Justyna Pietkiewicz

MIKROSFERY LIPIDOWE JAKO NOWA POSTAĆ LEKU POZAJELITOWEGO: OPRACOWANIE METODY SPORZĄDZANIA I PRÓBA INKORPORACJI SUBSTANCJI LECZNICZYCH

Praca wykonana
w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej
Akademii Medycznej w Gdańsku
i przedstawiona
Radzie Wydziału Farmaceutycznego
w celu uzyskania stopnia
doktora nauk farmaceutycznych

Promotor:
Prof. dr hab. Małgorzata Sznitowska

Gdańsk 2005

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE (SUMMARY) 5

I. WSTĘP 9

1. Rozwój idei submikronowych nośników leku 10
2. Liposfery – charakterystyka nanosfer (SLN®) i mikrosfer lipidowych jako nowej postaci leku 12
3. Metody sporządzania liposfer 16
4. Trwałość zawiesin i zjawisko krystalizacji lipidów 19
5. Inkorporacja substancji leczniczych w liposferach 25
6. Dostępność farmaceutyczna i biologiczna substancji leczniczych z liposfer 31
7. Nanostrukturalne nośniki lipidowe (NLC®) jako zmodyfikowana forma liposfer 40
8. Ocena toksyczności liposfer w zależności od drogi podania 45

II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY 47

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA 50

1. ODCZYNNIKI I APARATURA 51
   - 1.1. Odczynniki 51
   - 1.2. Aparatura 52
   - 1.3. Materiały 53
2. OTRZYMYWANIE ZAWIESINY LIPOSFER DO BADAŃ WSTĘPNYCH 55
   - 2.1. Skład i podstawowy sposób sporządzania zawiesin liposfer 55
   - 2.2. Dobór parametrów technologicznych 56
   - 2.3. Sporządzanie liposfer z lipidem mieszanym 56
   - 2.4. Stabilizacja zawiesiny liposfer polimerami hydrofilowymi 57
   - 2.5. Wyjaławianie zawiesin liposfer 58
3. INKORPORACJA BUPIWAKAINY W LIPOSFERACH 58
   - 3.1. Rozpuszczalność bupiwakainy w wodzie oraz buforach pH 8,0 i pH 7,0 58
   - 3.2. Rozpuszczalność bupiwakainy zasady w lipidach oraz współczynnik podziału lipid/woda 59
   - 3.3. Synteza stearynianu bupiwakainy i identyfikacja otrzymanej substancji 60
   - 3.4. Rozpuszczalność stearynianu bupiwakainy w wodzie i lipidach 60

3.5. Sporządzanie zawiesiny liposfer z bupiwakainą lub stearynianem bupiwakainy 61
3.6. Próba sporządzenia liposfer ze stearynianem bupiwakainy tworzącym matrycę lipidową 62
4. SPORZĄDZANIE I BADANIE KONCENTRATÓW LIPOSFER 63
4.1. Sporządzanie koncentratów liposfer 63
4.2. Badanie koncentratów liposfer 63
4.3. Wyjaławianie koncentratów liposfer 64
5. SPORZĄDZANIE KONCENTRATÓW LIPOSFER Z BUPIWAKAINĄ I STEARYNIANEM BUPIWAKAINY 64
6. SPORZĄDZANIE ZAWIESIN I KONCENTRATÓW LIPOSFER Z INDOMETACYNĄ 65
6.1. Rozpuszczalność indometacyny w lipidach 65
6.2. Sporządzanie zawiesin liposfer z indometacyną 65
6.3. Sporządzanie koncentratów liposfer z indometacyną 67
7. BADANIA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH LIPOSFER 68
7.1. Ocena wizualna 68
7.2. Oznaczanie wielkości cząstek 68
7.3. Obserwacje mikroskopowe 68
7.4. Pomiar pH 68
8. BADANIA REOLOGICZNE 69
9. SZYBKOŚĆ UWALNIANIA INDOMETACYNY 70
10. ANALIZA ILOŚCIOWA BUPIWAKAINY I INDOMETACYNY 71
10.1. Oznaczanie zawartości bupiwakainy i indometacyny w zawiesinach i koncentratach liposfer 71
10.2. Oznaczanie stężenia substancji leczniczych w fazie wodnej zawiesin i koncentratów liposfer 71
10.3. Metoda oznaczania ilościowego bupiwakainy i stearynianu bupiwakainy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) 72
10.4. Metoda oznaczania ilościowego indometacyny z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) 73
11. BADANIE HISTOLOGICZNE TKANKI MIĘŚNIOWEJ PO WSTRZYKNIĘCIU ZAWIESINY NANOSFER I MIKROSFER LIPIDOWYCH 74
11.1. Sporządzanie zawiesiny mikrosfer lipidowych 74
11.2. Sporządzanie zawiesiny nanosfer lipidowych 75

11.3. Sporządzanie izotonicznego roztworu polisorbatu 80 75
11.4. Podawanie domięśniowe zawiesin nanosfer i mikrosfer lipidowych 75
11.5. Badania histologiczne 77

IV. WYNIKI 78

USTALENIE SKŁADU I SPOSOBU SPORZĄDZANIA ZAWIESINY LIPOSFER 79
Dobór parametrów technologicznych 79
Liposfery z Precirolem w mieszaninie z innymi lipidami 87
Stabilizacja zawiesiny liposfer polimerami hydrofilowymi 89
Wyjaławianie zawiesiny liposfer 92
ZAWIESINY LIPOSFER Z BUPIWAKAINĄ ORAZ STEARYNIANEM BUPIWAKAINY 94
Sporządzanie lipofilowej pochodnej bupiwakainy – stearynianu bupiwakainy 95
Zawiesiny liposfer z bupiwakainą lub stearynianem bupiwakainy 97
Próba sporządzenia liposfer ze stearynianem bupiwakainy jako fazą lipidową zawiesiny 100
KONCENTRATY LIPOSFER 100
Wyjaławianie koncentratów liposfer 102
KONCENTRATY LIPOSFER Z BUPIWAKAINĄ LUB STEARYNIANEM BUPIWAKAINY 103
ZAWIESINY I KONCENTRATY LIPOSFER Z INDOMETACYNĄ 105
Zawiesiny liposfer z indometacyną 106
Koncentraty liposfer z indometacyną 109
BADANIA REOLOGICZNE KONCENTRATÓW LIPOSFER 111
SZYBKOŚĆ UWALNIANIA INDOMETACYNY Z KONCENTRATÓW LIPOSFER 114
BADANIA HISTOLOGICZNE TKANKI MIĘŚNIOWEJ PO WSTRZYKNIĘCIU ZAWIESINY NANOSFER I MIKROSFER LIPIDOWYCH 115

V. DYSKUSJA WYNIKÓW 118

VI. WNIOSKI 133

VII. PIŚMIENNICTWO 136

STRESZCZENIE

Celem pracy było opracowanie metody sporządzania mikrosfer lipidowych jako nowej postaci leku pozajelitowego oraz próba inkorporacji substancji leczniczych w tych cząstkach, tak by możliwe było uzyskanie przedłużonego uwalniania i działania leku. Mikrosfery lipidowe są zaliczane do liposfer - biodegradowalnych i biozgodnych nośników leku, których matryce stanowią lipidy stałe w temperaturze ciała ludzkiego. Liposfery występują w postaci zawiesin w fazie wodnej, stabilizowanych przez dodatek emulgatorów. Liczne publikowane w ciągu ostatnich 10 lat prace dotyczą głównie nanosfer lipidowych, które mogłyby być podawane dożylnie, lecz nie zapewniałyby dostatecznie przedłużonego działania leku.

Pierwszy etap pracy polegał na ustaleniu składu i sposobu sporządzania zawiesin liposfer charakteryzujących się odpowiednią wielkością cząstek i stabilnością fizyczną. Jako główny lipid wytypowano Precirol - palmitostearynian glicerolu - natomiast jako emulgatory użyto, pojedynczo lub w mieszaninach, lecytynę jajową, polisorbat 80, poloksamer, Span. Ustalono, że emulgowanie faz w czasie 5 min w temperaturze 80ºC za pomocą mieszadła szybkoobrotowego i następnie chłodzenie w temperaturze 4ºC pozwalało na otrzymanie zawiesiny liposfer (10% lipidu) o wielkości cząstek w zakresie 1-20 µm. Układy zawierające Precirol okazały się jednak nietrwałe i żelowały w krótkim czasie, w zależności od użytego emulgatora. Zawiesiny liposfer płynne podczas długotrwałego przechowywania (co najmniej 2 lata) otrzymano stosując Precirol z Miglyolem w stosunku 4:1 jako składnik matrycy liposfer, a polisorbat 80 (2%) jako emulgator.

Najistotniejszym etapem badań była ocena inkorporacji substancji leczniczych w mikrosferach lipidowych. Jako modelowe substancje lecznicze, o zróżnicowanej lipofilności wytypowano bupiwakainę, stearynian bupiwakainy oraz indometacynę. Nie uzyskano zamykania tych substancji w matrycach liposfer zbudowanych z Precirolu, jego mieszaniny z Miglyolem, ani w liposferach złożonych z innych lipidów. Niezależnie od oznaczonej rozpuszczalności substancji w użytych lipidach, następowała szybka krystalizacja substancji w fazie wodnej zawiesin liposfer i w tej fazie, uzyskanej metodą ultrafiltracji, oznaczano całą dawkę substancji leczniczej.

Poprzez wprowadzenie do układu polimerów hydrofilowych (hydroksyetylocelluloza, karmeloza sodowa, poloksamer) nie zwiększono istotnie stabilności fizycznej ani stopnia inkorporacji substancji leczniczej w zawiesinach liposfer.

Ze względu na niepowodzenie tego etapu badań podjęto próbę tworzenia koncentratów liposfer (50% fazy lipidowej) charakteryzujących się półstałą

konsystencją, przeznaczonych do podania po rozcieńczeniu. Oceniano te układy pod względem wielkości cząstek lipidowych oraz badano ich właściwości strukturalne za pomocą reometru. Wykazano, że układy te charakteryzują się tiksotropią i podlegają zmianom strukturalnym podczas przechowywania lub na skutek wprowadzenia substancji leczniczych.

Z koncentratów otrzymywano przez rozcieńczenie (1:5) zawiesiny liposfer o wielkości cząstek zbliżonej do oznaczanej w zawiesinach liposfer sporządzanych *de novo*. Układy te wyjaławiano termicznie. W czasie tego procesu dochodziło do aglomeracji cząstek lipidowych. Aglomeraty wykrywano także w rozcieńczanych koncentratach. Jednak po ekstruzji przez igłę strzykawki uzyskiwano odpowiednią wielkość cząstek lipidowych w rozcieńczonych koncentratach, co umożliwiałoby ich podanie pozajelitowe.

Po 3-krotnym podaniu domięśniowym szczurom zawiesiny mikrosfer lipidowych w badaniach histologicznych nie wykrywano po 3 dniach pozostałości liposfer w miejscu wstrzyknięcia, podobnie jak po podaniu nanosfer lipidowych, co dowodzi szybkiej biodegradacji tej postaci leku, jak również wskazuje na jej biozgodność.

W koncentratach liposfer uzyskano pozornie większą inkorporację badanych substancji leczniczych. Jednak dalsze badania wykazały, że po rozcieńczeniu następowała szybka krystalizacja substancji leczniczej w fazie wodnej i w zależności od intensywności wytrząsania liposfer podczas rozcieńczania wykrywano w fazie wodnej nawet całą dawkę substancji leczniczej. W badaniu uwalniania wykonanym z użyciem błony dializacyjnej wykryto szybkie uwalnianie indometacyny (w czasie 4-8 godzin) z koncentratu rozcieńczonego, natomiast koncentrat nierozcieńczony zapewniał przedłużone uwalnianie w czasie 48 h. Badania dowiodły, że substancje lecznicze były wykluczane z matrycy lipidowej podczas jej zestalania i ostatecznie ulegały jedynie powierzchniowej adsorpcji na cząstkach utworzonych liposfer.

W toku pracy wskazano na podstawowe wady zawiesin mikrosfer lipidowych, również przypisywane nanosferom: żelowanie, nieprzewidywalną i bardzo małą inkorporację substancji leczniczej lub jej brak, trudną do kontroli powtarzalność adsorpcji substancji leczniczej na powierzchni liposfer. Stabilniejszą i bardziej obiecującą formą liposfer wydają się być koncentraty liposfer.

SUMMARY

The aim of the study was to develop method of preparation of lipid microspheres which could be a new drug delivery formulation and to examine whether it is possible to incorporate active substances in these lipid particles so the prolonged drug release can be achieved. Lipid microspheres are particular type of lipospheres – biodegradable and biocompatible drug carriers, whose matrices are composed of lipids which are solid at body temperature. Lipospheres are presented as suspensions in aqueous phase, stabilized with appropriate emulsifying agents. Many papers were published within last 10 years on lipid nanospheres, which can be given intravenously, but are not suitable for prolonged drug release.

At the first stage of the study composition of the lipospheres in suspension as well as parameters of the technological process were developed in order to achieve proper particle size and physical stability of the system. Precirol (gliceryl palmitostearate) was used as the main lipid, while egg lecithin, polisorbat 80, poloxamer and Span, also in mixtures, were used as emulsifying agents. It was concluded that phase emulsification should be performed at 80ºC with high-shear mixing for 5 min and the cooling was performed at 4ºC. This procedure enabled preparation of lipospheres in suspension (10% lipid), sizing in the range 1-20 µm. The formulations based on Precirol appeared, however, unstable and gelation was observed in a short time, depending on a type of the emulsifying agent. Suspensions of lipospheres which remained liquid for at least 2 years were obtained using Precirol with Miglyol (4:1) as lipid components and polysorbate 80 (10%) as an emulsifier.

Evaluation of ability of lipospheres to incorporate active substances was the most important step of the study. Bupivacaine, bupivacaine stearate and indomethacin were used as model active substances, differing in lipophilicity. Incorporation of these substances was achieved neither in Precirol and Precirol : Miglyol matrices nor in matrices composed of other lipids. Irrespective of their solubility in lipids fast crystallization of the active substances occurred and in the aqueous phase, collected in the ultrafiltration process, total dose of the drug was recovered.

Hydrophilic polymers i.e. hydroxyethylcellulose, sodium carmellose or poloxamer improved neither the physical stability of the system nor the incorporation ability of the drugs in the suspensions of lipospheres.

Regarding the unsuccessful incorporation of active substances an attempt to prepare concentrated lipospheres (50% lipid) with semisolid appearance was undertaken. They are intended for administration after dilution. These formulations were analyzed in respect to the size of the lipospheres as well as their physical

structure was determined using a rheometer. It was demonstrated that the concentrated lipospheres are tixotropic systems and their structure is changing under storage or when active substances are introduced.

The concentrated lipospheres were diluted (1:5) and the size of the lipospheres in the resulting suspensions was similar as in suspensions prepared *de novo*. The formulations were autoclaved what resulted in agglomeration of the particles. The agglomerates were also detected in the diluted formulations. However, when extrusion through a syringe needle was performed, the appropriate size of lipospheres was restored what enable their parenteral administration.

Following 3-fold intramuscular administration of suspension of lipospheres to rats, the histological examination of the tissue revealed that no lipospheres (nanospheres or microspheres) remained after 3 days, what proves that the biodegradation is fast and the carrier is biocompatible.

The increased incorporation of active substances observed in the concentrated lipospheres was only apparent. More detailed study revealed that after dilution of the concentrates fast crystallization of the drugs was evident. Depending how intensive was the shaking during the dilution procedure, in the aqueous phase as much as the total dose of the drug was detected. In the release experiment, when dialysis membrane was employed, fast release of indomethacin was noted (within 4-8 h) from the diluted concentrate, while the undiluted system allowed for prolonged release during 48 h. The experiments demonstrated that expulsion of the active substances occurs from the lipid matrix during the cooling process and finally only drug adsorption on the surface was possible.

In the course of the study it was demonstrated that lipid microspheres in suspension possess many drawbacks which were also noted by other authors for lipid nanospheres. These are: gelation, unpredictable and very small (or none) incorporation of active substances, difficult to control reproducibility of the surface adsorption. Concentrated lipospheres appear as a more promising system.

I. WSTĘP

1. ROZWÓJ IDEI SUBMIKRONOWYCH NOŚNIKÓW LEKU

Nośniki leku w postaci cząstek o wielkości mierzonej w nano- i mikrometrach są obecnie w centrum zainteresowania ośrodków badawczych na całym świecie. Zastosowanie w lecznictwie znalazły już emulsje submikronowe, liposomy oraz mikrosfery i nanosfery zbudowane z polimerów biodegradowalnych [1].

Profesor Stanisław Janicki [2] zwracał uwagę na fakt, że lek wielokompartmentowy, jakim są postacie leku, gdzie substancja lecznicza jest rozdzielona pomiędzy liczne cząstki – zbiorniki, jest wielkim krokiem w technologii postaci leku. Dąży się do tego, aby postać leku decydowała o działaniu substancji leczniczej w odpowiednim miejscu i czasie. Ta idea realizowana jest np. w podaniu pozajelitowym, gdzie postacie leku, takie jak liposomy, czy inne nanocząstki umożliwią terapię celowaną.

Podstawowe znaczenie dla rozwoju nowych postaci leku mają właściwości substancji pomocniczych, które tworzą matryce danej postaci leku - ich toksyczność i biozgodność decyduje o bezpieczeństwie stosowania.

Lipidy są od dawna poznaną i szeroko stosowaną grupą substancji pomocniczych, a obecne czasy określa się nawet „erą nośników lipidowych”, ponieważ wzrasta zainteresowanie nanocząstkami, których podstawą są lipidy i dzięki temu mogą one w nowoczesnej nanotechnologii odegrać kluczową rolę [3].

Submikronowymi nośnikami lipidowymi są emulsje dożylne, które zostały wprowadzone do klinik w latach pięćdziesiątych, w celu podawania tłuszczów w żywieniu pozajelitowym. Są to emulsje o/w stabilizowane lecytyną. Podanie dożylne możliwe jest dzięki wielkości kropli olejowych poniżej 1 μm. Średnia wielkość cząstek w zakresie 200 – 400 nm jest uzyskiwana na etapie homogenizacji wysokociśnieniowej [4].

Bazując na tych emulsjach i wykorzystując ich właściwości fizykochemiczne i biozgodność, wprowadzono do nich substancje lecznicze dobrze rozpuszczalne w olejach, jak np. propofol, diazepam, etomidat [5]. Dzięki tym nośnikom możliwe jest podanie dożylne substancji leczniczych nierozpuszczalnych w wodzie. Przykładem emulsji submikronowej dostępnej na polskim rynku jest preparat Plofed z propofolem, wytwarzany w Warszawskich Zakładach Farmaceutycznych Polfa. Jego technologia została opracowana w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej Akademii Medycznej w Gdańsku.

Emulsje dożylne są postacią leku tylko dla niewielu substancji leczniczych, ponieważ w obecności wielu związków dochodzi do ich destabilizcji fizycznej [6]. Emulsje submikronowe podane dożylnie nie zapewniają też przedłużonego działania

leku, gdyż uwalnianie substancji leczniczych po podaniu dożylnym jest niemal natychmiastowe [7]. Dużym ograniczeniem w zastosowaniu tych nośników jest zwykle niewystarczająca rozpuszczalność substancji lipofilowych w olejach.

Fosfolipidowe cząstki wynalezione przez Banghama w 1965 r., nazwane liposomami, uznane zostały za niezwykle obiecującą postać leku. Są to kuliste pęcherzyki wielkości 0,01 – 1,0 μm, których rdzeń tworzy mikrokropelka wody otoczona podwójną warstwą fosfolipidową, dzięki czemu mogą stanowić nośnik substancji hydrofilowych i hydrofobowych. Z reguły występują w postaci zawiesiny w fazie wodnej i podaje się je dożylnie [8].

Liposomy wykazują wiele zalet, jak zdolność ochrony substancji leczniczej przed rozkładem, spowolnione lub kontrolowane uwalnianie inkorporowanej substancji, a także umożliwiają terapię celowaną, tzn. dostarczanie substancji leczniczej do określonego narządu. Ta ostatnia cecha jest wykorzystywana w terapii przeciwnowotworowej, gdzie liposomy są nośnikami leków cytostatycznych.

Pomimo licznych zalet liposomów, w lecznictwie jest stosowanych niewiele preparatów w tej postaci (doksorubicyna, daunorubicyna, amfoterycyna B). Jest to związane głównie z ich niewielką trwałością fizyczną, a także z technologią sporządzania, która jest trudna i kosztowna na skalę przemysłową [8].

Chociaż liposomy szybko trafiły do produktów kosmetycznych, to ich obecność w leczniczych preparatach dermatologicznych jest znikoma. Dzieje się tak, pomimo że stanowią nośnik wpływający na zwiększenie przenikania substancji leczniczych do skóry, choć same nie wykazują zdolności penetracji, ze względu na rozmiary [9, 10].

Mikrosfery to mikrocząstki o rozmiarach do kilkudziesięciu mikrometrów zbudowane z matryc stałych, przede wszystkim polimerowych [12]. Największy sukces w lecznictwie uzyskano dzięki zastosowaniu polimerów biodegradowalnych - kwasu polimlekowego oraz kopolimerów kwasów mlekowego i glikolowego. Wielkość mikrosfer polimerowych stosowanych w lecznictwie mieści się w zakresie 10 – 50 μm i służą one do podania podskórnego. Mogą być też podawane dożylnie, bezpośrednio do tkanki nowotworowej w celu wywołania chemoembolizacji. Pomimo niezwykle licznych badań nad tą postacią leku, do tej pory jedynie kilka preparatów jest dostępnych w tej formie. W Polsce w postaci mikrosfer zarejestrowana jest leuprorelina i tryptorelina.

Uwalnianie substancji leczniczej z mikrosfer polimerowych zachodzi na drodze degradacji polimeru i jednoczesnej dyfuzji. Biodegradacja matrycy polimerowej może zachodzić na drodze chemicznej lub fizycznej. Na drodze chemicznej dochodzi do hydrolizy polimeru, natomiast na drodze fizycznej do erozji matrycy w wyniku penetracji płynu ustrojowego do jej wnętrza. Na tej zasadzie tworzą się mikrokanały, które

sprzyjają dyfuzji substancji leczniczej. W przypadku mikrosfer z kwasu polimlekowego jest to proces długotrwały, ponieważ następuje w czasie od 1 do 4 miesięcy.

Wadą polimerowych mikrosfer, jest głównie niedostateczna wiedza o działaniu polimerów na tkanki i procesie ich biodegradacji *in vivo*, niebezpieczeństwo kumulacji w miejscu iniekcji, mała zdolność inkorporacji substancji leczniczej oraz trudna technologia [12].

2. LIPOSFERY – CHARAKTERYSTYKA NANOSFER (SLN®) I MIKROSFER LIPIDOWYCH JAKO NOWEJ POSTACI LEKU

W połowie lat dziewięćdziesiątych uwaga naukowców skupiła się wokół postaci leku alternatywnej dla emulsji tłuszczowych, liposomów czy mikrosfer polimerowych - cząstek zbudowanych z lipidów stałych w temperaturze pokojowej. Tego typu postać o rozmiarach wyrażanych w nanometrach uzyskała nazwę „nanocząstki lipidowe" lub SLN® (Solid Lipid Nanoparticles). Wspólny termin „liposfery" dotyczy zarówno SLN, jak i mikrosfer lipidowych [13]. Wprawdzie liposfery nie zostały jeszcze wprowadzone do praktyki klinicznej, lecz postać ta cieszy się ogromnym i ciągle wzrastającym zainteresowaniem wielu ośrodków badawczych [14]. Na temat liposfer (głównie nanosfer lipidowych) od 1993 r. ukazało się ok. 300 publikacji w czasopismach wydawanych na całym świecie oraz zarejestrowano ponad 2000 patentów.

Liposfery to kuliste cząstki zbudowane z lipidów stałych, występujące w zawiesinie stabilizowanej przez dodatek emulgatorów i innych substancji pomocniczych. Wielkość liposfer mieści się w zakresie 0,01 – 100 μm i w zależności od średnicy cząstek lipidowych wyróżnia się nanosfery lipidowe, o wielkości mniejszej niż 1 μm i mikrosfery lipidowe o większych rozmiarach - do kilkudziesięciu mikrometrów. Większość prac badawczych dotyczy nanosfer lipidowych.

Jako matryc lipidowych używa się wysoko oczyszczonych triglicerydów nasyconych kwasów tłuszczowych, alkoholi tłuszczowych lub wosków. Występują one jako samodzielne lipidy lub w mieszaninach złożonych z kilku składników. Lipidy użyte do otrzymania tej postaci są dobrze tolerowane przez organizm i stosowane już w innych postaciach leku, np. w kapsułkach o kontrolowanym uwalnianiu (Mucosolvan retard capsules) [1, 15].

Głównym składnikiem liposfer są lipidy stałe w temperaturze pokojowej. Są to triglicerydy (np. tristearynian glicerolu), częściowe glicerydy (np. monostearynian glicerolu), kwasy tłuszczowe (np. kwas stearynowy), steroidy (np. cholesterol), a także woski (Tabela 1).

Tabela 1. Lipidy stosowane jako matryce liposfer [16]

LIPID	Nazwa handlowa
TRIGLICERYDY	
trikaprynian glicerolu	
trilaurynian glicerolu	Dynasan®112
trimyrystynian glicerolu	Dynasan®114
tripalmitynian glicerolu	Dynasan®116
tristearynian glicerolu	Dynasan®118
GLICERYDY	
behenian glicerolu	Compritol® 888 ATO
digliceryd kwasu stearynowego i cytrynowego	Acidan® N12
monostearynian glicerolu	Imwitor® 900
mono- di- trigliceryd kwasu palmitynowego	Precirol® ATO 5
mieszanina mono-, di-, triglicerydów nasyconych kwasów tłuszczowych C10-C18	Witepsol® S55
	Witepsol® E85
	Witepsol® H5
	Witepsol® H35
	Witepsol® H42
KWASY TŁUSZCZOWE	
kwas behenowy	
kwas kaprynowy	
kwas palmitynowy	
kwas stearynowy	

Wybór matrycy lipidowej, która jest zbudowana z lipidów fizjologicznych, zmniejsza niebezpieczeństwo wystąpienia toksyczności postaci leku, zarówno ostrej jak i chronicznej.

W doniesieniach literaturowych opisywany jest wpływ rodzaju lipidów na wielkość cząstek liposfer [16]. Ahlin i wsp. [17] stwierdzili, że liposfery na bazie Witepsolu W 35 były mniejsze, niż zbudowane z Dynasanu 118, co wyjaśniono krótszymi łańcuchami kwasów tłuszczowych oraz znaczną ilość mono- i dwu glicerydów w Witepsolu W 35.

Ponadto znaczenie ma również zawartość lipidu w formulacjach. Wzrost ilości lipidu powyżej 5 – 10% w większości przypadków daje większe cząstki, które mają rozmiary w szerszym zakresie [16]. Podstawowe zawiesiny liposfer zawierają zazwyczaj do 20% lipidu.

Drugim podstawowym składnikiem liposfer są emulgatory (Tabela 2). Dobór emulgatora zależy przede wszystkim od drogi podania postaci leku i jest znacznie ograniczony przy podaniu pozajelitowym [18].

Tabela 2. Emulgatory stabilizujące zawiesiny liposfer [16]

EMULGATORY/WSPÓŁEMULGATORY	Nazwa handlowa
cholan sodu	
ester kwasu rycynolowego i polioksyetylenoglikolu	Cremophor EL
estry polioksyetylenosorbitanu z kwasami tłuszczowymi	polisorbat 20,Tween 20
	polisorbat 60,Tween 60
	polisorbat 80,Tween 80
fosfatydylocholina	Epikuron® 170, Epikuron® 200
glikocholan sodu	
lecytyna jajowa	Lipoid® E 80
lecytyna sojowa	Lipoid® S 75, Lipoid® S 100
kopolimery blokowe glikoli polioksypropylenowych z glikolami polioksyetylenowymi	poloksamer 182
	poloksamer 188
	poloksamer 407
distearynian metyloglukozo poliglicerolu	TegoCare 450

Liposfery występują w postaci zawiesiny w wodnej fazie dyspergującej. Zawiesiny charakteryzują się płynną konsystencją przy zawartości fazy lipidowej w granicach 1 – 20%. Müller i wsp. [19, 20] zaproponowali również koncentraty nanosfer lipidowych - układy o zwiększonej zawartości fazy lipidowej nawet do 95% i półstałej konsystencji, przeznaczone do rozcieńczania w celu uzyskania zawiesin liposfer lub w formie koncentratu do zastosowań dermatologicznych.

W założeniu liposfery, posiadając wszystkie korzystne cechy postaci submikronowych, pozwalają na wyeliminowanie niektórych wad innych nośników submikronowych. W porównaniu z emulsjami submikronowymi liposfery, dzięki stałej matrycy lipidowej, uwalniają substancję w sposób przedłużony. Ponadto uznaje się, że niektóre substancje lecznicze słabo rozpuszczalne w olejach roślinnych, których nie można inkorporować w emulsjach tłuszczowych, w zadowalającym stężeniu ulegają inkorporacji w liposferach, tworząc zawiesinę w stałej matrycy lipidowej. Oprócz tego, stała matryca może silniej wiązać substancje czynne w niej inkorporowane i jednocześnie chronić je przed degradacją chemiczną, przez co zwiększa się ich trwałość [21].

W porównaniu z mikrosferami polimerowymi liposfery wykazują większą biozgodność ze względu na bardziej naturalny proces biodegradacji. Jest to także związane z czasem przebywania postaci w organizmie. Mikrosfery mogą uwalniać substancję leczniczą w czasie 1 – 4 miesięcy, natomiast liposfery od kilku dni do 6 tygodni [13].

Ze względu na biozgodność i biokompatybilność, w pierwszej kolejności liposfery są tworzone z myślą o ich wykorzystaniu jako nośników substancji leczniczych podawanych drogą pozajelitową. Również rozmiary SLN pozwalają na ich podanie dożylne. Liczne publikacje dotyczą tego zastosowania [1, 16, 21-28], co opisano w dalszej części rozdziału (str. 37).

Poza podaniem pozajelitowym możliwe jest podanie doustne. SLN mogą mieć postać dyspersji w wodzie lub mogą być umieszczane w kapsułkach, a nawet, po wysuszeniu, można z nich prawdopodobnie tworzyć tabletki i peletki [16, 29]. Liposfery mogą być aplikowane miejscowo do oka [28, 30], a także w formie inhalacji do płuc. Dla celów podania inhalacyjnego cząstki nanosfer lipidowych można wysuszyć rozpyłowo i podawać używając inhalatorów przeznaczonych do suchych proszków [1].

Liczne badania dotyczą aplikacji liposfer na skórę [31-43]. Początkowo SLN inkorporowano do podstaw maściowych, ponieważ niskie stężenie fazy lipidowej (do 5%) dyspersji nanosfer nie pozwalało na sporządzanie półstałych form jedynie z tą fazą [16]. Zwiększenie zawartości fazy lipidowej (w koncentratach) prowadzi do uzyskania konsystencji półstałej i struktury żelowej, co ułatwia aplikację na skórę również w celach kosmetycznych [44]. W badaniach właściwości reologicznych układów udowodniono strukturę żelową SLN i ich właściwości elastyczne, porównywalne ze standardowymi preparatami dermatologicznymi [31-33].

Badano wpływ SLN na hydratację skóry i jej elastyczność [37]. Krem o/w porównywano z kremem o takim samym składzie zawierającym SLN. Po 4 tygodniach

aplikacji preparatów uzyskano znaczące różnice w hydratacji skóry dowodząc, że krem z SLN prowadził do większej hydratacji i był bardziej efektywny (o 31%), chociaż nie miał wpływu na właściwości elastyczne skóry. Dyspersje SLN po rozsmarowaniu na skórze tworzą film nanocząstek, dzięki czemu osiągany jest efekt okluzyjny. Właściwości okluzyjne układów zależą od stężenia fazy lipidowej, wielkości cząstek oraz stopnia krystalizacji lipidu. Zawiesina SLN z 20% zawartością fazy lipidowej wywierała większy efekt okluzyjny niż zawierająca 10% liposfer [38].

Zawiesiny liposfer uznano za nową generację nośników dla kosmetyków, w szczególności dla filtrów słonecznych [39-42]. Wykazano, że liposfery po aplikacji na skórę odbijają i rozpraszają promieniowanie słoneczne [39]. Oprócz działania fotoprotekcyjnego są zdolne do absorbowania promieni słonecznych. Inkorporacja filtrów słonecznych prowadzi więc do synergistycznego działania ochronnego - trzykrotnie większego niż obserwowano dla postaci emulsji. Wykazano także, że cząstki SLN o dużej krystaliczności lipidu zachowują się jak fizyczne ekrany słoneczne [40]. Wykazano, że ilość filtra słonecznego penetrującego do skóry z emulsji o/w z mikrosferami lipidowymi jest dziesięciokrotnie mniejsza niż obserwowano dla żelu, czy maści. Ponadto inkorporacja filtra słonecznego w mikrosferach lipidowych zwiększyła jego fotostabilność [41, 42]. Badano również działanie przeciwzmarszczkowe kremu z dodatkiem SLN i stwierdzono redukcję głębokości zmarszczek o 10,3%, gdy w przypadku kremu bez SLN wartość ta wynosiła 4,1% [43]. Należy jednak dodać, że różnice pomiędzy obu preparatami nie były statystycznie istotne.

3. METODY SPORZĄDZANIA LIPOSFER

Liposfery najczęściej występują w postaci zawiesiny cząstek lipidowych w rozpraszającej fazie wodnej, zawierającej emulgatory i stabilizatory. W zależności od wyboru metody sporządzania można otrzymać liposfery różniące się pod względem wielkości cząstek: nanosfery lub mikrosfery.

Opisano przede wszystkim metody sporządzania nanosfer lipidowych. Niektóre z nich po modyfikacji służą również do otrzymywania mikrosfer [1, 16]. Stosowane są następujące metody:

- homogenizacji wysokociśnieniowej
- tworzenia mikroemulsji
- emulgowania i odparowania lub dyfuzji rozpuszczalnika organicznego
- dyspergowania mieszadłem szybkoobrotowym lub z zastosowaniem ultradźwięków

- tworzenia emulsji wielokrotnej w/o/w.

Metoda homogenizacji wysokociśnieniowej

W metodzie tej proces homogenizacji prowadzi do otrzymania nanosfer lipidowych. Homogenizację wykonuje się w podwyższonej temperaturze („na gorąco") lub w temperaturze pokojowej („na zimno").

W metodzie gorącej homogenizacji substancja lecznicza jest rozpuszczana w lipidzie, który jest ogrzewany do temperatury co najmniej 5 - 10°C powyżej temperatury topnienia. Gorąca faza lipidowa jest dyspergowana przez mieszanie w wodnym roztworze emulgatora o tej samej temperaturze. Otrzymana wstępna emulsja jest następnie na gorąco kilkakrotnie tłoczona przez szczelinę homogenizatora wysokociśnieniowego, w wyniku czego powstaje nanoemulsja, którą chłodzi się i w efekcie dochodzi do krystalizacji lipidu i otrzymania zawiesiny SLN [1, 16].

Metoda zimnej homogenizacji jest stosowana dla termolabilnych substancji leczniczych lub substancji o charakterze hydrofilowym. Substancja lecznicza jest rozpuszczona lub zawieszona w stopionym lipidzie, a mieszaninę gwałtownie chłodzi się przez zanurzenie w ciekłym azocie lub suchym lodzie. Kolejnym etapem jest mielenie zestalonego lipidu do otrzymania cząstek wielkości 50 – 100 μm. Uzyskane mikrocząstki są dyspergowane w silnie ochłodzonym roztworze emulgatorów, przez co otrzymuje się zawiesinę wstępną. Produkt jest homogenizowany kilkakrotnie w homogenizatorze wysokociśnieniowym w temperaturze pokojowej lub niższej, co prowadzi do otrzymania SLN [1, 16].

W porównaniu z metodą homogenizacji na gorąco, stosowanie metody zimnej homogenizacji może zapobiec problemom związanym z podwyższoną temperaturą procesu: unika się rozkładu substancji leczniczej, jej dystrybucji do fazy wodnej w trakcie homogenizowania oraz eliminuje się problemy związane z krystalizacją lipidu. Tą metodą otrzymuje się większe cząstki z większym rozrzutem wielkości [1, 16].

Dowiedziono, że parametry technologiczne procesu sporządzania SLN mają wpływ na wielkość cząstek [45]. Badano wpływ homogenizacji wysokociśnieniowej, stosując ciśnienia 250 - 600 bar. Wraz ze zwiększającą się wartością ciśnienia średnia wielkość nanocząstek lipidowych ulegała zmniejszeniu z 380 nm do 240 nm.

