Firmness, C – Index of Viscosity, D – Consistency [50]

kości porów 3500 Da, przed przystąpieniem do badań pozostawiono do spęcznienia w wodzie oczyszczonej przez 30 minut. Płaszcz wodny w komorach Franz'a termostatowano z zastosowaniem ultratermostatu. Po umieszczeniu błony półprzepuszczalnej i pierścienia z otworem do nakładania badanego nośnika w odpowiednim miejscu komory, wprowadzono do niej wodę oczyszczoną, odgazowaną. Po osiągnięciu przez płyn akceptorowy w komorze stabilnej temp. $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, na błonę półprzepuszczalną наносono strzykawką odważone z dokładnością do około 0,001 g formułacje zawierające wankomycynę.

Komora do uwalniania substancji umieszczona została na mieszadle magnetycznym, zapewniającym mieszanie płynu akceptorowego wewnątrz komory przy pomocy mieszadła typu „Helix”, z prędkością 100 obrotów/min. Płyn akceptorowy pobierano w ilości 3,0 ml po 30, 60, 90, 120, 150, 180 minucie. Badanie prowadzono równolegle dla 3 próbek, a z uzyskanych wyników obliczono średnią, odchylenie standardowe oraz wykreślono zależność $\ln$ % uwolnionej substancji od czasu.

Ilość uwolnionej wankomycyny oznaczono metodą spektrofotometryczną przy wyznaczonej analitycznej długości fali λ , wynoszącej 279,5 nm. Na podstawie sporządzonej krzywej wzorcowej obrazującej zależność absorbancji od stężenia substancji ($y = 4,358x$, $r^2 = 0,9999$) obliczono ilość uwolnionej wankomycyny w czasie.

Uwalnianie wankomycyny z otrzymanych formułacji interpretowano matematycznie, w oparciu o model zgodny z kinetyką pierwszego rzędu.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Zgodnie z wymaganiami FPVIII, postaci leku podawane pozajelitowo powinny być w miarę możliwości izohydryczne i odpowiadać fizjologicznym wartościom pH płynów ustrojowych w granicach 7,2–7,6 [11]. Odczytane wartości odczynu pH wraz z wartościami odchyłeń standardowych umieszczono w tabeli 2.

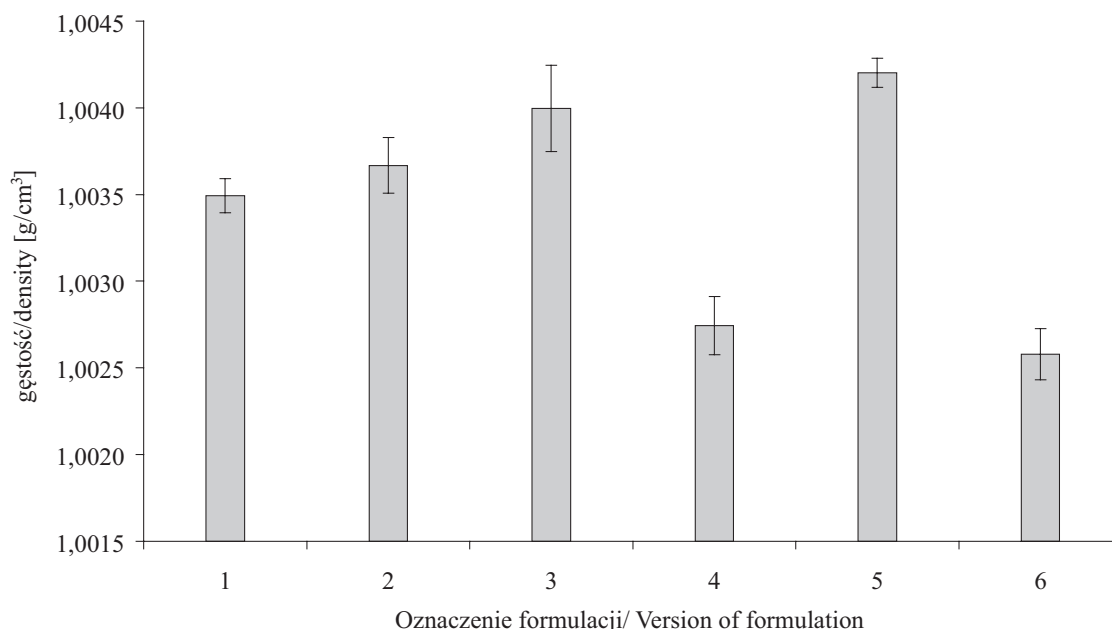
Najwyższą wartość pH posiadały formułacje porównawcze nie zawierające substancji leczniczych. Dodatek kwasu hialuronowego do tych formułacji (2–4) powodował spadek wartości ich odczynu pH, proporcjonalny do wzrostu stężenia tego polimeru. Wprowadzenie do nośników chlorowodoru wankomycyny w stężeniu 0,5% powodowało spadek wartości odczynu pH. Jednak uzyskane wartości pH formułacji nie odbiegały na tyle od wartości fizjologicznych pH płynów ustrojowych, aby istniała obawa, iż po iniekcji będą powodowały drażnienie tkanek i bolesność w trakcie podania.

