

Otrzymywanie mikrosfer chitozanowych metodą emulsyjno-sieciującą z zastosowaniem trifosforanu (TPP) i aldehydu glutarowego (GLT)

Emilia Szymańska, Katarzyna Winnicka, Monika Muško

Zakład Farmacji Stosowanej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Adres do korespondencji: Katarzyna Winnicka, Zakład Farmacji Stosowanej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2c, 15-222 Białystok, tel./faks: 085 748 56 16, e-mail: kwin@umwb.edu.pl

Preparation of chitosan microspheres by emulsion/polymerization method using tripolyphosphate (TPP) and glutaraldehyde (GLT) · Chitosan microspheres are promising candidates in controlled release drug delivery especially for instable and sensitive drugs. Among various methods of microspheres' preparation emulsion/polymerization method based on ion cross-linking is thought to be suitable for chitosan microspheres technology because of its simplicity and mild characteristic. In this paper, chitosan microspheres preparation by the emulsion/polymerization method using tripolyphosphate (TPP) and glutaraldehyde (GLT) as cross-linkers was described. The influence of the type of oil phase, water/oil ratio, surfactant, pH, TPP concentration and additional cross-linking with GLT was evaluated. It was found that type of oil is very important in microspheres formation. Liquid paraffin seems to be inappropriate due to difficulties with purification of microspheres, therefore less viscous Miglyol 812 could be more suitable. Crucial factors for microspheres preparation were both pH solution before and after cross-linking. TPP/chitosan microspheres had much poorer mechanical strength compare to GLT/chitosan microspheres. In addition, water/oil volume ratio and surfactant concentration less importantly affected the microspheres preparation.

Keywords: microspheres, chitosan, tripolyphosphate, emulsion/polymerization method.

© Farm Pol, 2010, 66(4): 238-242

Wstęp

Wśród postaci leków o kontrolowanym uwalnianiu od lat dużym zainteresowaniem cieszą się mikrosfery – kuliste cząstki o średnicy 1–500 µm, w których substancja lecznicza jest inkorporowana w matrycy polimeru. Cząstki te charakteryzuje biogodność, wysoka biodostępność, a dzięki odpowiednio dobranej polimerowej

matrycy, ulegającej powolnej degradacji – możliwość uzyskania przedłużonego profilu uwalniania substancji czynnej. Zaletą tej postaci leków jest ponadto zdolność do zamykania nietrwających substancji leczniczych, takich jak białka (hormony, enzymy, przeciwciała) czy materiał genetyczny. Wadą będącą poważnym ograniczeniem w otrzymywaniu mikrosfer jest ich nietrwałość, a tym samym trudności z wyjąłowieniem [1, 2].

Do najczęstszych sposobów otrzymywania mikrosfer na skalę laboratoryjną należą metody emulsyjne oraz polimeryzacji (sieciowania). W metodzie polimeryzacji, w zależności od charakteru zastosowanego czynnika sieciującego, dochodzi do powstania kulistych mikrosfer na drodze oddziaływań fizycznych (trifosforan pentasodu – TPP) lub chemicznych (aldehyd glutarowy) podczas wkraplania roztworu polimeru do naczynia z czynnikiem sieciującym. W metodach emulsyjnych wodny roztwór polimeru zostaje połączony z fazą organiczną za pomocą odpowiedniego emulgatora, a do powstania mikrosfer dochodzi podczas eliminacji fazy hydrofobowej (poprzez odparowanie czy ekstrakcję) lub podczas dodawania czynnika sieciującego [3].

W ostatniej dekadzie pojawiło się wiele doniesień na temat otrzymywania mikrosfer chitozanowych za pomocą metod emulsyjnych i polimeryzacji. Zwraca się uwagę zwłaszcza na prostotę wykonania chitozanowych mikrosfer tymi metodami, łatwość oddzielenia uzyskanych cząstek, łagodne warunki procesu oraz brak konieczności stosowania rozpuszczalników organicznych [4, 5]. Duże nadzieje na otrzymywanie mikrosfer budzi TPP – nietoksyczny związek zdolny do tworzenia trwałych połączeń z grupami aminowymi chitozanu w szerokim zakresie pH (1,9–7,5) [6].

