

**Ewa DŁUSKA, Agnieszka MARKOWSKA-RADOMSKA, Agata METERA**

e-mail: e.dluska@ichip.pw.edu.pl

Zakład Kinytyki i Termodynamiki Procesowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika warszawska, Warszawa

**Wymiana masy w procesie uwalniania kilku składników czynnych z emulsji wielokrotnych****Wstęp**

Problematyka jednoczesnego uwalniania kilku składników aktywnych dotyczy m.in. nurtu badawczego nowych nośników leków skojarzonych do terapii ukierunkowanych [Perrett i Rathbone, 2012]. W grupie tych nośników obok strukturyzowanych włókien, czy cząstek dowolnego kształtu typu rdzeń – otoczka, wyróżnić można ciekłe układy rozproszone, takie jak emulsje wielokrotne [Aserin, 2008; Lee i in., 2013;].

Hierarchicznie zorganizowana struktura emulsji wielokrotnych (krople w kroplach) umożliwia zamykanie kilku składników chemicznie i biologicznie czynnych w rozproszonej fazie wewnętrznej (krople wewnętrzne) lub membranowej (krople, w których rozproszone są krople wewnętrzne) i ich uwalnianie z określoną szybkością. Szybkość uwalniania składnika może być kontrolowana parametrami fizykochemicznymi faz ciekłych emulsji i strukturą wewnętrzną emulsji (rozmiar i rozkład rozmiarów kropeł oraz wielkość ich upakowania). Układy takie charakteryzują się dużą powierzchnią międzyfazową, a ich funkcjonalna struktura nadaje cech szczególnie poszukiwanych w takich obszarach jak medycyna, farmacja, przemysł chemiczny czy ochrona środowiska [Aserin, 2008].

W zakresie zastosowań medycznych substancja aktywna np. toksyczny chemoterapeutyk zamknięty w kroplach wewnętrznych emulsji jest oddzielony od środowiska zewnętrznego (zdrowe komórki) warstwą membranową chroniącą te komórki. W konsekwencji można częściowo rozwiązać problem toksyczności substancji czynnych w stosunku do zdrowych tkanek w porównaniu do klasycznych postaci chemoterapeutyków. Struktura emulsji wielokrotnych umożliwia też wprowadzenie na powierzchnie kropeł dodatkowych substancji np. przeciwciał rozpoznających receptory odpowiedzialnych komórek. W rezultacie emulsje z modyfikowanymi powierzchniami kropeł mogą selektywnie oddziaływać na np. komórki nowotworowe, co jest podstawą idei terapii ukierunkowanych zwiększających efektywność działania leku.

Celem pracy było zbadanie szybkości i mechanizmu jednoczesnego uwalniania dwóch substancji aktywnych (tzw. ko-uwalnianie) enkapsulowanych w emulsjach wielokrotnych o różnych strukturach wewnętrznych. Wyniki uwalniania dla układów emulsyjnych z dwoma modelowymi składnikami porównano z wcześniejszymi wynikami zespołu dla jednego składnika (leku) [Dłuska i Markowska-Radomska, 2010]. Praca jest częścią rozpoczętych szerszych badań emulsyjnych platform do dostarczania chemoterapeutyków stosowanych klinicznie w chorobach nowotworowych.

**Proces wytwarzania i enkapsulacji dwóch składników w emulsjach wielokrotnych**

**Aparatura.** Proces emulsyfikacji i enkapsulacji dwóch substancji czynnych prowadzono w biokontaktorze z przepływem Couette'a-Taylor (CTF) w różnych warunkach hydrodynamicznych (częstość obrotów cylindra wewnętrznego, wielkość i stosunek strumieni faz ciekłych wprowadzanych do kontaktora) dla różnych początkowych stężeń substancji aktywnych. Zakres parametrów prowadzenia procesu podano w tab. 1 i 2.

**Materiały.** Badania prowadzono dla wstępnie wybranych prostych modelowych substancji aktywnych tj. salicylanu fenylu (salolu) jako składnika podstawowego oraz kwasu benzoowego i witaminy B2 jako drugiego składnika. Wytwarzano emulsje typu

$O_1/W/O_2$  w warunkach podanych w tab. 1 dla układów a i b oraz w tab. 2 dla układów A, BI, BII, CI, CII.