Metoda tworzenia mikroemulsji

Metoda tworzenia mikroemulsji, wprowadzona przez zespół włoskich naukowców pod kierunkiem Gasco [1, 16, 28], podlegała modyfikacjom [21].

Mikroemulsje sporządza się w temperaturze wyższej niż temperatura topnienia lipidu. Do stopionego lipidu (zazwyczaj 10%), dodaje się mieszaninę emulgatorów

(15%) i współemulgatorów (10%) o tej samej temperaturze. Następnie mikroemulsja jest dyspergowana w zimnej wodzie (2 - 3°C) podczas łagodnego mieszania, co prowadzi do krystalizacji lipidowych nanocząstek. Wadą metody jest duże rozcieńczenie otrzymanej zawiesiny liposfer.

Metoda emulgowania i odparowania lub dyfuzji rozpuszczalnika organicznego

W metodzie przez odparowanie rozpuszczalnika lipid jest rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym niemieszającym się z wodą (np. toluen, chloroform). Roztwór ten emulguje się w fazie wodnej i przy ciągłym mieszaniu odparowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Podczas odparowywania rozpuszczalnika lipid wytrąca się tworząc SLN. Ważną zaletą tej metody jest niska temperatura procesu, co jest pożądane w przypadku termolabilnych substancji leczniczych. Natomiast problemy stwarzają pozostałości organicznego rozpuszczalnika w gotowej dyspersji [21].

Przy zastosowaniu techniki przez dyfuzję rozpuszczalnika stosuje się rozpuszczalniki częściowo mieszające się z wodą (np. alkohol benzylowy, mrówczan etylu, mleczan butylu) [46, 47]. Roztwór lipidu w rozpuszczalniku organicznym emulguje się w wodno - organicznym roztworze emulgatorów, w podwyższonej temperaturze. Nanosfery lipidowe tworzą się przez wytrącenie lipidu po dodaniu wody, najczęściej w stosunku 1:5 lub 1:10, ponieważ następuje dyfuzja rozpuszczalnika organicznego z kropel emulsji do fazy dyspergującej. W ten sposób otrzymana dyspersja SLN jest dość znacznie rozcieńczona i wymaga zagęszczenia, podobnie jak w metodzie tworzenia mikroemulsji.

W obu modyfikacjach metody osiąga się nanosfery lipidowe o bardzo małych rozmiarach ok. 100 nm.

Metoda dyspergowania mieszadłem szybkoobrotowym lub z zastosowaniem ultradźwięków

Emulguje się stopioną fazę olejową w fazie wodnej. Podczas procesu energia mechaniczna mieszadła ścinającego lub ultradźwięków prowadzi do zmniejszenia wielkości kropel emulsji do rozmiarów poniżej 1 μm. Metoda ta prowadzi do powstania układu o wysokiej energii wewnętrznej i w efekcie podczas przechowywania łatwo dochodzi do aglomeracji cząstek lipidu. Ten proces można zahamować poprzez zwiększenie stężenia emulgatorów, co może z kolei powodować toksyczność przy podaniu pozajelitowym. Wadą metody z wykorzystaniem mieszadła szybkoobrotowego jest też możliwość zanieczyszczenia liposfer opiłkami metalu [21, 48].

Metoda tworzenia emulsji wielokrotnej w/o/w

Jest to metoda sporządzania SLN z hydrofilową substancją leczniczą. Substancja lecznicza razem ze stabilizatorem jest zawarta w wewnętrznej fazie wodnej emulsji w/o/w [21].

Roztwór wodny substancji leczniczej jest emulgowany ze stopionym lipidem w podwyższonej temperaturze, przy zastosowaniu mieszadła szybkoobrotowego. Utworzona emulsja wstępna jest stabilizowana przez dodanie do fazy wodnej żelatyny lub poloksameru 407. Następnie emulsja jest dyspergowana w podwyższonej temperaturze w fazie wodnej zawierającej alkohol poliwinylowy. Otrzymana emulsja wielokrotna (w/o/w) jest mieszana przez 3-5 h i jednocześnie chłodzona w temperaturze pokojowej. Wytrącone mikrocząstki oddziela się przez filtrację. Metodą tą sporządzano mikrosfery lipidowe z kromoglikanem sodowym o wielkości cząstek ok. 80 μm [49].

4. TRWAŁOŚĆ ZAWIESIN LIPOSFER I ZJAWISKO KRYSTALIZACJI LIPIDÓW

Podstawowym zjawiskiem fizycznym zachodzącym podczas przechowywania liposfer jest ich aglomeracja, a także wzrost wielkości pojedynczych cząstek.

Stabilność fizyczną dyspersji liposfer określa się głównie wykonując pomiar wielkości cząstek (np. metodą dyfrakcji laserowej). Ponadto prowadzi się badania potencjału zeta, badanie metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) oraz obserwacje mikroskopowe.

Na stabilność SLN wpływa skład matrycy lipidowej, używane emulgatory i współemulgatory, składniki fazy dyspersyjnej i pH tej fazy oraz właściwości inkorporowanych substancji leczniczych. Ponadto czynnikami zewnętrznymi wpływającymi na stabilność podczas przechowywania zawiesin liposfer są: ekspozycja na światło, temperatura oraz materiał opakowań.

Do czynników destabilizujących w procesie otrzymywania liposfer należą: sonikacja oraz proces sterylizacji, a także suszenie rozpyłowe.

Podstawowym problemem podczas przechowywania układów jest ich destabilizacja objawiająca się żelowaniem. Żelowanie poprzedza aglomeracja cząstek [52]. Wiele doniesień literaturowych potwierdza, że na zjawisko żelowania wpływają podobne czynniki zewnętrzne, jak w przypadku krystalizacji lipidu (temperatura przechowywania i ekspozycja na światło), a stopień żelowania koreluje ze stopniem krystalizacji lipidów. Wprawdzie żelowanie to proces niekorzystny, lecz to zjawisko

wykorzystano proponując żelujące układy jako podstawy kremów kosmetycznych [16, 33, 43, 44].

Badano działanie światła, temperatury oraz materiału opakowań na stabilność fizyczną zawiesiny nanosfer [50]. SLN sporządzone na bazie Compritolu, z emulgatorem Pluronic F68, były przechowywane w temp. 8°, 20° i 50°C. Dodatkowo układy były eksponowane na różnego typu oświetlenie. Najszybciej uległy destabilizacji układy przechowywane w fiolkach z bezbarwnego szkła poddane działaniu światła sztucznego, natomiast najbardziej stabilne były próby chronione od światła. Najszybsze żelowanie obserwowano w temp. 50°C, a obniżenie temp. do 20°C przedłużyło stabilność układu do 3 miesięcy. Liposfery przechowywane w temp. 8°C bez dostępu światła były stabilne przez 3 lata.

Ci sami autorzy [51] badali wpływ rozcieńczenia układów wodą lub roztworem elektrolitów na stabilność liposfer. Potencjał zeta mierzony w stabilnych układach wynosił –25 mV. Dodanie do zawiesiny SLN roztworu elektrolitów powodowało redukcję ujemnego potencjału zeta do –15 mV, co prowadziło do agregacji cząstek lipidowych i w konsekwencji układy żelowały.

Poza właściwościami lipidu wybór rodzaju emulgatora oraz jego stężenia jest czynnikiem kluczowym wpływającym na jakość liposfer [13]. Wiele uwagi poświęcono badaniom przydatności w tych układach fosfolipidów (lecytyny) jako biozgodnych emulgatorów.

Dowiedziono, że stabilność SLN maleje wraz ze wzrostem zawartości fosfolipidów w układzie (od 0,5 do 3,0%). Wprawdzie dochodzi wtedy do wzrostu ujemnego potencjału zeta (z wartości –19,5mV do –42,6 mV), lecz jednocześnie zwiększa się rozmiar cząstek. Wskazano zakres stężenia fosfolipidów 0,5 – 1,0% jako optymalny w zawiesinie nanosfer zbudowanych z kwasu stearynowego [52].

Również Ahlin i wsp. [17] stwierdzili, że fosfolipidy użyte w stężeniu 1-2% pozwalały na otrzymanie zawiesiny liposfer, natomiast przy wyższym stężeniu (ponad 2%) otrzymywano dwa rodzaje cząstek w układzie: nanocząstki lipidowe i większe cząstki przypominające liposomy lub SLN z wieloma warstwami fosfolipidów na powierzchni. Wraz ze wzrostem stężenia fosfolipidów, ilość większych cząstek typu liposomów wzrastała [17].

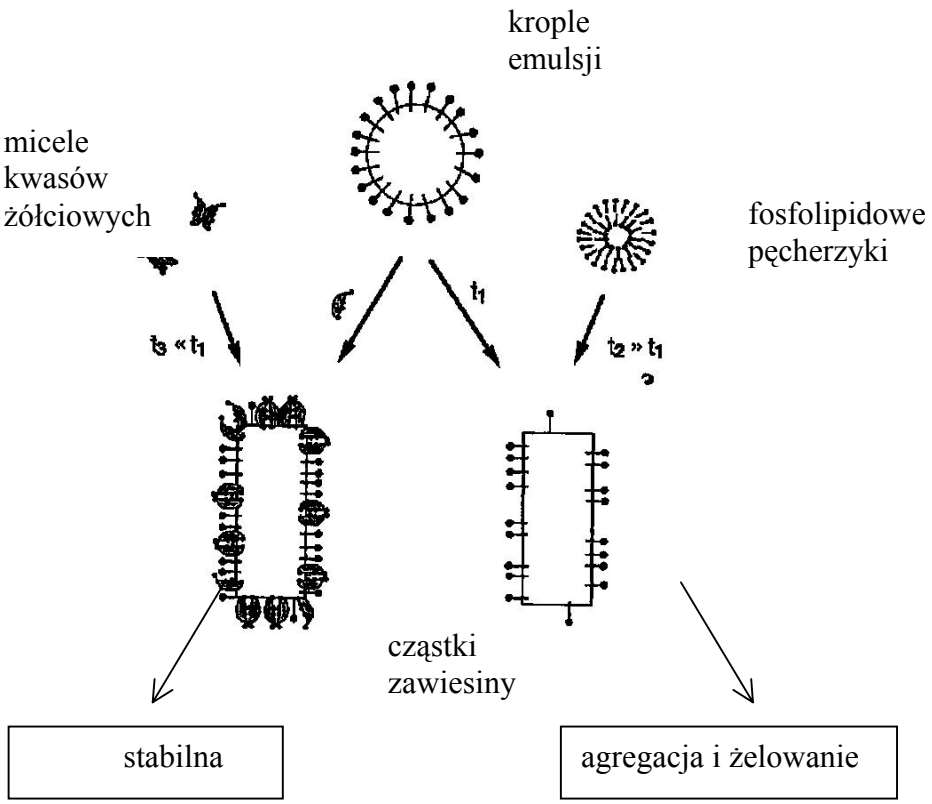
Westesen i wsp. [7, 53] badali zawiesiny nanocząstek lipidowych zbudowanych z tripalmitynianu. Układy te stabilizowane fosfolipidami szybko ulegały żelowaniu. Ustalono, że fosfolipidy użyte jako samodzielny emulgator nie są w stanie dokładnie pokryć powierzchni krystalizujących cząstek lipidowych, uformowana bariera steryczna jest niekompletna i dochodzi do agregacji cząstek. Zjawisku żelowania zapobiegano dodając współemulgatorów (glikocholan sodu, tyloksapol, poloksamer). Są one

adsorbowane na wolnej powierzchni liposfer tworząc w ten sposób kompletną barierę (Ryc. 1).

Emulgatorem stosowanym w celu sporządzania SLN jest również poloksamer. Znany jest amfifilny charakter tego polimeru i jego zdolność do tworzenia hydrofilowej otoczki wokół cząstek SLN [13, 54]. Badano wpływ poloksameru (w stężeniu od 0,5% do 3,0%) na stabilność liposfer [50, 52]. Nie dochodziło do zmiany potencjału zeta wraz ze wzrostem stężenia poloksameru w układzie (wartość potencjału zeta wynosiła od -31,1 mV do –28,5 mV), lecz obserwowano wzrastającą tendencję do żelowania, gdy stężenie emulgatora było wyższe niż 1%, co mogło być związane z żelowaniem samego poloksameru, a nie liposfer [52].

Pod kątem zjawiska żelowania obserwowano mikrosfery lipidowe o wielkości cząstek od 1 do 300 μm, w których inkorporowano bupiwakainę [55]. Jako emulgatorów użyto fosfolipidy, zarówno naturalne, jak i syntetyczne, a matrycę lipidową stanowiły triglicerydy. Stwierdzono, że w badanych układach na żelowanie miały wpływ: temperatura przechowywania, stężenie substancji leczniczej i typ fosfolipidu. Kluczowym czynnikiem powodującym żelowanie zawiesin liposfer był jednak typ użytych fosfolipidów. Syntetyczne fosfolipidy w porównaniu z naturalnymi, powodowały opóźnienie żelowania. Wzrost stężenia bupiwakainy z 2% do 4% przyspieszał żelowanie, podobnie jak przechowywanie układów w temperaturze pokojowej. Obserwowano także wpływ obecności polimeru hydrofilowego na trwałość układu i stwierdzono, że dodatek karmelozy sodowej poprawiał stabilność fizyczną układów przechowywanych w temperaturze pokojowej z syntetycznym fosfolipidem jako emulgatorem.

Podjęto próbę zwiększenia stabilności SLN poprzez ich inkorporację w układach hydrożelowych [56]. Badania prowadzono przez 3 miesiące przechowując próby w temperaturze pokojowej. Nie stwierdzono wzrostu wielkości cząstek ani zmian potencjału zeta, a także agregacji SLN wprowadzonych do hydrożeli. Zaobserwowano również, że obecność cząstek lipidowych prowadziła do zwiększenia właściwości elastycznych podłoża. Taka właściwość jest korzystna w preparatach dermatologicznych.



Ryc. 1. Stabilność zawiesin nanocząstek lipidowych w obecności fosfolipidów i współemulgatorów [53].

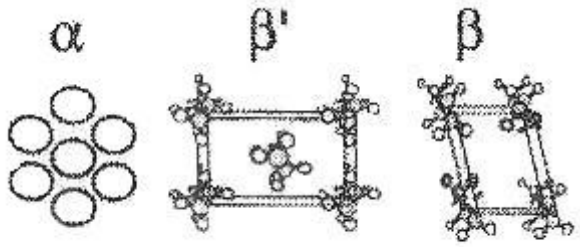
W badaniach nad wpływem emulgatorów na stabilność fizyczną nanosfer lipidowych stwierdzono, że dobór właściwych emulgatorów, we właściwym stężeniu jest krytycznym czynnikiem decydującym o stabilności zawiesiny liposfer. Na podstawie badań DSC, porównując polisorbat, poloksamer i TegoCare 450 dowiedziono, że dla nanosfer z Witepsolu E85, najkorzystniejszym emulgatorem jest TegoCare 450 w stężeniu 1,5% [57].

Badano wpływ różnych emulgatorów na krystalizację SLN zbudowanych z tripalmitynianu glicerolu [60]. Użyto glikocholan sodu, oleinian sodu, tyloksapol, Solutol HS 15 i Cremophor EL oraz ich mieszaniny z lecytyną sojową. Zastosowane emulgatory nie miały wprawdzie znaczącego wpływu na temperaturę krystalizacji lipidu, lecz wpływały na przemiany polimorficzne cząstek tripalmitynianu, co oznacza, że dochodziło do interakcji pomiędzy otoczką z emulgatora a triglicerydową matrycą. Ponadto wykazano, że główne przegrupowania form polimorficznych w SLN mają miejsce po krystalizacji lipidu. Wynika z tego, że emulgatory mają wpływ nie tylko na wielkość

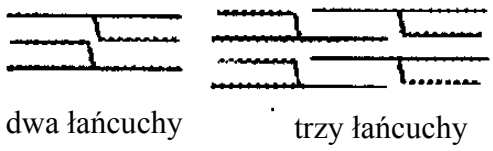
cząstek oraz stabilność zawiesin liposfer, ale także wpływają na wewnętrzną strukturę cząstek lipidowych.

Podjęto próbę wyjaśnienia związku stabilności SLN ze stanem krystalicznym fazy lipidowej badając polimorfizm lipidów w zawiesinach SLN [58, 59].

Polimorfizm lipidów w układach innych niż koloidalne dyspersje jest stosunkowo dobrze poznany. Triglicerydy (triacyloglicerole), występują w trzech odmianach polimorficznych: α, β' i β, co zobrazowano na ryc. 2 [60]. Najbardziej niestabilną odmianą polimorficzną jest forma α (heksagonalna), która jest tylko częściowo uporządkowana, z niewielką rotacją grup alifatycznych. Tworzy się ona w wyniku szybkiego chłodzenia stopionego lipidu. Przejście do ściśle uporządkowanej formy β' (ortorombowej) można uzyskać przez powolne ogrzewanie formy α do jej stopienia oraz powolne zestalanie. Z kolei z formy β' następuje przejście do formy β (trójskośnej), którą również można otrzymać przez krystalizację z rozpuszczalnika. Odmiana β o najwyższej temperaturze topnienia jest najbardziej trwała, ponieważ reprezentuje układ najbardziej uporządkowany i najściślej upakowany [60, 61]. W odmianie β wszystkie płaszczyzny, w której leżą zygzakowate łańcuchy węglowe są ułożone równolegle względem siebie. Jednostką długości krystalizacji w formie β jest długość dwóch (β_2) lub trzech (β_3) łańcuchów (Ryc. 3) [60].

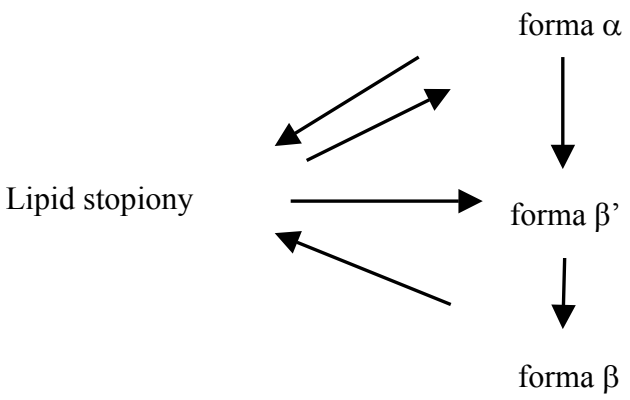


Ryc. 2. Schemat formy α (heksagonalnej), β' (ortorombowej) i β (trójskośnej) lipidów [60].



Ryc. 3. Jednostki krystalizacyjne lipidów [60].

Przejście ze stanu stopionego lipidu w formę α jest zjawiskiem odwracalnym, natomiast dalsze przejścia są nieodwracalne, co przedstawia ryc. 4 [62].



Ryc. 4. Przejścia polimorficzne lipidów [62].

Formy krystaliczne lipidów w nanosferach lipidowych były przedmiotem kilku opublikowanych prac [58, 61, 63-65]. Ustalono, że krystalizacja triglicerydów podczas gwałtownego chłodzenia zawiesiny liposfer prowadzi do powstania niestabilnej formy α, która przechodzi poprzez odmianę β' w stabilną formę β podczas ogrzewania lub w trakcie przechowywania. Okazuje się, że w dyspersjach koloidalnych zjawisko zachodzi szybciej niż w samodzielnym lipidzie. Ponadto przemiany polimorficzne zachodzą wolniej dla triglicerydów o długich łańcuchach kwasów tłuszczowych [64].

Sporządzano SLN na bazie Compritolu z poloksamerem 188 jako emulgatorem [58]. Stopień krystalizacji lipidu badano metodą DSC. Bezpośrednio po sporządzeniu SLN frakcja lipidu nie była całkowicie zestalona. Compritol krystalizował w mieszaninie form polimorficznych: stabilnej β' i niestabilnych α i sub-α. Czynniki destabilizujące, jak światło czy temperatura przechowywania, były przyczyną wyraźnego wzrostu szybkości przemiany lipidu w formę β'. W miarę zestalania się Compritolu, malała ilość defektów sieci krystalicznej oraz udział niestabilnych form α i sub-α. Zawiesina SLN żelowała, gdy lipid krystalizował całkowicie w formie β'.

Westesen i Bunjes [63] badali zjawisko krystalizacji nanocząstek sporządzonych z pojedynczych triglicerydów: trilaurynianu, trimyrystynianu, tripalmitynianu i tristearynianu glicerolu. Stwierdzono, że nanocząstki sporządzone z

udziałem triglicerydów stałych w temperaturze pokojowej niekoniecznie krystalizują podczas chłodzenia. Jeśli krystalizacja cząstek nie jest wymuszana przez chłodzenie dyspersji poniżej krytycznej temperatury rekrystalizacji, cząstki znajdują się w stanie przechłodzonym w ciągu dłuższego czasu. Nie otrzymuje się wtedy dyspersji stałych cząstek, a jedynie emulsję płynnych lipidów.

Krystalizację lipidu (Compritol) w SLN za pomocą DSC badali również Freitas i Müller [58]. W dniu sporządzania nanosfer krystalizacja lipidu była wysoka (ok. 70 – 80%), a dalsza krystalizacja następowała podczas przechowywania. Stwierdzono, że pozornie stabilne SLN (płynne zawiesiny) nie krystalizowały całkowicie podczas przechowywania nawet przez 3 lata. W układach obecne były formy: α i sub-α oraz β'. Jedynie w zawiesinach żelujących faza lipidowa była całkowicie skrystalizowana i występowała w nich tylko forma β'.

Niewłaściwie przebiegający proces krystalizacji może prowadzić do problemów związanych nie tylko ze stabilnością fizyczną zawiesiny liposfer, lecz także do wykluczania substancji leczniczej z wnętrza matrycy lipidowej (str. 27 - 29).

Inkorporacji substancji leczniczych nie sprzyja ściśle upakowana struktura lipidów w nanocząstkach lipidowych zbudowanych z pojedynczych triglicerydów [63]. Aby zaburzyć strukturę pojedynczego triglicerydu proponuje się więc jako matrycę mieszaniny triglicerydów: trimyrystynianu z tristearynianem oraz trilaurynianu z tristearynianem.

Sposobem na zwiększenie inkorporacji substancji leczniczej jest kontrolowane zestalanie się stopionych i homogenizowanych cząstek lipidowych w odmianę nisko uporządkowaną α lub formę amorficzną i uzyskiwanie lipidów w stanie przechłodzonym [63, 64, 66]. Taki stan wykazuje wysoką zdolność inkorporacji obcych cząsteczek. Jednak z drugiej strony, tak jak wyżej opisano układy te nie są stabilne fizycznie [66, 67].

5. INKORPORACJA SUBSTANCJI LECZNICZYCH W LIPOSFERACH

Liposfery wynaleziono z myślą o ich wykorzystaniu jako nośników substancji leczniczych. Podejmowano próby inkorporacji w SLN wielu substancji, np. diazepamu, retynolu, koenzymu Q10, prednizolonu, tetrakainy, etomidatu [1], a wyniki tych badań opisane są poniżej.

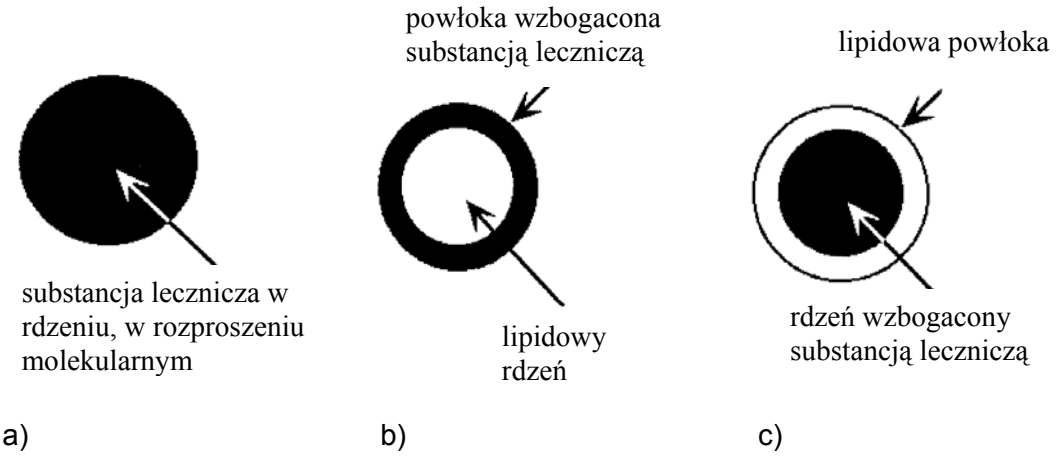
Ocena stopnia zamykania substancji leczniczych w liposferach, badania mikroskopowe i instrumentalne pozwoliły na ustalenie, że w zależności od metody otrzymywania liposfer, rozmieszczenie inkorporowanej substancji leczniczej w stałej

matrycy może być różne. Müller i wsp. [1] rozróżniają następujące modele liposfer (SLN) w zależności od lokalizacji substancji leczniczej w cząstce lipidowej (Ryc. 5):

a) model stałego roztworu

b) model rdzeń – powłoka I

c) model rdzeń – powłoka II.



Ryc. 5. Różne typy (modele) liposfer w zależności od lokalizacji substancji leczniczej w cząstce lipidowej [1].

a) ***Model stałego roztworu.*** Występuje przy sporządzaniu liposfer techniką zimnej dyspersji, bez udziału emulgatorów i solubilizatorów. Substancja lecznicza znajduje się w lipidowej matrycy w rozproszeniu molekularnym (Ryc. 5a).

b) ***Model rdzeń – powłoka I.*** Występuje w liposferach otrzymywanych metodą homogenizacji na gorąco. Przy wzroście temperatury podczas sporządzania substancja lecznicza częściowo przechodzi z fazy lipidowej do wodnej. Podczas chłodzenia następuje redystrybucja substancji leczniczej do lipidu, z koncentracją powierzchniową. Większość substancji leczniczej znajduje się w powłoce (Ryc. 5b).

c) ***Model rdzeń – powłoka II.*** Występuje w liposferach sporządzonych techniką gorącej dyspersji. Substancja lecznicza tworzy roztwór nasycony w lipidzie. Podczas chłodzenia dochodzi do przesycenia tego roztworu i w konsekwencji krystalizacja lipidu zachodzi wolniej, niż wytrącanie substancji leczniczej. Dalsze chłodzenie prowadzi do rekrystalizacji lipidu otaczającego rdzeń z substancją leczniczą. Powłoka lipidowa w

ten sposób będzie otaczała rdzeń, gdzie znajduje się większość substancji leczniczej (Ryc. 5c).

Ilość substancji leczniczej, która może być zamykana w liposferach, zależy od wielu czynników. Podstawowy wpływ ma [1]:

- rozpuszczalność substancji leczniczej w stopionym lipidzie
- zdolność mieszania się stopionej substancji leczniczej ze stopionym lipidem
- chemiczne i fizyczne właściwości stałej matrycy lipidowej
- forma polimorficzna lipidu.

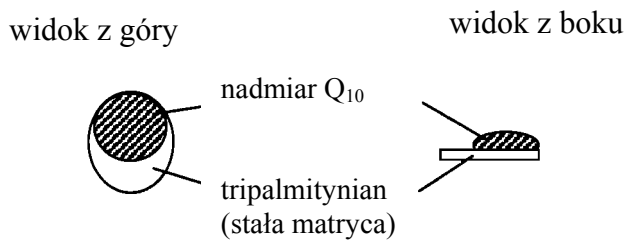
Badano wpływ struktury i lipofilności znacznika („spin probe") na jego inkorporację i rozmieszczenie w nanocząstkach lipidowych zbudowanych z tripalmitynianu glicerolu, stabilizowanych lecytyną sojową oraz poloksamerem 188 [68]. Wykazano, że cząsteczki substancji słabo lipofilowych rozmieszczają się głównie pomiędzy stałym rdzeniem lipidowym a zewnętrzną warstwą fosfolipidową SLN. W miarę wzrostu lipofilności substancji zwiększa się jej ilość w stałym rdzeniu lipidowym. Substancje amfifilne znajdują się głównie w warstwie fosfolipidowej, natomiast substancje hydrofilowe nie są zamykane w liposferach i pozostają w fazie wodnej.

W celu określenia wpływu stanu fizycznego matrycy lipidowej na inkorporację substancji leczniczej badano modelowe nanocząstki zbudowane z trimyrystynianu glicerolu (Dynasan 114) oraz z Witepsolu (H 35, H 42 i E 85) [69]. Inkorporowano menandion, walerianian betametazonu, ubidekarenon (Q_{10}), prednizolon, oksazepam, kortyzon, diazepam i retynol. Stosowano różną temperaturę chłodzenia nanosfer lipidowych, co miało wpływ na stan krystaliczny matrycy. W temp. 4°C matryce z Dynasanu zestalały się, natomiast nie doszło do krystalizacji matryc z Witepsolu. Fakt ten jest ściśle powiązany ze zdolnością inkorporacji substancji leczniczej. Gdy nanosfery lipidowe na bazie Dynasanu 114 były przechowywane w temperaturze pokojowej, znajdowały się w stanie płynnym przechłodzonym i wykazywały wysoką zdolność inkorporacji substancji leczniczej (menadionu). Natomiast krystalizacja Dynasanu 114 prowadziła do wykluczania substancji leczniczych do fazy wodnej. Dzieje się tak, pomimo, że ruchliwość cząsteczek substancji leczniczej w stałej cząstce lipidowej jest drastycznie zredukowana. Dowiedziono, że spośród badanych substancji leczniczych Q_{10} jest jedynym związkiem, który dodany w wysokim stężeniu (nawet 50%) nie powoduje destabilizacji zawiesiny nanosfer i silnie wbudowuje się w zestalony lipid.

Kontynuowano badania struktury SLN z palmitynianu cetylu (15%), w obecności Q_{10} (4,8%) [70]. Na podstawie badań DSC oraz NMR stwierdzono, że większość substancji aktywnej (ok. 60%) tworzy z zestalonym lipidem homogenną mieszaninę.

Natomiast pozostała część Q_{10} tworzy osobną fazę. Dodatkowo może formować się pojedyncza warstwa substancji leczniczej wokół homogennej cząstki lipid/Q_{10}.

Również badania cząstek SLN z tripalmitynianu glicerolu prowadzone metodą TEM (transmisyjna mikroskopia elektronowa) wykazały, że przy wysokim stężeniu Q_{10} (30 – 50%) nanocząstki mają budowę dwufazową. Faza stałego triglicerydu ma wygląd płytek, do których na jednym końcu przytwierdzona jest mikrokropelka substancji leczniczej, wykluczonej z części stałej podczas krystalizacji lipidu (Ryc. 6) [67, 71]. Struktura ta przypomina strukturę obserwowaną w liposferach złożonych ze stałego i płynnego lipidu (str. 42).



Ryc. 6. Model cząstki SLN z tripalmitynianu glicerolu zawierającej ubidekarenon (Q_{10}) [67].

Porównywano nanosfery z wosków i glicerydów pod względem zdolności inkorporacji retynolu, wielkości cząstek oraz sieci krystalograficznej [72]. Użyto glicerydy: monostearynian glicerolu (Imwitor 900), behenian glicerolu (Compritol 888) i tripalmitynian glicerolu (Dynasan 116), natomiast badane woski to palmitynian cetylu (Cutina CP) i wosk pszczeli. Liposfery zbudowane z glicerydów wykazały dużą zdolność inkorporacji substancji leczniczej, lecz ich stabilność fizyczna była bardzo mała. Spośród badanych triglicerydów najbardziej stabilny układ uzyskano z Dynasanem 116, natomiast Imwitor tworzył najmniej stabilne zawiesiny - dochodziło do aglomeracji cząstek. Z kolei cząstki lipidowe na bazie wosków wykazywały wprawdzie oczekiwaną wielkość oraz zadowalającą trwałość fizyczną, lecz ich wysoko zorganizowana struktura krystaliczna nie pozwalała na wystarczającą inkorporację substancji leczniczej: udało się w nich zamknąć jedynie ok. 10% całkowitej dawki retynolu, gdy tymczasem w liposferach z Compritolu wskaźnik ten wynosił 70%.

Substancje lecznicze mogą być inkorporowane w sieci krystalicznej lipidu, która jest niedoskonała. Ilość defektów krystalicznej matrycy lipidowej warunkuje zdolność inkorporacji w niej substancji leczniczych. Substancja lecznicza może być zamknięta w cząstce, gdy nie zaburza struktury krystalicznej lipidu lub jeżeli jej cząsteczki pasują przestrzennie do sieci, a także, gdy substancja lecznicza i matryca lipidowa mają zdolność formowania wspólnej sieci krystalicznej. Jeśli jest to niemożliwe, substancja lecznicza jest wykluczana z matrycy lipidowej podczas krystalizacji lub jej przemian polimorficznych i w konsekwencji wykrywana jest w fazie wodnej, w której obserwuje się jej wytrącenie. Przykładem substancji, które ulegają inkorporacji w liposferach (w określonym zakresie stężeń) są wspomniane wyżej retynol i Q_{10} [69, 70, 72]. Ich cząsteczki posiadają długie i apolarne łańcuchy węglowe, co może być korzystne dla „wpasowania się" ich w strukturę krystaliczną lipidu. Także użycie proleku substancji lipofilowych, np estrów długołańcuchowych kwasów tłuszczowych służy zwiększeniu inkorporacji [66].

Wyniki badań inkorporacji wielu innych substancji leczniczych nie są jednoznaczne i trudno jest na ich podstawie ustalić jakie są reguły doboru matrycy lipidowej i emulgatora, tak aby uzyskać zadowalające stężenie substancji leczniczej w nośniku. Poniżej przedstawione są niektóre prace poświęcone temu zagadnieniu.

Próbowano inkorporować menadion w dyspersji nanosfer, gdzie fazę lipidową stanowił pojedynczy lipid: trimyrystynian glicerolu [64]. Stwierdzono, że stan fizyczny matrycy lipidowej jest ważnym czynnikiem determinującym zdolność inkorporacji substancji leczniczej. Krystalizacja lipidu prowadziła do wykluczania substancji leczniczej z matrycy i wytrącania jej kryształów (igły) w fazie wodnej dyspersji chłodzonej w temp. 4°C. Inkorporacja była znacząco mniejsza niż obserwowana w cząstkach w stanie przechłodzonym [64].

W liposferach sporządzanych metodą dyfuzji rozpuszczalnika inkorporowano cyklosporynę A jako modelową substancję lipofilową [73]. Udało się inkorporować 97,5% całkowitej dawki cyklosporyny A w matrycy ze stearyloaminy, wprowadzając substancję leczniczą w ilości 5 mg/50 mg lipidu. Ponadto cyklosporynę A inkorporowano również w SLN sporządzanych metodą mikroemulsji [74]. Do uzyskania mikroemulsji użyto kwas stearynowy i lecytynę sojową. Wprowadzając cyklosporynę A w ilości 440 mg/g lipidu, uzyskano inkorporację najwyżej 13% substancji.

W SLN sporządzanych metodą mikroemulsji inkorporowano również interleukinę-2, paklitaksel, a także kompleksy β – cyklodekstryn z hydrokortyzonem i progesteronem [28]. Uzyskano wydajność inkorporacji w zakresie od 2,8% (paklitaksel) do 48% (interleukina-2).

Badano wpływ rodzaju matrycy lipidowej na inkorporację nimesulidu w SLN [45]. Przy zastosowaniu tristearynianu glicerolu zamykaniu ulegało 10% substancji leczniczej, w Precirolu - 28%, a w Compritolu - 27%. Ponadto stwierdzono, że w SLN opartych na tristearynianie glicerolu dodatek Spanu 60 prowadził do wzrostu inkorporacji nimesulidu z 10% do 34%.

W SLN z kwasu stearynowego, kwasu behenowego i diglicerydu stearynowego i cytrynowego (Acidan N12) inkorporowano diazepam [75]. Uzyskano zamykanie substancji leczniczej w ilości 1,2 – 2,2%, niezależnie od użytego lipidu. Ponadto stwierdzono, że proces wyjaławiania nie wpływa na stopień zamykania substancji leczniczej. Spośród badanych lipidów najmniej korzystnym pod względem inkorporacji diazepamu okazał się Acidan N12.

Podejmowano również próby uzyskania mikrosfer z bupiwakainą, które zawierałyby substancję leczniczą w ilości 0,5 g/g lipidu [55]. Dla wszystkich formulacji zawierających triglicerydy krótkołańcuchowe (trikaprynian i trilaurynian) ilość bupiwakaniny oznaczona w fazie wodnej była wyższa (43 - 87,2%) w porównaniu z układami, gdzie lipid stanowiły triglicerydy długołańcuchowe (tristearynian i triarachidynian – 19 - 42%). Ponadto zaobserwowano również wpływ emulgatora na oznaczaną ilość substancji leczniczej w fazie wodnej. Gdy zastosowano fosfolipid naturalny, w porównaniu do układu stabilizowanego fosfolipidami syntetycznymi (10 - 19%) ilość oznaczana w fazie wodnej była znacząco wyższa (43,2% całkowitej dawki).

