

# **Właściwości fizykochemiczne oraz kinetyka uwalniania substancji lecniczej z matryc żelatynowo-alginianowych**

Janusz Pluta, Dorota Haznar

Zakład Farmacji Aptecznej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

---

## **Streszczenie**

Celem pracy była ocena wpływu składu oraz zastosowanego postępowania technologicznego na dostępność farmaceutyczną substancji leczniczej, oraz właściwości porowatych matryc żelatynowo-alginianowych. W skład nośnika oprócz żelatyny i alginianu sodu wchodził glicerol lub olej arachidowy, a część matryc dodatkowo była modyfikowana mleczanem wapnia.

Uzyskane matryce charakteryzowały się dobrymi właściwościami sorpcyjnymi oraz dobrą odpornością na działanie enzymów proteolitycznych. Uwalnianie modelowego antybiotyku zachodziło zgodnie z kinetyką I rzędu, a okres półuwalniania *in vitro* (w warunkach prowadzenia badań) wynosił od około 1,5 do 3 godzin.

**Słowa kluczowe:** nośniki leków, żelatyna, alginian sodu, gąbka

---

Zakażenie tkanek jest poważnym problemem klinicznym. Konwencjonalne leczenie polegające na ogólnoustrojowym podaniu antybiotyku, jest często mało skuteczne i obciążone wieloma działaniami niepożądanymi. Do osiągnięcia stężeń terapeutycznych w miejscu zakażenia, konieczne jest podawanie bardzo wysokich dawek leku, ponieważ tylko niewielka jego część dociera do miejsca zakażenia. Z tego powodu stosuje się zamiennie, z dość dobrym skutkiem, leczenie miejscowe. Dąży się do stworzenia takiego nośnika dla leku, który pozwalałby na długotrwałe utrzymywanie się stężenia terapeutycznego w chorobowo zmienionej tkance, a jednocześnie nie wywoływałby odczynów tkankowych i ulegałby bioresorpcji.

Podjęmowane były badania nad zastosowaniem antybiotyku w klejach tkankowych. Kleje fibrynowe są dobrze znanymi biomateriałami o dobrej biogodności i dobrym działaniu hemostatycznym oraz dobrej adhezji. Problemem jest jednak uzyskanie przedłużonego działania, gdyż lek jest z nich uwalniany bardzo szybko [3].

Podjęmowano też próby zastosowania chitozanowych lub kolagenowych gąbek nasączanych roztworem antybiotyku tuż przed ich zastosowaniem. Jednak w pierwszej fazie następowało bardzo szybkie uwalnianie leku, a działanie antybiotyku było tylko nieznacznie przedłużone [1, 2].

Długotrwałe stężenie terapeutyczne leku w tkance kostnej (przez okres około 10 dni), uzyskiwano przy zastosowaniu stałych implantów zbudowanych z biodegradowalnych polimerów kwasu mlekowego lub jego kopolimerów oraz sieciowanej żelatyny [4, 5].

Obiecującą postacią leku, która może w przyszłości znaleźć zastosowanie w leczeniu i zapobieganiu zakażeniom tkanek, są filmy hydrożelowe z takich polimerów jak kwas hialuronowy, sieciowany chitozan oraz żelatyna. W badaniach *in vitro* uzyskano zadawalającą kinetykę uwalniania leku podczas ich pęcznienia. Mogłyby one być stosowane w trakcie zabiegów operacyjnych w celu zapobieżenia zakażeniom [6-8].

Celem pracy jest uzyskanie porowatej matrycy żelatynowo–alginianowej, stanowiącej nośnik dla leku, która mogłaby znaleźć zastosowanie w leczeniu zakażeń słabo ukrwionych tkanek np. kości. Jako składników matrycy użyto materiałów powszechnie stosowanych w technologii farmaceutycznej, dobrze tolerowanych, nie toksycznych.

