

Agnieszka SEBAI, Agnieszka GADOMSKA-GAJADHUR, Paweł RUŚKOWSKI,

e-mail: asebai@ch.pw.edu.pl

Laboratorium Procesów Technologicznych, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, Warszawa

## Optymalizacja procesu otrzymywania nanosfer proleku polilaktydu z chlorofenezyną

### Wstęp

W prezentowanych badaniach otrzymano sfery z wielkocząsteczkowego proleku polilaktydu z chlorofenezyną (CF). Proleki wielkocząsteczkowe to substancje aktywne farmaceutycznie API (*Active Pharmaceutical Ingredient*), chemicznie związane z łańcuchem polimerowym, które właściwości terapeutyczne uzyskują dopiero w wyniku metabolizmu. Są one jednym z rodzajów systemów leków o kontrolowanym czasie uwalniania DDS (*Drug Delivery Systems*) [Hoffmann, 2001]. Systemy te charakteryzują się stopniowym uwalnianiem substancji aktywnej w organizmie, co powoduje wydłużenie efektu terapeutycznego. Proleki z polimerów ulegających degradacji mogą stanowić budulec dla innych form DDS i tworzyć złożone systemy o kontrolowanym czasie uwalniania.

Chlorofenezyna jest lekiem bakterio- i grzybobójczym, dopuszczonym do stosowania jako konserwant, w stężeniu do 0,3% mas. [Dziewiętnasta Dyrektywa KE, 1996]. Mimo silnego działania grzybobójczego nie jest stosowana w praktyce medycznej, ponieważ słabo wchłania się z przewodu pokarmowego. Znane dotychczas proleki wielkocząsteczkowe chlorofenezyny to estry winylowe [Quan i in., 2007; 2008], których wadą jest brak biodegradowalności, co ogranicza ich zastosowanie w farmacji i medycynie.

Sfery polimerowe można otrzymać kilkoma metodami. Jedną z nich jest metoda emulsyjna z odparowaniem rozpuszczalnika, w której otrzymuje się dyspersję sfer w wodzie. Modyfikacją tej metody jest metoda wysalania poprzez dodanie nierozpuszczalnika do roztworu polimeru. Sfery można otrzymywać również poprzez suszenie rozpyłowe. Ostatnią metodą jest rozprężanie nadkrytycznego ditlenku węgla. Jeżeli w formie nadkrytycznej jest on rozpuszczalnikiem polimeru, rozprężenie gazu powoduje wytrącenie sfer. Ze względu na możliwość otrzymania sfer o rozmiarze poniżej 100 nm zdecydowano się na zastosowanie metody emulsyjnej z odparowaniem rozpuszczalnika [Nawagarna i in., 2012].

Potencjalnym zastosowaniem otrzymanej formy leku jest naskórne podawanie API w walce z kłopotliwą, a powszechną chorobą, jaką jest grzybicą skóry. Choroba ta jest uciążliwa i dosyć wstydliva, słyne z nawracających infekcji. Zastosowanie sfer z proleku PLA-CF w jej leczeniu znacznie wydłużyłoby czas ochrony przed wtórną infekcją. W przypadku naskórnego podanie chlorofenezyny nie występuje problem z niską wchłaniałością w przewodzie pokarmowym. Dodatkowo polilaktyd degraduje m.in. do kwasu mlekowego, który jest promotorem przenikania, co wzmacnia efekt terapeutyczny. Domyślną formą leku byłby liofilizat do tworzenia zawiesin w maściach lub kremach.

Przedstawiona w pracy optymalizacja ma na celu głębsze poznanie wpływu parametrów procesu na rozmiar otrzymywanych sfer, a także określenie czy proces jest powtarzalny. Wpływ zmiennych zależy od użytej substancji aktywnej, rodzaju matrycy polimerowej, a także oddziaływań między nimi. Określenie powtarzalności procesu jest bardzo ważne dla potencjalnej aplikacji w przemyśle farmaceutycznym, jest podstawą do podjęcia dalszych badań w tym kierunku.