Celem pracy była ocena wpływu wybranych parametrów technologicznych na przygotowanie mikrosfer

chitozanowych metodą emulsyjno-sieciującą, z wykorzystaniem TPP oraz GLT jako czynników sieciujących. Metoda ta poprzez wprowadzenie fazy olejowej pozwala uniknąć niedogodności spotykanych w klasycznej metodzie polimeryzacji, tj. powstawania dużych mikrosfer o nieregularnych, kropłopodobnych kształtach [7]. W pracy zbadano wpływ rodzaju fazy olejowej, stosunku faz w/o, ilości surfaktanta, ilości i typu czynnika sieciującego oraz pH – parametrów kluczowych przy otrzymywaniu mikrosfer.

Materiały i metody

Odczynniki

Chitozan – CHN (MMW, 75-85% deacetylacja), trifosforan pentasodu – TPP (Sigma Aldrich, Steinheim, Niemcy), parafina ciekła (Maga-Herba, Legionowo, Polska), olej rycynowy (Microfarm, Kraków, Polska), frakcjonowany olej kokosowy – Miglyol 812 (Caesar&Loretz, Hilden, Niemcy), aldehyd glutarowy 50% – GLT, oleinian sorbitanu – Span 80 (Sigma Aldrich, Steinheim, Niemcy), n-heksan (POCH, Gliwice, Polska), alkohol izopropylowy (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy).

Aparatura

Mieszadło mechaniczne IKA, Yellow Line OST 20 digital (IKA POL, Warszawa, Polska), wirówka MPW-365 (Mechanika Precyzyjna, Warszawa, Polska), viskozymetr rotacyjny Haake Viscotester 6 Plus (Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Niemcy), pH-metr mikrokomputerowy CP-401 (Elmetron, Zabrze, Polska), mikroskop biologiczny badawczy z kamerą Motic BA400 (Motic, Wetzlar, Niemcy).

Metoda otrzymywania mikrosfer

Mikrosfery otrzymywano metodą emulsyjno-sieciującą. Chitozan (CHN) rozpuszczano w 2% kwasie

octowym, tak aby uzyskać 2% stężenie roztworu polimeru (w/v) (pH = 3,7–4,0). Roztwór CHN przesączano pod ciśnieniem przez filtr membranowy 0,45 µm. Przy pomocy igły o tępy ostrzu (Ø 0,5 mm) do fazy olejowej z dodatkiem Spanu 80 jako surfaktantu dodawano kroplami roztwór CHN. Mieszaninę mieszano z prędkością 500 obr/min przy użyciu mieszadła mechanicznego. Po 15 minutach kroplami (przy pomocy igły Ø 0,8 mm) dodawano 8% lub 10% roztwór czynnika sieciującego – TPP o odpowiednim pH. Powstałą emulsję mieszano z prędkością 600 obr/min przez 2–3 godziny, tj. czas potrzebny do usieciowania CHN.

Po wytypowaniu optymalnego sposobu sporządzania zawiesiny mikrosfer, zastosowano dodatkowe sieciowanie za pomocą aldehydu glutarowego. Mikrosfery otrzymywano wykorzystując 50% aldehyd glutarowy, który dodawano po 2 godzinach od wkroplenia TPP (stosunek czystego GLT do CHN 1:1), a układ mieszano dodatkowo przez 30 minut.

W doświadczeniach określano wpływ rodzaju fazy olejowej (wykorzystano olej mineralny – parafinę płynną, olej roślinny – olej rycynowy, frakcjonowany olej kokosowy – Miglyol 812), wpływ stosunku faz w/o (1: 5–1: 3), ilości emulgatora (1–3% Span 80) oraz wpływ pH 8% i 10% TPP (5,0; 6,0; 7,0), (tabela 1).