Zastosowane polimery - żelatyna i alginian sodu są szeroko stosowanymi, dobrze tolerowanymi, biozgodnymi polimerami. Wstępne doświadczenia wykazały, że matryce złożone tylko z powyższych polimerów są zbyt kruche, twarde i łamliwe, z tego powodu konieczny był dodatek substancji uelastyczniających. Jako substancje uelastyczniające matrycę zastosowano glicerol, który naturalnie występuje w organizmie człowieka oraz olej arachidowy, który jest stosowany jako rozpuszczalnik olejowy w iniekcjach.

## **1. MATERIAŁY**

Żelatyna ze skór świń 180 Bloom (Fluka – BioChemika), sól sodowa kwasu alginowego (Sigma), glicerol 86% (PPH POCH Gliwice), olej arachidowy, 0,1 N kwas solny (PPH POCH Gliwice), pepsyna (BTL Gliwice), cefradyna (Polfa Tarchomin)

## **2. PRZYGOTOWANIE MATRYC**

Produkty wyjściowe do przygotowania matryc żelatynowo-alginianowych, uzyskiwano poprzez zmieszanie wyjałowionych roztworów 20% żelatyny z 2% roztworem alginianu sodu w odpowiednim stosunku wagowym 9:1. Uzyskane mieszaniny poddawano następnie liofilizacji, a otrzymany suchy produkt rozdrabniano.

Odpowiednią ilość rozdrobnionej suchej mieszaniny żelatynowo-alginianowej poddawano pęcznieniu w wodzie oczyszczonej, a następnie rozpuszczono, podgrzewając na

łaźni wodnej. Ilość wody była tak dobrana, aby uzyskane stężenie żelatyny wynosiło 20%. W części wyliczonej ilości wody rozpuszczano 1g cefradyny, która była dodawana do mieszaniny w trakcie spieniania.

Do uzyskanego roztworu dodawano glicerolu lub oleju arachidowego w takiej ilości, że ich zawartość wynosiła odpowiednio 1%, 3%, 5% i 10% w stosunku do żelatyny. Mieszaninę spieniano mieszadłem szybkoobrotowym, a uzyskaną pianę przenoszono do szalek Petriego i poddawano 24h liofilizacji (liofilizator Steris – Lyovag GT – 2E). Gąbki wersji C i D były dodatkowo modyfikowane mleczanem wapnia. Mleczan wapnia w postaci roztworu dodawano pod koniec procesu spieniania w takiej ilości, że stanowił on 2% ilości alginianu sodu. Składy poszczególnych wersji matryc przedstawiono w tabeli 1.

### **3. METODY BADAŃ**

Przygotowane matryce o strukturze gąbki były oceniane pod względem zabarwienia i stopnia zachowania struktury porowatej. Określano również dla nich cechy fizykochemiczne: gęstość teoretyczna, zdolności sorpcyjne oraz odporność na rozmywanie. Dla wybranych opatrunków przeprowadzono badania dostępności farmaceutycznej cefradyny. Uzyskane wyniki były poddane analizie statystycznej Anova/Manova.

#### **3. 1. Badanie gęstości teoretycznej**

Liofilizowane matryce cięto na fragmenty o wymiarach około 1cm x 1cm, następnie mierzono z dokładnością do 0,001mm i ważono z dokładnością do 0,0001g przy użyciu wagi SARTORIUS MC1. Gęstość matryc obliczano na podstawie wzoru:

$$D = m / g \times h \times a$$

Gdzie: D- gęstość, m - masa fragmentu matrycy, g,h,a - wymiary matrycy.

Dla każdej wersji matrycy wykonywano 8 pomiarów, z których obliczano średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 2.

### **3. 2. Badanie zdolności sorpcyjnych**

Do badania zdolności sorpcyjnej matryc używano fragmentów o wymiarach 1cm x 0,5cm, zważonych z dokładnością do 0,0001g. Fragmenty te umieszczano w uprzednio zważonych naczynkach, zawierających 5ml wody oczyszczonej. Po upływie 30 minut fragmenty gąbek usuwano, a naczynka ponownie ważono. Zdolność sorpcyjną materiału obliczano na podstawie ubytku wody w naczynkach według wzoru:

$$S_w = (W_a - W_b) / W_s$$

Gdzie:  $S_w$  – ilość pochłoniętej wody,  $W_a$  – masa naczynka przed badaniem,  $W_b$  - masa naczynka po usunięciu matrycy,  $W_s$  – masa gąbki.