Zbadano gęstość formułacji 1–6 będących grupą odniesienia, nie zawierających substancji leczniczej (ryc. 2). Gęstość wykonanych układów mieściła się w zakresie 1,0026–1,0042 g/cm³. Najmniejszą gęstością charakteryzowały się formułacje zawierające w swoim składzie 10% pluroniku F-127 (4 i 6), a największą gęstość posiadała formułacja o składzie 15% pluroniku F-127 i 2% pluroniku F-68 (5). Wraz ze wzrostem procentowego udziału kwasu hialuronowego w formułacji rosła ich gęstość. Zwiększenie procentowego stężenia kwasu hialuronowego do 1% i równoczesne zmniejszenie udziału pluroniku F-127 z 15% do 10% spowodowało spadek gęstości.

TABELA 2. Wartości pH formułacji odniesienia 1–6, nie zawierających chlorowodoru wankomycyny oraz wartości pH i ciśnienia osmotycznego formułacji 1W–6W z chlorowodorkiem wankomycyny

TABLE 2. pH values for formulation 1–6 without vancomycin hydrochloride and pH, osmotic pressure values for formulation 1W–6W with vancomycin hydrochloride

Oznaczenie Formułacji/ Version of formulation	pH $X \pm SD$	Oznaczenie Formułacji/ Version of formulation	pH $X \pm SD$	Ciśnienie osmotyczne/ Osmotic pressure [mOsm/kg] $X \pm SD$
1	$7,33 \pm 0,1211$	1W	$6,38 \pm 0,1722$	$271,0 \pm 47,4710$
2	$7,16 \pm 0,1366$	2W	$6,30 \pm 0,0894$	$315,0 \pm 12,5100$
3	$6,90 \pm 0,0894$	3W	$6,53 \pm 0,1966$	$334,4 \pm 2,8809$
4	$6,90 \pm 0,0894$	4W	$6,25 \pm 0,2167$	$210,6 \pm 8,7635$
5	$7,28 \pm 0,1169$	5W	$6,80 \pm 0,1095$	$252,6 \pm 12,3409$
6	$7,06 \pm 0,1032$	6W	$6,43 \pm 0,1632$	$121,2 \pm 12,1531$



RYC. 2. Średnia gęstość badanych formulacji 1–6 nie zawierających chlorowodoru wankomycyny

FIG. 2. Mean density of prepared formulations 1–6 without vancomycin hydrochloride

Badanie gęstości wykazało, że najbardziej znacząco na jej zmianę wpływał udział procentowy pluroniku F-127. Zmiana stężenia kwasu hialuronowego oraz dodatek 0,2% pluroniku F68 nie wpłynęły znacząco na gęstość formulacji. Wynika z tego, iż gęstość wykonanych układów można najłatwiej modyfikować poprzez zmianę udziału procentowego pluroniku F-127, którego zawartość w opracowanych nośnikach była największa (ryc. 2).

Średnie wartości oznaczonego ciśnienia osmotycznego formulacji zawierających chlorowodorek wankomycyny mieściły się w zakresie 121,2–343,0 mOsm/kg (tabela 2). Spośród formulacji zawierających 0,5% chlorowodoru wankomycyny, fizjologiczną wartość ciśnienia osmotycznego posiadał nośnik zawierający 15% pluroniku F-127 i 0,3% kwasu hialuronowego (2W). Układ 3W zawierający 15% pluroniku F-127 i 0,5% kwasu hialuronowego okazał się hiperosmotyczny.

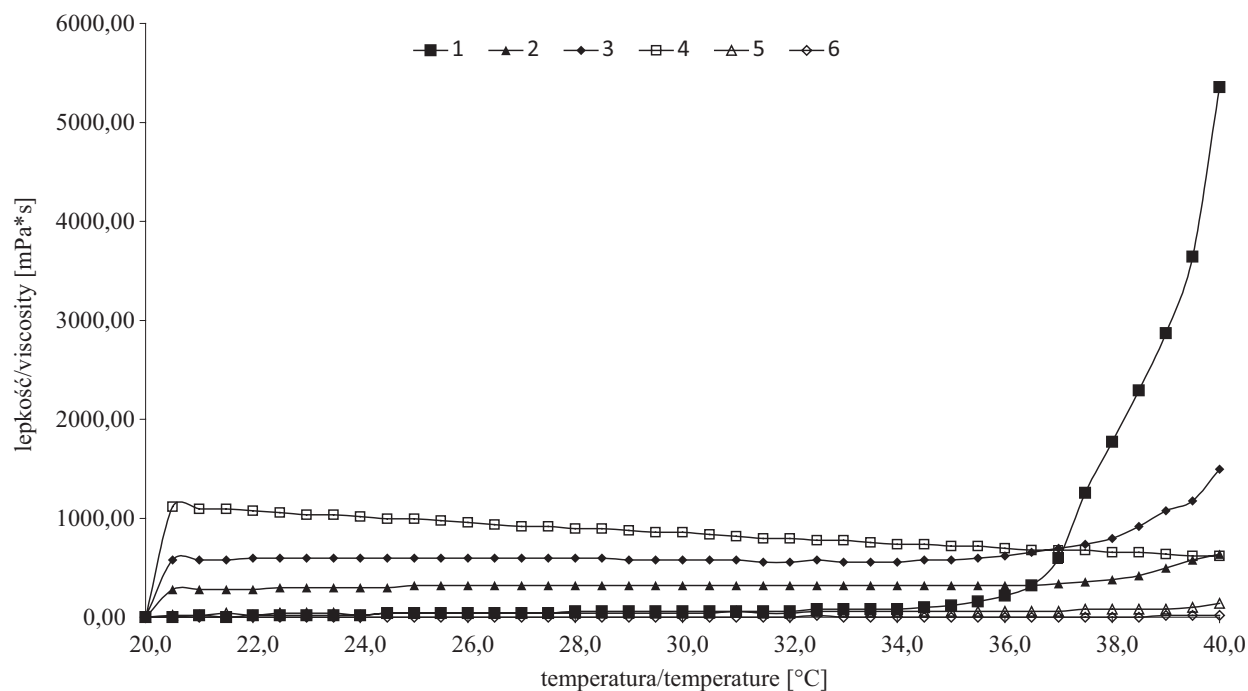
Z otrzymanych wartości wynika, że nośniki zawierające najmniejszy udział procentowy pluroniku F-127, czyli 10%, uzyskały najniższe wartości ciśnienia osmotycznego. Silnie hiposmotyczna okazała się formuła otrzymana na bazie 10% pluroniku F-127 i 2% pluroniku F-68 (6W). Formuły te, aby spełniały wymogi farmakopealne i by można było je podawać w iniekcji należałoby doprowadzić do izotonii.