### Badania doświadczalne

#### Surowce

Do otrzymywania nanosfer polimerowych stosowano prolek wielkocząsteczkowy poli-L-laktydu z chlorofenezyną o średniej liczbowo masie molowej 3300 g/mol (PLA-CF). Prolek otrzymano w Laboratorium Procesów Technologicznych Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej metodą polimeryzacji z otwarciem

pierścienia laktydu wobec 2-etyloheksanianu cynku i substancji aktywnej. Jako stabilizatory emulsji stosowano poli(alkohol winylowy) PVA *Mowiol* 4\_88 (symbolach 4\_88 ( $M_w$  30 000 g/mol, stopień hydrolizy 88%), 18\_88 ( $M_w$  130 000 g/mol, stopień hydrolizy 88%) oraz 40\_88 ( $M_w$  210 000 g/mol, stopień hydrolizy 88%). Rozpuszczalnikiem proleku był dichlorometan cz.d.a. produkcji *POCh SA*.

#### Metoda otrzymywania

Przygotowano 0,1% wodny roztwór PVA. Naważkę 0,5 g PVA (*Mowiol* 4\_88, 18\_88 lub 40\_88) i 400 mL wody destylowanej pozostawiono w kolbie miarowej o poj. 500 mL na dwa dni do całkowitego rozpuszczenia polialkoholu. Następnie uzupełniono wodą do kreski. Przygotowano 1% roztwór proleku w dichlorometanie. Naważkę 1 g proleku PLA-CF i 80 mL rozpuszczalnika pozostawiono w kolbie miarowej o poj. 100 mL do całkowitego rozpuszczenia polimeru. Następnie uzupełniono dichlorometanem do kreski.

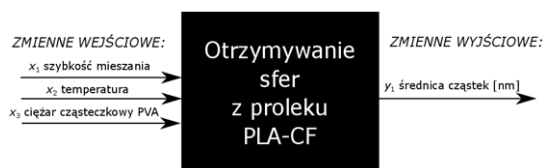
W celu otrzymania sfer polimerowych, do kolby kulistej o poj. 250 mL zaopatrzonej w mieszadło magnetyczne wprowadzono 100 mL 0,1% wodnego roztworu PVA. We wkraplaczu umieszczano 5 mL 1% roztworu proleku w dichlorometanie. Następnie wkraplano przez 15 minut mieszając z szybkością 300, 600 lub 900  $\text{min}^{-1}$ , w temp. 20, 25 lub 30°C. Po wkropleniu całego roztworu polimeru zawieszinę sfer polimerowych mieszano przez 1 h w celu odparowania rozpuszczalnika, po czym sączono na lejeku *Schotta 3G* oraz zmierzono rozmiar sfer wykorzystując analizę DLS.

#### Metody analityczne

Rozmiar otrzymanych sfer oznaczono metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) w aparacie *Malvern Zetasizer Nano* model *ZEN 3600*. Pomiary wykonywano w kuwetach polistyrenowych.

### Optymalizacja procesu

Proces otrzymywania sfer z proleku PLA-CF zoptymalizowano z wykorzystaniem matematycznych metod planowania doświadczeń. W pierwszej kolejności określono strukturę procesu i zmienne mające wpływ na rozmiar sfer (Rys. 1).



Rys. 1. Struktura procesu (tzw. czarna skrzynka)

W serii doświadczeń wstępnych stwierdzono, że tymi zmiennymi są szybkość mieszania roztworu, temperatura procesu oraz ciężar cząsteczkowy stabilizatora emulsji – poli(alkoholu winylowego). Ciężar cząsteczkowy PVA określano średnią wagowo masą molową polimeru. Następnie określono zakres zmiennych, które zakodowano (Tab. 1), aby móc porównać moc wpływu poszczególnych zmiennych na wynik doświadczenia.

### Wyniki i dyskusja

#### Plan czynnikowy

Wykonano doświadczenia zgodnie z planem czynnikowym  $2^3 - 8$  doświadczeń w jądrze planu (wszystkie kombinacje zmiennych na poziomach -1 i +1) oraz 3 w środku planu pozwalające wyznaczyć powtarzalność eksperymentów (Tab. 2).