Wykonano po 8 pomiarów dla każdej z wersji matryc, a następnie obliczono z nich średnią oraz odchylenie standardowe. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 2.

### **3. 3. Badanie odporności na rozmywanie**

Badanie odporności matryc na rozmywanie, przeprowadzono w aparacie do uwalniania substancji leczniczej z tabletek wg. Ph. Eur. 2004 [9]. Zważone fragmenty matryc o wymiarach 1cm x 1cm, umieszczano w naczyniach zawierających 1dm<sup>3</sup> 1% roztworu pepsyny w 0,1N kwasie solnym o temp. 37°C, mieszanym z prędkością 50 obr/min. Po upływie 30 minut, wyjmowano pozostałości matryc i przepłukiwano wodą oczyszczoną. Następnie fragmenty suszono nad żelazem silikonowym do stałej masy. Suchą pozostałość ważono, a procent pozostałości oznaczano według wzoru:

$$\%P = (W_{sb} \times 100\%) / W$$

Gdzie: %P – procent pozostałości,  $W_{sb}$  – masa suchej pozostałości, W – masa wyjściowa matrycy.

Dla każdej wersji matrycy wykonywano po 8 pomiarów, z których obliczano średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 3.

### **3. 4. Dostępność farmaceutyczna cefradyny**

Badanie dostępności farmaceutycznej antybiotyku przeprowadzono dla wybranych wersji matryc żelatynowo - alginianowych. Badanie przeprowadzono w aparacie dyfuzyjnym złożonym z komory donorowej i komory akceptorowej, oddzielonych od siebie błoną półprzepuszczalną (rycina 1).

Badanie prowadzono w temp. 37°C wytrząsając aparat dyfuzyjny z prędkością 50 obr/min. Komory zawierały po 20 ml wody. W komorze donorowej umieszczono uprzednio zważony fragment matrycy o wymiarach 1cm x 1,5cm. Ilość uwolnionej cefradyny oznaczano spektrofotometrycznie, w próbkach pobieranych z komory akceptorowej po 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 i 180 minutach.

Dla każdej wersji matrycy wykonano po 4 badania, z których obliczano średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe. Na podstawie uzyskanych wyników wykreślano zależność  $\ln(100\% - \% \text{ leku uwolnionego})$  od czasu oraz wyznaczano linię trendu kinetyki uwalniania. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinach 2-7.

## **4. OMÓWIENIE WYNIKÓW**

Wszystkie uzyskane gąbki charakteryzowały się kremowym zabarwieniem i dobrym zachowaniem struktury porowatej, przy czym wzrost zawartości glicerolu lub oleju

arachidowego powodował zmniejszenie zdolności porowatości materiału. W przeciwny sposób działał dodatek mleczanu wapnia.

#### **4. 1. Badanie gęstości teoretycznej**

Wykonane oznaczenia, których wyniki przedstawiono w tabeli 2 wykazały, że skład jakościowy matrycy w istotny sposób wpływa na wartości gęstości teoretycznej. Uzyskane wyniki zawierały się w przedziale od 0,182 g/cm<sup>3</sup> (dla wersji C3) do 0,570 g/cm<sup>3</sup> (dla wersji B10).

Stwierdzono wprost proporcjonalną zależność pomiędzy zawartością glicerolu lub oleju arachidowego, a wartością gęstości teoretycznej. Przy czym w przypadku oleju arachidowego była ona bardziej widoczna. Dodatek mleczanu sodu w istotny sposób zmniejszał teoretyczną gęstość matrycy i to zarówno w gąbkach zawierających olej arachidowy jak i tych z glicerolem. Stwierdzono istotnie statystycznie efekty związane z zawartością glicerolu i oleju arachidowego, oraz związane z dodatkiem czynnika sieciującego.