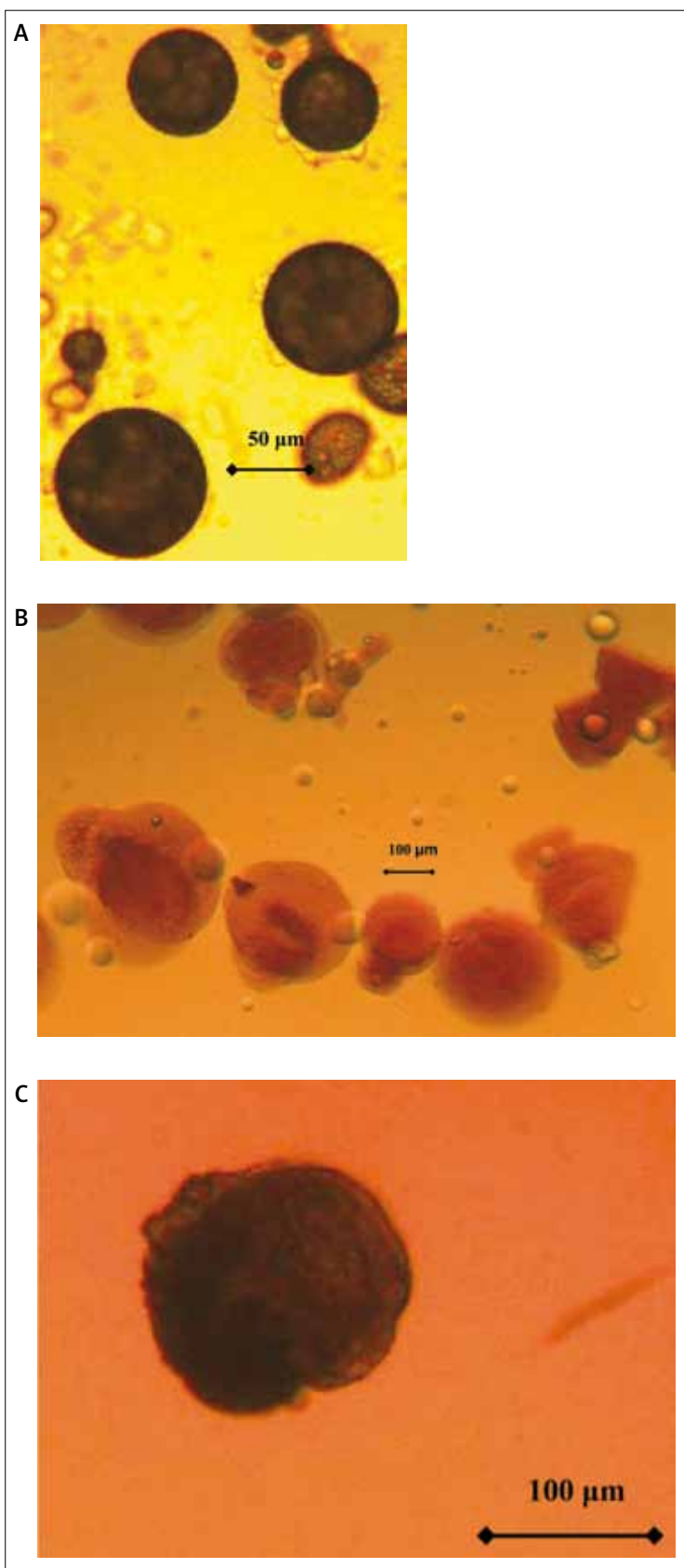
Rozdział mikrosfer

W doświadczeniach przeprowadzonych z użyciem parafiny ciekłej, w celu pozbycia się fazy olejowej stosowano wirowanie (10 tys. obr/min, 10–15 min, 4°C) [5], a następnie przemywanie powstałego osadu n-heksanem lub/i alkoholem izopropylowym. W pozostałych doświadczeniach pomijano etap wirowania, ponieważ do rozdziału faz dochodziło po zaprzestaniu mieszania, a powstałe cząstki z łatwością przechodziły do fazy wodnej.

Tabela 1. Wpływ wybranych parametrów na otrzymywanie mikrosfer chitozanowych metodą emulsyjno-sieciującą

Parametr/formulacja	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	OR1	OR2	OR3	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	
Parafina ciekła	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+													
Typ oleju	Olej rycynowy										+	+	+										
	Miglyol 812														+	+	+	+	+	+	+	+	+
Stosunek faz w/o	1:5	1:5	1:5	1:4	1:4	1:4	1:3	1:3	1:3	1:4	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3
% TPP	8%	8%	8%	8%	8%	8%	8%	8%	8%	10%	8%	10%	8%	8%	8%	8%	8%	8%	10%	8%	10%	8%	8%
pH 2% CHN*	3,7	4,0	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	4,0	4,0	4,0	4,0	3,7	3,7	3,7	3,7	4,0	4,0	3,9	3,9	3,9	3,9
pH TPP*	5,0	6,0	7,0	5,0	6,0	7,0	6,0	6,0	6,0	7,0	5,0	6,0	7,0	7,0	6,0	5,0	6,0	6,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
% Span 80	1%	1%	1%	1%	1%	2%	1%	2%	3%	2%	3%	2%	2%	1%	1%	1%	3%	2%	1%	1%	2%	2%	2%
50% GLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Wynik	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+/-	+	+	+