Substancja lecznicza może mieć wpływ na stabilność fizyczną zawiesin liposfer. Pod tym względem badano SLN z Dynasanu 112 i Compritolu, w których inkorporowano tetrakainę i etomidat (1 - 10% w stosunku do lipidu) [76]. Inkorporacja tych substancji w matrycy zbudowanej z Dynasanu wywarła jedynie niewielki wpływ na wielkość cząstek liposfer i potencjał zeta, niezależnie od dawki substancji. Również stabilne były nanosfery na bazie Compritolu z zawartością 1% i 5% tetrakainy. Natomiast wyższe stężenia tetrakainy (10%) oraz etomidatu (5 i 10%) powodowały zwiększenie wielkości cząstek SLN.

Lipidowe cząstki są nośnikiem przede wszystkim dla substancji o charakterze lipofilowym. Hydrofilowe substancje mogą być inkorporowane jedynie w małym stopniu. Niewielka jednak inkorporacja może być wystarczająca dla peptydów czy białek [77]. I tak podjęto próbę użycia SLN jako biozgodnych nośników albumin [78]. Aby zapobiec rozkładowi białek w procesie tworzenia liposfer, adsorbowano albuminy na powierzchni wytworzonych wcześniej SLN. Otrzymywano cząstki o wielkości 660 nm, zawierające od 2,5 do 15% albumin.

Cząstki lipidowe można otrzymywać sprzęgając hydrofilowe substancje lecznicze z lipidem, np. przez tworzenie soli z anionem stanowiącym resztę kwasu

tłuszczowego lub przez wiązania kowalencyjne. Uzyskane połączenie lipidowe może być topione i wprowadzane do liposfer w procesie ich sporządzania, przy zastosowaniu metody gorącej homogenizacji. W zależności od rodzaju sprzęgania, w takim typie cząstek można osiągnąć inkorporację rzędu 30 – 50% [77]. Można więc mówić o dodatkowym typie nanocząstek lipidowych: LDC – Lipid Drug Conjugate [21, 79, 80].

Stworzono połączenie zasady diminazenu z kwasem stearynowym lub z kwasem oleinowym [80]. Połączenia uzyskiwano poprzez rozpuszczanie w etanolu substancji leczniczej i kwasu tłuszczowego w stosunku molowym 2:1, a następnie odparowanie rozpuszczalnika w temp. 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskaną substancję dyspergowano w 1% wodnym roztworze polisorbatu 80 z glicerolem homogenizując (20 – 27 cykli, 1500 bar) z chłodzeniem produktu pomiędzy cyklami tak, aby temperatura procesu nie przekroczyła 40°C. W taki sposób uzyskano 5% zawiesinę cząstek LDC. Substancję leczniczą inkorporowano w ilości 33%.

6. DOSTĘPNOŚĆ FARMACEUTYCZNA I BIOLOGICZNA SUBSTANCJI LECZNICZYCH Z LIPOSFER

Badania in vitro

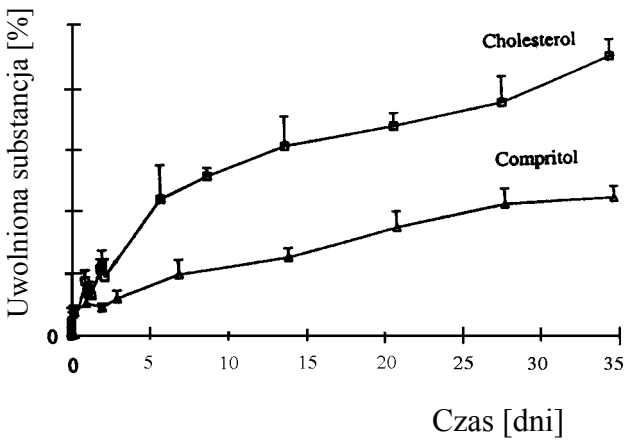
Aby doszło do wywołania efektu terapeutycznego substancja lecznicza musi uwolnić się z postaci leku. W warunkach *in vitro* substancja lecznicza uwalnia się z matrycy lipidowej na zasadzie dyfuzji. Na szybkość uwalniania ma wpływ skład matrycy lipidowej, użyte emulgatory, a przede wszystkim lokalizacja substancji leczniczej w cząstce lipidowej. Gdy substancja lecznicza znajduje się w powłoce (model inkorporacji rdzeń-powłoka I), wtedy najczęściej następuje gwałtowne uwalnianie, natomiast, gdy substancja znajduje się w stałym rdzeniu lipidowym (model stałego roztworu lub rdzeń-powłoka II), można spodziewać się efektu przedłużonego uwalniania.

Wyznaczano profil uwalniania substancji leczniczych z liposfer różnymi metodami. Należy zaznaczyć, że do tej pory brakuje standardowej metody badania dostępności farmaceutycznej substancji leczniczej nie tylko z zawiesin liposfer, lecz także z mikrosfer polimerowych, stąd też różnorodność stosowanych technik:

1) ***metoda łopatkowa*** - z użyciem farmakopealnego aparatu do badania uwalniania z tabletek [13, 81],
2) ***metoda wielokompartmentowej komory obrotowej*** składającej się z dwóch kompartmentów: donora i akceptora, pomiędzy którymi znajduje się błona dializacyjna [24, 26, 74],

3) ***metoda bez membrany*** - dyspersję SLN umieszczano w probówce z określoną ilością wodnego roztworu polisorbatu, na którego powierzchnię ostrożnie dodawano Miglyol 812 jako fazę akceptorową; probówkę umieszczano w termostatowanej (32°C) wytrząsarce [42],
4) ***metoda dyfuzji z worka dializacyjnego*** - zawiesinę liposfer umieszczano w worku dializacyjnym i zanurzano w płynie akceptorowym mieszanym mieszadłem łopatkowym [22] lub mieszadłem magnetycznym [81, 83],
5) ***metoda odwróconej dializy z użyciem worka dializacyjnego*** - w dyspersji nanosfer lipidowych umieszczano worki dializacyjne z fazą akceptorową [25],
6) ***metoda w probówkach testowych*** - SLN dyspergowano w roztworze wodnym zawierającym 40% makrogolu oraz 0,5% polisorbatu 80 (pH 7,03) i sonikowano przez 10 min, a następnie wytrząsano w temp. 37°C [47],
7) ***metoda w komorach dyfuzyjnych Franza*** - stosowano termostatowane komory z filtrem membranowym nasyconym myrystynianem izopropylu, na który nanoszono koncentrat liposfer; układ miał symulować warstwę rogową skóry [42, 84].

Uzyskano przedłużone uwalnianie prednizolonu z SLN na bazie cholesterolu lub Compritolu, gdzie inkorporowano 0,7% - 0,8% substancji leczniczej: w warunkach *in vitro* przez ponad 5 tygodni uwolniło się odpowiednio ok. 83% i 37% całkowitej dawki prednizolonu. Profil uwalniania zobrazowano na ryc. 7 [81].

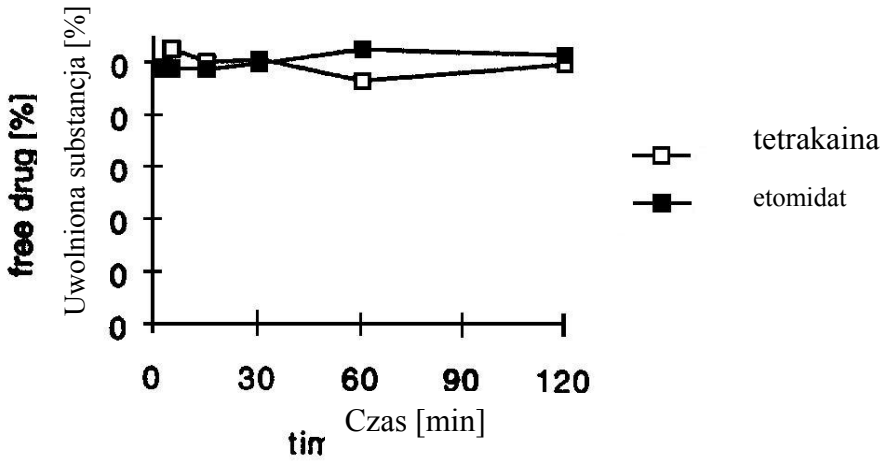


Ryc. 7. Uwalnianie prednizolonu z SLN w zależności od rodzaju matrycy lipidowej [81].

W badaniach SLN z cyklosporyną A zaobserwowano w czasie 15 min gwałtowne uwolnienie ok. 18% całkowitej dawki substancji leczniczej, lecz przez kolejne 16 dni substancja lecznicza uwalniała się w sposób przedłużony, ze stałą szybkością - 4% cyklosporyny/dzień [73]. W krótkoterminowym badaniu uwalniania cyklosporyny A, z SLN sporządzanych metodą mikroemulsji, stosując wielokompartmentową komorę obrotową, po 2 h obserwowano uwolnienie mniej niż 4% dawki substancji leczniczej, gdy w tym czasie z nasyconego roztworu wodnego uwalniało się ponad 60% cyklosporyny A [74].

Porównywano szybkość uwalniania witaminy A (retynolu) z SLN (Compritol) z uwalnianiem z nanoemulsji [84]. Do badań zastosowano przepływowe komory dyfuzyjne Franza. W czasie 6 h uwalnianie z SLN było trzykrotnie wolniejsze niż z emulsji, natomiast w przedziale czasowym 12 – 24 h szybkość uwalniania z obu układów była podobna. Ponadto zaobserwowano korelację pomiędzy przemianami polimorficznymi lipidu i wzrastającą szybkością uwalniania substancji leczniczej. Autorzy wnioskowali, że przedłużone uwalnianie retynolu z Compritolu można osiągnąć kontrolując przemianę polimorficzną formy β' w formę β przez dobór odpowiednich emulgatorów [84].

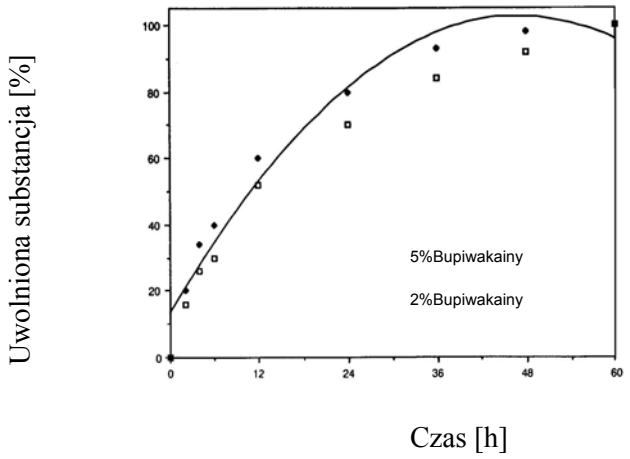
Nie uzyskano przedłużonego uwalniania tetrakainy i etomidatu z nanosfer lipidowych złożonych z behenianu glicerolu (Compritol) i trilaurynianu glicerolu (Dynasan 112) [81]. Tetrakainę i etomidat inkorporowano w ilości 1%, 5% i 10%. Gwałtowne uwalnianie substancji zaobserwowano z SLN złożonych zarówno z Dynasanu jak i Compritolu (Ryc. 8). Profil ten wskazuje na wątpliwy wynik wydajności zamykania tych substancji leczniczych w cząstkach lipidowych (85 – 100%).



Ryc. 8. Uwalnianie substancji leczniczych z SLN zbudowanych z Compritolu i stabilizowanych poloksamerem [81].

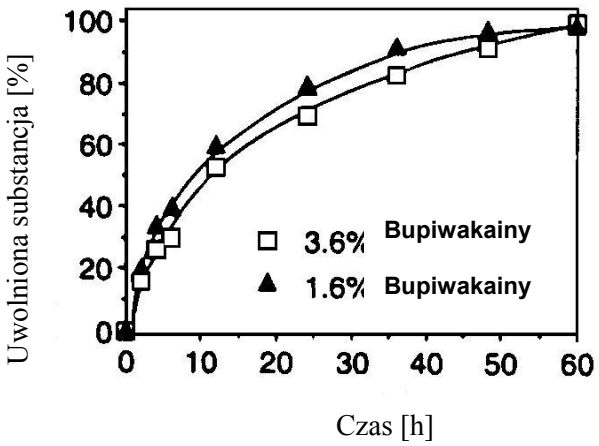
Badano także uwalnianie klotrimazolu z SLN, przeznaczonych do podania miejscowego [38]. Porównywano SLN zawierające 10% i 20% fazy lipidowej. Szybkość uwalniania klotrimazolu zależała od całkowitego stężenia substancji leczniczej w zawiesinie. Klotrimazol uwalniał się szybciej, gdy użyto go w niższym stężeniu (0,5%), ponieważ substancja lecznicza znajdowała się w powłoce cząstki lipidowej, natomiast gdy użyto wyższe stężenie (1%) substancji leczniczej, szybkość dyfuzji substancji leczniczej uległa zmniejszeniu.

Badano uwalnianie bupiwakainy z liposfer metodą z użyciem worka dializacyjnego [81]. Kontrolę stanowił roztwór bupiwakainy do wstrzykiwań o stężeniu 0,75% (Marcaine). Zawartość bupiwakainy w zawiesinie liposfer wynosiła 2 i 5%. Początkowo w fazie akceptorowej oznaczono 4% substancji leczniczej, natomiast pozostała dawka bupiwakainy uwolniła się w ciągu 48 h (Ryc. 9), natomiast w próbie kontrolnej uwolnienie całej dawki substancji leczniczej nastąpiło w ciągu kilku godzin.



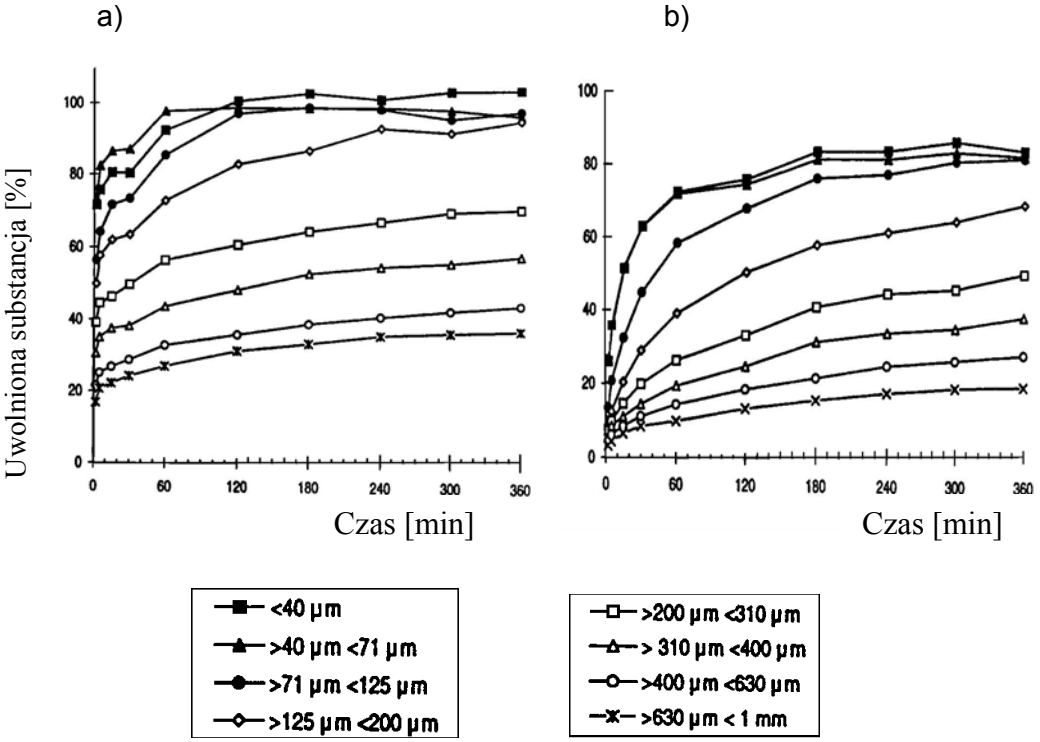
Ryc. 9. Uwalnianie bupiwakainy z liposfer [81].

Z kolei Masters i Domb [83] badając profil uwalniania bupiwakainy z liposfer o wielkości 5-15μm (3,6% i 1,6% substancji leczniczej), obserwowali uwalnianie bupiwakainy w sposób przedłużony w czasie dłuższym niż 2 dni, co obrazuje ryc. 10.



Ryc. 10. Uwalnianie bupiwakainy z mikrosfer lipidowych [83].

Wpływ na szybkość uwalniania substancji leczniczych z liposfer ma wielkość cząstek lipidowych, co obserwowano prowadząc badania uwalniania (metoda łopatkowa) substancji leczniczych (tetrakainy i etomidatu) z mikrosfer lipidowych o różnej wielkości cząstek [81]. Otrzymano mikrosfery na bazie Compritolu o średnicy od 40 μm do 1 mm. Wraz ze wzrostem średnicy liposfer, zmniejszała się szybkość uwalniania substancji leczniczych, co obrazuje ryc. 11.



Ryc. 11. Profil uwalniania tetrakainy (a) i etomidatu (b) z mikrosfer lipidowych z Compritolu w zależności od średnicy cząstek [81].

Uwalnianie substancji leczniczej w warunkach *in vivo* zachodzi na drodze dyfuzji i degradacji matrycy lipidowej przez lipazy. Dlatego też badania *in vitro* prowadzono stosując również dodatek enzymów [85].

Nanosfery lipidowe wykazują różny stopień trawienia przez enzymy lipolityczne, w zależności od składu matrycy lipidowej i użytych emulgatorów [86]. W badaniach wykazano zależność pomiędzy szybkością trawienia enzymatycznego, a długością łańcucha kwasu tłuszczowego wchodzącego w skład triglicerydów. Użycie triglicerydów o dłuższych łańcuchach kwasów tłuszczowych powodowało spowolnienie rozkładu enzymatycznego. Dla badanych SLN najszybsza degradacja enzymatyczna zachodziła dla Dynasanu 114 (myrystynian glicerolu), gdzie lipazy preferowały lipidy o krótkim łańcuchu, średnia - dla palmitynianu cetylu, a najwolniejsza - dla lipidów z dłuższym łańcuchem lipidowym (Compritol ATO 888).

Także emulgatory zastosowane do stabilizacji zawiesin SLN wywierały duży wpływ na szybkość rozkładu enzymatycznego. Użycie poloksameru 188 zapobiegało szybkiej degradacji *in vitro* cząstek na bazie Dynasanu 114, natomiast cholan sodu przyspieszał trawienie enzymatyczne matrycy SLN. Taki dominujący wpływ emulgatorów może być wykorzystany w projektowaniu optymalnego składu SLN z odpowiednią szybkością rozkładu enzymatycznego, co w konsekwencji daje kontrolowane uwalnianie, niezależne od matrycy lipidowej [86].

Podjęto również interesujące badania wpływu stopnia krystalizacji lipidu na szybkość trawienia enzymatycznego przez lipazy [87]. Jako matryc użyto Dynasanu 114 i 116, a emulgatorami były cholan sodu i poloksamer 407. Typ emulgatorów i warunki przechowywania wpływały na krystalizację matrycy lipidowej, a w konsekwencji na szybkość degradacji enzymatycznej. SLN sporządzone na bazie szybko krystalizującego lipidu (Dynasan 116), z użyciem emulgatora nie wpływającego na proces krystalizacji (poloksamer 407), nie wykazywały zmian szybkości rozkładu przez enzymy w trakcie przechowywania. Z kolei SLN oparte na Dynasanie 114 (z większą ilością formy α), stabilizowane cholanem sodu, były trawione szybciej, ponieważ emulgator dodatkowo zaburzał krystalizację. Szybkość trawienia ulegała zmianie podczas przechowywania, gdy wzrastał stopień krystalizacji lipidu. W badaniach tych potwierdzono też fakt spowalniania trawienia enzymatycznego w obecności poloksameru 407 [87].

Badania in vivo

O nadziejach związanych z wykorzystaniem liposfer jako nośników substancji leczniczych, szczególnie dla podania pozajelitowego, świadczy znaczna ilość publikacji na temat farmakokinetyki substancji leczniczych podanych w tej formie. Badania te prowadzone były na zwierzętach.

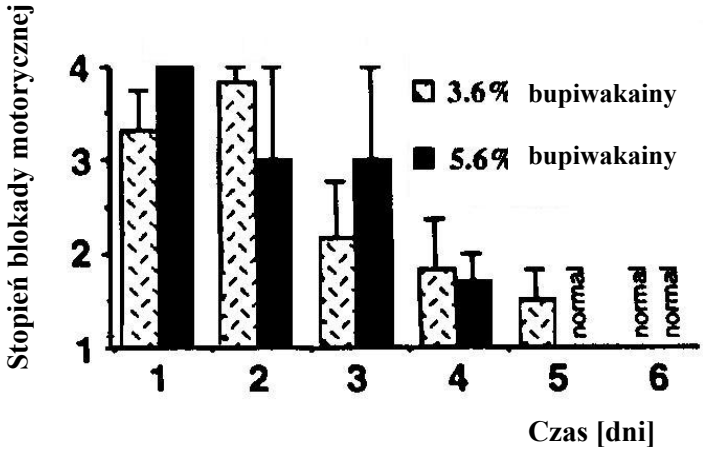
Zwierzętom laboratoryjnym podawano dożylnie SLN z tobramycyną oraz doksorubicyną, porównując stężenia w tkankach z obserwowanymi po podaniu roztworów [28]. Postać nanosfer lipidowych pozwala na wydłużenie czasu biologicznego półtrwania ($t_{0,5}$), który dla tobramycyny wynosi 2 h. Oznaczono niższe stężenia doksorubicyny w poszczególnych tkankach w porównaniu z obserwowanymi po podaniu roztworu. Wyjątkiem była tkanka mózgowa. Stwierdzono, że nanocząstki lipidowe wstrzyknięte dożylnie są zdolne do przejścia bariery krew - mózg [28].

Wykryto również wyższe stężenia w mózgu po podaniu dożylnym następujących substancji leczniczych w postaci SLN: paklitakselu [24], 3',5'-dioktanoylo-5-fluoro-2'-deoksyurydyny [25], idarubicyny [26] i indometacyny [27].

Dożylnie podawano również doksorubicynę w postaci SLN zbudowanych z kwasu stearynowego lub jego koniugatu z makrogolem 2000 [23]. Po podaniu roztworu we krwi wykryto substancję leczniczą już po 1 min, natomiast po aplikacji SLN, zarówno jednego i drugiego typu, po 30 – 45 min. Również i w tym badaniu doksorubicynę wykryto w mózgu i jej stężenie wzrastało wraz z ilością dodanego makrogolu 2000, natomiast w innych tkankach ilość doksorubicyny była niższa, niż po podaniu roztworu [23].

Kamptotecynę w ilości 0,1% inkorporowano w SLN na bazie kwasu stearynowego. Otrzymane liposfery miały wielkość ok. 196 nm. Po podaniu dożylnym oznaczano poziom substancji leczniczej we krwi i w tkankach. W porównaniu z roztworem po aplikacji SLN oznaczono wyższe stężenia substancji leczniczej [22].

Wykazano, że mikrosfery lipidowe z bupiwakainą o wielkości 5-15 μm mogą spowodować motoryczną i sensoryczną blokadę nerwu kulszowego szczura [83]. Określono stopień blokady motorycznej: 1) reakcja normalna, 2) częściowa blokada motoryczna oraz 3) i 4) silna blokada motoryczna. Na ryc. 12 przedstawiono wyniki obserwacji po podaniu okołonerwowym liposfer o wielkości cząstek ok. 18 μm. Silny blok motoryczny utrzymywał się w czasie do 3 dni i wykazano istotne różnice pomiędzy kończyną, do której wstrzykiwano mikrosfery lipidowe z bupiwakainą, a kończyną kontrolną. Nie udowodniono zależności stopnia blokady od dawki substancji leczniczej (3,6 – 5,6%). Wyniki odzwierciedlały profil uwalniania bupiwakainy z mikrosfer lipidowych *in vitro* w czasie 3 dni (str. 35). Ponadto stwierdzono, że blokada nerwu, spowodowana podaniem liposfer z bupiwakainą, jest bezpieczna i odwracalna.



Ryc. 12. Blokada motoryczna nerwu kulszowego szczura po podaniu mikrosfer lipidowych z bupiwakainą [83].

Królikom podawano *per os* mikrosfery lipidowe z pirybedylem i uzyskano przedłużone uwalnianie *in vivo* w czasie do 24 h (wartość t_{max} wynosiła 1 h, a dla zawiesiny pirybedylu 15 min) [29].

Podanie szczurom dodwunastniczo SLN z tobramycyną za pomocą kaniuli prowadziło do wykrycia wysokiego stężenia substancji leczniczej we krwi nawet po 24 h od podania, a nanocząstki lipidowe znajdowały się w limfie. Natomiast tobramycyna z roztworu nie wchłaniała się [28].

Porównywano stężenia diazepamu we krwi po podaniu doodbytniczym trzech postaci: roztworu, emulsji submikronowej i SLN [5]. Matryce lipidowe SLN tworzył palmitynian cetylu. Absorpcja diazepamu po podaniu doodbytniczym w postaci SLN była niska. Wartości C_{max} i AUC dla SLN były mniejsze niż obserwowano po podaniu roztworu lub emulsji submikronowej. Niską biodostępność diazepamu z SLN tłumaczono inkorporacją substancji leczniczej w ortorombowej matrycy palmitynianu cetylu.

Zawiesinę SLN o średnicy poniżej 100 nm, zawierającą 0,3% tobramycyny podawano do oka królika i porównano z efektem po podaniu roztworu substancji leczniczej [26]. Stężenie tobramycyny w płynie łzowym było oznaczane do 6 h. W porównaniu z kroplami z tobramycyną, dzięki SLN uzyskano znacząco przedłużone działanie: wartość t_{max} dla SLN wynosiła 4 h, a dla kropli - 0,5 h [30].

Z kolei zwężenie źrenic po podaniu pilokarpiny w postaci SLN było 2,8 razy większe niż po podaniu roztworu pilokarpiny [28].

Badano też przenikanie przez skórę kortykosteroidów w postaci SLN [34, 35, 36]. Otrzymano dobrze tolerowane przez skórę preparaty, a przenikanie prednikarbatu było większe o 30% w porównaniu z kremem referencyjnym [34]. Stwierdzono, że nanosfery lipidowe są dobrym nośnikiem substancji, które docelowo mają być dostarczane przezskórnie [35]. Porównywano absorpcję walerianianu betametazonu z kremu, nanoemulsji lub nanosfer lipidowych. Z kremu i nanoemulsji absorpcja była podobna, natomiast po podaniu dyspersji SLN notowano czterokrotnie większe przenikanie [36].

W tabeli 3 przedstawiono, na podstawie wyżej wymienionych publikacji, podstawowe cechy farmakokinetyczne leku podanego w postaci liposfer.

Tabela 3. Farmakokinetyka substancji leczniczych podawanych w postaci liposfer

PODANIE	**FARMAKOKINETYKA**	**Substancja lecznicza [piśmiennictwo]**
Dożylne	przedłużone działanie	tobramycyna [28]
	kumulacja substancji leczniczych w mózgu	paklitaksel [24], idarubicyna [26], 3',5'-dioktanoylo-5-fluoro-2'-deoksyurydyna [25], indometacyna [27]
	mniejsza kumulacja w tkankach (poza mózgiem)	doksorubicyna [23]
	wyższe stężenie w tkankach	kamptotecyna [22]
Domięśniowe	przedłużone działanie	bupiwakaina [83]
Doustne	przedłużone działanie	pirybedyl [29]
Dodwunastnicze	zwiększone stężenie we krwi	tobramycyna [28]
Doodbytnicze	mniejsza dostępność biologiczna	diazepam [5]
Do oka	zwiększona dostępność biologiczna	tobramycyna [30], pilokarpina [28]
Na skórę	zwiększone przenikanie do naskórka	prednikarbat [34], walerianian betametazonu [36]

7. NANOSTRUKTURALNE NOŚNIKI LIPIDOWE (NLC®) JAKO ZMODYFIKOWANA FORMA LIPOSFER

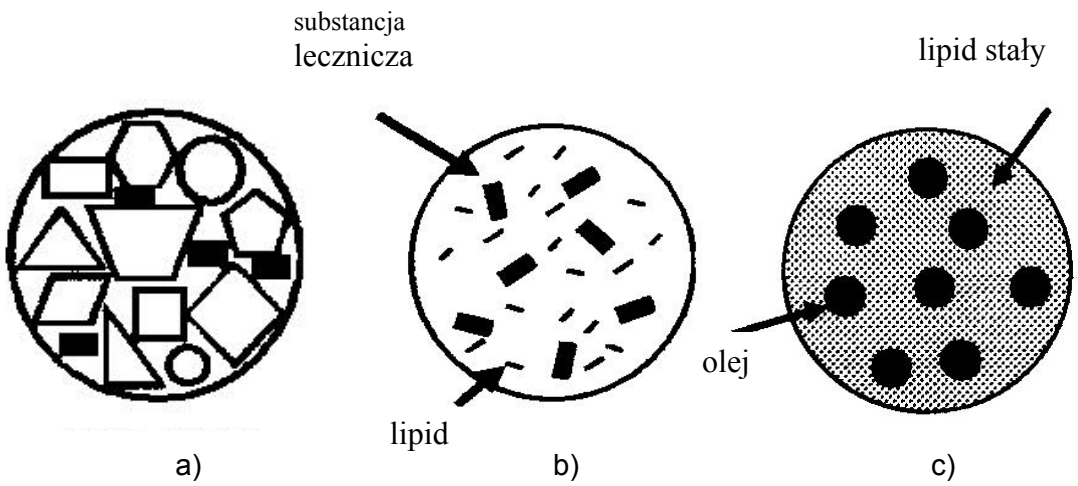
Jak wcześniej wskazywano (str. 25) niska zdolność inkorporacji substancji leczniczej jest związana ze ściśle upakowaną strukturą krystaliczną matrycy lipidowej SLN. Według Müllera i wsp. [20] można wyeliminować tą niekorzystna cechę, przez dodanie płynnego lipidu, co powoduje zmiany w strukturze krystalicznej matrycy lipidowej. Proponowana jest więc nowa generacja cząstek lipidowych, tzw. nanostrukturalne nośniki lipidowe (Nanostructured Lipid Carriers, NLC®) [20, 88]. Najczęściej dodawanym olejem jest Miglyol 812, ze względu na dobre właściwości jako rozpuszczalnika substancji leczniczych oraz biozgodność składu (trigliceryd kwasu kaprylowego i kapronowego) [89].

Celem modyfikacji liposfer było przede wszystkim zróżnicowanie przestrzenne matrycy lipidowej. Müller i wsp. [20] w badaniach nad strukturą cząstek lipidowych zawierających płynny lipid wskazują, że dodatek oleju prowadzi do zmiany wewnętrznej struktury SLN i dzięki temu redukuje się nadmierne wykluczanie substancji leczniczej z jej wnętrza. Można więc spodziewać się zwiększenia inkorporacji substancji leczniczej.

Badania nad strukturą nanocząstek zbudowanych z lipidów stałych i ciekłych prowadzono stosując NLC złożone z behenianu glicerolu (Compritol 888) i Miglyolu 812 w różnych stosunkach [88]. Cząstki badano metodą DSC i wykazano, że oba lipidy mają zdolność mieszania się i ostatecznie formowania homogennych cząstek. W liposferach z wysoką zawartością Miglyolu (38%) krystalizacja matrycy lipidowej była jednak opóźniona.

Według Müllera i wsp. [20, 77] dodatek ciekłych lipidów do stałych matryc lipidowych prowadzi do powstania jednego z trzech typów NLC (Ryc. 13):

- typu niedoskonałego
- typu amorficznego
- typu wielokrotnego.



Ryc. 13. Schematyczna prezentacja trzech typów NLC: niedoskonałego (a), amorficznego (b) i wielokrotnego (c) [20, 43, 77].

W pierwszym typie (***typ niedoskonały***) lipidy stałe i płynne (oleje) są wymieszane. Różnice strukturalne pomiędzy tymi lipidami przyczyniają się do modyfikacji ściśle upakowanej struktury SLN. Proces krystalizacji w matrycy niedoskonałej prowadzi do powstania nieuporządkowanej struktury, która posiada wolne przestrzenie dla cząsteczek substancji leczniczej. Dzieje się tak, gdy ilość dodanego ciekłego lipidu jest niewielka [20, 77].

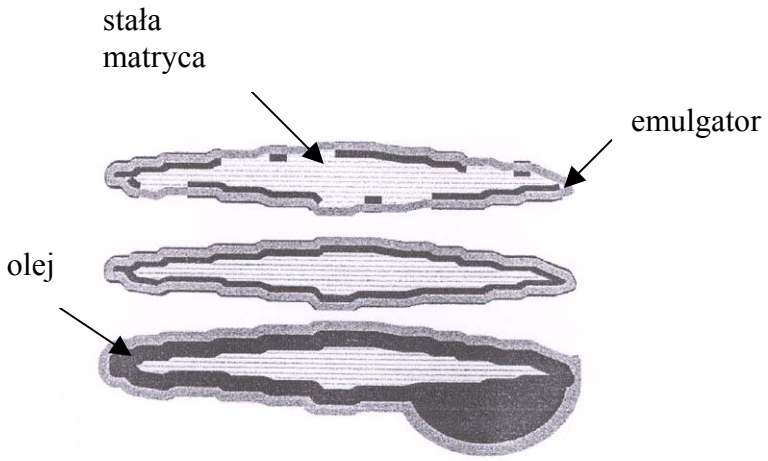
W typie ***amorficznym*** lipidy stałe i ciekłe są wymieszane w ten sposób, że nie dochodzi do ich krystalizacji. Matryca lipidowa jest stała, lecz nie krystalizuje. Zapobiega to wykluczaniu substancji leczniczej. Taki efekt uzyskuje się przez zmieszanie odpowiednich rodzajów lipidów stałych z ciekłymi, np. z myrystynianem izopropylu [20, 77].

Gdy wprowadzone są ciekłe lipidy w większej ilości powstaje tzw. ***typ wielokrotny***. W tym przypadku podczas procesu chłodzenia dochodzi do rozdziału faz i w konsekwencji do wydzielenia nanocząstek olejowych. W typie wielokrotnym, który stanowi dyspersję olej/lipid stały/woda, substancja lecznicza może rozpuszczać się w lipidzie ciekłym i w ten sposób jest chroniona przed środowiskiem wodnym [20, 77].

Cząstki NLC poddano szczegółowym badaniom strukturalnym stosując techniki ^{1}H-NMR, spektroskopię ESR, metodę DSC oraz metody rentgenowskie [90]. Porównywano dyspersje SLN, NLC oraz nanoemulsje. Jako lipidów użyto Compritolu i Miglyolu. Wyniki badań DSC wykazały dystrybucję oleju wewnątrz nanocząstek, gdy zawartość oleju jest niska (8 – 16%). Wtedy nanocząstki olejowe są otaczane stałą matrycą lipidową Compritolu, a wewnątrz matrycy ich układ jest przypadkowy.

Natomiast przy większej zawartości oleju (28 - 38%), fazy stałego i ciekłego lipidu są częściowo oddzielone, przy czym faza olejowa skupia się w centrum liposfer.

W odróżnieniu od powyższego modelu zaproponowanego przez zespół Müllera [77] oraz przez Jenninga i wsp. [89, 90], Jores i wsp. [91] stwierdzili, że rozmieszczenie oleju w NLC wewnątrz stałej matrycy lipidowej jest mało prawdopodobne, ze względu na zbyt ścisłą strukturę krystaliczną lipidu. Olej zostaje wykluczony na zewnątrz stałego lipidu podczas krystalizacji na etapie chłodzenia układu. Do tego zjawiska dochodzi nawet przy niewielkim stężeniu oleju w matrycy. W układach o niskim stężeniu lipidu płynnego, gdzie zawartość oleju jest zbyt mała, aby utworzyć samodzielną kroplę, olej przylega do powierzchni cząstki stałego lipidu. Wraz ze zwiększaniem się zawartości oleju w matrycy otoczka olejowa staje się kompletna i ostatecznie formuje się mikrokropelka olejowa na stałej cząstce lipidowej. Ponadto dowiedziono, że cząstki NLC nie posiadają struktury sferycznej, a raczej płytkową, natomiast olej rozmieszcza się między płytką stałego lipidu, a powierzchnią emulgatora znajdującego się na zewnątrz. Proces ten obrazuje ryc. 14 [91].