Skład układu emulsyjnego a i b: faza  $O_1$ : parafina ciekła +salol, W: woda destylowana + żelatyna (15% mas.) + sacharoza (5% mas.)+ witamina B2,  $O_2$ : parafina ciekła. Skład układu A, BI, BII, CI, CII: faza  $O_1$ : parafina ciekła + salol + kwas benzoowy, W: woda destylowana + żelatyna (15% mas.) + sacharoza (5% mas.),  $O_2$ : parafina ciekła. Na podstawie obserwacji mikroskopowych struktury kropeł emulsji do badań jednoczesnego uwalniania wytypowano układy A, B i C, które cechowała dłuższa w czasie stabilność i przeważający udział kropeł wielokrotnych w całej populacji w porównaniu do układów a i b. Charakterystykę układów emulsyjnych przedstawiono w tab. 2.

Tab. 1. Warunki wytwarzania emulsji a i b z dwoma składnikami aktywnymi w biokontaktorze z przepływem Couette'a-Taylor

Układ	a	b
Faza wewnętrzna: stężenie salicylanu fenylu, [% mas]	10	10
Faza membranowa: stężenie witaminy B2, [% as · 10 <sup>3</sup> ]	3,0	2,0
$V_{O1} = 50 \text{ cm}^3/\text{min}$ , $V_W = 10 \text{ cm}^3/\text{min}$ , $V_{O2} = 100 \text{ cm}^3/\text{min}$ , częstość obrotów cylindra kontaktora: 1080±2360 obr/min		

**Proces jednoczesnego uwalniania dwóch składników z emulsji wielokrotnych**

**Aparatura.** Badania uwalniania salicylanu fenylu i kwasu benzoowego prowadzono dla wytypowanych emulsji różniących się strukturą wewnętrzną i zawartością składników (Tab. 2) w temperaturze 37°C w standardowym szklanym zbiorniku o średnicy 10 cm i objętości 0,976 dm<sup>3</sup> dla dwóch częstości obrotów mieszadła 150 i 250 obr/min. Wymiary mieszadła wynosiły: średnica 5 cm; szerokość łopatek 0,5 cm, kąt nachylenia 45°.

**Metodyka.** Szybkość uwalniania składników wyznaczano na podstawie analizy chromatograficznej stężeń każdego ze składników w fazie zewnętrznej emulsji. Stężenie salicylanu fenylu oznaczano metodą chromatografii gazowej z detekcją MS (spektrometria masowa), natomiast stężenie kwasu benzoowego metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Tab. 2. Charakterystyka emulsji wielokrotnych z dwoma składnikami aktywnymi do badań uwalniania i warunki ich wytwarzania w biokontaktorze z przepływem Couette'a-Taylor

Układ	A	BI	BII	CI	CII	
stężenie salicylanu fenylu, [% mas]	9,25	10	10	10	10	
stężenie kwasu benzoowego, [% mas] · 10 <sup>3</sup>	2,68	9,09	9,09	2,95	2,91	
częstość obrotów cylindra kontaktora, obr/min	1622	1622	1802	1622	1802	
krople fazy membranowej	$D_{32}$ , [μm]	71,9	99,2	68,1	73,7	65,8
krople fazy wewnętrznej	$d_{32}$ , [μm]	10,4	8,9	24,9	10,9	10,9
φ, [%]		52,8	66,9	88,1	39,1	73,6
stopień enkapsulacji salolu, $EE_{salol}$ , [%]		57,2	70,0	79,0	42,5	77,2
stopień enkaps. kw. benzoosow. $EE_{kw,b}$ , [%]		55,6	71,6	77,9	43,7	76,0
$V_{O1} = 50 \text{ cm}^3/\text{min}$ , $V_W = 15 \text{ cm}^3/\text{min}$ , $V_{O2} = 100 \text{ cm}^3/\text{min}$						