P1–P10 – doświadczenia z użyciem parafiny ciekłej, OR1–OR3 – doświadczenia z użyciem oleju rycynowego, M1–M9 – doświadczenia z użyciem Miglyolu 812
Wynik (+) – obecne mikrosfery, (-) – brak mikrosfer, (+/-) – oprócz mikrosfer obecne fragmenty usieciowanego CHN * – pH do odpowiednich wartości doprowadzono za pomocą roztworu kwasu octowego



Rycina 1. Mikrosfery chitozanowe otrzymane metodą emulsyjno-sieciującą: (A) z wykorzystaniem parafiny ciekłej jako fazy olejowej (P6), powiększenie 40× (B) z wykorzystaniem Miglyolu 812 jako fazy olejowej (M5), powiększenie 10× (C) po dodatkowym usieciowaniu aldehydem glutarowym (M7), powiększenie 40×

Pomiar lepkości

Lepkość faz olejowych badano w temperaturze pokojowej przy użyciu wiskozymetru rotacyjnego Viscotester 6 Plus z cyfrowym wyświetlaczem Thermo Haake.

Pomiar pH

Wartość pH roztworów CHN, TPP oraz mieszanin poreakcyjnych określano w temperaturze pokojowej. Wyniki stanowią średnią z trzech pomiarów.

Omówienie wyników

Metoda emulsyjno-sieciująca uznawana jest za stosunkowo prosty sposób otrzymywania mikrosfer chitozanowych [4]. W zastosowanej metodzie powstawanie mikrosfer odbywa się dzięki interakcjom jonowym pomiędzy dodatnimi grupami aminowymi CHN i ujemnymi jonami fosforanowymi (głównie $-P_3O_{10}^{5-}$). Użycie fazy olejowej pozwala przezwyciężyć problemy występujące przy otrzymywaniu mikrosfer klasyczną metodą sieciowania, jak np. powstawanie dużych, uwarunkowanych średnicą igły cząstek (>1 mm) oraz tworzenie agregatów [6].

We wszystkich doświadczeniach użyto roztwór CHN w stężeniu 2%, optymalnym do otrzymania mikrosfer [8] i jednocześnie zapewniającym swobodne przeciskanie roztworu przez igłę o średnicy 0,5 mm. Przy wyższych stężeniach CHN, a tym samym wyższej jego lepkości, dochodziło bowiem do deformacji kropli i zatykania igły. Czas potrzebny na całkowite usieciowanie CHN został ustalony doświadczalnie i wynosił 2,5 godziny.

Wpływ doboru fazy olejowej

Zaobserwowano, że na otrzymywanie mikrosfer istotny wpływ wywierał rodzaj zastosowanej fazy olejowej. W przypadku parafiny płynnej, uzyskane mikrosfery charakteryzowały się kulistym kształtem i gładką powierzchnią, a ich wielkość w obrazie mikroskopowym nie przekraczała 80 µm (**rycina 1 A**).

Zastosowanie oleju rycynowego o wyższej lepkości (ok. 705 [mPa·s]) w porównaniu z parafiną (ok. 166 [mPa·s]) nie umożliwiło w żadnej z formułacji (OR1-OR3) uzyskania mikrosfer. Może to sugerować, że zbyt wysoka lepkość fazy olejowej nie zapewnia odpowiedniego rozproszenia fazy wodnej roztworu CHN, a w efekcie uniemożliwia powstanie trwałych mikrocząstek.

W doświadczeniach z wykorzystaniem Miglyolu 812 o lepkości około 29 [mPa·s] udało się uzyskać cząstki o średnicy <200 µm (M1, M5–M7). W obrazie mikroskopowym zaobserwowano jednak, że oprócz mikrosfer kulistych, obecne są nieliczne niesferyczne cząstki, ich agregaty oraz pozostałości usieciowanego CHN (**rycina 1 B**).

Dobór fazy olejowej miał także znaczenie podczas rozdziału mikrosfer od fazy olejowej. W doświadczeniach z użyciem parafiny ciekłej, mimo wirowania i przemywania rozpuszczalnikami organicznymi – n-heksanem czy alkoholem izopropylowym, nie udało się w całości pozbyć oleju z powierzchni mikrosfer. Podobne spostrzeżenia poczynili Biro i wsp., którzy ostatecznie zdecydowali o zastąpieniu parafiny ciekłej olejem roślinnym o niższej lepkości [9]. Problemu z rozdziałem mikrosfer nie zaobserwowano natomiast w doświadczeniach z użyciem Miglyolu 812, w których mikrocząstki po zaprzestaniu mieszania przechodziły samoistnie do fazy wodnej, opadając na dno naczynia.