Tab. 1. Zakres zmiennych i ich kodowanie

Zmienna		Wartość kodowana		
		-1	0	1
$x_1$	szybkość mieszania [min <sup>-1</sup> ]	300	600	900
$x_2$	temperatura, [°C]	20	25	30
$x_3$	$M_w$ PVA, [g/mol]	31 000	130 000	210 000

Doświadczenia wykonywano w losowej kolejności. Plan poszerzono o efekty współdziałania zmiennych. Otrzymano sfery o średnicy od 13 do 109 nm. W centrum planu można zaobserwować dużą powtarzalność (odchylenie standardowe  $\sigma = 4,9$  nm).

Tab. 2. Plan czynnikiowy 2<sup>3</sup> z efektami współdziałania i wynikami doświadczeń;  $y_{dośw.}$  – wynik eksperymentalny,  $y_{obl.}$  – wynik otrzymanego równania regresji.

Nr dośw.	$x_0$	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_1x_2$	$x_1x_3$	$x_2x_3$	$y_{dośw.}$	$y_{obl.}$
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	13	15
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	54	52
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	13	11
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	28	30
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	99	98
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	47	49
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	109	111
8	1	1	1	1	1	1	1	45	43
9	1	0	0	0	0	0	0	51	51
10	1	0	0	0	0	0	0	60	51
11	1	0	0	0	0	0	0	52	51

### Równanie regresji

Na podstawie wyników eksperymentalnych planu czynnikiowego obliczono metodą macierzową współczynniki równania regresji opisującego zależność średnicy sfer od zmiennych wejściowych. Istotność współczynników równania zbadano testem *t-Studenta*. Dla trzech zmiennych, 2 stopni swobody i poziomu ufności 0,05  $t_{kryt.}$  wynosi 4,30. Test istotności wykazał, że wszystkie współczynniki są istotne. Uzyskano następujące równanie regresji

$$y = 51,04 - 7,5x_1 - 2,35x_2 + 24,44x_3 - 4,59x_1x_2 - 2,148x_1x_3 + 4,18x_2x_3 \quad (1)$$

gdzie:

$x_{1-3}$  – jak w tab. 1

$y$  – średnica sfer, [nm]

Z otrzymanego równania wynika, że w badanym zakresie zmiennych największy wpływ na rozmiar sfer ma ciężar cząsteczkowy stabilizatora (wraz ze wzrostem wartości zmiennej zwiększa się średnica sfer) oraz jego efekt współdziałania z szybkością mieszania (wraz z jednoczesnym wzrostem lub spadkiem wartości zmiennych  $x_1$  i  $x_3$  zmniejsza się średnica sfer). Najmniejszy wpływ na rozmiar sfer ma temperatura procesu.

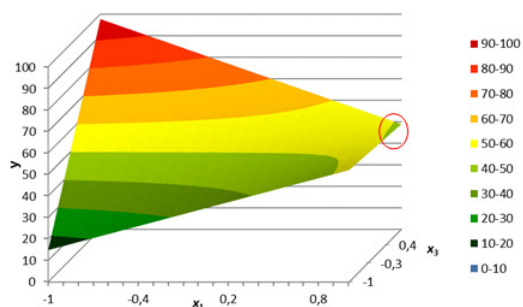
Sprawdzono adekwatność równania za pomocą testu statystycznego *F*. Obliczony parametr *F* wynosił 1,35, podczas gdy wartość krytyczna  $F_{kryt.}$  w tym przypadku (poziom istotności 0,05, obydwie liczby stopni swobody równe 2) wynosi 19. Równanie jest adekwatne, ponieważ wartość współczynnika obliczonego jest mniejsza od wartości krytycznej.

### Powierzchnia odpowiedzi i doświadczenie potwierdzające

Powierzchnię odpowiedzi zilustrowano wykresem, na którym przyjęto stałą wartość zmiennej  $x_2 = -1$ , ponieważ ma najmniejszy wpływ na wynik (Rys. 2). W badanym zakresie zmiennych wejściowych rozmiary sfer nie przekraczały 100 nm.