## Wyniki i dyskusja

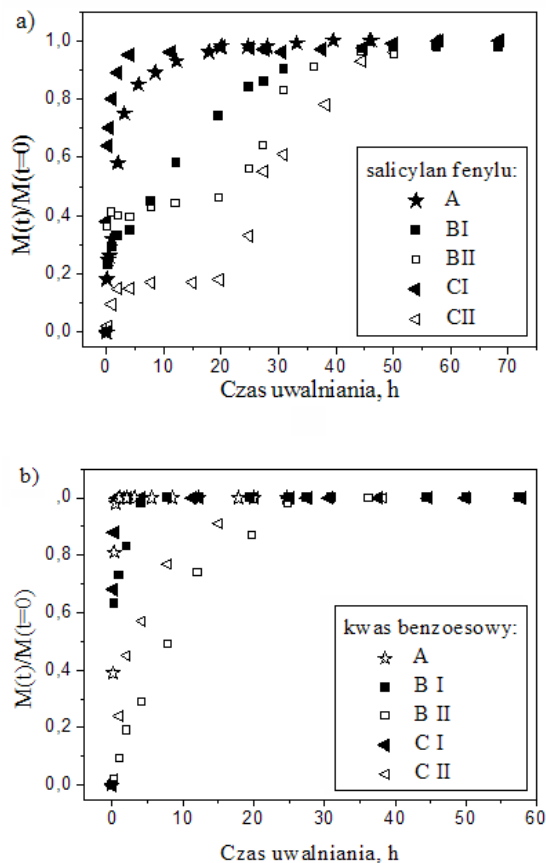
Identyfikacja mechanizmów uwalniania obejmowała analizę obrazu mikroskopowego morfologii kroplel emulsji w trakcie procesu uwalniania. Obserwacje obrazu dla badanych układów A, BI, BII, CI, CII wykazały, że krople nie ulegały rozpadowi, ani widocznym deformacjom. Pozwoliło to potwierdzić założony dyfuzyjny mechanizm jednoczesnego uwalniania obu składników.

Na rys. 1 przedstawiono doświadczalne profile uwalniania salicylanu fenylu (salol) w obecności kwasu benzoowego w postaci zależności skumulowanego ułamka masowego substancji uwolnionej  $M(t)/M(t=0)$  od czasu uwalniania. We wszystkich badanych układach obserwowano występowanie dwuetapowego uwalniania salicylanu fenylu z kroplel fazy wewnętrznej do fazy zewnętrznej.

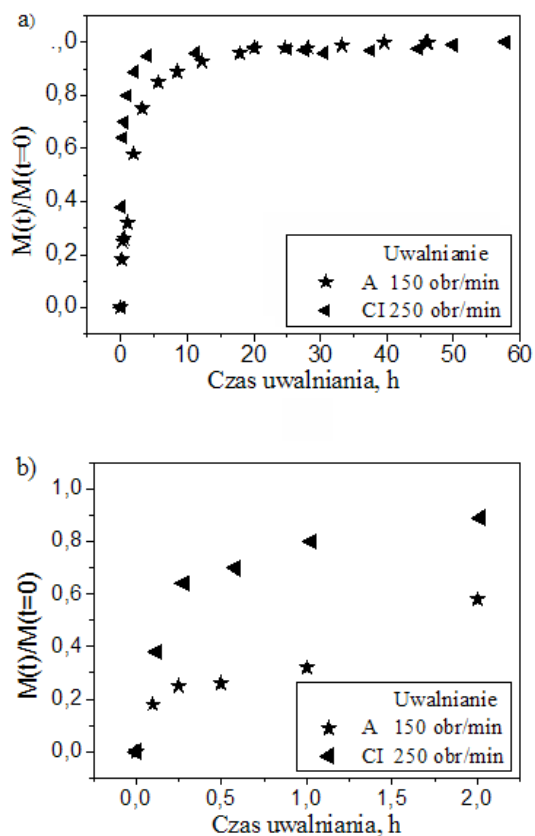
Długość etapu wstępnego uwalniania wynikała ze struktury danej układu emulsyjnego. Im bardziej upakowane były kroplel fazy membranowej i większe kroplel fazy wewnętrznej, tym dłuższy był czas uwalniania wstępnego (Rys. 1a).

Na rys. 1b przedstawiono wyniki badań szybkości uwalniania kwasu benzoowego w obecności salicylanu fenylu. Uwalnianie kwasu benzoowego, jako drugiego składnika aktywnego zawartego obok salicylanu fenylu w kroplach wewnętrznych, we wszystkich badanych układach emulsyjnych miało przebieg jednoetapowy.

Wpływ zewnętrznego oporu na szybkość transportu masy w procesie uwalniania składnika (wpływ częstości obrotów mieszadła w zbiorniku), przedstawiono na rys. 2. Przykład dotyczy uwalniania salolu z układów emulsji A i CI wybranych jako układy wytwarzane w kontaktorze CTF w zbliżonych warunkach procesowych. Zgodnie z oczekiwaniami salol uwalniał się wolniej przy niższej częstości obrotów mieszadła w zbiorniku. Uzyskane wyniki potwierdziły wpływ struktury wewnętrznej emulsji wielokrotnych, a tym samym warunków ich wytwarzania w kontaktorze CTF na szybkość uwalniania.