Wpływ pH

W celu określenia wpływu pH na powstawanie mikrosfer do doświadczeń wykorzystano roztwór 8% (w niektórych formułacjach użyto 10% roztwór) TPP o pH 5,0, 6,0, 7,0 (pH doprowadzano do określonych wartości za pomocą kwasu octowego), podczas gdy pH roztworu CHN wynosiło 3,7–4,0. Zakres pH, w którym dochodzi do oddziaływań pomiędzy CHN a TPP jest szeroki i mieści się w granicach 1,9–7,5 [7]. CHN żeluje natomiast przy $\text{pH} \geq 6,5$ [4], zatem przy użyciu czynnika sieciującego o $\text{pH} < 5,0$, pomimo wystąpienia silnych oddziaływań jonowych, problematyczne byłoby uzyskanie trwałych mikrosfer chitozanowych, biorąc pod uwagę dobrą rozpuszczalność CHN w takim pH.

W doświadczeniach z parafiną płynną jako fazą olejową zaobserwowano, że pH 8% TPP nie wpływa na strukturę uzyskanych mikrosfer. Uzyskane wyniki (P1–P3) były zgodne z obserwacjami innych autorów, że w przedziale $\text{pH}=5,0\text{--}7,0$ dochodzi do formowania kulistych mikrosfer [5]. W próbach z użyciem oleju rycynowego, bez względu na pH fazy wodnej, nie udało się otrzymać mikrosfer (tabela 1). Natomiast w doświadczeniu z Miglyolem 812 zaobserwowano obecność mikrocząstek przy użyciu 8% TPP o $\text{pH}=7,0$ (M1), podczas gdy przy pozostałych wartościach pH (M2–M3) nie udało się ich uzyskać. Przy nieznacznym wzroście pH roztworu CHN (3,7 → 4,0) możliwe było otrzymanie mikrosfer z użyciem roztworu TPP o $\text{pH}=6,0$ (M5) (tabela 1). Warto podkreślić, że wpływ na skuteczność metody może odgrywać pH, zarówno przed, jak i po połączeniu ze sobą poszczególnych faz. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że dopiero przy pH mieszaniny $\geq 6,3$ możliwe jest uzyskanie trwałych mikrosfer.

Wpływ ilości surfaktanta

Dodatek emulgatora przy sporządzaniu mikrosfer metodą emulsyjno-sieciującą poprawia kształt oraz wpływa na wielkość uzyskanych mikrocząstek [5], dlatego w pracy zbadano wpływ ilości dodanego surfaktantu (Spanu 80) na efektywność metody otrzymywania mikrosfer (formułacje P1, P6, P9 oraz

M3–M5). Zaobserwowano, że ilość dodanego emulgatora (stanowiącego 1–3% ilości użytej fazy olejowej) nie wpływa na poprawę kształtu mikrocząstek (tabela 1). W doświadczeniach przeprowadzonych bez dodatku emulgatora nie udało się otrzymać mikrosfer. Obecność emulgatora w mieszaninie jest zatem niezbędna do wytworzenia trwałego układu emulsyjnego i zapoczątkowania procesu formowania mikrosfer.

Wpływ stosunku faz woda/olej

W metodzie emulsyjno-sieciującej ważnym czynnikiem pozwalającym uzyskać kuliste, nietworzące agregatów mikrosfery jest odpowiednio niski stosunek fazy wodnej do olejowej. Dodatkowo dużo większa ilość fazy olejowej wpływa na zmniejszenie rozmiarów powstałych cząstek [9]. Optymalny stosunek faz w/o wynosi 1:5–1:3 [5]. Przewaga fazy olejowej pozwala bowiem całkowicie oddzielić krople fazy wodnej od siebie. Zaobserwowano, że wystarczający okazał się stosunek w/o 1:3, umożliwiający zmniejszenie ilości oleju. Otrzymano sferyczne cząstki o stosunkowo małych rozmiarach ($< 200 \mu\text{m}$), a wzrost ilości oleju tylko w niewielkim stopniu wpłynął na obniżenie rozmiarów mikrosfer.