Uzyskane wyniki są zbieżne z zaobserwowaną w badaniach wstępnych prawidłowością zachowania struktury porowatej.

#### **4. 2. Badanie zdolności sorpcyjnych**

W badaniu oceniano wpływ zawartości żelatyny, alginianu sodu, plastyfikatora – glicerolu lub oleju arachidowego oraz wpływ dodatku czynnika sieciującego, jakim jest mleczan wapnia na zdolności sorpcyjne matrycy.

W przypadku gąbek nie modyfikowanych mleczanem wapnia, matryce zawierające olej arachidowy pochłaniały mniejszą ilość wody w stosunku do gąbek zawierających glicerol (ryc. 2). Wyjątek stanowiła matryca wersji B3, która wykazywała najlepsze właściwości

sorpcyjne w tej grupie (4,443 gram wody na gram matrycy). Ilość wody pochłanianej przez 1 gram matrycy zawierającej olej arachidowy wynosiła od 2,186 do 3,163 grama, natomiast dla zawierających glicerol odpowiednio od 2,984 do 4,334 grama.

Gąbki modyfikowane mleczanem wapnia posiadały istotnie większą zdolność sorpcyjną, przy czym zaobserwowano znaczącą różnicę pomiędzy gąbkami z glicerolem, a olejem arachidowym. Matryce z glicerolem po modyfikacji znacznie zwiększyły ilość pochłanianego płynu, zarówno w stosunku do odpowiednich wersji niemodyfikowanych, jak i wersji zawierających olej arachidowy. Stwierdzono ponadto występowanie związku pomiędzy wzrostem zawartości plastyfikatora a spadkiem zdolności sorpcyjnej. Analiza statystyczna wyników wykazała, że efekty związane z sieciowaniem matrycy oraz z procentem zawartości glicerolu lub oleju arachidowego, były istotne statystycznie.

#### **4. 3. Badanie odporności na rozmywanie**

Przeprowadzone doświadczenia, których wyniki przedstawiono na rycinie 3, wykazały, że skład matryc w istotny sposób wpływa na ich trwałość na rozmywanie, w tym także działanie enzymów proteolitycznych.

Matryce z dodatkiem glicerolu wersji A oraz matryce z dodatkiem oleju arachidowego wersji B i D, charakteryzowały się zbliżoną trwałością w warunkach prowadzenia badań. Natomiast gąbki zawierające glicerol, a modyfikowane mleczanem wapnia (wersja C), wykazywały najmniejszą trwałość na działanie enzymów proteolitycznych.

#### **4. 4. Badanie dostępności farmaceutycznej cefradyny**

Badanie dostępności farmaceutycznej antybiotyku przeprowadzono dla wybranych matryc żelatynowo-alginianowych. Uzyskane wyniki, które zostały przedstawione na rycinach 4-7 wykazują, że uwalnianie cefradyny z matryc żelatynowo-alginianowych przebiega zgodnie z



kinetyką I rzędu, co potwierdzają wysokie współczynniki korelacji linii trendu zależności  $\ln$  (100% - % uwolniony) od czasu. Zaobserwowano, że rząd kinetyki uwalniania nie zależy od składu jakościowego gąbek, natomiast zawartość poszczególnych składników decyduje o ilości oraz szybkości uwalniania antybiotyku z matrycy.

Najkrótszy okres półuwalniania cefradyny uzyskano dla niemodyfikowanych gąbek z glicerolem jako plastyfikatorem. Usieciowanie matrycy poprzez dodatek mleczanu wapnia, tylko w nieznaczny sposób przedłużał okres półuwalniania (tabela 3). Wynosiły one odpowiednio 1,34h dla gąbek z glicerolem niemodyfikowanych, oraz 1,91h dla matryc z glicerolem modyfikowanych mleczanem wapnia.

W przypadku matryc z dodatkiem oleju arachidowego, usieciowanie mleczanem wapnia spowodowało przyspieszenie uwalniania antybiotyku. Okres półuwalniania skrócił się z 2,99h do 1,59h po modyfikacji mleczanem wapnia.