Podczas badania reologicznego w roztworach

koloidalnych związków wielkocząsteczkowych następuje wzrost lepkości formulacji, związany z pojawieniem się oporu względem przyłożonych z zewnątrz naprężeń. W badaniach termodynamicznych przemian fazowych zol-żel przy rosnącej temperaturze i stałej szybkości ścinania, gwałtowny wzrost lepkości roztworu koloidalnego polimeru następuje wtedy, gdy zbliża się on do punktu żelowania.

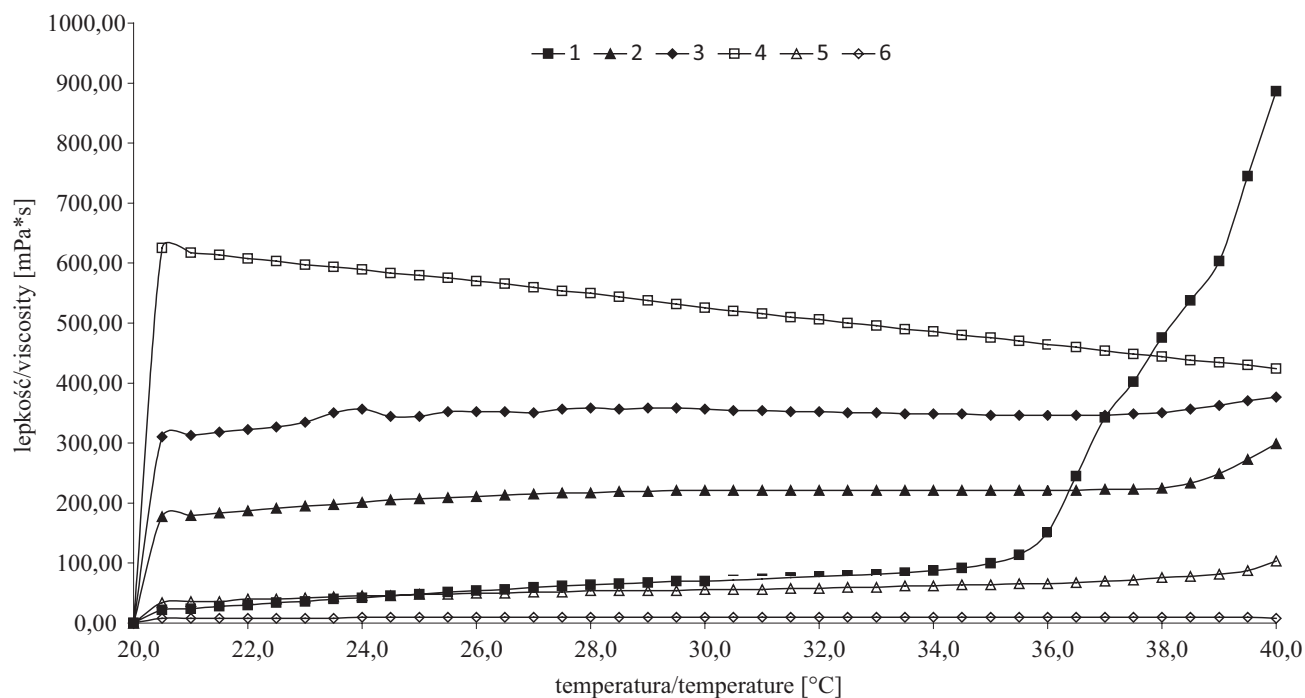
Przyjęto, iż otrzymaną temperaturą przejścia fazowego jest temperatura, przy której w warunkach badania odnotowano największy przyrost lepkości formulacji. Zmiany lepkości formulacji pozbawionych substancji leczniczej przedstawiono na rycinach 3 i 4. Skok lepkości formulacji 1 zawierającej 15% pluroniku F-127 widoczny na rycinie 4 wskazuje na temperaturę przejścia fazowego wynoszącą 36°C, co potwierdza badanie wykonane przy szybkości 100 obrotów/s. Zobrazowany na wykresie 4 skok lepkości formulacji 3 zawierającej 15% pluroniku F-127 i 0,5% kwasu hialuronowego, wskazuje na temperaturę przejścia fazowego wynoszącą 37,5°C.