Wpływ stężenia TPP

Minimalne stężenie roztworu TPP potrzebne do całkowitego usieciowania grup $-\text{NH}_3^+$ CHN wynosi 8% [5]. Zbyt niskie stężenie czynnika sieciującego uniemożliwia bowiem formowanie kulistych mikrosfer, a jedynie powstanie bezkształtnych fragmentów żelowanego chitozanu. Przy zastosowaniu 8% TPP w doświadczeniach możliwe było otrzymanie kulistych cząstek. Niestety, mimo sferycznych kształtów, charakteryzowały się one kruchością i okazały się wysoce niestabilne (całkowita deformacja następowała już po 10 min po umieszczeniu w wodzie). Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje innych autorów, że samo sieciowanie fizyczne nie prowadzi do otrzymania trwałych, umożliwiających przedłużone uwalnianie mikrosfer [6]. Zwiększenie ilości TPP do 10% (M8) tylko nieznacznie wydłużyło czas rozpadu w wodzie do 30 minut.

Wpływ dodatkowego sieciowania GLT

W celu poprawy trwałości mikrosfer zastosowano dodatkowe sieciowanie 50% aldehydem glutarowym (M7). Uzyskane mikrosfery (rycina 1 C) były trwałe po wysuszeniu w temperaturze pokojowej, a w roztworze wodnym wykazywały stabilność przez co najmniej 48 godzin.

Wśród postaci leków o kontrolowanym uwalnianiu, od lat dużym zainteresowaniem cieszą się mikrosfery – kuliste cząstki o średnicy 1–500 μm , w których substancja lecznicza jest inkorporowana w matrycy polimeru. Cząstki te charakteryzują biozgodność, wysoka biodostępność, a dzięki odpowiednio dobranej polimerowej matrycy ulegającej powolnej degradacji – możliwość uzyskania przedłużonego profilu uwalniania substancji czynnej.

Wnioski

1. Optymalne kształty i rozmiary mikrocząstek uzyskano przy użyciu parafiny płynnej, lecz, z uwagi na trudności z oczyszczaniem takich mikrosfer, korzystne wydało się zastąpienie parafiny mniej lepkim Miglyolem 812.
2. Stosunek faz w/o 1:3 jest wystarczający do otrzymania kulistych mikrosfer o średnicy <200 µm, a zwiększanie ilości emulgatora (z 1 do 3%) nie wpływa na poprawę kształtu mikrocząstek.
3. Mikrosfery uzyskane z zastosowaniem TPP nie są wystarczająco trwałe, a tym samym nie umożliwiają uzyskania przedłużonego profilu uwalniania. Stabilne mikrocząstki otrzymano po dodatkowym usieciowaniu chemicznym za pomocą aldehydu glutarowego.

Praca została przedstawiona na Konferencji naukowej pt. „Wpływ czynników technologicznych na wchłanianie substancji leczniczej z postaci leku” 18 listo pada 2009 r. w Warszawie. Organizator: Komisja Postaci Leku Farmakokinetiki i Farmacji Klinicznej PAN, Komitet Terapii i Nauk o Leku PAN, Wydział VI Nauk Medycznych PAN, Zakład Farmacji Stosowanej Wydziału Farmaceutycznego WUM.

Otrzymano: 2009.10.20 · Zaakceptowano: 2009.11.18

Piśmiennictwo

1. Sznitowska M.: Technologia mikrocząstek i nanocząstek jako nośników leku. *Farm. Pol.* 2001, 57: 962–969.
2. Burgess D.J., Hickey A.J.: Microsphere technology and applications. w: Swarbrick J. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Informa Healthcare, 2007, 3: 2328–2337.
3. Szymańska E., Winnicka K.: Mikrosfery – nowoczesna postać leku o kontrolowanym uwalnianiu. *Farm. Pol.* 2009, 65: 378–386.
4. Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S. i wsp.: Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. Pharm.* 2004, 274: 1–33.
5. Liu F., Liu L., Li X. i wsp.: Preparation of chitosan – hyaluronate double – walled microspheres by emulsification – coacervation method. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2007, 18: 2215–2224.
6. Shu X.Z., Zhu K.J.: Controlled drug release properties of ionically cross – linked chitosan beads: the influence of anion structure. *Int. J. Pharm.* 2002, 233: 217–225.
7. Shu X.Z., Zhu K.J.: Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation. *J. Microencapsul.* 2001, 18: 237–245.
8. Niu X., Feng Q., Wang M. i wsp.: Preparation and characterization of chitosan microspheres for controlled release of synthetic oligopeptide derived from BMP-2. *J. Microencapsul.* 2008, 15: 1–9.
9. Biro E., Nemeth A.S., Sisak C. i wsp.: Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2008, 70: 1240–1246.