Analiza Anova/Manova wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy parametrami opisującymi kinetykę (stała szybkości uwalniania, okres półuwalniania oraz całkowity % uwolniony), pomiędzy wersją gąbki A i modyfikowaną mleczanem wapnia wersja C, wersją B i D oraz A i B. Nieistotne statystycznie okazały się zmiany pomiędzy wersjami gąbki Ci D.

## **5. DYSKUSJA**

Uzyskane wyniki wykazują, że zarówno dodatek substancji uelastyczniających (glicerol lub olej arachidowy) jak i zastosowanie czynnika sieciującego (mleczan wapnia), w istotny sposób zmieniają parametry fizykochemiczne matrycy. Dodatek glicerolu czy też w większym stopniu oleju arachidowego, poprzez „obciążenie” matrycy powoduje wzrost jej gęstości. Wydaje się natomiast, że zmniejszenie wartości tego parametru w wyniku usieciowania matrycy jonami wapnia, jest spowodowane utrwaleniem struktury gąbki

(„usztynieniem”), w trakcie spieniania mieszaniny poprzez zmianę rozpuszczalności alginianu. Stwierdzono ponadto korelację pomiędzy gęstością matrycy a jej zdolnością sorpcyjną. Gąbki zawierające mniejszą ilość glicerolu lub oleju arachidowego, oraz gąbki sieciowane jonami wapnia zachowujące lepiej strukturę porowatą i wykazujące mniejszą gęstość, charakteryzowały się lepszymi właściwościami sorpcyjnymi. Sugerować to może, że zdolności sorpcyjne warunkowane są wiązaniem wody przez biopolimery (alginian i żelatynę), oraz zatrzymywaniem jej w porach materiału.

Podobne korelacje stwierdzono pomiędzy wynikami odporności na rozmywanie a badaniami gęstości i zdolności sorpcyjnych matryc żelatynowo-alginianowych. Gąbki wykazujące słabe zdolności sorpcyjne ulegały rozmyciu w najmniejszym procencie. Przykładowo matryca wersji B5, która pochłaniała najmniejszą ilość płynu, uległa rozmyciu jedynie w około 33%. Podczas gdy gąbki wersji C5, pochłaniające największą ilość płynu, w badaniu zdolności sorpcyjnych ulegały też w największym stopniu rozmyciu – w ponad 57%.

Wydaje się, że dobrze zachowana struktura porowata ułatwia wnikanie płynu do matrycy, a tym samym zwiększa powierzchnię, na którą mogą oddziaływać enzymy proteolityczne. Wydaje się też, że w przypadku dostępności farmaceutycznej istotne znaczenie dla szybkości uwalniania cefradyny z matryc żelatynowo-alginianowych ma stopień zachowania struktury porowatej, co ułatwia penetrację płynu do wnętrza gąbki i szybsze rozpuszczenie zawartego w niej antybiotyku.

Porównując wcześniejsze badania [10] stwierdzono, że wstępna liofilizacja mieszaniny żelatyny i alginianu ma decydujące znaczenie dla uzyskiwanego rzędu kinetyki uwalniania. Wstępna liofilizacja mieszaniny żelatyny z alginianem sodu, która następnie była używana do produkcji matryc, spowodowała uzyskanie uwalniania modelowego leku z kinetyką zbliżoną do I rzędu, podczas gdy uwalnianie leku z matryc uzyskanych bez wstępnej

liofilizacji mieszaniny żelatyny i alginianu, uwalniały lek z kinetyką zbliżoną do zerowego rzędu, a uzyskane okresy półuwalniania były znacząco dłuższe (około 30h).

## **6. WNIOSKI**

1. Z zastosowaniem biopolimerów takich jak żelatyna i alginian sodu, możliwe jest uzyskanie ulegających bioresorpcji porowatych nośników dla leku.

2. W zależności od składu uzyskuje się matryce o różnym stopniu porowatości, co w istotny sposób wpływa na ich właściwości fizykochemiczne oraz dostępność farmaceutyczną substancji leczniczej.