Rys. 1. Profile uwalniania a) salicylanu fenylu (salol) i b) kwasu benzoowego z kroplel wewnętrznych emulsji wielokrotnych dla badanych układów emulsyjnych: A, BI, BII, CI, CII



Rys. 2. Profile uwalniania salicylanu fenylu (salolu) z emulsji wielokrotnych A i CI – wpływ częstości obrotów mieszadła w aparacie typu zbiornik z mieszadłem na szybkość uwalniania: a) profile uwalniania dla całkowitego czasu procesu; b) profile w powiększeniu dla początkowego etapu uwalniania

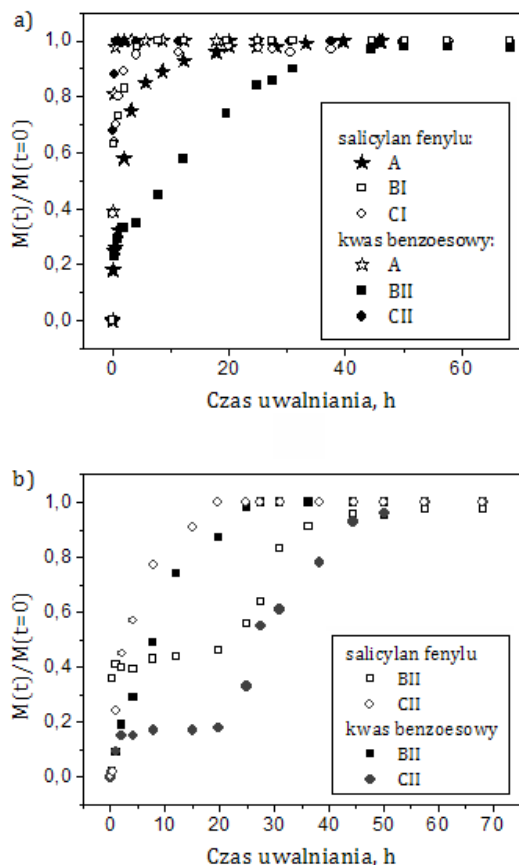
Z emulsji wytworzonych przy niższej częstości obrotów cylindra salol uwalniał się szybciej w porównaniu do emulsji wytwarzanych przy wyższej częstości obrotów. Emulsje wytworzone przy niższej częstości obrotów cylindra charakteryzowały się mniejszymi średnimi średnicami *Sautera* oraz większą polidispersyjnością kroplel fazy wewnętrznej w porównaniu z emulsjami otrzymanymi przy wyższej częstości obrotów cylindra. Kwas benzoowy podobnie, jak salicylan fenylu uwalniał się szybciej z emulsji wytworzonych przy niższej częstości obrotów cylindra w porównaniu do emulsji wytwarzanych przy wyższej częstości obrotów.

Na rys. 3 przedstawiono porównanie wyników jednoczesnego uwalniania kwasu benzoowego i salicylanu fenylu. Kwas benzoowy uwalniał się jako pierwszy, a uwalnianie miało przebieg jednoetapowy.

Stwierdzono istnienie obszaru jednoczesnego uwalniania salolu i kwasu benzoowego, co związane jest ze wstępnym uwalnianiem salolu znajdującego się po procesie enkapsulacji tuż przy powierzchni międzyfazowej: kroplel wewnętrzne/kroplel fazy membranowej. Kwas benzoowy był uwalniany najszybciej z emulsji układów A oraz CI.

W celu porównania profili uwalniania salolu, jako jedynego składnika zamkniętego w emulsjach oraz w obecności kwasu benzoowego wykorzystano wyniki wcześniejszych badań zespołu z samym salolem [Dłuska i Markowska-Radomska, 2010; Markowska-Radomska i Dłuska, 2012]. Porównywane układy emulsyjne wytwarzano w podobnych warunkach, które zapewniały uzyskiwanie emulsji o zbliżonych strukturach wewnętrznych, Rys. 4.