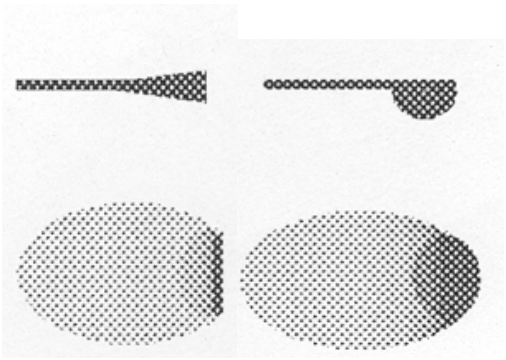


Ryc. 14. Struktura NLC zaproponowana przez Jores i wsp. [91].

Ci sami autorzy [92] badali także fizykochemiczne właściwości NLC za pomocą ^{1}H – NMR oraz ESR. Potwierdzili, że struktura NLC nie pozwoli, ze względu na budowę krystaliczną stałych lipidów, osiągnąć wysokiej inkorporacji substancji leczniczej, ani też nie zapewni jej ochrony przed środowiskiem wodnym.

Dodatkowo strukturę przedstawioną na ryc. 14 potwierdzają wyniki badań metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) [93]. W obrazie mikroskopowym

cząstki nanoemulsji uwidaczniały się jako sferyczne struktury, natomiast dyspersja SLN charakteryzowała się odmiennym wyglądem. Patrząc od góry cząstki SLN były kształtu kolistego lub eliptycznego, a widok z boku ujawniał ich strukturę płytkową (w postaci cienkich igieł). Z kolei struktura NLC (10% - 50% Miglyolu) miała charakter pośredni pomiędzy strukturą nanoemulsji i SLN. Widoczne były cienkie płytki o kształcie kolistym, na końcach których znajdowały się mikrokropelki płynnego oleju. Przy zawartości Miglyolu 10%, olej przylegał do powierzchni płytki tworząc strukturę dwufazową. Przy wzroście stężenia (30% i więcej), olej lokalizował się na jednym z końców płytki stałego lipidu formując kroplę i tym samym tworząc strukturę kształtem przypominającą łyżeczkę (ang. „nanospoon"). Obserwowane struktury przedstawia schemat (Ryc. 15).



Miglyol 10% Miglyol < 30%

Ryc. 15. Struktura „łyżeczkowa" NLC [93].

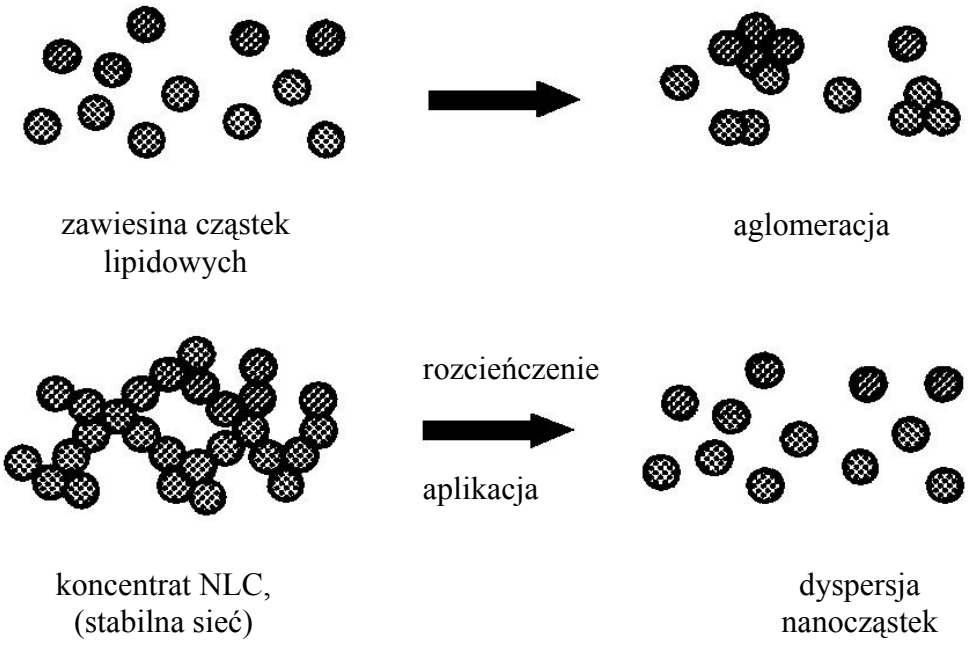
Nanostrukturalne nośniki lipidowe powinny przewyższać cząstki SLN pod względem zdolności inkorporowania i uwalniania substancji leczniczej, gdyż poprzez zróżnicowanie przestrzenne matrycy mają umożliwić inkorporację większej ilości substancji leczniczej oraz ograniczyć zjawisko wykluczania jej z cząstek podczas przechowywania.

Podjęto próbę inkorporacji retynolu w NLC złożonych z Compritolu i Miglyolu [88]. Porównywano matryce lipidowe ze wzrastającą ilością Miglyolu: 0% (SLN), 8%, 16%, 28%, 38% i 100% (nanoemulsja). Uzyskano zamykanie 0,33% retynolu w SLN, natomiast w układzie lipidów Compritol/Miglyol zamykano 3,8% substancji leczniczej. Stwierdzono wpływ zawartości oleju na szybkość uwalniania retynolu. Przedłużony

profil uwalniania substancji czynnej wykazały układy z niską zawartością Miglyolu (8% i 16%), natomiast przy ilości 28% i 38% uwalnianie substancji leczniczej przebiegało zgodnie z profilem uwalniania obserwowanym dla emulsji.

Jako modelową substancję lipofilową inkorporowano także znacznik - 2,2,6,6-tetrametylo-1-piperydynyloksy benzoesan [91]. Matrycę lipidową stanowił Compritol z dodatkiem Miglyolu w ilości 2%, 4% i 10%, a jako emulgator zastosowano poloksamer 188 (2,5%). Badania wykazały, że większość inkorporowanego znacznika została wykluczona do otoczki nanosfer, a nawet do fazy wodnej.

Podobnie jak w przypadku SLN, zaproponowano zwiększenie stężenia fazy lipidowej w zawiesinach NLC nawet do 95%, tworząc koncentraty. Ta postać ma zapobiegać trwałej agregacji cząstek lipidowych i w konsekwencji ma być osiągana stabilność fizyczna układu po rozcieńczeniu [20, 77]. Zakłada się, że struktura stężonych układów przypomina krzemionkę koloidalną, gdzie cząstki lipidowe tworzą sieć złożoną z „łańcuszków pereł", co stabilizuje układ przed rozcieńczeniem. Różnice pomiędzy zawiesiną NLC i koncentratem przedstawia ryc. 16.



Ryc. 16. Struktura zawiesiny i koncentratu NLC [20].

Według Müllera i wsp. [20] NLC mogą być podawane wszystkimi drogami opisanymi dla SLN. Przewiduje się uzyskanie przedłużonego uwalniania substancji leczniczych z NLC po podaniu podskórnym lub domięśniowym, np. erytropoetyny, lub podanie dożylne paklitakselu. Stała matryca nanocząstek lipidowych ma chronić przed rozkładem chemicznym substancję leczniczą, np. retynol czy koenzym Q_{10} [20].

Podobnie jak SLN również NLC mogą znaleźć zastosowanie w kosmetyce jako nośniki składników aktywnych, perfum czy nawet środków odstraszających owady [20, 43]. Do cząstek NLC wprowadzano np. filtry słoneczne, co dało efekt synergistyczny z efektem rozpraszania światła przez cząstki lipidowe [94].

8. OCENA TOKSYCZNOŚCI LIPOSFER W ZALEŻNOŚCI OD DROGI PODANIA

Brak dostatecznych danych na temat działań niepożądanych liposfer na tkanki, a także ewentualnej toksyczności tej postaci leku, stanowi główny czynnik decydujący o wyborze miejsca ich aplikacji i zastosowania.

Pomimo założenia, że zawiesiny liposfer mają być przeznaczone do podawania pozajelitowego, do dnia dzisiejszego żadna z dyspersji SLN lub NLC nie weszła na rynek farmaceutyczny [18]. Nie jest to związane ze stosowaniem emulgatorów, gdyż udowodniono, że układy te można tworzyć z emulgatorami akceptowanymi do podania pozajelitowego: lecytyną, polisorbatem 80, poloksamerem 188, glikocholanem sodu, Spanem 85 [1, 18].

Müller i wsp. [95, 96] badali *in vitro* cytotoksyczność SLN na bazie myrystynianu glicerolu i Compritolu. Jako emulgatorów użyto lecytyny, polisorbatu 80, poloksameru oraz glikocholanu sodu. Porównywano właściwości toksyczne otrzymanych liposfer wobec ludzkich granulocytów i stwierdzono, że działanie cytotoksyczne jest niższe w porównaniu z mikrosferami złożonymi z polimerów biodegradowalnych PLA/GA. Wyniki badań *in vitro* sugerują, że badane liposfery spełniały konieczne wstępne warunki dla postaci, które mają być wprowadzone do lecznictwa.

W przeciwieństwie do podania pozajelitowego, podanie miejscowe czy doustne nie stanowi problemu i układy mogą być w tym celu stosowane bez bardziej szczegółowych badań toksykologicznych. Dla miejscowego podania dopuszczalne są wszystkie składniki używane do sporządzania liposfer. Przy podaniu doustnym można z kolei wykorzystać każdy lipid i emulgator stosowany w postaciach aplikowanych doustnie, takich jak: tabletki, peletki czy kapsułki.

Wprawdzie dotychczasowe badania nie pozwalają jeszcze na zastosowanie kliniczne liposfer, lecz ich intensywność daje nadzieję na zaistnienie w lecznictwie tej nowej postaci leku.

II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Biodegradowalne substancje jak lipidy są obiecującymi składnikami nowoczesnych postaci leku i duża ilość publikacji poświęcona jest ich zastosowaniu w układach koloidalnych, których technologie współcześnie zalicza się do nanotechnologii farmaceutycznych. Wśród licznych prac poświęconych cząstkom złożonym z lipidów stałych w temperaturze pokojowej i temperaturze ciała ludzkiego niemal wszystkie poświęcone są cząstkom o wymiarach poniżej 1 μm, przeznaczonym do podania dożylnego, określanym jako nanosfery lipidowe (SLN - Solid Lipid Nanoparticles). Nieliczne publikacje dotyczą mikrosfer lipidowych - cząstek o wielkości 1-50 μm. Zawiesiny takich cząstek mogą być podawane pozajelitowo – na drodze wstrzyknięcia podskórnego, domięśniowego czy okołostawowego. W efekcie można oczekiwać przedłużonego działania, na skutek biodegradacji wolniejszej niż po wstrzyknięciu nanosfer.

Celem pracy było sporządzenie cząstek lipidowych o średnicy powyżej 1 μm, które stanowiłyby biodegradowalne nośniki leku o przedłużonym działaniu, przeznaczone przede wszystkim do podania pozajelitowego. Założono użycie wyłącznie emulgatorów akceptowanych do użycia parenteralnego: fosfolipidów, poloksameru, polisorbatu oraz estrów sorbitanu z kwasami tłuszczowymi. Jako główny badany lipid wytypowano palmitostearynian glicerolu, na podstawie biozgodnego składu chemicznego i odpowiedniej temperatury topnienia (55ºC). Glicerol obecny w układach regulował ciśnienie osmotyczne.

Metody otrzymywania nanosfer lipidowych są opisane w licznych pracach, a najczęściej stosowaną jest metoda emulgowania i homogenizacji na gorąco. Zastosowano do otrzymania mikrosfer lipidowych podobną metodę, z tą różnicą, że nie stosowano etapu homogenizacji wysokociśnieniowej, co pozwalało na uzyskanie mikrosfer lipidowych. Założono, że wielkość cząstek liposfer powinna zawierać się w zakresie 1-30 μm, tak by odpowiadała wielkości cząstek w zawiesinach pozajelitowych stosowanych w praktyce klinicznej. Formą aplikacyjną liposfer powinna być jałowa zawiesina w izotonicznej fazie wodnej.

Ponieważ w badaniach wstępnych zaobserwowano, że podstawowym problemem związanym z trwałością dyspersji liposfer w fazie wodnej jest ich żelowanie z wytworzeniem układu półstałego, poszukiwano składu i sposobu sporządzania zawiesin mikrosfer tak, by zachowywały płynną konsystencję podczas długoterminowego przechowywania. Wzięto pod uwagę tworzenie matryc liposfer z lipidu stałego (głównie palmitostearynianu glicerolu - Precirol ATO 5), jak również z

lipidu stałego w mieszaninie z olejem (Miglyol), tworząc układy analogiczne do opisanych w literaturze nanostrukturalnych nośników lipidowych (NLC).

Zawiesiny liposfer zawierały 10% fazy lipidowej. Alternatywną formą mikrosfer lipidowych, podobnie jak dla nanosfer, mogłyby być koncentraty liposfer. Podjęto więc badania nad koncentratami zawierającymi 50% fazy lipidowej.

Badania histologiczne prowadzone na zwierzętach miały wyjaśnić, czy badane mikrosfery lipidowe ulegają biodegradacji po wielokrotnym domięśniowym podaniu zwierzętom.

Najistotniejszym etapem zaplanowanych badań była ocena stopnia inkorporacji substancji leczniczych w mikrosferach lipidowych i w tym celu tworzono zawiesiny i koncentraty liposfer z modelowymi substancjami o zróżnicowanej lipofilności: bupiwakainą, stearynianem bupiwakainy oraz indometacyną. Zmiany składu liposfer oraz sposobu ich sporządzania miały służyć zwiększeniu zamykania tych substancji w matrycy lipidowej liposfer. Kolejne doświadczenia pozwalały wyjaśnić, w jaki sposób substancja lecznicza oddziaływuje z cząstkami lipidowymi i czy charakter tych oddziaływań może zapewnić jej przedłużone uwalnianie, co mogłoby mieć zastosowanie w praktyce klinicznej. Badania te prowadzono mając na uwadze często rozbieżne wyniki publikowanych prac dotyczących zdolności nanosfer lipidowych do inkorporacji substancji leczniczych.

Temat badawczy realizowano wykorzystując szereg metod analitycznych: analizę ilościową substancji leczniczych prowadzono metodą HPLC, analizę wielkości cząstek liposfer – metodą dyfrakcji laserowej i mikroskopową, ponadto analizowano właściwości reologiczne koncentratów liposfer, a do identyfikacji syntezowanego stearynianu bupiwakainy użyto techniki różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC).

III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. ODCZYNNIKI I APARATURA

1.1. Odczynniki

- Acetonitryl (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Alkohol cetylowy (Henkel, Hamburg, Niemcy)
- Alkohol cetostearylowy (Henkel, Hamburg, Niemcy)
- Bupiwakaina (otrzymano z ZF Polfa, Warszawa)
- Chlorek sodu (Kopalnia Soli, Wieliczka)
- Compritol 888 ATO - *dibehenian glicerolu, behenian glicerolu* (Gatteffosé, Lyon, Francja)
- Eozyna (POCH, Gliwice)
- Faza ruchoma do chromatografii bupiwakainy i stearynianu bupiwakainy:

  40% (v/v) acetonitryl

  25% (v/v) metanol

  35% (v/v) 0,01 mol/l roztworu buforowego fosforanowego pH 7,7 o składzie:

potasu diwodorofosforan (KH_2PO_4)	0,97 g
potasu wodorofosforan (K_2HPO_4)	1,24 g
woda oczyszczona	do 500 ml

- Faza ruchoma do chromatografii indometacyny:

roztwór octanu sodu 0,01 mol/l	35% (wag/wag)
metanol bezwodny do HPLC	65% (wag/wag)

  korekta za pomocą kwasu octowego lodowatego do pH 3,61
- Gliceryna bezwodna cz.d.a. (POCH, Gliwice)
- Hematoksylina (Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria)
- Hydroksyetyloceluloza (Hercules, Wilmington DE, USA)
- Indometacyna (otrzymano z ZF Jelfa, Jelenia Góra)
- Karmeloza sodowa - *Karboksymetyloceluloza sól sodowa* (Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Niemcy)
- Kwas octowy lodowaty cz.d.a. (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- Kwas solny (POCH, Gliwice)
- Kwas stearynowy (Loba Feinchemie, Fischamend, Austria)
- Lecytyna jajowa - *Lipoid E-80* (Lipoid, Ludvigshafen, Niemcy)
- Metanol cz.d.a. (POCH, Gliwice)
- Metanol do chromatografii HPLC (POCH, Gliwice)

- Miglyol 812 - *olej MCT, Medium Chain Triglicerydes* (Celo Caesar&Loretz, Hilden, Niemcy)
- Mounting medium DPX (POCH, Gliwice)
- Parafina płynna (Laboratorium Galenowe PZF-Cefarm, Gdańsk)
- Parafina stała (Baker Chemical, Phillipsburg N.J., USA)
- Polisorbat 80 (Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria)
- Poloksamer 188 - *Pluronic F 68, Synperonic F 68* (Boehringer Ingelheim, Heidelberg, Niemcy)
- Potasu diwodorofosforan - KH_2PO_4 cz.d.a. (POCH, Gliwice)
- Potasu wodorofosforan - K_2HPO_4 cz.d.a. (POCH, Gliwice)
- Precirol - *palmitostearynian glicerolu* (Gatteffosé, Lyon, Francja)
- Roztwór buforowy fosforanowy pH 7,4 do uwalniania indometacyny:

roztwór diwodorofosforanu potasu (KH_2PO_4) 0,2 mol/l	5,00 ml
roztwór wodorotlenku sodu (NaOH) 0,2 mol/l	3,93 ml
woda oczyszczona	do 20,0 ml

- Sodu octan bezwodny cz.d.a. (POCH, Gliwice)
- Span 40 - *palmitynian sorbitanu* (Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria)
- Tripalmitynian glicerolu (Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Niemcy)
- Tristearynian glicerolu (Fluka Chemie, Buchs, Szwajcaria)
- Woda oczyszczona otrzymana przez wymianę jonową i odwróconą osmozę - system Elix3 (Millipore, Bedford, USA)
- Wodorotlenek sodu cz.d.a. (POCH, Gliwice)
- Wosk pszczeli biały - *Cera alba* (Pharma-Cosmetic, Kraków)

1.2. Aparatura

- Cieplarka (Termometal, Andrzejów)
- Dewar na ciekły azot typ KB 20 (Cryometal, Ričany, Rep. Czeska)
- Dezintegrator ultradźwięków typ UD-20 (Techpan, Puławy)
- Dyfraktometr laserowy, MasterSizer\E (Malvern Instruments, Malvern, Wielka Brytania)
- Kriostat CM 1900 (Leica, Niemcy)
- Łaźnia z ultradźwiękami typ UM-1 (Unitra, Unia, Olsztyn)
- Mieszadło szybkoobrotowe Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen, Niemcy)

- Mieszadło magnetyczne typ MM4 (Spółdzielnia Pracy Artykułów Techniczno-Metalowych, Poznań)
- Mikroskop biologiczny typ B1 223A (Motic, Wetzlar, Niemcy) wyposażony w kamerę Panasonic typu GP-KR 222 (Matsushita, Communication Industrial, Japonia) i program analizy obrazu Multiscan
- Osmometr (Knauer, Berlin, Niemcy)
- Pehametr, model 350 (Orion Beverly, USA) wyposażony w elektrodę kombinowaną ERH-11 (P.E.A.F. „Hydrometr")
- Reometr: Rheomat 115 typu płytka – płytka (Contraves, Wenzel Laborshop, Niemcy)
- Różnicowy kalorymetr skaningowy DSC 822^{e} heat flux (Mettler Toledo, USA)
- Sterylizator parowy ASHE (Spółdzielnia Pracy Mechaników, Warszawa)
- Waga typ WPS 1200/C (Zakład Mechaniki Precyzyjnej, Radwag, Radom)
- Waga analityczna typ PRLT A14 (Zakład Mechaniki Precyzyjnej, Gdańsk)
- Waga analityczna, elektroniczna WAX 62 (Zakład Mechaniki Precyzyjnej, Radwag, Radom)
- Wirówka WE-6 (Zakład Mechaniki Precyzyjnej, Warszawa)
- Wirówka typ 4122 (Hevans CHRUST, Osterröde, Niemcy)
- Wysokociśnieniowy homogenizator laboratoryjny 8.30 H (APV Gaulin, Hilversum, Holandia)
- Wytrząsarka do probówek Vortex (DHN, Warszawa)
- Wytrząsarka mechaniczna z termostatowaną łaźnią wodną, typ 375 (Elan)
- Zamrażarka typ TZ121E (PPSD, Żagań)
- Zestaw do HPLC (Merck Hitachi, Darmstad, Niemcy)
  Integrator model D-2500A,
  Detektor UV-VIS L-4250,
  Pompa typ L-6200A

1.3. Materiały

- Celulozowa błona dializacyjna M. W. 12400 (Sigma, St. Louis, USA)

  Sposób kondycjonowania błony:

  Wycięto odcinek rękawa błony długości 9 cm, zalano wrzącą wodą oczyszczoną i delikatnie podgrzewano w ciągu 5 min (temp. 90°C). Przeniesiono do zimnej wody oczyszczonej.
- Klipsy wykonane z materiału Nylon 66 (Sigma, St. Louis, USA)

- Kolumna Lichrospher 100 RP 18 (5 μm, 250 x 4 mm) (Merck Hitachi, Darmstad, Niemcy)
- Kolumna Lichrospher 100 RP 18 (5 μm, 125 x 4 mm) (Merck Hitachi, Darmstad, Niemcy)
- Sączek Microcon YM – 100 (regenerowana celuloza, limit filtracji 100 000 Da), (Millipore, Bedford, USA) (Ryc. 18).

2. OTRZYMYWANIE ZAWIESINY LIPOSFER DO BADAŃ WSTĘPNYCH

2.1. Skład i podstawowy sposób sporządzania zawiesin liposfer

W badaniach wstępnych sporządzano liposfery z użyciem lipidu Precirol w stężeniu 10% (wag/wag), a zawartość emulgatorów pojedynczych lub w mieszaninie wynosiła 3 – 7% (wag/wag):

Lipid (Precirol ATO 5)	10,0
Emulgator	3,0 – 7,0
Woda do	100,0

Jako emulgatorów użyto: lecytyny jajowej, polisorbatu 80, poloksameru 188 i Spanu 40. W tabeli 4 przedstawiono skład tworzonych układów Z1 – Z9. Zawiesiny liposfer Z6 - Z9 zawierały glicerol w ilości 2,3% (wag/wag).

Tabela 4. Skład (% wag/wag) zawiesin liposfer otrzymywanych w badaniach wstępnych

Układ	**Z1**	**Z2**	**Z3**	**Z4**	**Z5**	**Z6**	**Z7**	**Z8**	**Z9**
Precirol	10,0								
Lecytyna	2,0	-	4,0	2,4	3,0	4,0	2,4	-	-
Polisorbat 80	1,0	2,0	-	4,0	-	1,0	1,0	2,0	3,0
Poloksamer 188	1,5	3,0	3,0	-	-	-	-		-
Span 40	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-
Glicerol	-					2,3			
Woda	do 100,0								
Całkowita ilość emulgatora [%]	4,5	5,0	7,0	6,4	3,0	5,0	3,4	3,0	3,0

W celu sporządzenia zawiesiny liposfer mieszaninę wody i emulgatora lub wody z emulgatorem i glicerolem, podgrzewano mieszając do temp. 80°C ± 2°C. Lipid topiono ogrzewając na łaźni wodnej w tej samej temperaturze. Do stopionego lipidu dodawano fazę wodną, mieszając za pomocą szybkoobrotowego mieszadła typu Ultra – Turrax (8000 obr./min przez 5 min). Gorące układy dozowano do fiolek poj. 20 ml,

zamykano zatyczką gumową i kapslem, a następnie chłodzono pozostawiając w temp. 4°C.

Przy sporządzaniu zawiesin wstępnych (Z1 – Z4) stosowano chłodzenie w temperaturze pokojowej lub w lodzie.

2.2. Dobór parametrów technologicznych

Układy sporządzano zgodnie z opisem w p. 2.1 zmieniając niektóre z parametrów technologicznych:

a) temperatura sporządzania - temperatura procesu wynosiła 65° lub 80°C,

b) czas mieszania - w czasie dyspergowania fazy lipidowej w wodnej stosowano mieszanie za pomocą mieszadła szybkoobrotowego Ultra – Turrax przez 5 lub 10 min z szybkością 8000 obr./ min,

c) stosowanie ultradźwięków - zastosowano dodatkowo etap sonikacji: po 5 min mieszania mieszadłem szybkoobrotowym układy przenoszono do dezintegratora ultradźwiękowego i poddawano działaniu ultradźwięków o częstotliwości 22 kHz, w czasie 5 min,

d) sposób chłodzenia - badano wpływ szybkości chłodzenia na żelowanie układów: po etapie mieszania lub działania ultradźwięków gorące układy przenoszono do fiolek poj. 20 ml i pozostawiano w temperaturze pokojowej (15 - 25°C) lub w lodzie (0 - 4°C) przez 1 h. Podczas chłodzenia układy nie były mieszane,

e) odpowietrzanie pod zmniejszonym ciśnieniem - zawiesiny liposfer, które ulegały pienieniu przenoszono do kolbki ssawkowej, podłączanej do wodnej pompy próżniowej na czas 30 min. W tym czasie układ powoli mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego.

2.3. Sporządzanie liposfer z lipidem mieszanym

Sporządzano zawiesiny, w których matrycę lipidową stanowiła mieszanina Precirolu i alkoholu cetylowego lub Precirolu i Miglyolu w różnym stosunku wagowym. Skład badanych układów przedstawiono w tabeli 5. Liposfery wykonano zgodnie z opisem w p. 2.1 w temp. 80°C z zastosowaniem etapu sonikacji lub bez tego etapu.

Tabela 5. Skład (% wag/wag) zawiesin liposfer tworzonych z mieszaniną lipidów

Układ	Z10	Z11	Z12
Precirol	8,0	10,0	8,0
Alkohol cetylowy	2,0	-	-
Miglyol	-	5,0	2,0
Polisorbat 80	2,0	1,2	2,0
Glicerol	2,3	-	2,3
Woda	do 100,0		

2.4. Stabilizacja zawiesiny liposfer polimerami hydrofilowymi

Przeprowadzono modyfikację fazy wodnej zawiesiny liposfer. Jako fazę dyspergującą stosowano roztwory polimerów o niskich lepkościach (50 – 200 cps): karbomeru, karmelozy sodowej, metylocelulozy i hydroksyetylocelulozy.

Zawiesiny liposfer sporządzono zgodnie z opisem w p. 2.1. Fazę wodną, którą stanowiły roztwory polimerów hydrofilowych w mieszaninie z polisorbatem i glicerolem, podgrzewano do temp 80°C. Fazy wodną i lipidową łączono mieszając mieszadłem szybkoobrotowym, a układ chłodzono w temp. 4°C. Stężenie zastosowanych roztworów polimerów przedstawiono w tabeli 6.

Udział (% wag/wag) pozostałych składników w otrzymanych układach przedstawiał się następująco:

Precirol	8,0
Miglyol	2,0
Polisorbat 80	2,0
Glicerol	2,3
Roztwór polimeru	do 100,0

Badano wpływ sonikacji na właściwości zawiesin liposfer w wybranych układach: Z13, Z 14c i Z15.

Tabela 6. Stężenie (% wag/wag) polimerów w fazie wodnej zawiesin liposfer (Precirol:Miglyol 4:1)

Układ / Polimer	Z13	Z14			Z15	Z16		
		a	b	c		a	b	c
Karbomer	0,2	-			-	-		
Karmeloza sodowa	-	0,1	0,5	1,0	-	-		
Metyloceluloza	-	-			0,5			
Hydroksyetyloceluloza	-	-			-	0,1	0,5	1,0

2.5. Wyjaławianie zawiesin liposfer

Zawiesiny liposfer po etapie chłodzenia wyjaławiano w autoklawie w zamkniętych kapslem fiolkach poj. 20 ml. Stosowano następujące warunki wyjaławiania: temp. 121°C, nadciśnienie 101,4 kPa, czas 15 min. Po wyrównaniu ciśnienia w komorze autoklawu gorące układy wyjmowano, wstrząsano i pozostawiano w temperaturze pokojowej do ostygnięcia.

Wyjaławianiu poddano układ Z12 sporządzony z zastosowaniem sonikacji oraz zawiesiny liposfer z dodatkiem polimeru w fazie dyspergującej: Z16.

3. INKORPORACJA BUPIWAKAINY W LIPOSFERACH

3.1. Rozpuszczalność bupiwakainy w wodzie oraz buforach pH 8,0 i pH 7,0

50 mg bupiwakainy zasady dodawano do 10 ml wody lub buforu fosforanowego pH 8,0 lub pH 7,0 i mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego w zamkniętych fiolkach, przez 24 h w temperaturze pokojowej (20°C ± 1°C). Zawiesinę sączono przez sączek membranowy 0,45 µm. Przesącz rozcieńczano wodą i stężenie bupiwakainy oznaczano metodą HPLC (p. 10.3).

3.2. Rozpuszczalność bupiwakainy zasady w lipidach oraz współczynnik podziału lipid/woda

- ***Miglyol - rozpuszczalność***

Przeprowadzono badanie rozpuszczalności bupiwakainy zasady metodą półilościową. Do probówek z Miglyolem dodawano bupiwakainę w ilościach: 20, 50, 80, 100 i 200 mg/g lipidu i ogrzewano do rozpuszczenia substancji leczniczej. Po ochłodzeniu przeprowadzono obserwacje wizualne i mikroskopowe.

- ***Miglyol / woda – współczynnik podziału***

Przygotowano roztwór nasycony bupiwakainy zasady w wodzie wytrząsając 500 mg substancji w 10 ml wody przez 24 h w temperaturze pokojowej. Odsączono nierozpuszczoną substancję i oznaczono stężenie bupiwakainy w roztworze. Do 5 ml roztworu nasyconego dodano 5 ml Miglyolu i układ wytrząsano z użyciem wytrząsarki Vortex przez 5 min. Fazy rozdzielono. W fazie wodnej oznaczono stężenie bupiwakainy metodą HPLC (p. 10.3). W celu określenia współczynnika podziału Miglyol/woda przeprowadzono trzy niezależne badania.

- ***Lipidy stałe - rozpuszczalność***

Badanie rozpuszczalności przeprowadzono metodą półilościową. Odważony lipid ogrzewano na łaźni wodnej do stopienia, dodawano bupiwakainę i mieszano do rozpuszczenia. Ilość bupiwakainy wynosiła 1, 5, 10, 15, 20 lub 25% w stosunku do masy lipidu. Na szkiełko podstawowe nanoszono cienką warstwę otrzymanego roztworu. Preparat pozostawiono w temperaturze pokojowej na czas 24 h, po czym obserwowano pod mikroskopem obecność kryształów bupiwakainy.

- ***Precirol / woda – współczynnik podziału***

Do 1,0 g Precirolu dodano 200 mg bupiwakainy i ogrzano do temp. 80°C, a następnie dodano 9,0 g wody o tej samej temperaturze. Mieszano mieszadłem magnetycznym przez 10 min utrzymując temp. 80°C. Układ ochłodzono w temperaturze pokojowej, a następnie pozostawiano na 24 h w temp. 4°C. Fazę lipidową oddzielano przez sączenie (sączek bibułowy). Lipid na sączku przemywano określoną ilością wody (5 ml) i 0,25% roztworem HCl (10 ml). W otrzymanych przesączach oznaczano stężenie bupiwakainy metodą HPLC (p. 10.3). Przeprowadzono trzy niezależne badania.

3.3. Synteza stearynianu bupiwakainy i identyfikacja otrzymanej substancji

Otrzymywanie stearynianu bupiwakainy

Otrzymywano stearynian bupiwakainy z zastosowaniem metody stapiania, używając jako substraty bupiwakainę zasadę i kwas stearynowy. Stosunek molowy obu substancji wynosił 1:1.

Odważono dokładnie 2,500 g zasady bupiwakainy (m.cz. 288,43) oraz 2,465 g kwasu stearynowego (m.cz. 284,49). Substancje wymieszano i topiono w probówce zanurzonej w parafinie ciekłej o temp. 120°C ± 2°C. Otrzymany stop mieszano i chłodzono w temperaturze pokojowej, a następnie proszkowano w schłodzonym moździerzu.

Analiza stearynianu bupiwakainy metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC)

Badanie wykonano w Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej Akademii Medycznej w Gdańsku.

Pomiary przeprowadzono przy użyciu różnicowego kalorymetru skaningowego DSC 822^{e} (heat flux), o zakresie temperaturowym od -150 do 700°C. Odważki produktu otrzymanego metodą opisaną powyżej, o masie ok. 10 mg, ogrzewano w zamkniętych tyglach aluminiowych (poj. 40 µl) z szybkością wzrostu temperatury 10ºC/min. Rejestrowano termogramy DSC badanych związków. Wyniki poddano analizie z użyciem programu STAR^{e} SYSTEM. Analizie kalorymetrycznej poddano również bupiwakainę zasadę oraz kwas stearynowy.

3.4. Rozpuszczalność stearynianu bupiwakainy w wodzie i lipidach

Rozpuszczalność w wodzie

50 mg stearynianu bupiwakainy dodawano do 10 ml wody i mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego przez 24 h w temperaturze pokojowej (20°C ± 1°C). Zawiesinę sączono przez sączek membranowy 0,45 µm. Przesącz rozcieńczano wodą i stężenie stearynianu bupiwakainy oznaczano metodą HPLC (p. 10.3). Przeprowadzono trzy niezależne badania.

Rozpuszczalność w lipidach

Przeprowadzono badanie rozpuszczalności stearynianu bupiwakainy w Precirolu, Miglyolu i mieszaninie Precirolu z Miglyolem w stosunku 4:1 metodą półilościową opisaną poniżej.

- ***Precirol oraz Precirol z Miglyolem (4:1)***

Odważony Precirol lub Precirol z Miglyolem (4:1) ogrzewano na łaźni wodnej do stopienia Precirolu i dodawano określoną ilość stearynianu bupiwakainy, a następnie mieszano do rozpuszczenia. Stearynian bupiwakainy dodawano w ilości: 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 i 25% w stosunku do masy lipidu. Na szkiełko podstawowe nanoszono cienką warstwę otrzymanego roztworu. Płytkę pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 h, a następnie przeprowadzono obserwacje mikroskopowe pod kątem obecności kryształów substancji leczniczej.

- ***Miglyol***

Do probówek z Miglyolem dodawano stearynian bupiwakainy w ilości: 2, 5, 10, 20 i 25% w stosunku do masy lipidu i ogrzewano do rozpuszczenia substancji leczniczej. Po ochłodzeniu prowadzono obserwacje wizualne i mikroskopowe.

3.5. Sporządzanie zawiesiny liposfer z bupiwakainą lub stearynianem bupiwakainy

Zawiesiny liposfer sporządzano metodą opisaną w p. 2.1. Do stopionego lipidu dodawano odważoną substancję leczniczą: bupiwakainę lub stearynian bupiwakainy. Po rozpuszczeniu substancji leczniczej w lipidzie fazę lipidową dyspergowano w fazie wodnej zawierającej emulgator (polisorbat 80) i glicerol. Nie stosowano etapu sonikacji. Otrzymano zawiesiny liposfer z bupiwakainą lub stearynianem bupiwakainy stosując dwa rodzaje matryc lipidowych: z Precirolu jako samodzielnego lipidu (układy ZB1 - ZB3) lub z lipidu mieszanego Precirol:Miglyol w stosunku 4:1 (układy ZB4 – ZB8). Skład otrzymanych zawiesin liposfer przedstawia tabela 4. Ilość dodawanej substancji leczniczej w przeliczeniu na bupiwakainę zasadę wynosiła 0,5%, z wyjątkiem układu ZB1 (0,25%) i ZB3 (1,0%).

Dodatkowo do fazy wodnej zawiesin ZB6, ZB7 i ZB8 dodawano polimery hydrofilowe: karmelozę sodową, hydroksyetylocelulozę i poloksamer.

W celu maksymalnej inkorporacji bupiwakainy w liposferach układy doprowadzano do pH 8,0 dodając roztwór NaOH (0,1 mol/l) przed etapem chłodzenia (Tabela 7).