Zmiany lepkości formulacji zawierających chlorodorek wankomycyny przedstawiono na rycinach 5 i 6. Rycina 5 obrazuje nieznaczny wzrost lepkości w przypadku formulacji 2W składającej się z 15% pluroniku F-127, 0,3% kwasu hialuronowego w temp. 38,5°C. Również podobne mało znaczące wzrosty zaobserwowano w temp. 39,5°C w przypadku układu 1W, zawierającego 15% pluroniku F-127



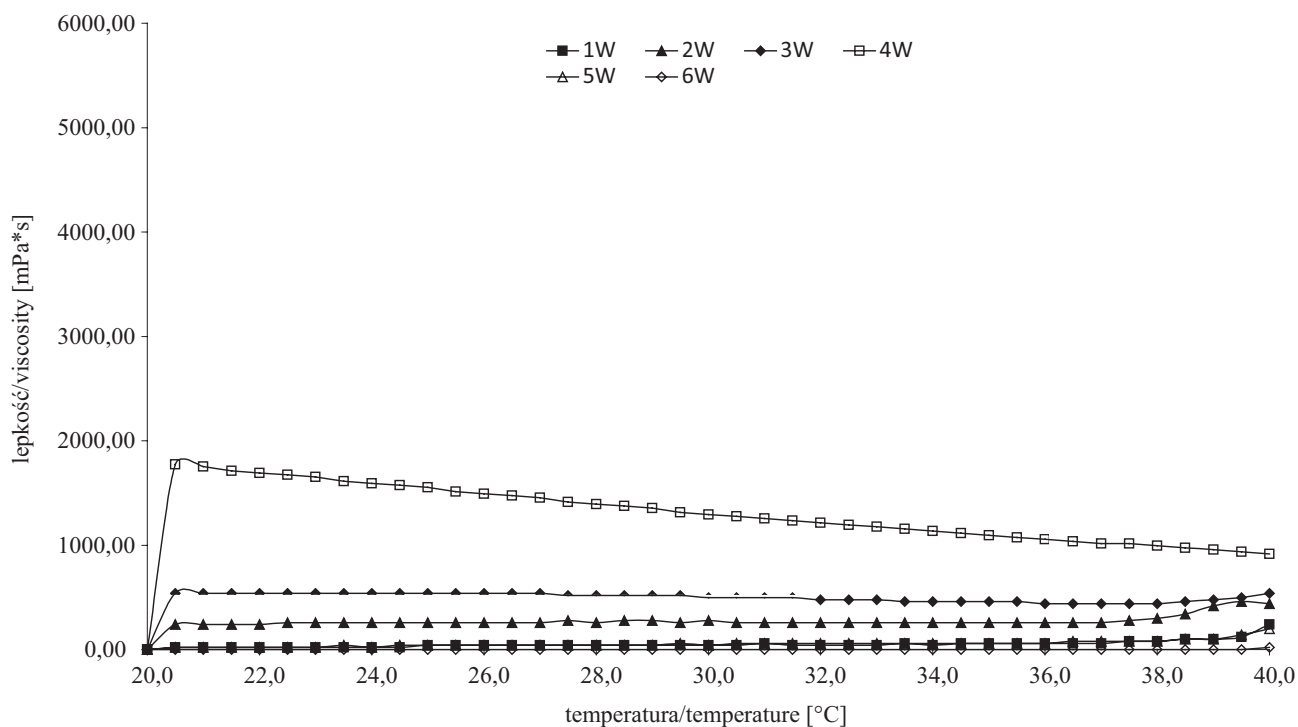
RYC. 3. Zmiany lepkości formułacji nie zawierających substancji leczniczej przy wzrastającej temperaturze i szybkości ścinania 10 s^{-1}

FIG. 3. Changes in viscosity of formulations at shear rate of 10 s^{-1} for formulation without vancomycin hydrochloride