Z porównania profili uwalniania wynika, że obecność drugiego składnika znacząco zmienia kinetykę uwalniania. Salol występujący jako jedyny składnik czynny w emulsjach, uwalniał się jednoetapowo, natomiast w układzie z dodatkowym składnikiem (kwas benzoowy), obserwowano dwuetapowy przebieg procesu uwalniania.



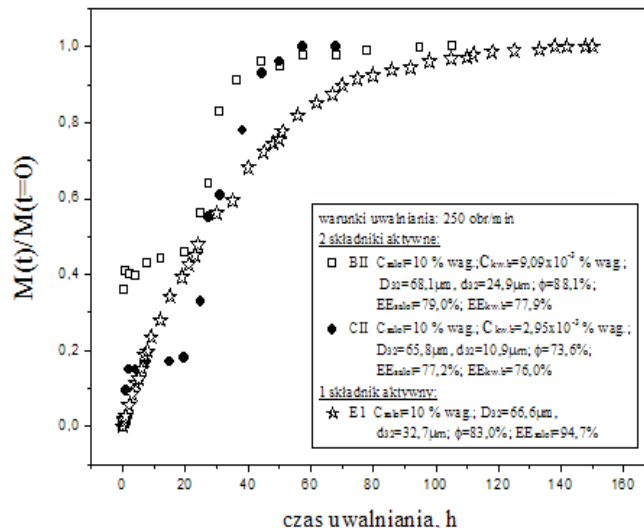
Rys. 3. Profile jednoczesnego uwalniania kwasu benzooesowego i salicylanu fenylu z emulsji wielokrotnych dla badanych układów emulsyjnych wytwarzanych przy częstotliwości obrotowej a) 1622 obr/min, b) 1802 obr/min

Uwalnianie salolu z emulsji z dwoma składnikami trwało krócej (dla BII i CII ok. 55 godzin), podczas gdy w układzie z samym salolem uwalnianie w podobnych warunkach mieszania proces uwalniania trwał 120 godzin.

Podczas jednoczesnego zamykania salolu z kwasem benzooesowym sprawność enkapsulacji była niższa niż w przypadku enkapsulacji samego salolu. Ponadto emulsje z jednym składnikiem cechowała stabilność znacznie wyższa niż dla układów z dwoma składnikami.

### Wnioski

Przeprowadzone badania wymiany masy w procesie jednoczesnego uwalniania dwóch składników aktywnych enkapsulowanych w kroplach fazy wewnętrznej emulsji wielokrotnych pozwalają stwierdzić, że poprzez dodatek kolejnego składnika aktywnego można zmieniać przebieg uwalniania składnika podstawowego.



Rys. 4. Porównanie profili uwalniania jednego i dwóch składników czynnych z emulsji wielokrotnych

Możliwość uzyskania wyżej wymienionej modyfikacji kinetyki uwalniania stwarza potencjalne nowe zastosowania emulsji wielokrotnych, jako bio-nośników do kontrolowanego uwalniania kilku substancji leczniczych.

Badania są kontynuowane w aspekcie wykorzystania emulsji wielokrotnych do selektywnego transportu chemoterapeutyków.

### LITERATURA

- Aserin A., 2008. *Multiple emulsion: Technology and Applications*. J. Wiley & Sons, USA.
- Dłuska E., Markowska-Radomska A., 2010. A mathematical model for predicting release rate from multiple emulsions and micro/nanospheres, *Chem. Eng. Technol.*, **33**, 1471-1480. DOI: 10.1002/ceat.201000095
- Lee J.H., Ko I.H., Jeon S., Chae J., Chang J.H., 2013. Micro-structured hydroxyapatite microspheres for local delivery of alendronate and BMP-2 carriers. *Mater. Lett.*, **105**, 136-139. DOI: 10.1016/j.matlet.2013.04.082
- Markowska-Radomska A., Dłuska E., 2012. The multiple emulsion entrapping active agent produced via one-step preparation method in the liquid-liquid helical flow for drug release study and modeling, *Colloid. Polym. Sci.: Prog. Colloid. Polym. Sci.*, **139**, 29-34. DOI: 10.1007/978-3-642-28974-3\_6
- Perrett S., Rathbone M.J., 2012. *The shaping of controlled release drug product development by emerging trends in the commercial, regulatory, and political macroenvironment* [in:] Fundamentals and applications of controlled release drug delivery. Springer, 571-577

*Praca była finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych w ramach projektu nr 2014/13/B/ST8/04274*