Tabela 7. Skład (% wag/wag) zawiesin liposfer z bupiwakainą lub stearynianem bupiwakainy

Układ	ZB1	ZB2	ZB3	ZB4	ZB5	ZB6	ZB7	ZB8
Bupiwakaina	0,25	0,5	1,0	0,5	-	0,5	0,5	0,5
Stearynian bupiwakainy	-	-	-	-	1,0	-	-	-
Precirol	10,0			8,0				
Miglyol	-			2,0				
Polisorbat 80	3,0			2,0				
Glicerol	2,3							
CMC	-	-	-	-	-	1,0	-	-
HEC	-	-	-	-	-	-	1,0	-
Poloksamer	-	-	-	-	-	-	-	5,0
0,1 mol/l NaOH	do pH 8,0							
Woda	do 100,0							

CMC - karmeloza sodowa

HEC - hydroksyetyloceluloza

3.6. Próba sporządzenia liposfer ze stearynianem bupiwakainy tworzącym matrycę lipidową

Zawiesinę liposfer sporządzano metodą opisaną w p. 2.1. Fazę lipidową stanowił stearynian bupiwakainy lub stearynian bupiwakainy z nadmiarem kwasu stearynowego. Skład przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Skład (% wag/wag) zawiesin liposfer ze stearynianem bupiwakainy tworzącym matrycę lipidową

Układ	ZB9	ZB10
Stearynian bupiwakainy	2,0	2,0
Kwas stearynowy	-	2,0
Polisorbat 80	2,0	2,0
Glicerol	2,3	
Woda	do 100,0	

4. SPORZĄDZANIE I BADANIE KONCENTRATÓW LIPOSFER

4.1. Sporządzanie koncentratów liposfer

Otrzymywano koncentraty liposfer zawierające 50% (wag/wag) lipidu. Mieszaninę lipidów (Precirol i Miglyol 4:1) topiono w łaźni wodnej i ogrzewano do temp. 80°C, a następnie dyspergowano w gorącej (temp. 80°C) mieszaninie wody, glicerolu i emulgatora. Jako emulgator zastosowano polisorbat 80 w ilości 2,0 g/100 g koncentratu. Dyspersję mieszano za pomocą szybkoobrotowego mieszadła Ultra – Turrax (8000 obr./min, przez 5 min). Aby zapobiec przedwczesnemu zestaleniu fazy lipidowej, układ ogrzewano podczas mieszania. Gorące emulsje dozowano do fiolek i chłodzono pozostawiając w temp. 4°C.

4.2. Badanie koncentratów liposfer

Obserwowano koncentraty nierozcieńczone oraz rozcieńczone wodą w stosunku 1:5. Po dodaniu wody zawiesiny wytrząsano ręcznie przez 2 min, a dla porównania mieszano za pomocą wytrząsarki do probówek Vortex (3 min) lub mieszadła szybkoobrotowego Ultra – Turrax (4 min), a także stosując ultradźwięki 22 kHz (5 i 15 min). Podczas sonikacji przez 15 min temperatura układu znacznie wzrastała (do 65°C), dlatego po 5 min zastosowano chłodzenie w lodzie. Ponadto, aby symulować warunki podania klinicznego, przeprowadzano jednorazową ekstruzję rozcieńczonego koncentratu przez igłę strzykawki o średnicy 0,4 mm. Przedtem koncentraty rozcieńczano wodą w stosunku 1:5 i wstępnie mieszano za pomocą wytrząsarki Vortex przez 1 min.

Koncentraty nierozcieńczone i po rozcieńczeniu obserwowano wizualnie oceniając barwę, homogenność i konsystencję układów. Pod mikroskopem badano kształt i wielkość cząstek liposfer, a także krystalizację substancji leczniczej. Przeprowadzano również badanie pH rozcieńczonych koncentratów. Elektrodę zanurzano w układach rozcieńczonych wodą w stosunku 1:5 lub 1:1 i przeprowadzano pomiar (p. 7.4). W rozcieńczonych koncentratach badano również wielkość liposfer metodą dyfrakcji laserowej (p. 7.2).

4.3. Wyjaławianie koncentratów liposfer

Koncentraty liposfer po etapie chłodzenia wyjaławiano w autoklawie w zamkniętych korkami i kapslami fiolkach poj. 20 ml. Stosowano następujące warunki wyjaławiania: temp. 121°C, nadciśnienie 101,4 kPa, czas 15 min. Po etapie wyjaławiania gorące fiolki z koncentratem wstrząsano i pozostawiano do ochłodzenia w temperaturze pokojowej.

5. SPORZĄDZANIE KONCENTRATÓW LIPOSFER Z BUPIWAKAINĄ I STEARYNIANEM BUPIWAKAINY

Układy sporządzano metodą opisaną w p. 4.1. Substancję leczniczą (bupiwakainę lub stearynian bupiwakainy) rozpuszczano w stopionym lipidzie, przed etapem emulgowania faz.

Skład otrzymanych koncentratów przedstawiono w tabeli 9. Zastosowano bupiwakainę zasadę w ilości 2 i 10% (wag/wag) oraz stearynian bupiwakainy - 4%, co odpowiada 2% (wag/wag) bupiwakainy zasady. Ponadto do układów dodawano roztwór 0,1 mol/l NaOH w ilości 0,5 g/100 g koncentratu w celu uzyskania pH układów w granicach 8,0 - 8,5.

Tabela 9. Skład (% wag/wag) koncentratów liposfer z bupiwakainą lub stearynianem bupiwakainy

Układ	KB 1	KB 2	KB 3
Bupiwakaina	2,0	10,0	-
Stearynian bupiwakainy	-	-	4,0
Precirol	40,0		
Miglyol	10,0		
Polisorbat 80	2,0		
Glicerol	2,3		
0,1 mol/l NaOH	0,5		
Woda	do 100,0		

Układy przechowywano w temperaturze 4°C. Prowadzono obserwacje wizualne konsystencji oraz pomiary wielkości cząstek koncentratów nierozcieńczonych i po rozcieńczeniu wodą w stosunku 1:5. Rozcieńczenia przygotowywano mieszając koncentraty ręcznie (2 min) oraz przy użyciu wytrząsarki Vortex (2 min) lub z zastosowaniem ultradźwięków (p. 4.2). W układach rozcieńczonych przeprowadzono pomiary wartości pH. Układy obserwowano także pod mikroskopem (p. 7.3).

W celu uzyskania z koncentratu zawiesiny liposfer w formie zbliżonej do formy aplikacyjnej, rozcieńczano koncentrat w stosunku 1:5 roztworem kwasu solnego 0,015 mol/l, co pozwoliło na otrzymanie układu o pH ok. 6,75 i rozpuszczenie ewentualnych kryształów substancji leczniczej.

Oznaczano stężenie bupiwakainy w fazie wodnej zakwaszanych rozcieńczonych koncentratów stosując wirowanie i ultrafiltrację (p. 10.2).

6. SPORZĄDZANIE ZAWIESIN I KONCENTRATÓW LIPOSFER Z INDOMETACYNĄ

6.1. Rozpuszczalność indometacyny w lipidach

Przeprowadzono badania rozpuszczalności indometacyny w lipidach metodą półilościową (p. 3.2). Do badań użyto różne lipidy: Precirol, Miglyol, Compritol, parafinę płynną oraz mieszaniny Precirolu z Miglyolem, alkoholem cetylowym, alkoholem cetostearylowym, kwasem stearynowym, Compritolem i woskiem pszczelim. Indometacynę dodawano w ilości: 0,1 – 10,0% (wag/wag) w stosunku do masy lipidu.

Odważoną ilość lipidu, pojedynczego lub w mieszaninie, ogrzewano do stopienia na szkiełku zegarkowym. Do stopionego lipidu dodawano odważoną ilość indometacyny i mieszając delikatnie ogrzewano na łaźni wodnej do rozpuszczenia. Uzyskany roztwór przenoszono na mikroskopowe szkiełko podstawowe, rozprowadzając w postaci cienkiej warstwy i pozostawiano w temperaturze pokojowej. Preparaty obserwowano po 24 h oraz po 7 i 14 dniach pod mikroskopem przy powiększeniu 400 i 600 x.

6.2. Sporządzanie zawiesin liposfer z indometacyną

Zawiesiny liposfer sporządzano metodą opisaną w p. 2.1. Zawiesiny zawierały 10% lipidu. Był to Precirol lub mieszanina Precirolu z lipidem dodatkowym: kwasem stearynowym, alkoholem cetostearylowym, alkoholem cetylowym lub Miglyolem.

Indometacynę rozpuszczano w stopionym lipidzie przed etapem dyspergowania w fazie wodnej. Sporządzane układy zawierały indometacynę w ilości 20 mg/g lub 50 mg/g lipidu, co odpowiada stężeniu 0,2% lub 0,5% (wag/wag) w zawiesinie. Skład zawiesin liposfer z indometacyną podano w tabeli 10.

Podjęto również próbę inkorporowania indometacyny do liposfer przez dodawanie do stopionego lipidu jej roztworu etanolowego o stężeniu 33%. Mieszano fazę lipidową w temp. 80°C przez 10 min, a następnie łączono z fazą wodną.

Sporządzano także zawiesiny liposfer z poloksamerem (0,5%), gdzie fazę wodną stanowił roztwór poloksameru w mieszaninie z polisorbatem i glicerolem (Tabela 10). Wszystkie układy sporządzano bez etapu sonikacji.

Tabela 10. Skład (% wag/wag) zawiesin liposfer z indometacyną

Układ	**ZI 1**	**ZI 2**	**ZI 3**	**ZI 4**	**ZI 5**	**ZI 6**	**ZI 7**	**ZI 8**	**ZI 9**	**ZI 10**
Indometacyna	0,2	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,2	0,4	0,2	0,5
Precirol	10,0	8,0				6,0	8,0			
Miglyol	-					2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Alkohol cetostearylowy	-					2,0	-	-	-	-
Kwas stearynowy	-	2,0	2,0	-	-	-	-	-	-	-
Alkohol cetylowy	-	-	-	2,0	2,0	-	-	-	-	-
Etanol 95°	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-
Poloksamer	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0	-
Polisorbat 80	2,0									
Glicerol	2,3									
Woda	do 100,0									

Układy przechowywano w temp. 4°C. Prowadzono obserwacje wizualne i pod mikroskopem. Oceniano konsystencję, barwę, obecność kryształów substancji leczniczej w fazie wodnej, wielkość cząstek liposfer oraz dokonywano pomiaru pH.

Oznaczano stężenie indometacyny w fazie wodnej zawiesin ZI 7 i ZI 9, w których nie dochodziło do krystalizacji substancji leczniczej. Z powodu zjawiska krystalizacji nie badano fazy wodnej układów zawierających 0,4% lub 0,5% (wag/wag) indometacyny.

6.3. Sporządzanie koncentratów liposfer z indometacyną

Koncentraty liposfer sporządzano metodą opisaną w p. 4.1. Indometacynę rozpuszczano w stopionym lipidzie przed etapem dyspergowania w fazie wodnej. Sporządzono koncentraty liposfer zawierające 50% (wag/wag) lipidu i indometacynę w stężeniu 20 mg i 40 mg/g lipidu (odpowiednio: 1% i 2% substancji leczniczej w koncentracie).

Skład koncentratów z indometacyną przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Skład (% wag/wag) koncentratów liposfer z indometacyną

Układ	KI 1	KI 2	KI 3	KI 4	KI 5	KI 6	KI 7
Indometacyna	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	5,0
Precirol	50,0	40,0	40,0	40,0	30,0	40,0	50,0
Miglyol	-	-	-	-	10,0		
Kwas stearynowy	-	10,0	10,0	-	-	-	-
Alkohol cetylowy	-	-	-	10,0	-	-	-
Alkohol cetostearylowy	-	-	-	-	10,0	-	-
Polisorbat 80	2,0						
Glicerol	2,3						
Woda	do 100,0						

Oznaczano stężenie indometacyny w fazie wodnej rozcieńczonego koncentratu liposfer KI 6, stosując metodę wirowania i ultrafiltracji. Przed etapem rozdziału faz i ultrafiltracji koncentrat rozcieńczano 60% metanolem (p. 10.2).

7. BADANIA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH LIPOSFER

7.1. Ocena wizualna

Zawiesiny i koncentraty liposfer poddawano obserwacji wizualnej. Oceniano konsystencję i homogenność oraz barwę otrzymanych układów.

7.2. Oznaczanie wielkości cząstek

Wielkość cząstek liposfer badano za pomocą dyfraktometru laserowego typu Mastersizer E, używając wody jako płynu rozpraszającego. Koncentraty liposfer badano po uprzednim rozcieńczeniu wodą w stosunku 1:5 (p. 4.2). Wyznaczano procentowy udział cząstek w zakresie wielkości od 0,05 μm do 80 μm. Rozkład wielkości cząstek wyznaczano posługując się programem komputerowym wykonującym obliczenia według teorii Mie [97].

Rozkład wielkości cząstek opisywano następującymi parametrami:

d (0,5) mediana średnicy; poniżej tej wartości zawiera się średnica 50% cząstek obecnych w układzie badanym

d (0,9) maksymalna średnica 90% cząstek

d_{max} średnica największych wykrywanych cząstek.

7.3. Obserwacje mikroskopowe

Układy obserwowano pod mikroskopem optycznym, przy użyciu powiększenia 400- i 600- krotnego. Oceniano wielkość, kształt cząstek oraz obecność kryształów substancji leczniczej i aglomeratów liposfer. Obserwowano zawiesiny i koncentraty liposfer nierozcieńczone oraz po rozcieńczeniu. Koncentraty rozcieńczano w stosunku 1:5 wodą, bezwodnym metanolem lub metanolem 60% (v/v) (p. 4.2).

7.4. Pomiar pH

Wartość pH badano bezpośrednio po sporządzeniu układów oraz w trakcie przechowywania. Pomiary przeprowadzono poprzez bezpośrednie zanurzenie

elektrody w zawiesinach liposfer. Koncentraty liposfer rozcieńczano przed pomiarem wodą w stosunku 1:1 lub 1:5.

8. BADANIA REOLOGICZNE

Badania wykonano w Katedrze Technologii Wydziału Farmaceutycznego i Biofarmaceutycznego Uniwersytetu im. Christiana – Albrechta w Kilonii (Niemcy). Do badań reologicznych użyto reometr Rheomat 115 z układem pomiarowym typu Searle, płytka – płytka (Ryc. 17).

Ryc. 17. Reometr Rheomat 115.

Badaniom reologicznym poddawano koncentraty liposfer bez substancji leczniczej oraz z bupiwakainą lub indometacyną. Ponadto badano wpływ stężenia emulgatora na właściwości reologiczne koncentratów bez substancji leczniczej. Jako emulgatora użyto polisorbatu 80 w stężeniach: 2 i 10% (wag/wag). Skład badanych koncentratów przedstawia tabela 12.

Tabela 12. Skład (% wag/wag) koncentratów poddanych badaniom reologicznym

Układ	K1	KI 6	KB 4	K2
Indometacyna	-	1,0	-	-
Bupiwakaina	-	-	0,5	-
Precirol	40,0			
Miglyol	10,0			
Polisorbat 80	2,0			10,0

Glicerol	2,3
Woda	do 100,0

Właściwości układów badano po wykonaniu, a także po 28 dniach przechowywania w temperaturze pokojowej oraz w temp. 4°C.

Badania przeprowadzano w temperaturze pokojowej (20°C ± 2°C). Koncentraty przechowywane w temp. 4°C przed pobraniem próbki pozostawiano przez kilka godzin w temperaturze pokojowej. Badania prowadzono stosując próby o masie ok. 1 g. Dla każdego układu wykonano trzy niezależne analizy.

Minimalna szybkość ścinania (D) wynosiła 0,0 s^{-1} i wzrastała do wartości maksymalnej D=21,5 s^{-1}, a następnie malała do D=0,0 s^{-1}. Rejestrowano reogramy jako krzywe zależności naprężenia ścinającego od szybkości ścinania $\tau = f(D)$ [98].

9. SZYBKOŚĆ UWALNIANIA INDOMETACYNY Z LIPOSFER

Badano szybkość uwalniania indometacyny z następujących układów: koncentratu KI 6 (stężenie indometacyny wynosiło 20 mg/g lipidu, Tabela 11) nierozcieńczonego i rozcieńczonego wodą w stosunku 1:5. Aby uzyskać zawiesinę liposfer, koncentrat mieszano z użyciem wytrząsarki Vortex przez 30 s oraz dodatkowo ręcznie przez 2 min. Rozcieńczony koncentrat natychmiast użyto do badań.

W badaniu zastosowano błonę dializacyjną, którą wcześniej kondycjonowano (str. 53).

Do woreczka utworzonego z błony dializacyjnej (tulejka: ∅ 16 mm, długość 9 cm) spiętej klipsem, odważano 1,0 g koncentratu lub 2,0 g rozcieńczonego koncentratu (zawiesiny). Drugi koniec rękawa z błony zamykano również klipsem wcześniej usuwając powietrze. Worek dializacyjny z badanym układem umieszczano w zlewce zawierającej 100 ml buforu fosforanowego pH 7,4 o temp. 37°C. Zlewkę szczelnie przykrywano i pozostawiano w termostatowanej wytrząsarce (80 obr./min; amplituda 9) w temp. 37°C ± 1°C. Badanie uwalniania indometacyny prowadzono przez 48 h. W określonych odstępach czasu (po 4, 8, 24 i 48 h), przenoszono worek dializacyjny do kolejnej zlewki zawierającej 100 ml buforu fosforanowego o temp. 37°C. Do analizy pobierano 1,0 ml płynu akceptorowego, rozcieńczano metanolem do stężenia w zakresie 10^{-6} – 10^{-5} g/ml i oznaczano w próbce zawartość indometacyny metodą HPLC (p. 10.4).

10. ANALIZA ILOŚCIOWA BUPIWAKAINY I INDOMETACYNY

10.1. Oznaczanie zawartości bupiwakainy i indometacyny w zawiesinach i koncentratach liposfer

Odważano dokładnie ok. 50 mg zawiesiny lub koncentratu i umieszczano w kolbie miarowej poj. 25 ml (układy z bupiwakainą) lub 50 ml (układy z indometacyną). Do kolby dodawano metanol i w celu stopienia lipidu kolbę umieszczano w łaźni wodnej łagodnie ogrzewając. Po stopieniu lipidu zawartość kolby wytrząsano ręcznie i po chłodzeniu uzupełniano metanolem, a wytrącony lipid odsączono przez bibułę filtracyjną. Przed analizą bupiwakainy przesącz rozcieńczano w stosunku 1:10 wodą. Stężenie substancji leczniczych oznaczano metodą HPLC opisaną w p. 10.3 i 10.4.

10.2. Oznaczanie stężenia substancji leczniczych w fazie wodnej zawiesin i koncentratów liposfer

a) bupiwakaina

Fazę wodną zawiesin liposfer do oznaczenia stężenia substancji leczniczych uzyskiwano metodą ultrafiltracji. Układy z bupiwakainą lub stearynianem bupiwakainy były zakwaszane przed ultrafiltracją 10% roztworem kwasu solnego do pH ok. 2. Umieszczano w probówkach wirówkowych 300 µl zawiesiny liposfer lub rozcieńczonych koncentratów i wirowano przez 20 min (rozcieńczone koncentraty) lub 40 min (zawiesiny) stosując prędkość 3000 obr./min. Po tym czasie następowało wstępne rozdzielenie faz. Pobierano 100 µl fazy wodnej i nanoszono na sączek ultrafiltracyjny typu Microcon YM - 100 (Ryc. 18). Wirowano przez 20 min z szybkością 3000 obr./min. Pobierano 10 µl ultrafiltratu, dodawano 990 µl wody i w roztworze oznaczano stężenie bupiwakainy lub stearynianu bupiwakainy metodą opisaną w p. 10.3.

Ryc. 18. Sączek ultrafiltracyjny typu Microcon YM – 100.

b) indometacyna

Stężenie indometacyny w fazie wodnej oznaczano tylko w tych zawiesinach i koncentratach liposfer, gdzie matrycę lipidową stanowiła mieszanina Precirolu z Miglyolem.

Zawiesiny liposfer z indometacyną rozcieńczano 60% metanolem (1:1), a następnie wirowano przez 20 min z prędkością 3000 obr./min. Nanoszono 100 µl na sączek ultrafiltracyjny i wykonywano ultrafiltrację wirując z prędkością 300 obr./min przez 20 min. Przesącz rozcieńczano bezwodnym metanolem i w otrzymanym roztworze oznaczano stężenie substancji leczniczej metodą HPLC (p. 10.4).

Koncentrat liposfer z indometacyną rozcieńczano wodą w stosunku 1:5. W celu zdyspergowania układu zastosowano różne techniki mieszania: ręcznie przez 2 min i działając ultradźwiękami przez 5 min. Następnie do rozcieńczonego koncentratu dodawano 25 ml 65% metanolu w celu rozpuszczenia kryształów substancji leczniczej i wymieszano. Nanoszono na sączek ultrafiltracyjny 100 µl próby i wirowano z prędkością 3000 obr./min przez 20 min. Pobierano 30 µl ultrafiltratu, dodawano 270 µl bezwodnego metanolu i w roztworze oznaczano stężenie indometacyny (p. 10.4).

Ostatecznie zastosowano bardzo intensywne mieszanie koncentratu rozcieńczonego 60% metanolem. Koncentrat (1,0 g) początkowo rozcieńczono wodą 1:5 i poddano działaniu ultradźwięków przez 15 min, następnie rozcieńczono dodając 25 ml 65% metanolu i poddano ultrafiltracji. Otrzymany przesącz rozcieńczono (1:10) bezwodnym metanolem i w roztworze oznaczano stężenie indometacyny (p. 10.4).

10.3. Metoda oznaczania ilościowego bupiwakainy i stearynianu bupiwakainy z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Zastosowano metodę HPLC odwróconych faz. Użyto kolumnę o wymiarach 250 x 4 mm z wypełnieniem oktadecylokrzemowym (C18). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina: acetonitryl (40% v/v), metanol (25% v/v) i 0,01 mol/l bufor fosforanowy

(35% v/v), którą doprowadzano do pH 7,7 za pomocą kwasu fosforowego. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min.

Roztwory bupiwakainy lub stearynianu bupiwakainy nanoszono na kolumnę za pomocą pętli dozującej poj. 20 µl. Analityczna długość fali, przy której dokonywano rejestracji chromatogramów wynosiła 220 nm.

Stężenie bupiwakainy i stearynianu bupiwakainy w analizowanych roztworach, C_b (g/ml) obliczano na podstawie wzoru:

$$C_b = \frac{C_w \times A_b}{A_w}$$

C_w - stężenie roztworu wzorcowego
A_b – pole powierzchni piku roztworu badanego
A_w – pole powierzchni piku roztworu wzorcowego

W celu określenia powtarzalności i liniowości metody przygotowywano roztwory wzorcowe bupiwakainy i stearynianu bupiwakainy o stężeniach od 5×10^{-7} do 2×10^{-5} g/ml. Jako rozpuszczalnika użyto wody oczyszczonej lub fazy ruchomej.

Czas retencji (t_R) dla bupiwakainy wynosił ok. 12,0 min. Na chromatografie prób sporządzonych z liposfer niezawierających bupiwakainy nie stwierdzono w tych warunkach piku innych substancji interferujących. Wyznaczono następujące równanie regresji dla krzywej wzorcowej bupiwakainy w wodzie:

$$A = 22928\ C + 3{,}0741$$
$$R^2 = 0{,}9995$$

10.4. Metoda oznaczania ilościowego indometacyny z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Użyto metodę HPLC odwróconych faz. Do rozdziału chromatograficznego wykorzystano kolumnę o wymiarach 125 x 4 mm z wypełnieniem oktadecylokrzemowym (C18). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina 0,01 mol/l roztworu octanu sodu (35% wag/wag) oraz bezwodnego metanolu (65% wag/wag). Bufor przed zmieszaniem z metanolem doprowadzano do pH 3,6 za pomocą lodowatego kwasu octowego. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min.

Roztwory indometacyny nanoszono na kolumnę za pomocą pętli dozującej poj. 20 µl. Analityczna długość fali wynosiła 260 nm.

Stężenie indometacyny w analizowanych roztworach, C_i (g/ml) obliczano na podstawie wzoru:

$$C_i = \frac{C_w \times A_i}{A_w}$$

C_w - stężenie roztworu wzorcowego
A_i – pole powierzchni piku roztworu badanego
A_w – pole powierzchni piku roztworu wzorcowego

W celu określenia powtarzalności i liniowości metody przygotowywano roztwory wzorcowe indometacyny o stężeniach od 10^{-6} g/ml do 10^{-5} g/ml. Jako rozpuszczalnika użyto bezwodnego metanolu lub fazy ruchomej.

Czas retencji (t_R) dla indometacyny wynosił ok. 6,0 min. Na chromatografie prób sporządzonych z liposfer niezawierających indometacyny nie stwierdzono w tych warunkach piku innych substancji interferujących Wyznaczono następujące równanie regresji dla krzywej wzorcowej indometacyny w bezwodnym metanolu:

$$A = 32952\ C - 2{,}4998$$

$$R^2 = 1{,}0000$$

11. BADANIE HISTOLOGICZNE TKANKI MIĘŚNIOWEJ PO WSTRZYKNIĘCIU ZAWIESINY NANOSFER I MIKROSFER LIPIDOWYCH

11.1. Sporządzanie zawiesiny mikrosfer lipidowych

Zawiesinę mikrosfer lipidowych otrzymywano z koncentratu liposfer. Sporządzono koncentrat liposfer metodą opisaną w p. 4.1 o składzie przedstawionym poniżej:

Precirol	40,0
Miglyol 812	10,0
Polisorbat 80	2,0
Glicerol	2,3
Woda do	100,0

Koncentrat rozcieńczano w stosunku 1:5 izotoniczną mieszaniną glicerolu z wodą i wymieszano za pomocą wytrząsarki do probówek Vortex przez 1 min. Układ rozdozowano do fiolek poj. 20 ml i wyjałowiono (121°C, 15 min, nadciśnienie 101,4 kPa).

Przeprowadzono badanie wielkości mikrosfer lipidowych rozcieńczonego koncentratu symulując podanie za pomocą strzykawki z igłą 0,5 mm. Badano również wartości pH oraz ciśnienia osmotycznego.

11.2. Sporządzanie zawiesiny nanosfer lipidowych

Zawiesinę nanosfer lipidowych sporządzano metodą z zastosowaniem gorącej homogenizacji wysokociśnieniowej. Skład zawiesiny nanosfer lipidowych przedstawiono poniżej:

Precirol	8,0
Miglyol 812	2,0
Polisorbat 80	2,0
Glicerol	2,3
Woda do	100,0

Fazę lipidową (Precirol i Miglyol) ogrzewano do temp. 80°C. Fazę wodną (polisorbat 80 i glicerol w wodzie) również ogrzewano do tej samej temperatury. Fazę lipidową dyspergowano w gorącej fazie wodnej mieszając za pomocą szybkoobrotowego mieszadła Ultra – Turrax przez 5 min. Następnie gorącą emulsję wstępną przeniesiono do ogrzanego homogenizatora i na gorąco homogenizowano pod ciśnieniem 500 bar stosując 5 cykli. Emulsję dozowano do fiolek poj. 20 ml i chłodzono w temp. 4°C. Zawiesinę liposfer wyjaławiano w autoklawie (121°C, 15 min).

Przeprowadzono badanie wielkości nanosfer lipidowych po ekstruzji przez igłę 0,4 mm. Badano również wartość pH oraz ciśnienia osmotycznego.

11.3. Sporządzanie izotonicznego roztworu polisorbatu 80

Rozpuszczano polisorbat 80 w mieszaninie wody z glicerolem, uzyskując roztwór o składzie:

Polisorbat 80	2,0
Glicerol	2,3
Woda do	100,0

Po dokładnym wymieszaniu składników roztwór sączono przez sączek 0,2 μm, rozdozowano do fiolek poj. 20 ml i wyjałowiono w autoklawie (121°C; 15 min).

Przeprowadzono badanie ciśnienia osmotycznego oraz wartości pH sporządzonej mieszaniny.

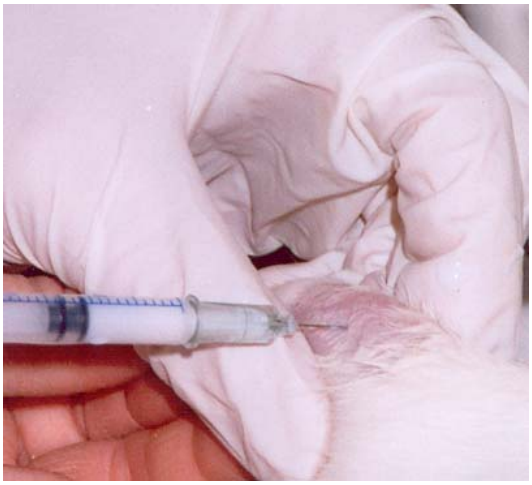
11.4. Podawanie domięśniowe zawiesin nanosfer i mikrosfer lipidowych

Uzyskano zezwolenie nr 7/05 na przeprowadzenie doświadczeń z wykorzystaniem zwierząt, wydane przez Lokalną Komisję Etyczną Akademii Medycznej w Gdańsku.

Jako zwierząt doświadczalnych użyto samce szczurów szczepu Wistar o masie ok. 200 g. Zwierzęta pochodziły z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskego PAN w Warszawie. Do badań użyto 12 szczurów, które podzielono na trzy grupy liczące po 4 osobniki i umieszczono w oznakowanych klatkach. Przez okres 10 dni szczury przechodziły aklimatyzację. W tym czasie i w trakcie badania były karmione standardową suchą karmą dla gryzoni.

Jako tkankę docelową podawania badanych układów wybrano mięsień udowy. Golono udo szczura w przeddzień każdego podania. Miejsce wstrzyknięcia oznakowano na skórze pozbawionej sierści.

Czterem osobnikom w danej grupie wstrzykiwano domięśniowo jeden z badanych układów. Wstrzyknięcia dokonano trzykrotnie, co trzy dni. Jednorazowa ilość wstrzykiwanego preparatu wynosiła 200 μl. Zawiesinę mikrosfer lipidowych wstrzykiwano do mięśnia za pomocą jednorazowej strzykawki z igłą 0,5 mm, natomiast zawiesinę nanosfer lipidowych oraz roztwór podawano strzykawką z igłą 0,4 mm. Ryc. 19 pokazuje wstrzyknięcie domięśniowe zawiesiny liposfer.



Ryc. 19. Podanie domięśniowe zawiesiny liposfer.

Trzeciego dnia od ostatniego podania preparatów zwierzęta usypiano i pobierano tkankę mięśniową z miejsca wstrzyknięć. Jako tkanka kontrolna została pobrana analogiczna tkanka mięśniowa z drugiego uda zwierzęcia.

11.5. Badania histologiczne

Badania histologiczne przeprowadzono w Katedrze Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku.

Tkanki mięśniowe pobrane od zwierząt zamrażano w temp. -30°C. Następnie przygotowywano preparaty do badań histologicznych, tnąc tkanki na grubość 50 µm, w temp. -28°C za pomocą kriostatu „Leica" CM 1900. Otrzymane skrawki mrożeniowe barwiono topograficznie hematoksyliną przez 5 min (wybarwiając jądra komórkowe) i eozyną przez 1 min (wybarwiając cytoplazmę komórkową). Po każdym barwieniu płukano skrawki w bieżącej wodzie. Następnie wybarwione preparaty odbarwiano w alkoholu i prześwietlano w ksylenie. Po zabarwieniu skrawki zatapiano w substancji zabezpieczającej tzw. „mounting medium" zawierającej ksylen (DPX). Preparaty obserwowano pod mikroskopem przy powiększeniu 10x i 20x.

IV. WYNIKI

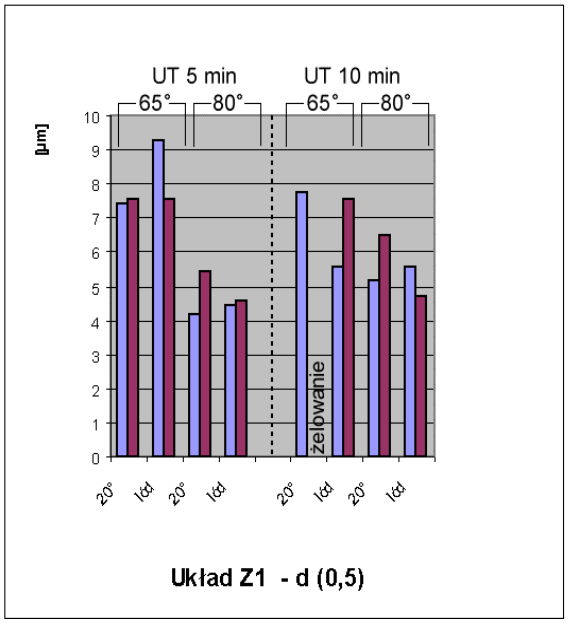
USTALENIE SKŁADU I SPOSOBU SPORZĄDZANIA ZAWIESINY LIPOSFER

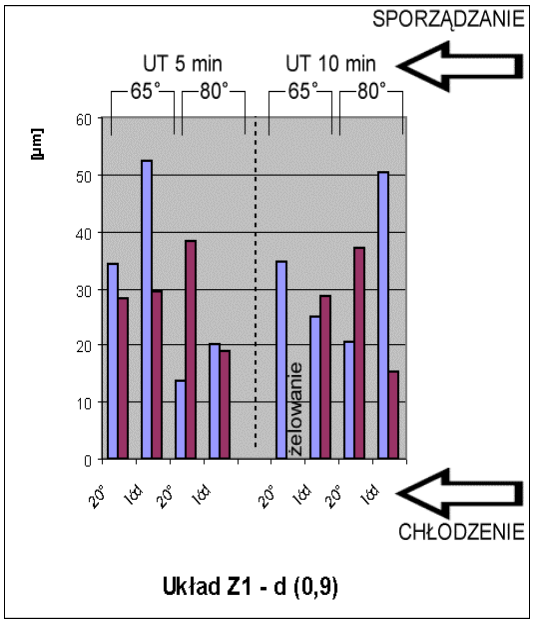
Dobór parametrów technologicznych

W badaniach wstępnych sporządzano zawiesiny liposfer (Z1 – Z9), w których udział lipidu (Precirol) wynosił 10% (wag/wag), a zawartość emulgatora była zmienna. Zastosowane stężenia emulgatorów w zawiesinach wstępnych mieściły się w granicach 3,0 – 7,0% (Tabela 4). Charakteryzowano zawiesiny liposfer otrzymane w różnych warunkach: zmieniano czas mieszania mieszadłem szybkoobrotowym (5 i 10 min), temperaturę emulgowania (65 i 80°C) i chłodzenia układów (20°C i w lodzie). Pomiar wielkości cząstek prowadzono bezpośrednio po sporządzeniu liposfer i po 7 dniach przechowywania w temp. 4°C (bez dostępu światła).

Wyniki pomiaru wielkości cząstek dla układów doświadczalnych Z1 – Z4, w zależności od warunków technologicznych i czasu przechowywania, prezentuje ryc. 20.

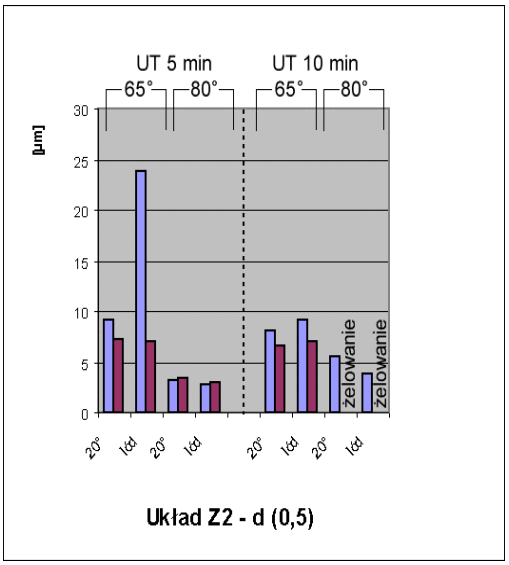
Ryc. 20. Wielkość cząstek liposfer w układach doświadczalnych Z1 – Z4 (Tabela 4) po wykonaniu ■ oraz po 7 dniach ■ przechowywania w temp 4°C: wpływ czasu mieszania mieszadłem Ultra-Turrax (5 i 10 min), temp. sporządzania (65 i 80°C) oraz temp. chłodzenia (20°C i w lodzie) na wielkość cząstek, d (0,5) i d (0,9).