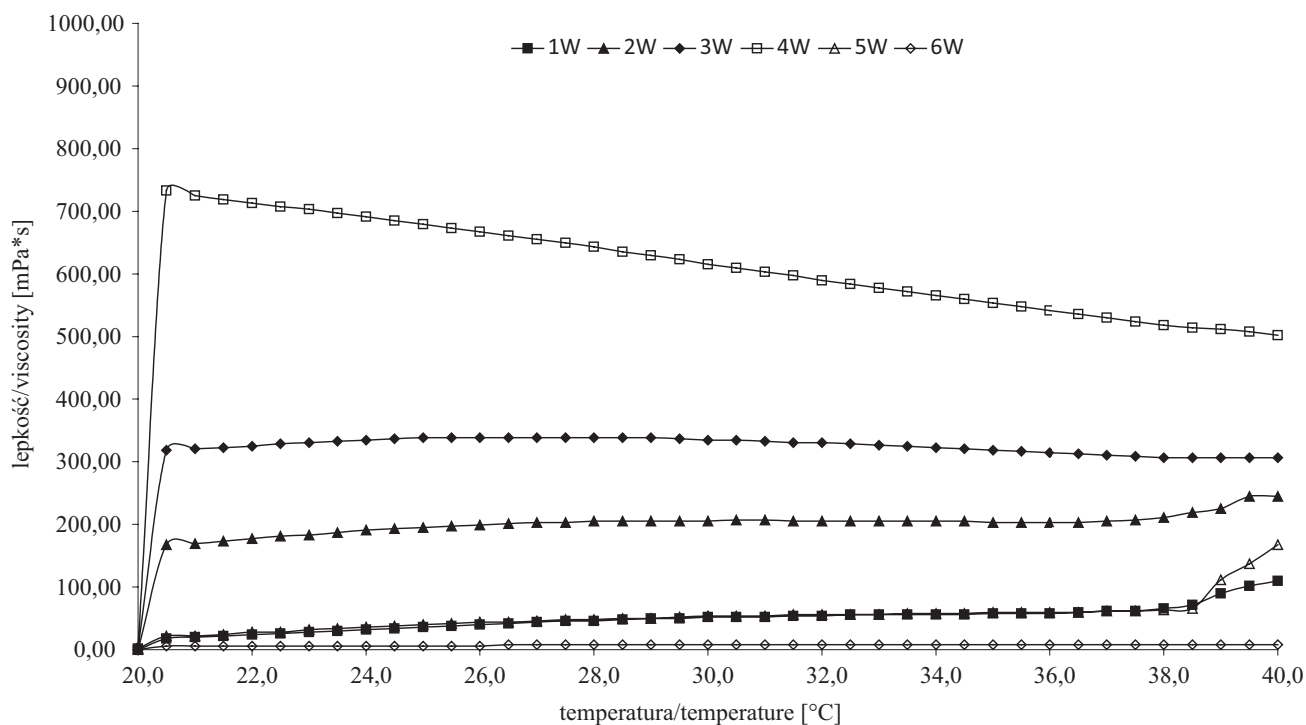
RYC. 4. Zmiany lepkości formułacji nie zawierających substancji leczniczej przy wzrastającej temperaturze i szybkości ścinania 100 s^{-1}

FIG. 4. Changes in viscosity of formulations at shear rate of 100 s^{-1} for formulation without vancomycin hydrochloride



Ryc. 5. Zmiany lepkości formułacji zawierających chlorowoderek wankomycyny przy wzrastającej temperaturze i szybkości ścinania 10 s^{-1}

FIG. 5. Changes in viscosity of formulations at shear rate of 10 s^{-1} for formulation with vancomycin hydrochloride



Ryc. 6. Zmiany lepkości formułacji zawierających chlorowoderek wankomycyny przy wzrastającej temperaturze i szybkości ścinania 100 s^{-1}

FIG. 6. Changes in viscosity of formulations at shear rate of 100 s^{-1} for formulation with vancomycin hydrochloride

i 0,5% chlorowodorku wankomycyny oraz 5W składającego się z 15% pluroniku F-127, 2% pluroniku F-68 i 0,5% chlorowodorku wankomycyny. Wahania lepkości są jednak zbyt małe aby uważać je za wartość temperatury przejścia fazowego. Na wykresie 6 niskie wzrosty lepkości odnotowano dla formułacji 2W dla 39°C, a temperatura przejścia fazowego formułacji 1W i 5W wynosiła około 38,5°C.

Tekstura jest jedną z ważniejszych cech decydujących o jakości preparatu i wpływających na właściwości reologiczne i fizyczne postaci leku. Charakterystyka tekstury żeli najczęściej interpretowana jest w oparciu o parametry tj. twardość, spoistość, konsystencję i lepkość. Wartości wyliczonych parametrów tekstury badanych formułacji zebrano w tabelach 3 i 4.

Twardość żeli otrzymanych z dodatkiem kwasu hialuronowego rosła proporcjonalnie do wzrostu jego stężenia. Nośniki zawierające 1% dodatek kwasu hialuronowego posiadały w temp. 25°C przy obciążeniu 2 g dwukrotnie, a w temp. 37°C trzykrotnie większą twardość, niż zawierające 0,3% kwasu hialuronowego. Podobnie nośniki te zachowywały się przy obciążeniu wynoszącym 5 g.

Nośniki zawierające kwas hialuronowy charakteryzowały się wyższymi wartościami spójności, niż otrzymane bez jego dodatku. Omawiany parametr jest miarą stopnia trudności zniszczenia początkowej struktury żeli. Można zatem stwierdzić, iż wprowadzenie kwasu hialuronowego powodowało utworzenie bardziej zwartych żeli. Podobnie jak w przypadku spójności, wartości konsystencji układów zawierających kwas hialuronowy przewyższały wartości konsystencji innych układów.

Konsystencja nośnika ma decydujące znaczenie dla łatwości jego podawania w iniekcji i stopnia bolesności w trakcie i po aplikacji. Formułacje zawierające kwas hialuronowy charakteryzowały się również większą wartością bezwzględną współczynnika lepkości. Wysoka lepkość może utrudniać aplikację otrzymanych nośników, jednocześnie jednak wysoka wartość lepkości nośnika w temperaturze fizjologicznej, może być czynnikiem determinującym szybkość uwalniania substancji leczniczej w miejscu podania.