W celu eksperymentalnej weryfikacji prawidłowości równania regresji wykonano doświadczenie potwierdzające. Korzystając z dodatku *MS Excel Solver* szukano punktu, w którym średnica sfer będzie wynosiła 50 nm. Odpowiedzią bliską założonej jest punkt  $P_s = (0; -1; 0)$  ( $y = 53$  nm). Wykonano doświadczenie w warunkach

opisanych tym punktem i otrzymano sfery o średnicy 60 nm. Różnica 7 nm między średnicą sfer wynikającą z równania a doświadczalną jest mniejsza niż  $2\sigma$  (9,8 nm). Zatem równanie dobrze opisuje wpływ zmiennych wejściowych na rozmiar otrzymanych cząstek.



Rys. 2. Zależność średnicy nanosfer ( $y$ , nm) od szybkości mieszania ( $x_1$ ) i średniej wagowo masy molowej PVA ( $x_3$ ) (Temperatura procesu –  $x_2 = -1$ )

Należy mieć na uwadze, że każda metoda analityczna charakteryzuje się innym błędem pomiaru wynikającym z różnego sposobu wyznaczania danej wielkości fizycznej. Wykonana optymalizacja jest adekwatna tylko przy zastosowaniu tej metody analitycznej. W przypadku pomiaru metodą DLS wyznaczany jest promień hydrodynamiczny cząstek, na który wpływ ma ich otoczenie (np. obecność stabilizatora o różnej długości łańcucha). Otrzymane równanie regresji wskazuje na duży wpływ ciężaru cząsteczkowego stabilizatora, ale niewiele mniejszy wpływ ma efekt współdziałania ciężaru z szybkością mieszania. Stwierdzono, że w badanym zakresie zmiennych w zaznaczonym na rys. 2 obszarze (powierzchnia odpowiedzi równania regresji) otrzymuje się sfery o mniejszym rozmiarze mimo użycia stabilizatora ( $x_3$ ) o większej średniej masie molowej.

### Wnioski

Otrzymano sfery z proleku PLA-CF o rozmiarze od kilkudziesięciu do ok. 100 nanometrów.

Wyznaczono adekwatne i potwierdzone doświadczalnie równanie regresji opisujące wpływ parametrów procesu na rozmiar sfer z proleku PLA-CF otrzymywanych metodą emulsyjną z odparowaniem rozpuszczalnika. Równanie to pozwala na otrzymanie sfer o zadanym rozmiarze.

Największy wpływ na rozmiar sfer ma średni ciężar cząsteczkowy stabilizatora. Duży wpływ ma również efekt współdziałania ciężaru stabilizatora i szybkości mieszania. Byłoby to trudne do zaobserwowania w klasycznej analizie procesu *po jednej zmiennej*. Natomiast średnica sfer najmniej zależy od temperatury procesu.

Proces jest powtarzalny, co jest niezwykle ważne z punktu widzenia potencjalnej aplikacji w przemyśle farmaceutycznym.

Prezentowane badania dają podstawę do dalszych badań nad systemami o kontrolowanym czasie uwalniania zawierającymi chlorofenetyne. Należy zbadać, czy sfery z proleku PLA-CF zachowały aktywność antymikrobiologiczną oraz czy uwalniają chlorofenetyne w sposób kontrolowany.

### LITERATURA

- Dziewiętnasta Dyrektywa Komisji Europejskiej, 96/41/WE, 25.06.1996. dostosowująca do postępu technicznego załączniki II, III, VI i VII do dyrektywy Rady 76/768/EWG w sprawie zbliżenia ustawodawstw Państw Członkowskich odnoszących się do produktów kosmetycznych.
- Hoffman A.S., (2008). *J. Controlled Release*, 132, 152-163, DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.08.012
- Nawagarna B.V., Yadav H.K.S., Ayaz A, Vasudha L.S, Shivakumar H.G., (2012). Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles - a review. *Asian J. Pharm. Clin. Res. Suppl.* 5(3), 16-23, (ISSN: 0974-2441)
- Quan J., Wu Q., Lin X-F., (2007). *Polymer*, 48, 2595-2604, DOI: 10.1016/j.polymer.2007.03.014
- Quan J., Wu Q., Zhu L-M., Lin X-F., (2008). *Polymer*, 49, 3444-3449, DOI: 10.1016/j.polymer.2008.06.009

*Praca została sfinansowana w ramach działań statutowych Laboratorium Procesów Technologicznych Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej 504/P1021/0444/000.*