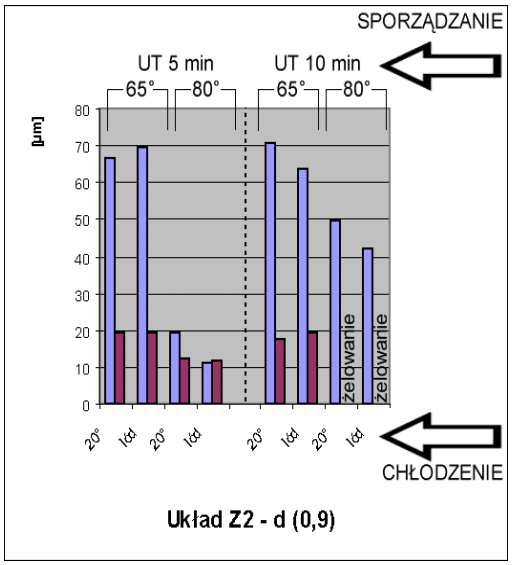


c.d. str. 2

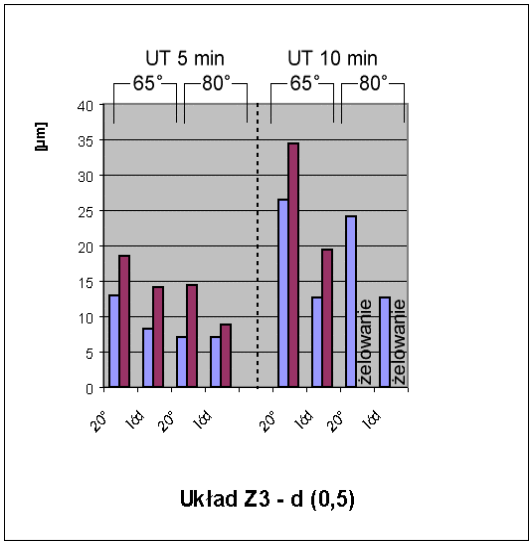
c.d. Ryc. 20.



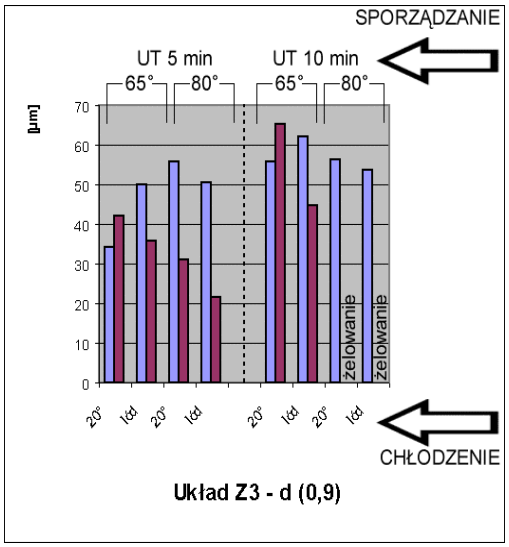
Układ Z2 - d (0,5)



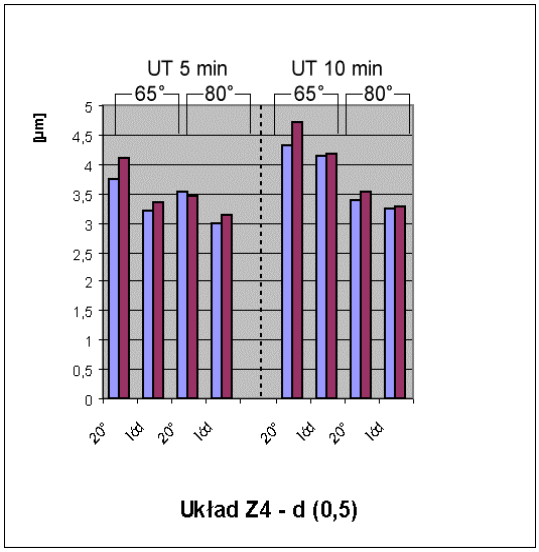
Układ Z2 - d (0,9)



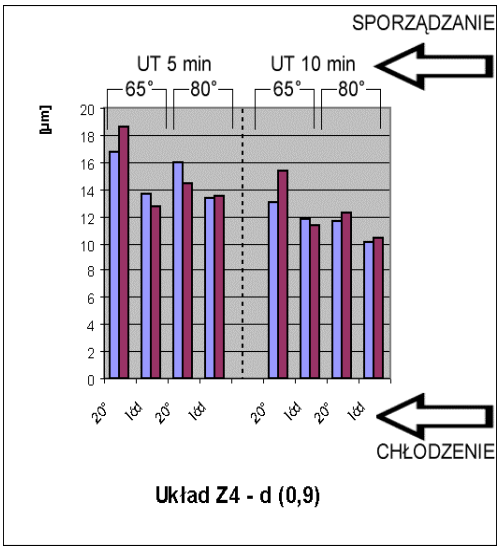
Układ Z3 - d (0,5)



Układ Z3 - d (0,9)



Układ Z4 - d (0,5)



Układ Z4 - d (0,9)

Otrzymywane układy charakteryzowały się płynną konsystencją. Gęstą konsystencję bezpośrednio po wykonaniu miał jedynie układ Z3, mieszany przez 10 min i ogrzewany do 80°C. Układ ten żelował podczas przechowywania.

Wielkość cząstek w otrzymywanych układach Z1 – Z4 różniła się znacząco. W zależności od układu największe cząstki, według pomiaru metodą dyfrakcji laserowej, miały wielkość od 20 μm do 70 μm. Bezpośrednio po sporządzeniu największe liposfery zaobserwowano w układzie Z3 (4% lecytyny): 50% cząstek układu, w zależności od warunków sporządzania, miało średnicę do ok. 7 – 25 μm. Natomiast najmniejsze cząstki liposfer tworzyły się w układzie Z4 (lecytyna z polisorbatem jako emulgator): w obu temperaturach emulgowania, niezależnie od czasu mieszania i temperatury chłodzenia, wielkość 50% cząstek była zbliżona i wynosiła do 3 – 4 μm. Nie zaobserwowano również znaczącego wpływu warunków sporządzania na wartość parametru d (0,9) w tym układzie.

Temperatura emulgowania układów miała wpływ na wielkość cząstek w układach: Z1, Z2 i Z3. Ogrzewanie układów w trakcie sporządzania do temp. 80°C przy mieszaniu przez 5 min, pozwalało na uzyskanie mniejszych cząstek liposfer w porównaniu do temp. 65°C.

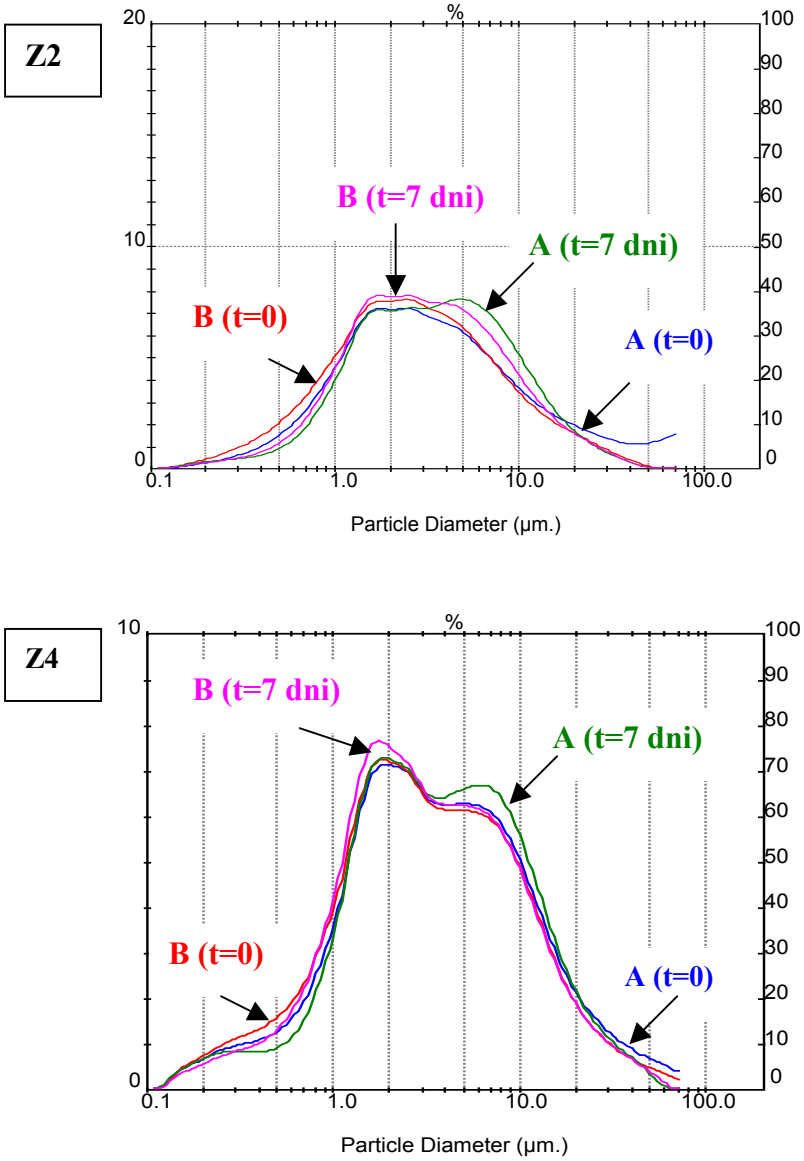
Nie zaobserwowano zdecydowanej zależności wielkości liposfer i szybkości chłodzenia układów. W wyniku szybkiego chłodzenia mniejsze cząstki obserwowano tylko w układzie Z3 wykonywanym z mieszaniem przez 10 min.

Mieszanie przez 10 min nie jest jednak korzystne w procesie sporządzania liposfer, ponieważ prowadzi do zbyt dużego napowietrzenia układów, co skutkowało dużą ilością piany na powierzchni zawiesiny liposfer. Nie uzyskano znaczącego zmniejszenia wielkości liposfer, natomiast dochodziło do szybkiego żelowania w zawiesinach Z1, Z2 i Z3, którego nie obserwowano, gdy stosowano mieszanie przez 5 min. Żelowaniu nie zapobiegało odpowietrzanie tych układów.

Poza występowaniem zjawiska żelowania w układach mieszanych przez 10 min, nie stwierdzono dużych zmian wielkości cząstek liposfer w zawiesinach Z1 - Z4 przechowywanych przez 7 dni, niezależnie od warunków sporządzania. W układzie Z3 mieszanym przez 5 min po 7 dniach cząstki miały nawet mniejszą wielkość (wartość d (0,9) wynosiła po sporządzeniu ok. 50 μm, a po 7 dniach ok. 22 μm). Podobnie, obserwowano mniejsze cząstki po 7 dniach w układzie Z2 sporządzanym w temp. 65°C.

Ustalono, że najbardziej optymalne właściwości spośród układów doświadczalnych z Precirolem wykazywały zawiesiny Z2 (polisorbat z poloksamerem) i Z4 (polisorbat z lecytyną).

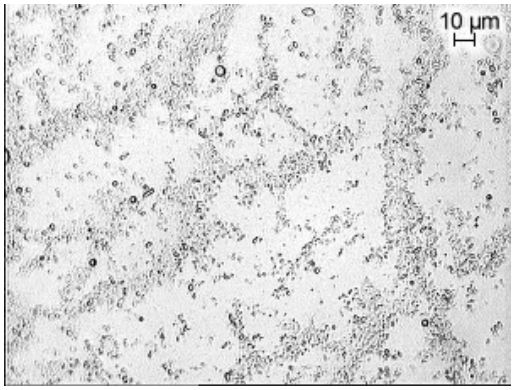
Na ryc. 21 przedstawiono rozkład wielkości cząstek zawiesin Z2 i Z4 po sporządzeniu (chłodzenie w temperaturze pokojowej i w lodzie) oraz po 7 dniach przechowywania w temp. 4°C.



Ryc. 21. Rozkład wielkości cząstek w zawiesinach Z2 i Z4, otrzymanych w temp. 80°C (A - chłodzenie w temp. 20°C; B - chłodzenie w lodzie): po sporządzeniu (t=0) i po 7 dniach przechowywania w temp. 4°C.

W obrazie mikroskopowym zawiesin liposfer zaobserwowano ułożenie cząstek lipidowych w charakterystyczne „łańcuszkowe” struktury. Obraz cząstek liposfer charakterystycznie układających się przedstawia ryc. 22. W czasie dalszego

przechowywania (1 – 2 miesiące) we wszystkich zawiesinach liposfer Z1 – Z4 dochodziło do żelowania - konsystencja zmieniała się z płynnej na półpłynną i półstałą.



Ryc. 22. Obraz mikroskopowy cząstek liposfer układających się łańcuchowo.

Badano wartość pH układów po sporządzeniu oraz po 7 dniach przechowywania. Wyniki przedstawiono w tabeli 13. Wartości pH układów Z1, Z2 i Z3 były niskie, poniżej 5,0, lecz tylko nieznacznie wyższe pH oznaczono w zawiesinach sporządzanych w temp. 65°C.

Tabela 13. Wpływ temperatury sporządzania i czasu przechowywania (temp. 4°C) na wartość pH zawiesin liposfer Z1 – Z4

	65°C		**80°C**	
Czas	***t=0***	***7 dni***	***t=0***	***7 dni***
Z1	4,4	4,3	4,3	4,3
Z2	4,4	4,4	4,2	4,2
Z3	5,1	5,2	4,8	5,2
Z4	3,7	3,6	3,5	3,7

Układy doświadczalne Z1 – Z4 (Tabela 4) sporządzano również stosując dodatkowo etap sonikacji przez 5 min. Wyniki pomiarów wielkości tak otrzymanych

liposfer przedstawia tabela 14. Pomiar wielkości cząstek prowadzono bezpośrednio po sporządzeniu oraz po 7 dniach przechowywania w temp. 4°C.

Tabela 14. Wielkość liposfer w zawiesinach doświadczalnych Z1 – Z4 sporządzanych z zastosowaniem **ultradźwięków**: wartości d (0,5) i d (0,9) po sporządzeniu i po 7 dniach przechowywania w temp. 4°C (μm)

Układy sporządzane w temp. 65°C									
		Z1		**Z2**		**Z3**		**Z4**	
chłodzenie		***20°C***	***lód***	***20°C***	***lód***	***20°C***	***lód***	***20°C***	***lód***
t=0	d (0,5)	-	1,70	0,60	0,51	15,3	2,06	Rozdział faz	Rozdział faz
	d (0,9)	-	49,3	1,65	1,28	57,9	4,55		
7 dni	d (0,5)	-	12,7	51,3	46,5	11,8	-		
	d (0,9)	-	53,9	74,8	73,8	61,2	-		
Układy sporządzane w temp. 80°C									
		Z1		**Z2**		**Z3**		**Z4**	
chłodzenie		***20°C***	***lód***	***20°C***	***lód***	***20°C***	***lód***	***20°C***	***lód***
t=0	d (0,5)	-	1,38	1,03	0,75	16,3	9,74	Rozdział faz	Rozdział faz
	d (0,9)	-	2,99	10,6	5,35	49,3	66,5		
7 dni	d (0,5)	-	-	40,5	29,8	-	-		
	d (0,9)	-	-	70,6	63,9	-	-		

(-) żelowanie

Etap sonikacji prowadził do zmniejszenia wielkości cząstek liposfer w przypadku zawiesiny Z2 (emulgatory: polisorbat, poloksamer) chłodzonej w temperaturze pokojowej. Porównanie wyników zawartych na ryc. 20 i w tabeli 14 wskazuje, że dla zawiesiny Z2 sporządzonej w temp. 80°C średnia wielkość cząstek d (0,5) zmniejszyła się z 3,13 μm do 1,03 μm, natomiast wartość d (0,9) układu zmniejszyła się z 19,3 μm do 10,6 μm. W układzie chłodzonym w lodzie sonikacja również prowadziła do zmniejszenia wielkości cząstek: wartość d (0,5) uległa zmianie z 2,71 μm do 0,75 μm, oraz d (0,9) z 11,4 μm do 5,35 μm.

Takiej zależności nie zaobserwowano w zawiesinie Z3 (lecytyna, poloksamer) chłodzonej w temperaturze pokojowej. 50% cząstek zawiesiny Z3 charakteryzowała wielkość do 16,3 μm, a więc większa w porównaniu do układu sporządzanego bez sonikacji, gdzie wielkość 50% cząstek mieściła się poniżej 7,2 μm. Ponadto po 7 dniach przechowywania układ sonikowany Z3, chłodzony w lodzie lub sporządzany w temp. 80°C i chłodzony w temperaturze pokojowej, żelował.

Niemożliwe do wykonania tą metodą okazały się zawiesiny Z1 (lecytyna, polisorbat, poloksamer) i Z4 (lecytyna, polisorbat), ponieważ w formulacji Z1 dochodziło do żelowania, gdy układ chłodzono w temperaturze pokojowej, natomiast w trakcie sporządzania zawiesiny Z4 następował trwały rozdział faz.

Jedynie zawiesinę Z2 można było otrzymać stosując etap sonikacji w obu temperaturach emulgowania i sposobach chłodzenia. Cząstki liposfer układu Z2 sporządzonego w temp. 80°C miały większą średnicę. Przykładowo wartość d (0,9) układu chłodzonego w temperaturze pokojowej wynosiła 10,6 μm, była więc większa w porównaniu z d (0,9) = 1,65 μm w układzie sporządzanym w temp. 65°C.

Podczas przechowywania układu Z2 w temp. 4°C już po 7 dniach dochodziło jednak, niezależnie od warunków otrzymywania, do dramatycznego zwiększania się wielkości cząstek liposfer i układy ulegały żelowaniu w czasie kolejnych 3 -5 tygodni.

Dalsze układy zawierające lecytynę z polisorbatem w stężeniu 1% (wag/wag) (Z6 – Z7) lub bez polisorbatu (Z5) (Tabela 4) sporządzano albo stosując sonikację (Z7) albo bez tego etapu (Z5, Z6 i Z8). Niezależnie od stężenia lecytyny i obecności polisorbatu układy Z5 – Z7 nie były trwałe. Również układ emulgatorów polisorbat i Span 40 (Z8) nie stabilizował zawiesiny liposfer, co obrazuje tabela 15.

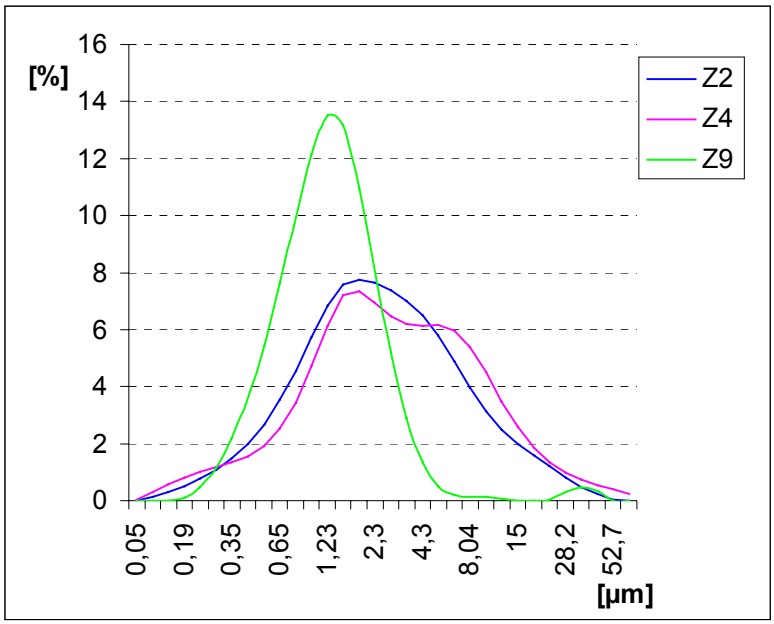
Tabela 15. Wyniki obserwacji zawiesin liposfer Z5 – Z8 podczas sporządzania i przechowywania

Układ	Obserwacje
Z5	destabilizacja (brak homogenności, wystąpienie grudek) w trakcie mieszania mieszadłem szybkoobrotowym
Z6	wydzielanie się kropli oleju podczas mieszania, po sporządzeniu układ gęstnieje
Z7	bez sonikacji - gęstnienie po 1 dniu; całkowite żelowanie po 4 tygodniach; sonikacja - żelowanie podczas chłodzenia
Z8	po ochłodzeniu konsystencja płynna; po 24 h żelowanie

Układ Z9 (Tabela 4) sporządzono z samodzielnym emulgatorem - polisorbatem 80 w stężeniu 3%. Bezpośrednio po sporządzeniu układ, niezależnie czy był sonikowany, pozostawał płynny.

Na ryc. 23 porównano pod względem wielkości cząstek układ Z9 z zawiesinami liposfer, które posiadały w swoim składzie oprócz polisorbatu poloksamer (Z2) lub lecytynę (Z4) (Tabela 4). Zawiesiny tych liposfer wykonywano bez etapu sonikacji. Wielkość 50% cząstek liposfer w układach Z2 i Z4 była porównywalna i mieściła się poniżej odpowiednio 2,7 µm i 3,0 µm, natomiast w układzie Z9 cząstki były mniejsze - 50% mieściło się w zakresie poniżej 1,5 µm. W układach Z2 i Z4 wielkość 90% cząstek liposfer mieściła się poniżej odpowiednio: 11,3 i 13,3 µm, a natomiast w układzie Z9 wartość d (0,9) wynosiła 3,15 µm.

Zawiesina liposfer Z9, wykonana bez etapu sonikacji po 7 dniach przechowywania w temp. 4°C żelowała, natomiast wykonana z udziałem ultradźwięków, po tygodniu przechowywania w temp. 4°C, była płynna, a wielkość 90% cząstek układu mieściła się poniżej 12 µm. Również w tym układzie dochodziło jednak do żelowania w czasie krótszym niż 3 miesiące.



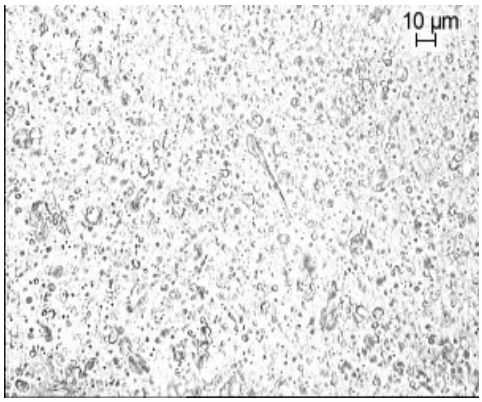
Ryc. 23. Rozkład wielkości cząstek w układach Z2, Z4 i Z9 (Tabela 4), bezpośrednio po wykonaniu bez użycia ultradźwięków.

Liposfery z Precirolem w mieszaninie z innymi lipidami

Sporządzano zawiesinę liposfer Z10 (Tabela 5), gdzie jako matrycę lipidową użyto mieszaninę Precirolu i alkoholu cetylowego w stosunku 4:1, a emulgatorem był polisorbat (2%).

Bezpośrednio po sporządzeniu układ był płynny. Po 7 dniach przechowywania w temp. 4°C nastąpiła zmiana konsystencji na półpłynną. Pomimo tego wielkość liposfer nie zmieniła się znacząco podczas przechowywania układu w czasie do 6 tygodni w temp. 4°C. Po sporządzeniu, w zakresie poniżej 10,6 µm mieściła się wielkość 90% cząstek, natomiast po 6 tygodniach wartość d (0,9) wynosiła 16,8 µm, a wartość d (0,5) wynosiła 5,6 µm.

Pod mikroskopem zaobserwowano, że cząstki liposfer w tym układzie miały kształt łezkowaty. Obraz mikroskopowy zawiesiny liposfer Z10 przedstawia ryc. 24.



Ryc. 24. Obraz mikroskopowy zawiesiny liposfer Z10 (Precirol: alkohol cetylowy 4:1).

Sporządzano także zawiesiny liposfer Z11 i Z12 z matrycą lipidową złożoną z Precirolu i oleju Miglyol (Tabela 5).

Przy sporządzaniu zawiesiny Z11 (Precirol : Miglyol 2:1) na etapie sonikacji wystąpiło znaczne pienienie układu. Podczas chłodzenia, po ok. 10 min zawiesina zgęstniała do konsystencji półpłynnej.

Stabilniejszym układem z matrycą lipidową złożoną z Precirolu i Miglyolu, okazała się zawiesina Z12, gdzie stosunek Precirol : Miglyol wynosił 4:1. Obserwowano wygląd tego układu, konsystencję, wielkość cząstek po sporządzeniu oraz podczas przechowywania w temp. pokojowej i 4°C w czasie do 2 lat. Płynna konsystencja oraz barwa układu Z12 po sporządzeniu nie zmieniała się w czasie przechowywania w temperaturze pokojowej. Zawiesina liposfer przechowywana w temp. 4°C bezpośrednio przeniesiona do temperatury pokojowej miała bardziej gęstą konsystencję, lecz w krótkim czasie ulegała upłynnieniu. Wyniki pomiarów wielkości cząstek układu Z12 przedstawiono w tabeli 16.

Tabela 16. Wielkość cząstek liposfer w zawiesinie Z12 (Precirol : Miglyol): wartości d (0,9) i d (0,5) oraz ilość (%) cząstek w przedziałach wielkości – wpływ warunków przechowywania

Przechowywanie		**d (0,5) (µm)**	**d (0,9) (µm)**	**Udział (%) cząstek w zakresie wielkości (µm)**	
czas	**temp.**			**1 – 10**	**10– 30**
Układ bez sonikacji					
t=0		1,64	3,77	80,5	1,1
7 dni	4°C	1,63	3,94	76,9	0,6
14 dni	4°C	3,16	10,05	80,2	9,7
6 tygodni	4°C	60,7	76,8	12,7	9,8
Układ sonikowany					
t=0		0,76	3,03	35,7	0,8
7 dni	4°C	0,7	3,89	31,4	1,2
6 miesięcy	4°C	1,39	17,1	53,2	4,1
6 miesięcy	temp. pok.	63,8	77,2	6,5	7,0
2 lata	4°C	32,9	75,5	8,9	9,4
2 lata	temp. pok.	59,9	76,7	6,9	9,0

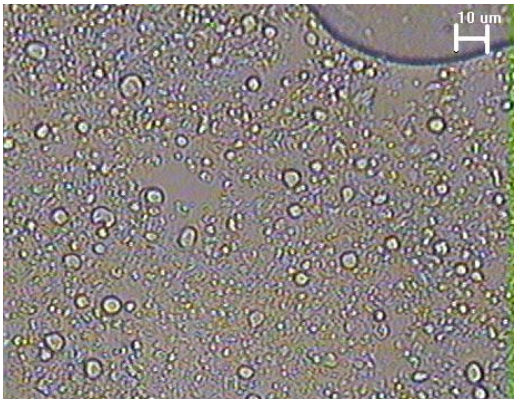
Podczas przechowywania układu w temperaturze pokojowej zaobserwowano zwiększenie wielkości liposfer. W układzie sporządzanym bez etapu sonikacji wielkość 90% cząstek po sporządzeniu mieściła się poniżej 3,77 µm, natomiast po 6 tygodniach przechowywania w temp. 4°C wzrosła do 76,8 µm. W układzie sonikowanym

zwiększanie wielkości cząstek zachodziło wolniej, ponieważ wartość d (0,9) po sporządzeniu wynosiła 3,03 µm, a po 6 miesiącach w temp. 4°C - 17,1 µm.

Układ sonikowany przechowywano w dwóch temperaturach: pokojowej i 4°C. Temperatura przechowywania układów miała znaczący wpływ na szybkość wzrostu wielkości cząstek liposfer. W układzie sporządzanym z użyciem ultradźwięków, po 6 miesiącach przechowywania w temp. 4°C 90% cząstek miało wielkość poniżej 17,1 µm. Natomiast w układzie przechowywanym w tym samym czasie w temperaturze pokojowej wartość d (0,9) wynosiła 77,2 µm. Po 2 latach różnice nie były tak znaczące.

Wartość pH otrzymanego układu wynosiła 4,91 i nie ulegała istotnym zmianom podczas przechowywania.

Wzrost wielkości cząstek lipidowych wykazany metodą dyfrakcji laserowej nie został potwierdzony badaniami mikroskopowymi. W obrazie mikroskopowym nie wykrywano cząstek o wielkości kilkudziesięciu mikrometrów, a jedynie obserwowano aglomeraty cząstek, które nie były obecne po ekstruzji układów przez igłę strzykawki. Na ryc. 25 przedstawiono obraz mikroskopowy zawiesiny liposfer Z12 sporządzonej bez użycia ultradźwięków, przechowywanej przez 6 tygodni i poddanej ekstruzji przez igłę strzykawki.



Ryc. 25. Obraz mikroskopowy zawiesiny liposfer Z12 (Precirol: Miglyol 4:1).
Długość podziałki wynosi 10 µm. (W prawym górnym rogu widoczny jest pęcherz powietrza).

Stabilizacja zawiesiny liposfer polimerami hydrofilowymi

Sporządzono zawiesiny liposfer Z13 – Z16 (p. 2.4), które składem emulgatora (polisorbat) i lipidu odpowiadały układowi Z12. Do fazy wodnej dodane zostały jednak polimery hydrofilowe: metyloceluloza, karmeloza sodowa, hydroksyetyloceluloza lub karbomer. Wyniki obserwacji wpływu dodatku polimerów oraz sonikacji na wielkość cząstek liposfer po sporządzeniu przedstawiono w tabeli 17.

Po sporządzeniu wszystkie układy były płynne, chociaż zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia polimeru konsystencja układów zmienia się na bardziej gęstą.

Etap sonikacji wpłynął na zmniejszenie wielkości cząstek w układach z udziałem metylocelulozy (Z15) i karmelozy sodowej (Z14c) i również umożliwił otrzymanie zawiesiny liposfer z karbomerem (Z13), ponieważ w tym przypadku zawiesiny otrzymywane bez sonikacji ulegały szybkiemu żelowaniu.

Dodatek polimeru w układach Z15, Z16a i Z16b nie spowodował znaczącej zmiany wielkości cząstek, w porównaniu z układem bez polimeru (Z12). Natomiast karmeloza sodowa i hydroksyetyloceluloza w stężeniu od 0,5 do 1% przyczyniły się do zwiększenia wielkości cząstek, czego wynikiem jest wartość d (0,5), która wynosi dla układu Z16c 4,46 µm, a dla Z14b i Z14c – odpowiednio 15,4 µm i 10,0 µm.

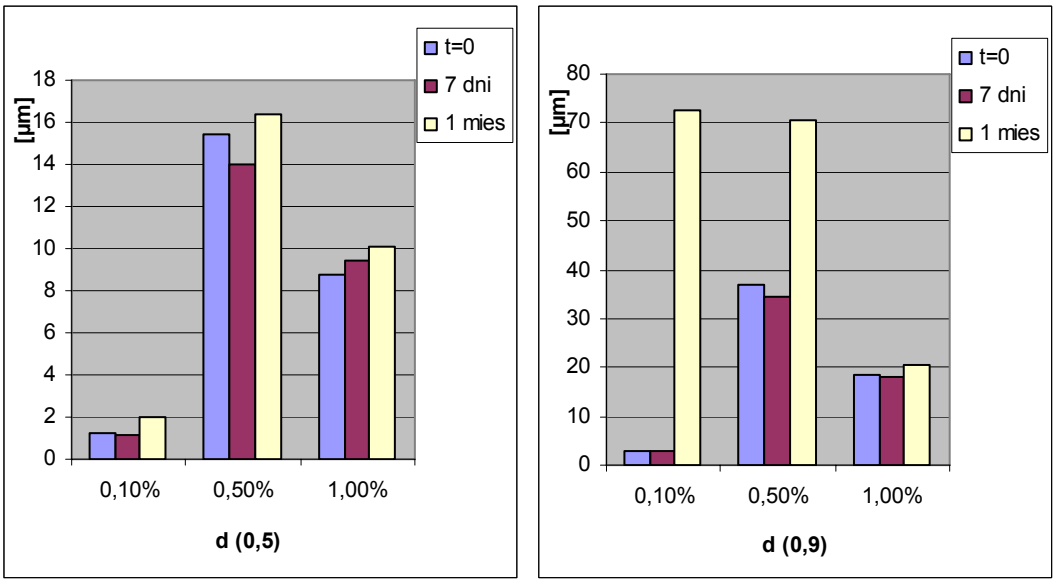
Tabela 17. Wielkość liposfer w zawiesinach (Precirol: Miglyol 4:1) z fazą dyspergującą zawierającą polimery hydrofilowe

Układ	**Polimer**	**Stężenie**	**Sonikacja**	**d (0,5) (µm)**	**d (0,9) (µm)**	**Udział (%) cząstek w zakresie wielkości (µm)**		
						1 - 10	**10 - 30**	**> 30**
Z13	karbomer	0,2%	-	n.b.	n.b.	żelowanie		
			+	1,52	44,8	45,0	6,31	12,8
Z14a	CMC	0,1%	-	1,20	2,88	57,3	1,5	4,85
Z14b		0,5%	-	15,4	36,8	30,8	44,3	22,8
Z14c		1,0%	-	10,0	18,8	47,6	49,3	0,37
			+	2,72	14,7	79,8	9,01	5,33
Z15	MC	0,5%	-	2,20	6,75	83,7	1,05	5,30
			+	0,82	2,80	41,9	0,18	0
Z16a	HEC	0,1%	-	1,65	3,85	75,6	0,75	3,15
Z16b		0,5%	-	1,60	4,96	77,1	0,51	2,85
Z16c		1,0%	-	4,46	10,8	85,6	11,7	0

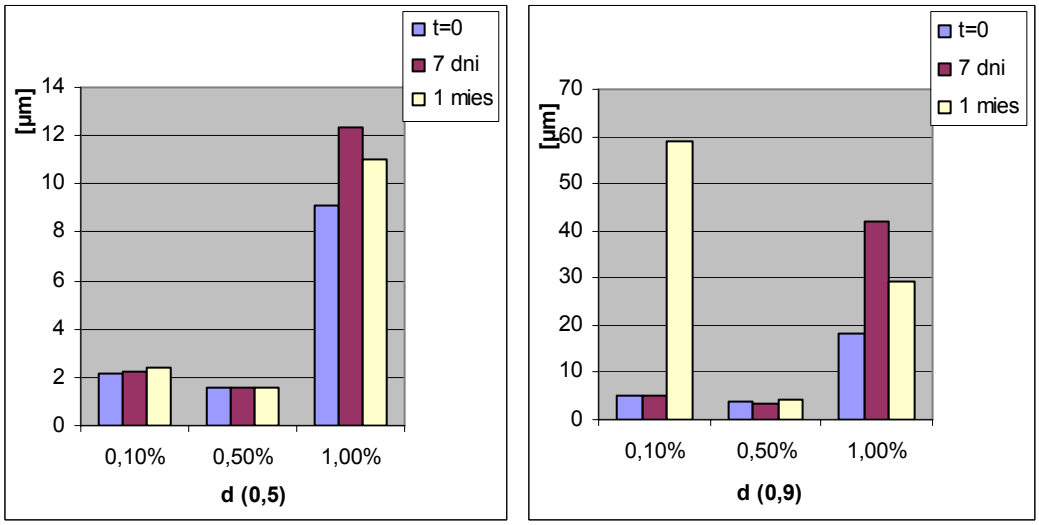
n.b. - nie badano
MC - metyloceluloza
CMC – karmeloza sodowa
HEC – hydroksyetyloceluloza

Zawiesiny liposfer z udziałem karmelozy sodowej (Z14) i hydroksyetylocelulozy (Z16) obserwowano podczas przechowywania (temp. 4°C) w czasie do 1 miesiąca. Wyniki obserwacji wielkości cząstek przedstawiono na ryc. 26.

Z14



Z16



Ryc. 26. Wielkość liposfer (µm) w zawiesinach sporządzonych z roztworem karmelozy sodowej lub hydroksyetylocelulozy jako fazą rozpraszającą (Z14 i Z16, Tabela 6) i przechowywanych w temp. 4°C: wpływ stężenia polimeru 0,1%, 0,5% i 1,0%.

Zbliżoną wielkość cząstek do układu bez polimeru (układ Z12, Tabela 16) wykazała zawiesina liposfer Z14a z karmelozą sodową (0,1%), a także układ Z16a i Z16b z hydroksyetylocelulozą (0,1% i 0,5%), gdzie wartość d (0,5) wynosiła odpowiednio: 1,20 µm, 1,65 µm i 1,60 µm.

Wraz ze wzrostem stężenia karmelozy sodowej do 0,5% lub 1,0% (układ Z14a i Z14b) następował znaczący wzrost wielkości liposfer (d (0,5) 10 – 15 µm). W przypadku układu z hydroksyetylocelulozą taki wzrost obserwowano po zwiększeniu stężenia do 1,0%.