Uwalnianie leku z postaci pozajelitowych o przedłużonym działaniu przebiega w warunkach *in vivo* do bardzo ograniczonej ilości płynu, bez praktycznie żadnych efektów hydrodynamicznych. Trudno jest stworzyć takie warunki w modelach badań *in vitro*, kiedy musi być zastosowana pewna objętość płynu akceptorowego oraz respektowany czas badania. Jedynymi parametrami, jakie zazwyczaj w warunkach badania *in vitro* pozostają zachowane jako zgodne

z fizjologicznymi wartościami, są pH i temperatura [46].

Równania linii trendu dla kinetyki uwalniania wankomycyny z nośników zebrano w tabeli 5. Zależność $\ln$ % pozostałości chlorowodorku wankomycyny od czasu przedstawiono na rycinie 7. Dla procesów uwalniania wankomycyny z układów wyznaczono linie trendu. Na podstawie wyznaczonych współczynników kierunkowych linii trendu, które odpowiadały stałym szybkościom reakcji uwalniania, zostały obliczone okresy półuwalniania substancji z poszczególnych formułacji.

Najszybciej chlorowodorek wankomycyny (8,42%) uwalniał się z nośnika 5W zawierającego 15% pluroniku F-127 i 2% pluroniku F-68. Najmniejszą dostępność farmaceutyczną chlorowodorku wankomycyny (3,39%) odnotowano dla układu 4W, zawierającego 10% pluroniku F-127 i 1% kwasu hialuronowego, co było prawdopodobnie spowodowane największą odnotowaną wartością lepkości i niską osmolarnością. Z formułacji zawierających pluronik F-127 oraz pluronik F-127 z dodatkiem niższych stężeń kwasu hialuronowego, po 3 h uwolniła się podobna ilość substancji.

Formułacje zawierające chlorowodorek wankomycyny otrzymane na bazie 15% pluroniku F-127 oraz opracowane na bazie 15% pluroniku F-127 i 2% pluroniku F-68 posiadają pożądane właściwości fizykochemiczne, temperaturę przejścia fazowego w zakresie wartości temperatury fizjologicznej i zapewniają przedłużone uwalnianie chlorowodorku wankomycyny. Tak więc zastosowanie tych związków wielkocząsteczkowych do konstruowania postaci leków podawanych pozajelitowo, pozwala na uzyskanie nośników o jednocześnie optymalnych parametrach i przedłużonym czasie uwalniania substancji.

WNIOSKI

1. Zwiększenie procentowego udziału kwasu hialuronowego do 1% i równoczesne zmniejszenie stężenia pluroniku F-127 z 15% do 10% powodowało spadek gęstości.
2. Nośniki zawierające najmniejszy udział procentowy pluroniku F-127, posiadały najniższe wartości ciśnienia osmotycznego. Silnie hiposmotyczne okazały się formułacje otrzymane na bazie 10% pluroniku F-127 i 2% pluroniku F-68.
3. Formułacje zawierające chlorowodorek wankomycyny otrzymane na bazie 15% pluroniku

TABELA 3. Wartości twardości, spójności, konsystencji i współczynnika lepkości przy obciążeniu 2 g, w temperaturze 25°C i 37°C

TABLE 3. Values of gel firmness, cohesiveness, consistency and index of viscosity with the force on the cell 2 g in temperature 25°C i 37°C

Formu- lacja	Twardość/ Firmness (kg)	Spoistość/ Cohesiveness (kg*s)	Konsystencja/ Consistency (kg)	Współczynnik lepkości/ Index of viscosity (kg*s)	Twardość/ Firmness (kg)	Spoistość g/ Cohesiveness (kg*s)	Konsystencja/ Consistency (kg)	Współczynnik lepkości/ Index of viscosity (kg*s)
Temperatura/Temperature 25°C								
Formulacja 1								
X ± SD n = 2	0,0101 ± 0,00021	0,0419 ± 0,00014	-0,0045 ± 7,07E-05	-0,0052 ± 0,00014	0,0109 ± 0,00014	0,0405 ± 0,00028	-0,0058 ± 0,00014	-0,0082 ± 0,00021
Formulacja 2								
X ± SD n = 2	0,0129 ± 7,07E-05	0,04215 ± 0,00021	-0,0054 ± 0,00014	-0,0095 ± 0,00028	0,0139 ± 0,00014	0,0411 ± 0,00014	-0,0103 ± 0,00028	-0,0052 ± 7,07E-05
Formulacja 3								
± SD n = 2	0,0164 ± 7,07E-05	0,0428 ± 0,00014	-0,0055 ± 7,07E-05	-0,0108 ± 7,07E-05	0,0207 ± 0,00028	0,0433 ± 0,00028	-0,0111 ± 0,00014	-0,0056 ± 0,00014
Formulacja 4								
X ± SD n = 2	0,0242 ± 0,00028	0,0431 ± 7,07E-05	-0,0068 ± 0,00014	-0,0190 ± 7,07E-05	0,0312 ± 0,00014	0,0442 ± 0,00014	-0,0062 ± 0,00014	-0,0106 ± 0,00028
Formulacja 5								
X ± SD n = 2	0,0109 ± 0,00014	0,0406 ± 0,00021	-0,0054 ± 0,00014	-0,0071 ± 0,00014	0,0104 ± 0,000141	0,0403 ± 0,00021	-0,0056 ± 0,00014	-0,0083 ± 0,00028
Formulacja 6								
X ± SD n = 2	0,0098 ± 0,00042	0,0402 ± 0,00014	-0,0053 ± 7,07E-05	-0,0072 ± 0,00014	0,0092 ± 0,000283	0,0383 ± 0,00021	-0,0056 ± 0,00014	-0,0072 ± 0,00014