Najbardziej stabilnym układem otrzymanym z udziałem karmelozy sodowej okazała się formulacja zawierająca polimer w stężeniu 1%, ponieważ wielkość cząstek liposfer podczas przechowywania przez 1 miesiąc w temp. 4°C, nie zwiększała się znacząco, co nastąpiło w układach o mniejszym stężeniu karmelozy sodowej. Natomiast w zawiesinach z hydroksyetylocelulozą (Z16) najbardziej stabilnym układem podczas przechowywania w czasie 7 dni w temp. 4°C, okazała się zawiesina zawierająca 0,5% polimeru w fazie wodnej. Po 1 miesiącu przechowywania wielkość cząstek w tym układzie praktycznie nie wzrosła i 90% cząstek miało wielkość poniżej 4,2 µm.

Wyjaławianie zawiesin liposfer

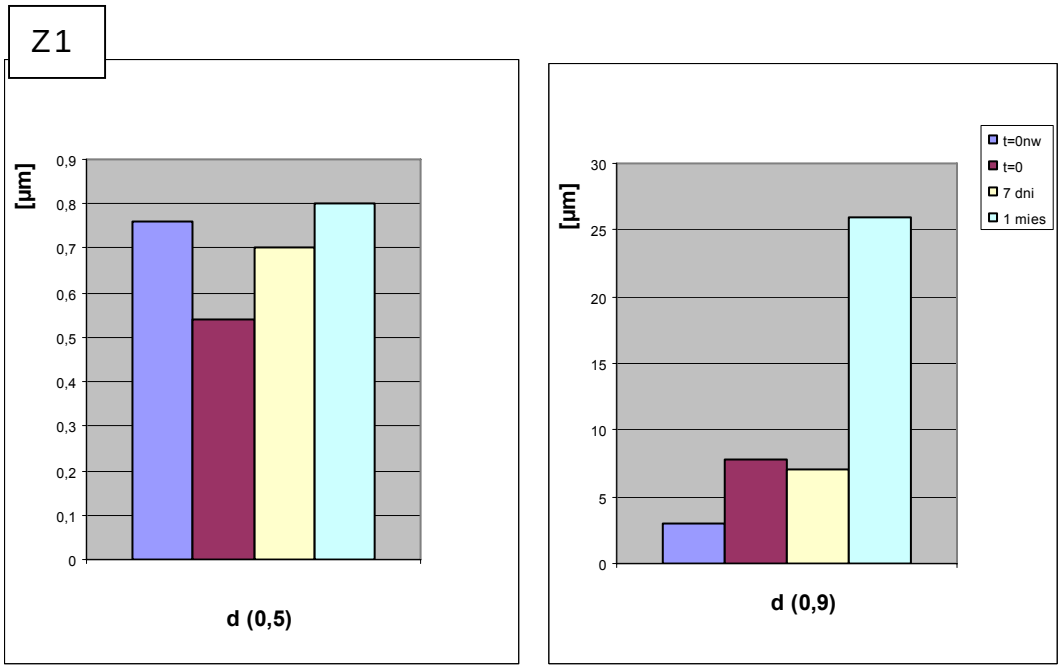
Wyjaławiano (p. 2.5) zawiesinę liposfer złożoną z mieszaniny Precirolu i Miglyolu i zawierającą polisorbat w stężeniu 2% (zawiesina Z12, sporządzona z etapem sonikacji). Ponadto poddano wyjałowieniu układy o takim samym składzie, lecz zawierające dodatek hydroksyetylocelulozy (zawiesiny Z16). Układy po wyjałowieniu przechowywano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Wyniki pomiarów wielkości liposfer wyjałowionych zawiesin Z12 i Z16 przedstawiono na ryc. 27.

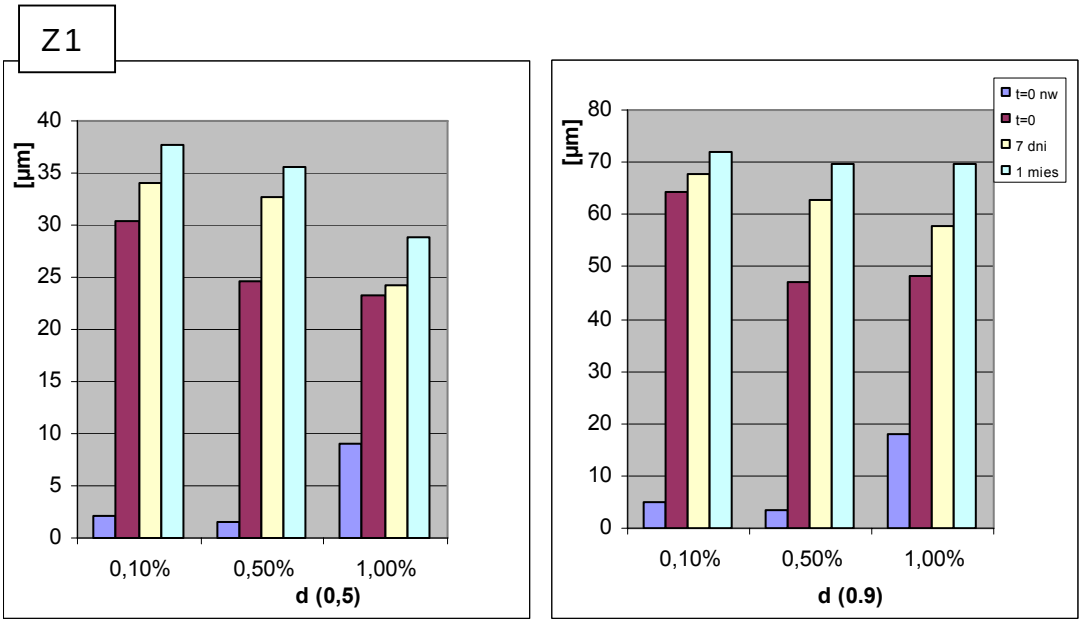
Etap wyjaławiania nie wpłynął na konsystencję zawiesin, natomiast miał wpływ na wielkość cząstek liposfer. Liposfery wyjałowione miały większe cząstki w porównaniu z niepoddanymi procesowi wyjaławiania, niezależnie, czy w fazie wodnej była obecna hydroksyetyloceluloza. W zawiesinie Z12 zmiana była niewielka - nie doszło, do znaczącego wzrostu wartości d (0,5), a tylko wartość d (0,9) wzrosła po wyjałowieniu z 3,03 µm do 7,85 µm. Z kolei w układach Z16, w których przed

wyjałowieniem oznaczono wartości d (0,5) w zakresie 3 – 8 µm, po wyjałowieniu nastąpił wzrost tego parametru do 20 – 30 µm i również doszło do znacznego zwiększenia wartości d (0,9).

Wyniki zobrazowane na ryc. 27 wskazują, że w obecności hydroksyetylocelulozy podczas wyjaławiania dochodzi do wielokrotnego wzrostu wielkości cząstek liposfer, co potwierdzają obserwacje mikroskopowe. Z kolei zmiany obserwowane w układzie Z12, bez polimeru, nie są duże. Wartość d (0,5) wyjałowionej zawiesiny liposfer Z12 nadal zawiera się poniżej 1 µm (0,54 µm).

Przechowywanie układów wyjałowionych w temperaturze pokojowej przez 1 miesiąc spowodowało wzrost wielkości cząstek liposfer we wszystkich układach. Przykładowo wartość d (0,9) wyjałowionej zawiesiny Z12 wzrosła z 7,85 µm do 26 µm, natomiast dla zawiesiny Z16b z 24,5 µm do 35,6 µm.





Ryc. 27. Wpływ wyjaławiania na wielkość liposfer w zawiesinach Z12 (bez polimeru w fazie wodnej) i Z16 (hydroksyetyloceluloza w fazie wodnej) po sporządzeniu (t=0) oraz po 7 dniach i 1 miesiącu przechowywania w temperaturze pokojowej; (nw – zawiesiny przed wyjałowieniem).

ZAWIESINY LIPOSFER Z BUPIWAKAINĄ ORAZ STEARYNIANEM BUPIWAKAINY

W celu inkorporacji w liposferach bupiwakainy zasady prowadzono wstępne badania rozpuszczalności substancji w buforach fosforanowych pH 7,0 i pH 8,0 oraz w wodzie (p. 3.1, str. 58). Wartość pH nasyconego roztworu wodnego bupiwakainy wynosiła 8,02. Wyniki badań rozpuszczalności (wartości średnie z trzech oznaczeń) przedstawiono w tabeli 18. Najwyższą rozpuszczalność bupiwakainy wyznaczono w buforze fosforanowym pH 7,0, gdzie dochodzi do częściowego tworzenia soli bupiwakainy.

Rozpuszczalność w Miglyolu oznaczona półilościowo mieściła się w zakresie 50 – 80 mg/g. Wyznaczono również współczynnik podziału Miglyol/woda, który wynosi 13,9.

Tabela 18. Rozpuszczalność (mg/ml) bupiwakainy zasady w wodzie i buforach fosforanowych (temperatura pokojowa)

Rozpuszczalnik	Rozpuszczalność (mg/ml)
Woda	0,203
Bufor pH 7,0	1,035
Bufor pH 8,0	0,239

Oceniano rozpuszczalność bupiwakainy w lipidach stałych. Badanie przeprowadzono półilościowo stosując serię stężeń: 1% - 25% (wag/wag) bupiwakainy w stosunku do lipidu (p 3.2). Ponadto do badań użyto mieszaninę lipidu stałego Precirolu i oleju Miglyol. Wyniki badania rozpuszczalności bupiwakainy zasady w wybranych lipidach przedstawia tabela 19. Największą rozpuszczalność bupiwakainy uzyskano w Precirolu.

Bupiwakana zasada ulegała wytrąceniu z mieszaniny Precirolu z Miglyolem w stężeniu 2%.

Wyznaczono współczynnik podziału dla stałego lipidu Precirol metodą opisaną w p. 3.2 (str. 59). Współczynnik podziału Precirol/woda wynosi 3741.

Tabela 19. Rozpuszczalność (X) bupiwakainy w wybranych lipidach i ich mieszaninach

Lipid	**Bupiwakaina**	**Stearynian bupiwakainy**
	X (% wag/wag)	
Compritol	**X<1,0**	**-**
Precirol	**20,0<X<25,0**	**X>25**
Parafina stała	1,0<X<5,0	-
Tripalmitynian glicerolu	10,0<X<15,0	-
Tristearynian glicerolu	10,0<X<15,0	-
Witepsol	5,0<X<7,0	-
Wosk pszczeli biały	5,0<X<10,0	-
Precirol : Miglyol (4:1)	**1,0<X<2,0**	**0,2<X<0,5**

Sporządzanie lipofilowej pochodnej bupiwakainy – stearynianu bupiwakainy

Prowadzono syntezę metodą stapiania stosując jako substraty bupiwakainę zasadę i kwas stearynowy (str. 60).

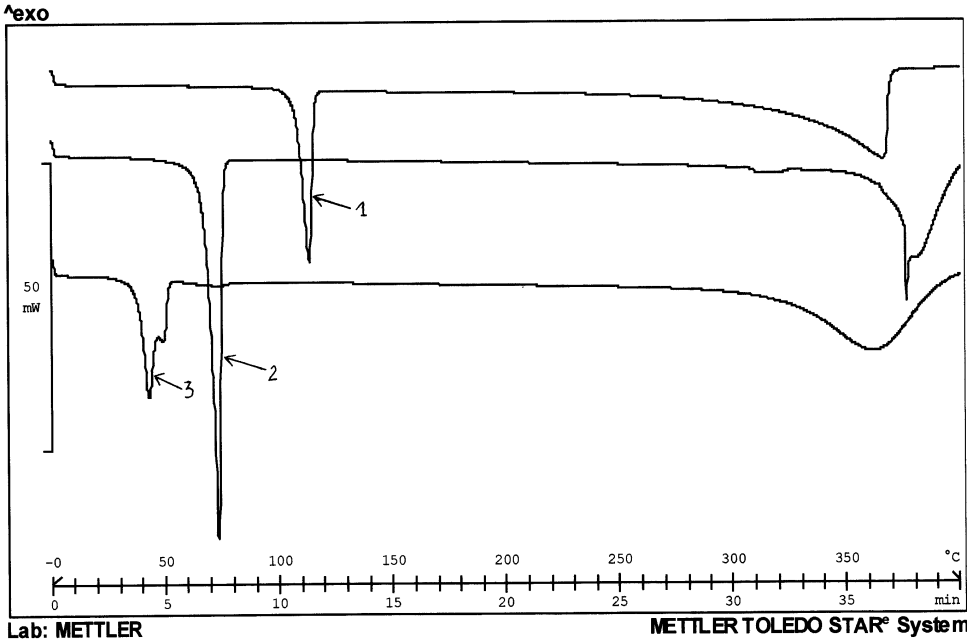
Uzyskano produkt o barwie kremowej, który poddano badaniu metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej DSC, opisaną w p. 3.3 (str. 60). Na ryc. 28 przedstawiono termogram stearynianu bupiwakainy, a także porównawczo - bupiwakainy i kwasu stearynowego.

Efekty endotermiczne zaobserwowano w następujących temperaturach:

1) bupiwakaina – 112,27°C

2) kwas stearynowy – 71,05°C

3) stearynian bupiwakainy otrzymany metodą stapiania – 42,14°C.



Ryc. 28. Termogramy DSC: 1) bupiwakainy; 2) kwasu stearynowego; 3) stearynianu bupiwakainy.

Na podstawie przeprowadzonych badań produktu reakcji bupiwakainy zasady i kwasu stearynowego ustalono, że powstał nowy związek, który uznano za stearynian bupiwakainy. Na termogramie stearynianu bupiwakainy zaobserwowano niewielki pik odpowiadający kwasowi stearynowemu, co świadczy o pewnym zanieczyszczeniu stearynianu bupiwakainy nadmiarem kwasu stearynowego. Nie wyjaśniono przyczyn istnienia niewielkiego piku odpowiadającego temp. ok. 49°C.

Prowadzono badanie rozpuszczalności stearynianu bupiwakainy w wodzie w temperaturze pokojowej. W tym celu wykonano trzy niezależne badania. Oznaczona rozpuszczalność związku wynosiła 0,149 mg/ml. Wartość pH nasyconego wodnego roztworu stearynianu bupiwakainy wynosiła 8,46.

Półilościowo badano rozpuszczalność stearynianu bupiwakainy w lipidach: Precirolu, Miglyolu i mieszaninie Precirol : Miglyol (4:1).

Stearynian bupiwakainy charakteryzował się większą rozpuszczalnością w Precirolu niż bupiwakaina w postaci zasady - nawet przy stężeniu 250 mg/g nie obserwowano kryształów wytrąconej substancji (Tabela 19). Natomiast w mieszaninie Precirolu z Miglyolem obserwowano kryształy wolnej bupiwakainy (w postaci igieł) przy stężeniu 5 mg/g, a więc mniejszym niż w badaniach bupiwakainy (Tabela 19). Rozpuszczalność w Miglyolu mieściła się w zakresie 20 - 50 mg/g lipidu.

Zawiesiny liposfer z bupiwakainą lub stearynianem bupiwakainy

Otrzymano układy zawierające 10% (wag/wag) lipidu Precirol. Wstępnie inkorporowano bupiwakainę zasadę w ilości: 25 mg/g, 50 mg/g i 100 mg/g lipidu (odpowiednio 0,25%, 0,5% i 1,0% w zawiesinie) – otrzymując układy ZB1, ZB2 i ZB3 (Tabela 7). Zawiesiny liposfer z większą zawartością bupiwakainy żelowały w czasie 24 h, natomiast układ Z1 pozostał płynny.

Ponadto sporządzano zawiesiny liposfer na bazie lipidu mieszanego Precirol : Miglyol (4:1) z bupiwakainą zasadą w ilości 50 mg/g lipidu (0,5% w zawiesinie - układ ZB4). Stearynian bupiwakainy wprowadzano do liposfer w ilości 100 mg/g lipidu (1% w zawiesinie - układ ZB5), co odpowiadało równoważnej ilości bupiwakainy, tzn. 50 mg/g lipidu. Aby zwiększyć trwałość fizyczną układów, do fazy wodnej zawiesin dodawano polimery hydrofilowe, tworząc zawiesiny ZB6, ZB7 i ZB8 (Tabela 7). Wszystkie układy zawierające Precirol z Miglyolem były płynne po sporządzeniu.

Zawiesiny liposfer, gdzie fazą rozpraszającą były roztwory polimerów hydrofilowych (karmeloza sodowa - ZB6 i hydroksyetyloceluloza - ZB7), charakteryzowały się mniej płynną konsystencją w porównaniu do układów bez dodatku polimerów. Konsystencja układu ZB7 zmieniła się na półpłynną w czasie przechowywania (2 dni). Z kolei układ ZB8 (z poloksamerem) nie wykazywał zmiany konsystencji.

Ostateczna wartość pH zawiesin liposfer (korygowana do wartości 8,0 za pomocą 0,1 mol/l roztworu NaOH) wynosiła 7,3 - 7,8.

Podczas przechowywania w temp. 4°C zachodziła krystalizacja substancji leczniczej w fazie wodnej wszystkich sporządzonych zawiesin. Czas, po którym obserwowano to zjawisko przedstawia tabela 20.

W układzie ZB3, zawierającym 1% bupiwakainy kryształy substancji leczniczej widoczne były okiem nieuzbrojonym bezpośrednio po sporządzeniu. Po 24 h zaobserwowano ich obecność we wszystkich zawiesinach liposfer z Precirolem (ZB1 – ZB3). W układzie ZB4 (Precirol : Miglyol 4:1) krystalizację bupiwakainy zaobserwowano po 48 h przechowywania. W zawiesinie ZB5 zawierającej stearynian bupiwakainy, krystalizację bupiwakainy (kryształy w postaci charakterystycznych igieł) zaobserwowano później niż w zawiesinie liposfer z bupiwakainą zasadą (ZB4).

Obecność poloksameru w fazie wodnej liposfer nie zapobiegła krystalizacji bupiwakainy bezpośrednio po sporządzeniu układu (ZB8), natomiast w układach z karmelozą sodową i hydroksyetylocelulozą (ZB6 i ZB7) krystalizacja była opóźniona i nastąpiła odpowiednio po 3 i 7 dniach przechowywania.

Tabela 20. Szybkość krystalizacji i zawartość bupiwakainy w fazie wodnej liposfer sporządzonych z bupiwakainą lub stearynianem bupiwakainy

Układ	**Inkorporowana substancja lecznicza**	**Polimer w fazie wodnej**	**Krystalizacja substancji leczniczej**	**Ilość substancji leczniczej w fazie wodnej***
ZB1	bupiwakaina	-	< 24 h	nie oznaczano
ZB2	bupiwakaina	-	< 24 h	nie oznaczano
ZB3	bupiwakaina	-	po sporządzeniu	nie oznaczano
ZB4	bupiwakaina	-	48 h	100,4 %
ZB5	stearynian bupiwakainy	-	3 dni	93,4 %
ZB6	bupiwakaina	1% CMC	3 dni	87,0%
ZB7	bupiwakaina	1% HEC	7 dni	101,0 %
ZB8	bupiwakaina	5% poloksamer	< 24 h	nie oznaczano

CMC – karmeloza sodowa

HEC – hydroksyetyloceluloza

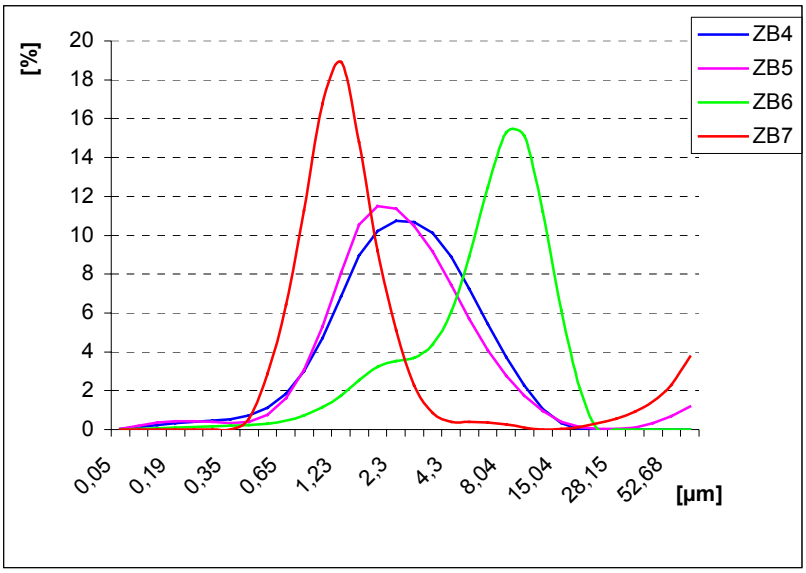
* - (%) całkowitej dawki, badanie po 24 h

Na ryc. 29 przedstawiono wygląd zawiesiny liposfer (układ ZB2) w fiolce, w której widoczne są okiem nieuzbrojonym kryształy bupiwakainy.

Ryc. 29. Kryształy bupiwakainy w zawiesinie liposfer widoczne okiem nieuzbrojonym.

W układach, w których krystalizacja była opóźniona oznaczano stężenie bupiwakainy w fazie wodnej uzyskanej metodą ultrafiltracji (p. 10.2). W celu rozpuszczenia ewentualnych kryształów bupiwakainy układy przed filtracją zakwaszano. Wyniki (średnia z wyników otrzymanych dla trzech próbek) przedstawione w tabeli 20 świadczą, że całkowita (ZB4, ZB7) lub prawie całkowita (ZB5, ZB6) dawka bupiwakainy wykrywana była w fazie wodnej.

W zawiesinach liposfer, gdzie nie dochodziło do krystalizacji substancji leczniczej bezpośrednio po sporządzeniu, przeprowadzano również pomiary wielkości cząstek liposfer. Na ryc. 30 przedstawiono rozkład wielkości cząstek dla układów: ZB4, ZB5, ZB6 i ZB7.



Ryc. 30. Rozkład wielkości liposfer w zawiesinach (ZB4 – ZB7, Tabela 7) z inkorporowaną substancją leczniczą.

W porównaniu z układem bez bupiwakainy (Z12) wielkość cząstek nieznacznie zwiększyła się po inkorporacji substancji leczniczej: w zawiesinie Z12 50% cząstek miało wielkość do 1,64 μm (Tabela 16), natomiast w układzie z bupiwakainą (ZB4) do 2,8 μm, a ze stearynianem bupiwakainy (ZB5) do 2,6 μm. Wartości d (0,9) przedstawiały się odpowiednio: 3,77 μm (Z12) oraz 7,2 μm (ZB4) i 7,4 μm (ZB5).

W rozkładzie wielkości cząstek zaobserwowano wpływ obecności substancji leczniczej oraz polimerów hydrofilowych: karmelozy sodowej i hydroksyetylocelulozy na wielkość cząstek liposfer. W zawiesinie ZB6 z karmelozą sodową wszystkie cząstki mają rozmiar w zakresie 1 – 30 μm (d (0,5) wynosi 8,02 μm), natomiast w zawiesinie ZB7 dodatek hydroksyetylocelulozy umożliwił uzyskanie cząstek mniejszych (średnia wielkość d (0,5) wynosiła 1,4 μm), a 21% cząstek posiadało rozmiar poniżej 1 μm. Metodą dyfrakcji laserowej wykrywano również skłonność tak małych liposfer do aglomeracji, o czym świadczy frakcja (9%) powyżej 30 μm (Ryc. 30).

Próba sporządzenia liposfer ze stearynianem bupiwakainy jako fazą lipidową zawiesiny

Ze względu na właściwości lipofilowe stearynianu bupiwakainy, podjęto próbę sporządzenia zawiesiny stearynianu bupiwakainy bez dodatkowego lipidu tworzącego matrycę (p. 3.6). Podczas sporządzania układu fazy wodna i lipidowa nie uległy dokładnemu zdyspergowaniu, natomiast po 30 min chłodzenia w temp. 4°C, nastąpił trwały ich rozdział. Również po wprowadzeniu namiaru kwasu stearynowego nie uzyskano zawiesiny liposfer o zadowalającej homogenności.

KONCENTRATY LIPOSFER

Otrzymywano skoncentrowane zawiesiny liposfer zawierające 50% lipidu mieszanego Precirol : Miglyol (4:1). Koncentraty sporządzano metodą opisaną w p. 4.1 (str. 63). Podczas chłodzenia układy żelowały do konsystencji półstałej.

Koncentraty przeznaczone są do podania po rozcieńczeniu. Badano wpływ sposobu mieszania podczas rozcieńczania na stopień rozproszenia cząstek liposfer w rozcieńczanych koncentratach. Układy mieszano ręcznie, z użyciem wytrząsarki Vortex, mieszadła szybkoobrotowego Ultra-Turrax, a także z wykorzystaniem ultradźwięków (p. 4.2).

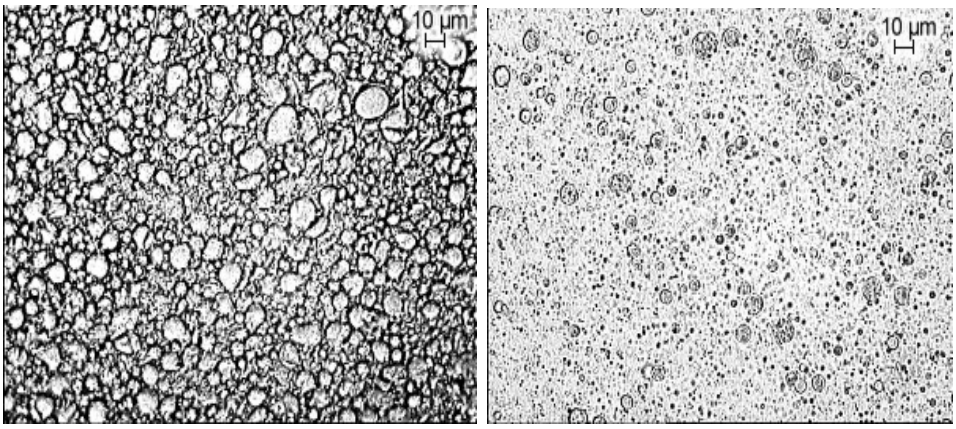
Podczas obserwacji mikroskopowych rozcieńczonych koncentratów mieszanych ręcznie zaobserwowano, że liposfery są połączone w większe aglomeraty

o rozmiarach powyżej 30 µm, natomiast pojedyncze cząstki posiadały wielkość ok. 10 µm. Wielkość cząstek liposfer, po zastosowaniu mieszania ręcznego oraz ultradźwięków, mierzono metodą dyfrakcji laserowej. Wyniki pomiarów przedstawia tabela 21. Średnia wielkość cząstek w koncentratach mieszanych ręcznie wynosiła ok. 20 µm, a wielkość ok. 54% cząstek mieściło się w zakresie wielkości 10 – 30 µm, tymczasem w wyniku mieszania za pomocą ultradźwięków 5 i 15 min, najwięcej cząstek liposfer mieściło się w zakresie wielkości 1 – 10 µm, odpowiednio: ok. 62 i 74%.

Dłuższe mieszanie, za pomocą wytrząsarki Vortex lub mieszadła szybkoobrotowego Ultra – Turrax, prowadzi do „rozrywania" cząstek z utratą ich kształtów kulistych. W efekcie liposfery są nieregularne i dochodzi do szybkiego gęstnienia i żelowania rozcieńczonego układu. Koncentraty nierozcieńczone i po rozcieńczeniu poddawano obserwacjom mikroskopowym. Obraz mikroskopowy koncentratu nierozcieńczonego i rozcieńczonego przedstawiono na ryc. 31. Na obrazie mikroskopowym koncentratu nierozcieńczonego widoczne są cząstki liposfer ciasno ułożone, natomiast po rozcieńczeniu układu można zaobserwować, że nastąpiło zdyspergowanie pojedynczych liposfer w wielokrotnej objętości użytej wody.

Tabela 21. Wpływ wyjaławiania i sposobu mieszania na wielkość cząstek liposfer w rozcieńczanych koncentratach (rozcieńczenie wodą 1:5)

Sposób mieszania	**d (0,5) (µm)**	**d (0,9) (µm)**	**Udział (%) cząstek w zakresie wielkości (µm)**			
			<1	**1 – 10**	**10 – 30**	**>30**
Koncentraty nie wyjałowione						
Ręcznie 2 min	20,85	43,68	1,0	15,1	53,9	30,0
sonikacja 5 min	1,29	3,19	34,0	61,9	2,2	1,9
sonikacja 15 min	1,42	3,16	24,5	73,4	1,6	0,5
Koncentraty wyjałowione						
Ręcznie 2 min	50,0	74,9	0,9	9,5	18,2	71,4
Vortex 2 min	43,1	73,8	1,0	12,6	22,8	63,6
sonikacja 5 min	45,7	74,2	0,9	11,2	21,0	66,9
sonikacja 15 min	34,4	71,7	1,5	18,4	24,6	55,5



a) b)

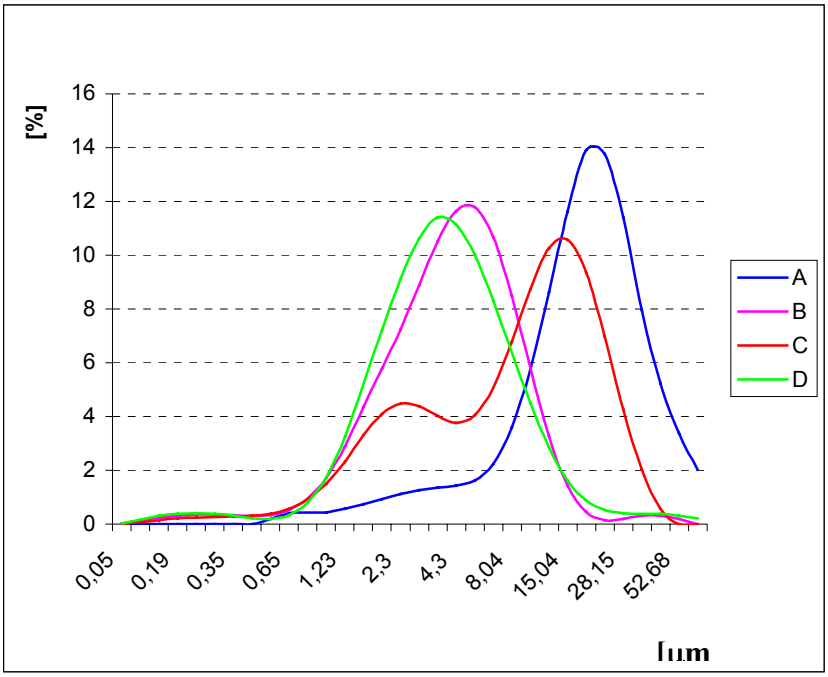
Ryc. 31. Koncentrat liposfer (50% lipidu): nierozcieńczony (a) i rozcieńczony wodą w stosunku 1:5 z sonikacją (b).

Wyjaławianie koncentratów liposfer

Koncentraty liposfer wyjaławiano zgodnie z opisem w p. 4.3. Koncentraty rozcieńczano wodą w stosunku 1:5, z użyciem różnego rodzaju mieszania: ręcznie (2 min), z użyciem wytrząsarki Vortex (2 min), stosując ultradźwięki (5 i 15 min). Badano wpływ etapu wyjaławiania na wielkość liposfer. Wyniki pomiarów wielkości cząstek liposfer koncentratów wyjałowionych przedstawiono w tabeli 21.

Zaobserwowano wpływ etapu wyjaławiania na wielkość cząstek liposfer w koncentracie. 90% cząstek, niezależnie od sposobu mieszania w trakcie rozcieńczania koncentratu wyjałowionego, miało średnicę do 75 µm. W układzie sonikowanym przez 15 min w zakresie wielkości powyżej 30 µm mieściło się ok. 55% cząstek. W porównaniu z koncentratami niewyjałowionymi, cząstki koncentratów wyjałowionych były większe. W układzie sonikowanym przez 15 min niejałowym, średnia wielkość cząstek wynosiła 1,4 µm, natomiast w rozcieńczonym w ten sam sposób układzie wyjałowionym wartość ta wzrosła do 34,4 µm.

Badano wpływ ekstruzji rozcieńczonych koncentratów przez igłę strzykawki na wielkość cząstek liposfer (p. 4.2). Rozkład wielkości cząstek koncentratu wyjałowionego lub niewyjałowionego po ekstruzji przez igłę przedstawiono na ryc. 32.



Ryc. 32. Rozkład wielkości cząstek koncentratu liposfer rozcieńczonego wodą w stosunku 1:5 (Vortex 1 min): koncentrat niewyjałowiony (A) po ekstruzji przez igłę 0,5 mm (B); koncentrat wyjałowiony (C) po ekstruzji przez igłę 0,4 mm (D).

Po wyjałowieniu układu 90% cząstek zawierało się w zakresie wielkości 0,5 - 26 µm. Ekstruzja uzyskanej wyjałowionej dyspersji liposfer przez igłę 0,4 mm pozwoliła na wyeliminowanie agregatów cząstek powstałych przy wyjaławianiu i w rezultacie 90% cząstek charakteryzowało się średnicą poniżej 11 µm.

Przeprowadzano badanie pH rozcieńczonego koncentratu liposfer. Wartość pH koncentratu liposfer bez substancji leczniczej, rozcieńczonego wodą w stosunku 1:5 wynosiła 5,49.

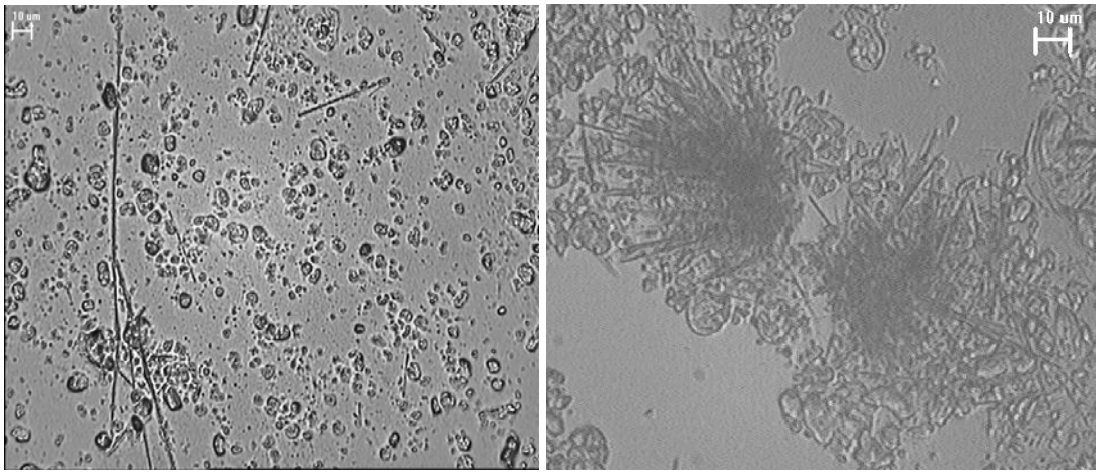
KONCENTRATY LIPOSFER Z BUPIWAKAINĄ LUB STEARYNIANEM BUPIWAKAINY

Skład sporządzonych koncentratów przedstawiono w tabeli 9 (str. 64). Zawierały one 50% (wag/wag) lipidu mieszanego Precirol i Miglyol (4:1). Do fazy lipidowej wprowadzano bupiwakainę w ilości 40 mg/g i 200 mg/g lipidu, a stearynianu bupiwakainy w ilości 80 mg/g lipidu, co w efekcie pozwalało na uzyskanie koncentratów zawierających bupiwakainę w stężeniu odpowiednio 2% i 10% (wag/wag), a stearynian bupiwakainy w stężeniu 4%, (2% w przeliczeniu na bupiwakainę).

Otrzymywane układy miały konsystencję półstałą oraz białą barwę i nie różniły się barwą, konsystencją oraz wielkością cząstek od układu nie zawierającego substancji leczniczej. Rozcieńczany z mieszaniem ręcznym koncentrat bez substancji leczniczej posiadał 90% cząstek o wielkości do 43,7 μm, przy wartości d (0,5) wynoszącej 20,9 μm, natomiast dla koncentratu z substancją leczniczą wielkości te wynosiły odpowiednio: 46,2 μm i 21,2 μm.

Koncentraty liposfer obserwowano pod mikroskopem zarówno w formie nierozcieńczonej, jak i po rozcieńczeniu, oceniając zjawisko krystalizacji substancji leczniczej. We wszystkich koncentratach nierozcieńczonych (KB 1, KB 2 i KB 3) podczas przechowywania przez 2 lata nie zauważono krystalizacji substancji leczniczej. W układach z bupiwakainą w formie zasady (KB 1 i KB 2), rozcieńczanych wodą w stosunku 1:5, już po sporządzeniu rozcieńczenia w obrazie mikroskopowym zaobserwowano kryształy substancji leczniczej. Nie zaobserwowano kryształów bezpośrednio po rozcieńczeniu w obrazie mikroskopowym rozcieńczonego koncentratu ze stearynianem bupiwakainy (KB 3). Natomiast kryształy pojawiły się po 2 dniach przechowywania (temp. 4°C). Wartość pH koncentratów rozcieńczonych wodą z bupiwakainą zasadą wynosiła odpowiednio: 8,5 i 8,4, natomiast ze stearynianem bupiwakainy 8,1.