TABELA 4. Wartości twardości, spójności, konsystencji i współczynnika lepkości przy obciążeniu 5 g, w temperaturze 25°C i 37°C

TABLE 4. Values of gel firmness, cohesiveness, consistency and index of viscosity with the force on the cell 5 g in temperature 25°C i 37°C

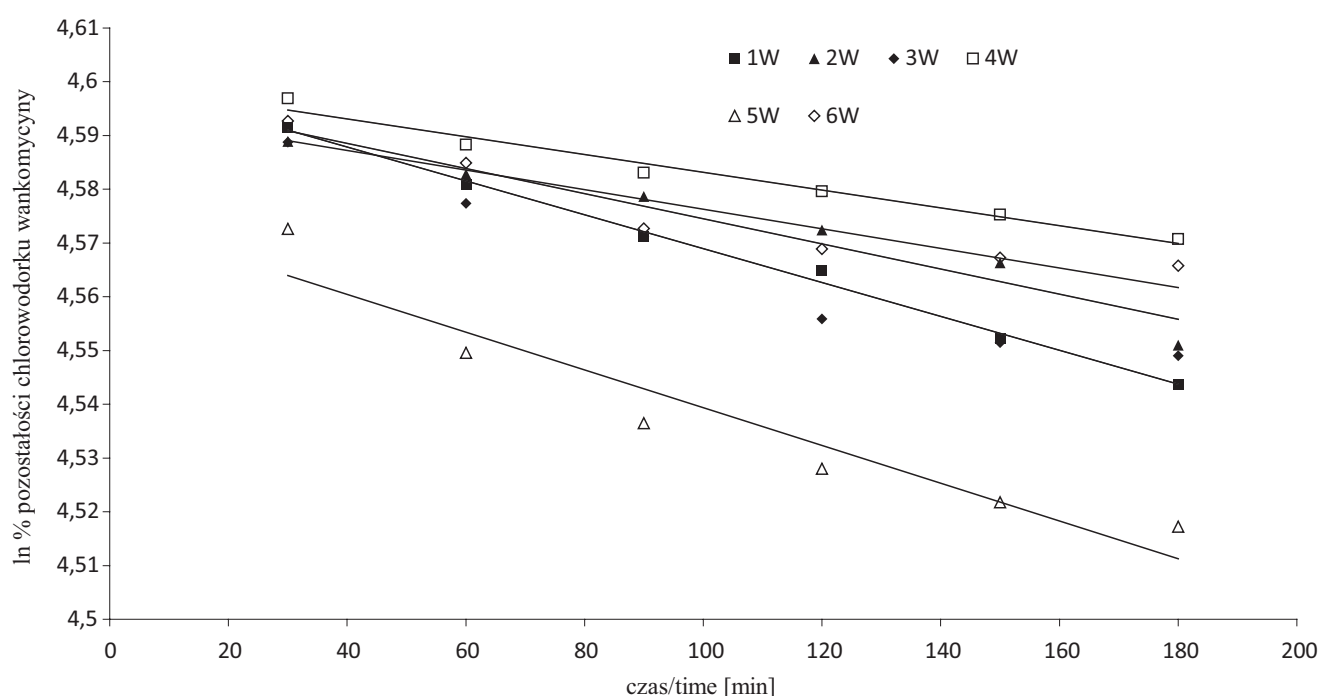
Formu- lacja	Twardość/ Firmness (kg)	Spoistość/ Cohesiveness (kg*s)	Konsystencja/ Consistency (kg)	Współczynnik lepkości/ Index of viscosity (kg*s)	Twardość/ Firmness (kg)	Spoistość g/ Cohesiveness (kg*s)	Konsystencja/ Consistency (kg)	Współczynnik lepkości/ Index of viscosity (kg*s)
Temperatura/Temperature 25°C					Temperatura/Temperature 37°C			
Formulacja 1								
X ± SD n = 2	0,0102 ± 0,00014	0,0460 ± 0,00028	-0,0055 ± 0,00028	-0,0070 ± 0,00021	0,0116 ± 0,00014	0,0370 ± 0,00028	-0,0070 ± 0,00014	-0,0161 ± 0,00021
Formulacja 2								
X ± SD n = 2	0,0126 ± 0,00014	0,03595 ± 0,00021	-0,0082 ± 0,00021	-0,0200 ± 0,00021	0,0128 ± 0,00014	0,03715 ± 0,00007	-0,0077 ± 0,00014	-0,021 ± 0,00014
Formulacja 3								
X ± SD n = 2	0,0145 ± 0,00007	0,0381 ± 0,00028	-0,0081 ± 0,00007	-0,0270 ± 0,00021	0,0163 ± 0,00007	0,0429 ± 0,00021	-0,0054 ± 0,00014	-0,0111 ± 0,00028
Formulacja 4								
X ± SD n = 2	0,0193 ± 0,00007	0,0410 ± 0,00021	-0,0092 ± 0,00014	-0,0359 ± 0,00028	0,0206 ± 0,00014	0,0390 ± 0,00028	-0,0087 ± 0,00007	-0,0320 ± 0,00120
Formulacja 5								
X ± SD n = 2	0,0113 ± 0,00014	0,0379 ± 0,00014	-0,0069 ± 0,00014	-0,0161 ± 0,00014	0,0112 ± 0,00007	0,0379 ± 0,00021	-0,0069 ± 0,00014	-0,0151 ± 0,00014
Formulacja 6								
X ± SD n = 2	0,0108 ± 0,00014	0,0380 ± 0,00014	-0,0067 ± 0,00014	-0,0120 ± 0,00021	0,0101 ± 0,00007	0,0382 ± 0,00014	-0,0067 ± 0,00014	-0,0120 ± 0,00021

TABELA 5. Interpretacja procesu uwalniania chlorowodorku wankomycyny z otrzymanych formułacji w oparciu o kinetykę I rzędu

TABLE 5. Interpretation of the vancomycin hydrochloride release process on the basis first-order kinetic model

Oznaczenie formułacji/ Version of formulation	Równanie opisujące kinetykę uwalniania w układzie półlogarytmicznym	R ²	K [min ⁻¹]	T _{0,5} [min]
1W	$y = -0,0003x + 4,6005$	0,9956	-0,0003	2310,0
2W	$y = -0,0003x + 4,5979$	0,9448	-0,0002	3464,1
3W	$y = -0,0002x + 4,5948$	0,9536	-0,0002	3464,1
4W	$y = -0,0002x + 4,5997$	0,9759	-0,0002	3464,1
5W	$y = -0,0004x + 4,5745$	0,9135	-0,0004	1732,5
6W	$y = -0,0002x + 4,5945$	0,8741	-0,0002	3464,1

T_{0,5} – czas pół uwalniania/half-release time, K – stała szybkości uwalniania/first order rate constant, R² – współczynnik korelacji/correlation coefficient



Ryc. 7. Zależność logarytmu naturalnego % pozostałości chlorowodorku wankomycyny od czasu

Fig. 7. First order release model of vancomycin hydrochloride sustained release formulation

4. Twardość i spoistość nośników otrzymanych z dodatkiem kwasu hialuronowego była najwyższa.
5. Wankomycyna uwalniała się najwolniej z nośnika zawierającego 1% kwasu hialuronowego i 10% pluroniku F-127 o największym bezwzględnym współczynniku lepkości i wysokiej twardości. Najszybciej chlorowodorek wankomycyny uwalniał się z nośnika zawierającego 15% pluroniku F-127 i 2% pluroniku F-68.

LITERATURA

- [1] GIL E. S., HUDSON S. M.: Stimuli-reponsive polymers and their bioconjugates; *Prog. Polym. Sci.* (2004), 29, 1177–1222.
- [2] RUEL-GARIEPY E., LEROUX J. CH.: In situ forming hydrogels-review of temperature-sensitive systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, (2004), 58, 409–426.
- [3] ESCOBAR-CHÁVEZ J. J., LÓPEZ-CERVANTES M., NAĐK A., KALIA Y. N., QUINTANAR-GUERREIRO D., GANEM-QUINTANAR A.: Applications of thermoreversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* (2006), 9, 339–358.
- [4] GUZMAN M., GARSIA F. F., MOLPECERES J., ABERTURAS M. R.: Polyoxyethylenepolyoxypropylene block copolymer gels as sustained release vehicles for subcutaneous drug administration. *Int. J. Pharm.* (1992), 80, 119–127.
- [5] KIM M. R., PARK T. G.: Temperature-responsive and degradable hyaluronic acid/Pluronic composite hydrogels for controlled release of human growth hormone. *J. Control. Rel.* (2002), 80, 69–77.
- [6] KOWSZYK-GINDIFERZ., SOBICZEWSKI W.: Antybiotyki współczesny stan wiedzy. *Przedsiębiorstwo Wydawnictw i Wystaw Przemysłu Chemicznego i Lekkiego „Chemii”*. Warszawa 1990, 745–476.
- [7] VEYRIES M. L., COUARRAZE G., GEIGER S., AGNELY F., MASSIAS L., KUNZLI B., FAURISSON F., ROUVEIX B.: Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels. *Int. J. Pharm.* (1999), 192, 183–193.
- [8] SCHMOLKA I. R.: Artificial skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J. Biomed. Mater. Res.* (1972), 6, 571–582.
- [9] *Farmakopea Polska VII – Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych – Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne* Warszawa, 2007.
- [10] Internet: Application Study for TA.XT plus, Stable Micro system, Version current 2010-03-01 <http://www.stablemicrosystems.com> (dostęp 15.05.2010).
- [11] *Farmakopea Polska wydanie VIII. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych*, Warszawa 2008.

Adres do korespondencji

Bożena Karolewicz
Katedra Technologii Postaci Leku
Akademia Medyczna we Wrocławiu
51-124 Wrocław, ul. Szewska 38
el. 071 784 03 15
e-mail: bozkar@ktpl.am.wroc.pl