Kryształy substancji leczniczej, które pojawiły się w obrazie mikroskopowym po rozcieńczeniu koncentratów (Ryc. 33), miały postać charakterystycznych igieł, które w zależności od stężenia substancji leczniczej występują pojedynczo lub tworzą skupiska (pęki, gwiazdki).



a) b)

Ryc. 33. Kryształy bupiwakainy w rozcieńczonym koncentracie liposfer: pojedyncze (a) i w skupiskach (b). Długość podziałki wynosi 10 μm.

W celu określenia stopnia inkorporacji substancji leczniczej w koncentratach liposfer, przeprowadzono badanie jej stężenia w fazie wodnej. Badano koncentraty rozcieńczone roztworem kwasu solnego o stężeniu 0,015 mol/l w stosunku 1:5, co pozwalało na uzyskanie pH zawiesiny 6,5 – 7,0. Było to konieczne dla rozpuszczenia ewentualnych kryształów bupiwakainy. Początkowo do uzyskania rozproszeń liposfer stosowano mieszanie ręczne w czasie 2 – 3 min. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 22.

Zastosowano również mieszanie bardziej energiczne rozcieńczonych koncentratów za pomocą ultradźwięków (15 min). Badaniom poddano układy KB 2 i KB 3 (Tabela 9). Koncentraty do badań przechowywano w formie nierozcieńczonej. Rozcieńczenia koncentratów sporządzano bezpośrednio przed badaniem. Bezpośrednio po sporządzeniu oraz podczas przechowywania oznaczano ilość bupiwakainy i stearynianu bupiwakainy w fazie wodnej koncentratów (Tabela 22).

Zaobserwowano zależność pomiędzy ilością inkorporowanej substancji leczniczej, a ilością oznaczaną w fazie wodnej. Przy inkorporacji 2% bupiwakainy (40 mg/g lipidu), w fazie wodnej układu KB 1 oznaczono 82,6% całkowitej dawki (zamykano więc w matrycy lipidowej bupiwakainę w ilości ok. 7 mg/g lipidu), natomiast przy zwiększaniu ilości wprowadzanej bupiwakainy do 200 mg/g lipidu (KB 2), oznaczana ilość substancji leczniczej w fazie wodnej ulegała zmniejszeniu. Wykrywano tylko 28,9% dawki, co oznaczałoby, że bupiwakaina ulegała zamykaniu w liposferach w ilości ok. 140 mg/g lipidu. Zwiększoną inkorporację stearynianu bupiwakainy do 44,5 mg/g lipidu sugerował również wynik jego oznaczenia w fazie wodnej układu KB 3.

Stwierdzono, że ilość substancji leczniczej oznaczanej w fazie wodnej podczas przechowywania koncentratu przez 1 miesiąc w temp. 4°C, nie zmienia się znacząco, nawet przy stężeniu 10% bupiwakainy (układ KB 2).

Na oznaczaną ilość substancji leczniczej w fazie wodnej miał jednak wpływ sposób wykonania rozcieńczenia koncentratu (Tabela 22). Porównując układ KB 2 rozcieńczony z mieszaniem ręcznym i z użyciem wytrząsarki Vortex, zaobserwowano zwiększenie ilości obecnej w fazie wodnej substancji przy intensywniejszym mieszaniu: z 28,9% do 93,2%. Całkowitą dawkę substancji leczniczej wykrywano też w fazie wodnej podczas sporządzania rozcieńczenia KB 2 i KB 3, gdy przy mieszaniu stosowano sonikację.

Tabela 22. Ilość bupiwakainy (% całkowitej dawki) oznaczona w fazie wodnej koncentratów przechowywanych w temp. 4°C – wpływ sposobu mieszania

Układ	Mieszanie ręczne 2 min			Vortex 5 min	Sonikacja 15 min
	t=0	1 dzień	8 dni	1 miesiąc	t=0
KB 1	82,6	-	95,4	-	-
KB 2	28,9	28,9	28,5	93,2	101,9
KB 3	44,4	53,3	41,9	-	113,8

ZAWIESINY I KONCENTRATY LIPOSFER Z INDOMETACYNĄ

W celu inkorporacji indometacyny w liposferach, przeprowadzono ocenę rozpuszczalności indometacyny w lipidach stałych i ich mieszaninach, zgodnie z metodyką opisaną w p. 6.1. Jako podstawowy lipid użyto Precirol oraz dodatkowo badano olej Miglyol i jego mieszaniny z wybranymi stałymi lipidami, a także parafinę płynną. Badanie przeprowadzono półilościowo wprowadzając indometacynę w ilości 0,1% - 10% w stosunku do masy lipidu. Wyniki przedstawia tabela 23.

W Precirolu, jako samodzielnym lipidzie, krystalizacja substancji leczniczej zachodziła już przy stężeniu 5%. Lepszą rozpuszczalność indometacyny uzyskano w mieszaninie Precirolu z alkoholem cetylowym lub alkoholem cetostearylowym. W Compritolu, zarówno w samodzielnym lipidzie, jak i w mieszaninie z Precirolem, indometacyna nie rozpuszczała się nawet w stężeniu 0,1%.

W Miglyolu indometacyna rozpuszczała po ogrzaniu, jednak już w stężeniu 0,1% krystalizowała po ochłodzeniu. Natomiast w parafinie płynnej nie rozpuszczała się w tym stężeniu również na gorąco. Mieszanina Precirolu z Miglyolem (4:1) zapewniała rozpuszczenie przy stężeniu indometacyny poniżej 0,5%.

Tabela 23. Rozpuszczalność (X) indometacyny w wybranych lipidach i ich mieszaninach

Lipidy	X (% wag/wag)
Precirol	**2,0<X<5,0**
Precirol : Miglyol (4:1)	**0,2<X<0,5**
Precirol : Miglyol (1:4)	X<0,1
Precirol : Alk. cetylowy (4:1)	X>10,0
Precirol : Alk. cetostearylowy (4:1)	X>10,0
Precirol : Miglyol : Alk. cetylowy (3:1:1)	0,5<X<1,0

Precirol : Miglyol : Alk. cetostearyl (3:1:1)	0,5<X<1,0
Precirol : Kwas stearynowy	2,0<X<5,0
Precirol : Compritol (4:1)	X<0,1
Precirol : Wosk pszczeli biały (4:1)	X<0,1
Miglyol	**X<0,1**
Compritol	X<0,1
Parafina płynna	X<0,1

Zawiesiny liposfer z indometacyną

Do sporządzenia zawiesin liposfer zawierających indometacynę w stężeniu 0,2% i 0,5% (20 i 50 mg/g lipidu) użyto różnego rodzaju matryc lipidowych, w których podstawowym lipidem był Precirol. Skład zawiesin liposfer z indometacyną (ZI 1 – ZI 10) przedstawiono w tabeli 10 (str. 66).

Bezpośrednio po sporządzeniu wszystkie układy były płynne. Podczas przechowywania konsystencja zawiesin ZI 2 i ZI 6 zmieniła się z płynnej na półstałą, natomiast zawiesiny ZI 4 - na półpłynną, a w układach ZI 3 i ZI 5 (0,5% indometacyny) na półstałą. W żadnym z badanych układów okiem nieuzbrojonym nie zaobserwowano krystalizacji substancji leczniczej.

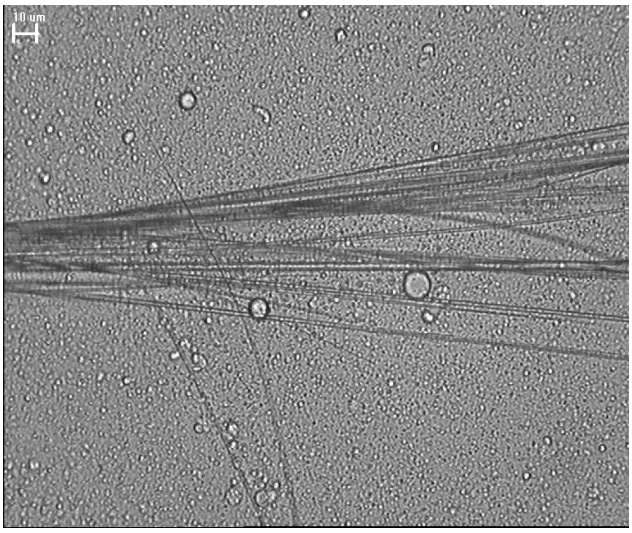
Wartość pH wszystkich zawiesin mieściła się w zakresie 4,5 – 5,5. Układy obserwowano pod mikroskopem. We wszystkich układach, gdzie indometacyna była wprowadzana w wyższym stężeniu tzn. 40 i 50 mg/g lipidu (układy ZI 3, ZI 5, ZI 8 i ZI 10), krystalizację substancji leczniczej zaobserwowano już po sporządzeniu. W tabeli 24 zamieszczono wyniki obserwacji mikroskopowych krystalizacji substancji leczniczej w układach z indometacyną w ilości 20 mg/g lipidu, bezpośrednio po sporządzeniu i po 7 dniach przechowywania w temp. 4°C. Charakterystyczne kryształy indometacyny obserwowane w tych zawiesinach liposfer - igły tworzące pęki - przedstawia ryc. 34.

Tabela 24. Obserwowana pod mikroskopem krystalizacja indometacyny w zawiesinach liposfer (zawartość indometacyny 20 mg/g lipidu)

Układ	**Skład matrycy lipidowej**	**Czas badania**	
		Po sporządzeniu	**Po 7 dniach**
ZI 1	Precirol	+	
ZI 2	Precirol : Kwas stearynowy (4:1)	+	
ZI 4	Precirol : Alkohol cetylowy (4:1)	+	
ZI 6	Precirol : Miglyol : Alkohol :	-	+

	cetostearylowy (3:1:1)		
ZI 7	Precirol : Miglyol (4:1)	-	+
ZI 9	Precirol : Miglyol (4:1)	-	-*

+ obecność kryształów indometacyny w fazie wodnej
- brak kryształów indometacyny w fazie wodnej
-* kryształy widoczne po 3 tygodniach



Ryc. 34. Obraz mikroskopowy zawiesiny liposfer z krystalizującą indometacyną (układ z Precirolem – ZI 1). Długość podziałki wynosi 10 µm.

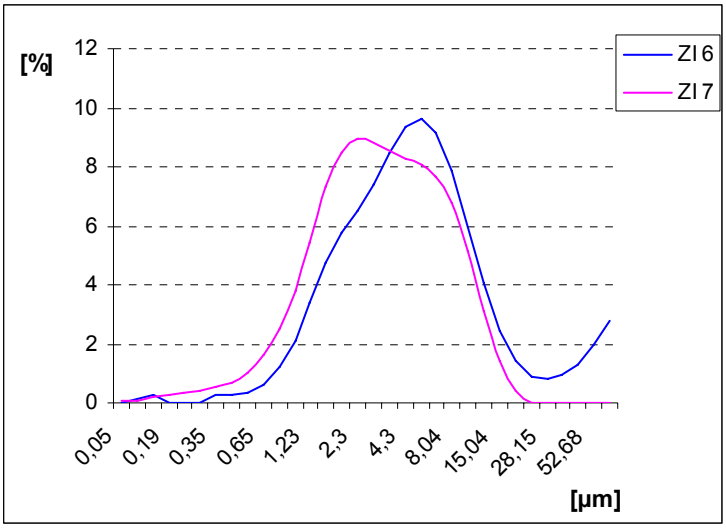
W badanych układach, zawierających indometacynę w stężeniu 0,2%, krystalizacja substancji leczniczej zachodziła w różnym czasie. Po sporządzeniu kryształy indometacyny w fazie wodnej zaobserwowano w układach z Precirolem jako samodzielnym lipidem (ZI 1), z mieszaniną Precirolu i kwasu stearynowego (ZI 2) oraz alkoholu cetylowego (ZI 4), natomiast po 7 dniach krystalizacja wystąpiła w zawiesinach liposfer ZI 6 i ZI 7.

Opóźnioną krystalizację substancji leczniczej zaobserwowano w zawiesinie liposfer ZI 9, zawierającej indometacynę w stężeniu 0,2% i poloksamer w fazie wodnej. Kryształy indometacyny zaobserwowano w obrazie mikroskopowym dopiero po 3 tygodniach przechowywania układu w temp. 4°C.

Pomimo opóźnionej krystalizacji indometacyny w układach ZI 9 oraz ZI 7 po ich sporządzeniu wykrywano w fazie wodnej odpowiednio 102,0% i 100,0% całkowitej dawki substancji leczniczej.

Aby zwiększyć inkorporację substancji leczniczej, sporządzano zawiesiny liposfer z indometacyną dodając do fazy lipidowej, złożonej z Precirolu i Miglyolu (4:1), indometacynę w postaci roztworu etanolowego (Układ ZI 8, Tabela 10). Bezpośrednio po sporządzeniu w obrazie mikroskopowym zawiesiny wykrywano kryształy indometacyny.

W układach, gdzie indometacyna nie wykrystalizowała bezpośrednio po sporządzeniu (ZI 6 i ZI 7), przeprowadzono pomiar wielkości cząstek liposfer metodą dyfrakcji laserowej. Wyniki pomiarów przedstawiono na ryc. 35.



Ryc. 35. Rozkład wielkości liposfer w zawiesinach ZI 6 (Precirol i Miglyol) i ZI 7 (Precirol, Miglyol i alkohol cetostearylowy), badanych po sporządzeniu.

Wprawdzie wartości d (0,5) dla obu układów nie różniły się znacznie (5,2 µm i 3,45 µm odpowiednio dla ZI 6 i ZI 7), to jednak w układzie ZI 6 dochodziło do aglomeracji cząstek i 9% cząstek wykrywano w zakresie wielkości powyżej 31 µm.

Koncentraty liposfer z indometacyną

Sporządzano koncentraty liposfer zawierające 50% lipidu oraz indometacynę w stężeniu 1%, 2% i 5% (p. 6.3, str. 67). Użyto Precirolu jako samodzielnego lipidu oraz jego mieszaniny z kwasem stearynowym, alkoholem cetylowym, alkoholem cetostearylowym oraz Miglyolem. Skład koncentratów liposfer z indometacyną przedstawiono w tabeli 11.

Otrzymane koncentraty miały konsystencję półstałą i białą barwę, niezależnie od stężenia indometacyny.

Układy nierozcieńczone i po rozcieńczeniu wodą obserwowano pod mikroskopem po 24 h po sporządzeniu oraz po 7 dniach przechowywania w temp. 4°C. Wyniki obserwacji koncentratów (indometacyna w stężeniu 1%) nierozcieńczonych i po rozcieńczeniu wodą przedstawiono w tabeli 25.

Bezpośrednio po sporządzeniu w koncentracie nierozcieńczonym, na bazie Precirolu (KI 1), zaobserwowano kryształy indometacyny, natomiast w układach z lipidem mieszanym Precirol z kwasem stearynowym (KI 2) oraz z Miglyolem i alkoholem cetostearylowym (KI 5) kryształy substancji leczniczej pojawiły się podczas przechowywania, odpowiednio po 4 i 7 dniach. W nierozcieńczonych układach KI 4 i KI 6 krystalizacji nie zaobserwowano. W koncentracie KI 7, zawierającym indometacynę w stężeniu 5%, obecne były cząstki nierozpuszczonej substancji leczniczej – w postaci płytek, a nie igieł. W układzie KI 3 nierozcieńczonym (indometacyna 2%) również zaobserwowano kryształy indometacyny.

Koncentraty rozcieńczano wodą w stosunku 1:5, mieszając ręcznie przez 2 min lub bardziej intensywnie z użyciem wytrząsarki Vortex przez 3 min (p. 4.2, str. 63).

W obrazie mikroskopowym rozcieńczonych koncentratów mieszanych ręcznie kryształy indometacyny zaobserwowano w układzie z Precirolem (KI 1) oraz jego mieszaniną z Miglyolem i alkoholem cetostearylowym (KI 5), natomiast w pozostałych układach kryształy pojawiły się po 7 dniach. Przy zastosowaniu bardziej intensywnego mieszania (Vortex) kryształy indometacyny zaobserwowano po 24 h w fazie wodnej wszystkich rozcieńczonych koncentratów.

Tabela 25. Krystalizacja indometacyny w koncentratach liposfer (substancja w stężeniu 1%): wyniki obserwacji mikroskopowych w trakcie przechowywania w temp. 4°C

Układ	**Skład matrycy lipidowej**	**Koncentraty nierozcieńczone**		**Koncentraty rozcieńczone wodą 1:5**			
				Mieszanie ręczne		**Vortex**	
		24 h	7 dni	24 h	7 dni	24 h	7 dni
KI 1	Precirol	+		+		n.b.	n.b.
KI 2	Precirol:kwas stearynowy (4:1)	-	+	-	+	+	
KI 4	Precirol:alkohol cetylowy (4:1)	-	-	-	+	+	
KI 5	Precirol:Miglyol:alkohol cetostearylowy (3:1:1)	-	+	+		+	
KI 6	Precirol : Miglyol (4:1)	-	-	-	+	+	

+ obecność kryształów indometacyny w fazie wodnej
- brak kryształów indometacyny w fazie wodnej

n.b. nie badano

Oznaczano stężenie substancji leczniczej w fazie wodnej koncentratu liposfer KI 6 zawierającego indometacynę w stężeniu 1%. Aby rozpuścić ewentualne kryształy substancji leczniczej, koncentrat rozcieńczano 60% metanolem (p. 10.2). Wyniki oznaczeń stężenia substancji leczniczej przedstawiono w tabeli 26.

Również w tym przypadku zastosowano do uzyskania dyspersji liposfer różny sposób mieszania: ręczne i sonikację. Stwierdzono, że przy użyciu ultradźwięków oraz dodatkowo 60% metanolu, wykrywano całkowitą dawkę indometacyny w fazie wodnej układu.

Tabela 26. Ilość indometacyny (% całkowitej dawki), oznaczona w fazie wodnej rozcieńczonego koncentratu liposfer

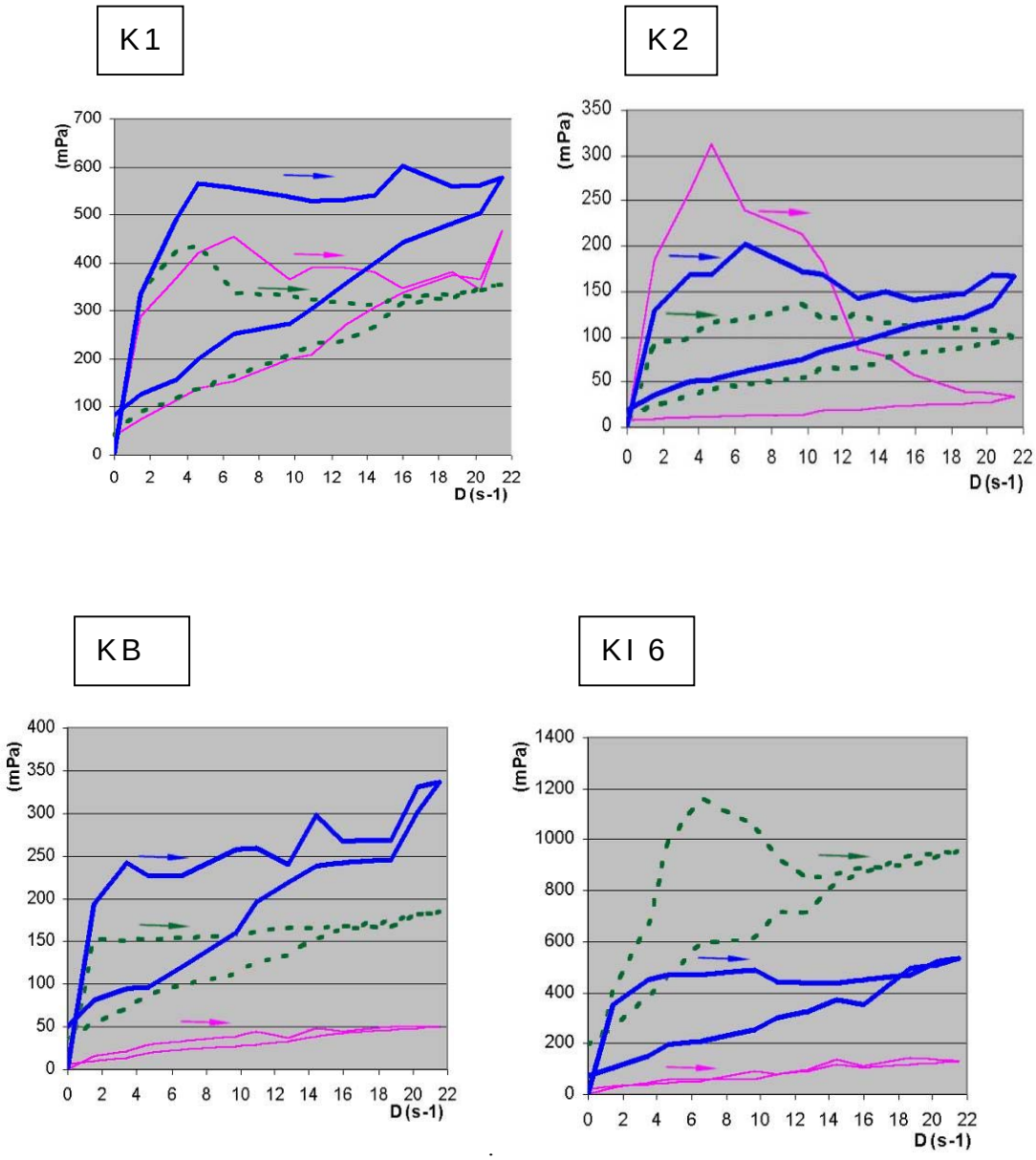
Układ	Płyn do rozcieńczenia	Sposób mieszania	Ilość substancji leczniczej w fazie wodnej
KI 6	Woda	ręcznie 3 min	60,9
KI 6	Woda	ultradźwięki 15 min	75,8
KI 6	60% metanol	ultradźwięki 15 min	97,5

BADANIA REOLOGICZNE KONCENTRATÓW LIPOSFER

Koncentraty liposfer poddano badaniom reologicznym. Skład badanych liposfer przedstawiono w tabeli 12. Zawierały one bupiwakainę lub indometacynę w stężeniu odpowiednio: 0,5% i 1% (wag/wag) oraz polisorbat 80 w stężeniu 2%. Ponadto porównywano koncentraty bez substancji leczniczej, zawierające 2% lub 10% polisorbatu.

Badania przeprowadzano po sporządzeniu oraz podczas przechowywania koncentratów przez 28 dni w temperaturze pokojowej i 4°C. Badania wykonano posługując się reometrem z układem pomiarowym płytka - płytka (str. 69).

Na ryc. 36 przedstawiono reogramy badanych koncentratów wyznaczone po sporządzeniu i po 28 dniach przechowywania. Krzywe reprezentują wartości średnie z 3 pomiarów. Wartość odchyleń nie przekraczała 2 - 5%. Na pojedynczy reogram składa się krzywa wstępująca i zstępująca. Krzywe wstępujące oznaczono strzałką (→).



Ryc. 36. Krzywe płynięcia koncentratu bez substancji leczniczej zawierającego: 2% (K1) lub 10% (K2) polisorbatu i koncentratów zawierających bupiwakainę (KB 4) iindometacynę (KI 6): po wykonaniu układu (t=0) ~~oraz~~ po 28 dniach przechowywania w temperaturze pokojowej ---- lub w temp. 4°C ——.
(D - szybkość ścinania, mPa – wartości naprężenia ścinającego).

Przy zastosowaniu programu komputerowego MathBook+ (wersja 2.6) obliczono pola powierzchni pętli histerezy (powierzchnia zawierająca się pomiędzy krzywą płynięcia wstępująca i zstępującą) dla wszystkich badanych koncentratów. Wyniki pomiarów przedstawia tabela 27.

Tabela 27. Pola powierzchni pętli histerezy (mPa x s^{-1}) koncentratów po sporządzeniu (t=0) oraz po 28 dniach przechowywania w temperaturze pokojowej (20°C) i temp. 4°C

Układ	**t=0**	**t=28 dni**	
		20°C	**4°C**
K1	2889,5	2451,3	4194,3
K2	2735,1	1065,4	1540,8
KB 4	135,8	745,2	1443,4
KI 6	-167,5	4379,0	3143,2

Badając krzywe płynięcia koncentratów po wykonaniu stwierdzono, że największą pętlą histerezy charakteryzowały się układy nie zawierające substancji leczniczej K1 i K2 i nie stwierdzono istotnej różnicy powierzchni pętli histerezy w związku ze wzrostem stężenia polisorbatu z 2% do 10%. W koncentracie zawierającym 10% polisorbatu mierzone naprężenia ścinające zarówno dla krzywej wstępującej, jak i zstępującej były małe, co świadczy o małym uporządkowaniu struktury wewnętrznej.

Zaobserwowano wpływ obecności substancji leczniczej na wielkość pętli histerezy. W układzie KB 4 z bupiwakainą, po sporządzeniu, pętla histerezy była ok. 20 razy mniejsza w porównaniu do układu K1 bez substancji leczniczej, natomiast w układzie KI 6 z indometacyną pętli histerezy nie obserwowano.

Podczas przechowywania w czasie 28 dni we wszystkich układach obserwowano zmianę przebiegu reogramów, choć niekoniecznie ze zmianą powierzchni pętli histerezy. W przypadku koncentratu K1 przechowywanego w temp. 4°C nastąpił wzrost powierzchni pętli histerezy (1,5 razy). Taki efekt zaobserwowano także w przypadku koncentratu zawierającego substancję leczniczą: dla układu KB 4 powierzchnia pętli uległa zwiększeniu ok. 10 razy, a w układzie KI 6 podczas przechowywania nastąpiło pojawienie się pętli histerezy. W koncentratach bez substancji leczniczej, przechowywanych w temperaturze pokojowej, nie dochodziło do zwiększenia powierzchni pętli histerezy, a nawet następowało jej zmniejszenie.

Istotny wpływ temperatury przechowywania na właściwości reologiczne zaobserwowano w układzie K1, dla którego po 28 dniach wyznaczona powierzchnia pętli histerezy była znacznie większa, gdy układ przechowywano w temp. 4°C, niż gdy przechowywano go w temperaturze pokojowej.

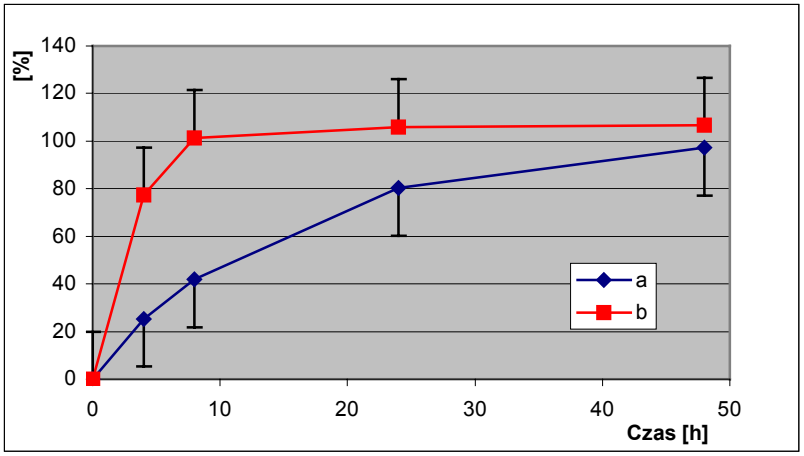
SZYBKOŚĆ UWALNIANIA INDOMETACYNY Z KONCENTRATÓW LIPOSFER

Metodą opisaną w p. 9 badano szybkość uwalniania indometacyny z koncentratu KI 6 nierozcieńczonego (Tabela 11, indometacyna w stężeniu 20 mg/g lipidu) i po rozcieńczeniu wodą w stosunku 1:5.

Ilość indometacyny oznaczaną w płynie akceptorowym wyrażano jako % całkowitej dawki. Uzyskane krzywe obrazujące szybkość uwalniania indometacyny z badanych układów przedstawiono na ryc. 37.

Uwalnianie indometacyny z nierozcieńczonego koncentratu przebiegało w sposób spowolniony, przy czym szybkość uwalniania ulegała zmniejszeniu w czasie. Po 8 h w płynie akceptorowym oznaczono ok. 40% całkowitej dawki substancji leczniczej, natomiast ponad 80% uległo uwolnieniu w czasie 48 h. W badaniu profilu uwalniania indometacyny z koncentratu rozcieńczonego zaobserwowano gwałtowne uwolnienie substancji leczniczej w czasie do 4 h (ok. 80%), a całkowite uwolnienie nastąpiło po 8 h.

Układy pobrane z worka dializacyjnego po 48 h poddano badaniu mikroskopowemu i nie wykryto w nich kryształów indometacyny.



Ryc. 37. Szybkość uwalniania indometacyny z koncentratu nierozcieńczonego (a) i koncentratu rozcieńczonego (b).

BADANIA HISTOLOGICZNE TKANKI MIĘŚNIOWEJ PO WSTRZYKNIĘCIU ZAWIESINY NANOSFER I MIKROSFER LIPIDOWYCH

Prowadzono badanie histologiczne tkanki mięśniowej po 3-krotnym wstrzyknięciu domięśniowym zawiesin liposfer w odstępach co 3 dni.

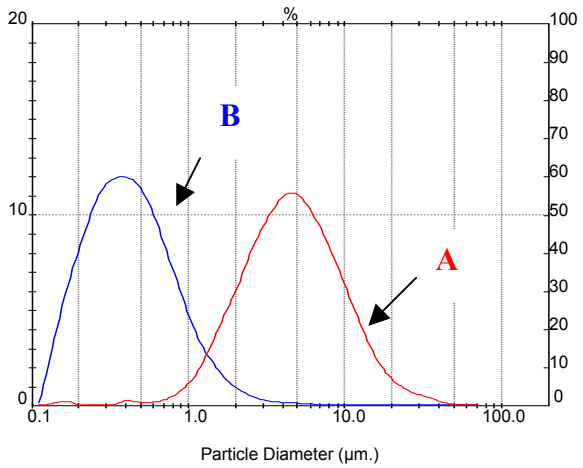
Przed podaniem preparatów zwierzętom badano wielkość liposfer oraz wartość pH i ciśnienia osmotycznego.

Wyniki zawarte w tabeli 28 wskazują, że podawane zawiesiny liposfer były izotoniczne, a ich odczyn był lekko kwaśny, ponieważ nie korygowano pH układów i podczas wyjaławiania dochodziło do częściowej hydrolizy lipidów [99].

Tabela 28. Wartości pH i ciśnienia osmotycznego preparatów podawanych zwierzętom

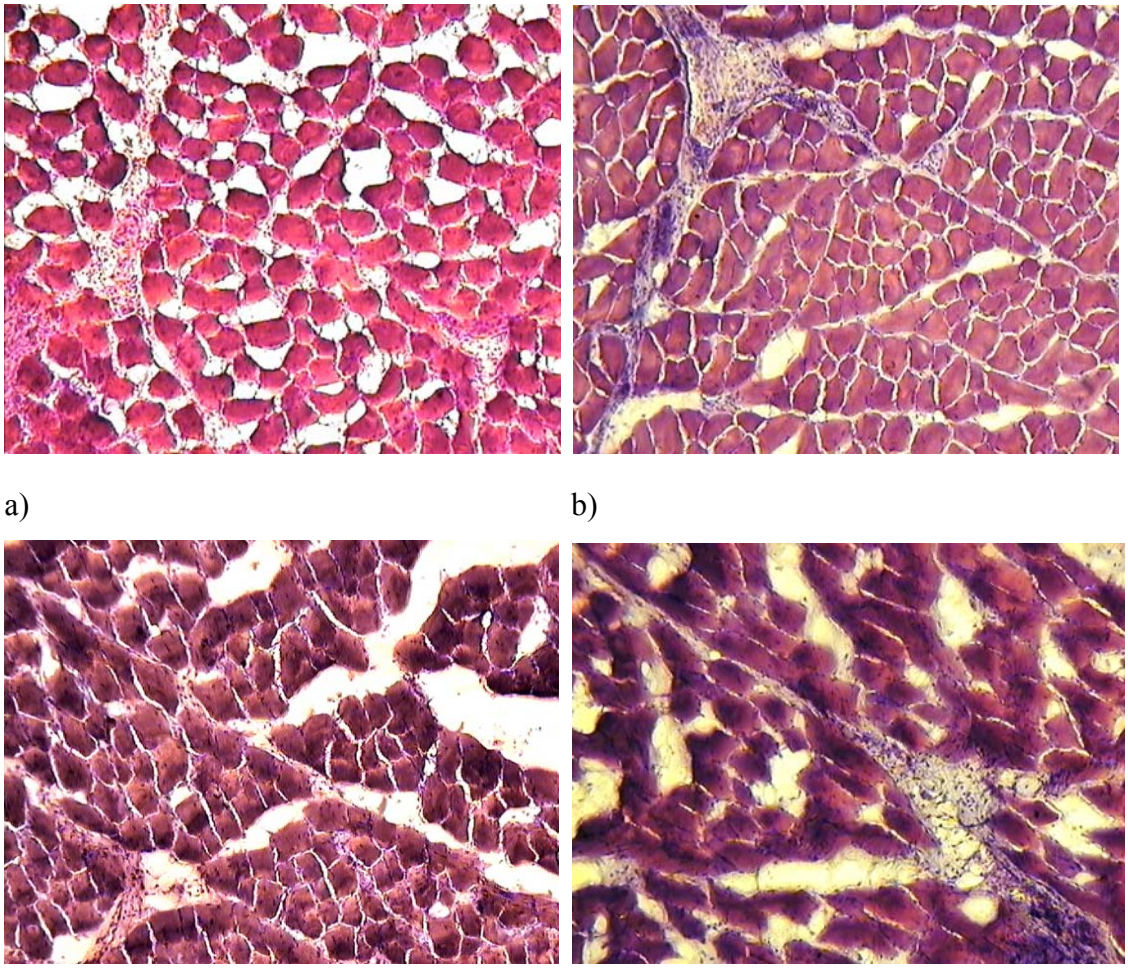
	Wartość pH	Ciśnienie osmotyczne (mOsm/kg)
Zawiesina mikrosfer lipidowych	4,65	309
Zawiesina nanosfer lipidowych	4,96	303
Roztwór polisorbatu	5,6	274

Na ryc. 38 zobrazowano wielkość cząstek w zawiesinach liposfer. Wyniki dowodzą, że zwierzętom podano, tak jak założono, liposfery w postaci nanosfer i mikrosfer. Wielkość 90% cząstek mikrosfer lipidowych, mierzona po ekstruzji przez igłę mieściła się poniżej 11,8 μm, a wielkość d (0,5) wynosiła 4,55 μm, natomiast wartości d (0,9) i d (0,5) nanosfer lipidowych wynosiły odpowiednio: 1,03 μm i 0,41 μm.



Ryc. 38. Rozkład wielkości cząstek zawiesin mikrosfer (A) i nanosfer (B) lipidowych przeznaczonych do podania zwierzętom.

Na ryc. 39 Przedstawiono obrazy wybarwionych tkanek mięśniowych uzyskanych z mięśnia po podaniu mikrosfer lipidowych, nanosfer lipidowych oraz roztworu izotonicznego polisorbatu, a także wybarwioną tkankę kontrolną.



Ryc. 39. Obraz mikroskopowy (powiększenie 10x) tkanki mięśniowej po podaniu: mikrosfer lipidowych (a), nanosfer lipidowych (b), roztworu polisorbatu (c) oraz tkanka kontrolna (d).

Po iniekcji nanosfer lipidowych, mikrosfer lipidowych i izotonicznego roztworu polisorbatu w tkankach mięśniowych nie stwierdzono zmian patologicznych. Nie zaobserwowano także rozrostu tkanki. W porównaniu z tkanką kontrolną, nie wykazano

istotnych różnic w obserwowanych preparatach histologicznych. W miejscu podania liposfer (zarówno nanosfer jak i mikrosfer) nie zaobserwowano pozostałości cząstek lipidowych.

V. DYSKUSJA WYNIKÓW

Prace dotyczące technologii mikrosfer lipidowych są nieliczne i nie wskazuje się standardowej metody ich sporządzania. Założono, że dla celów niniejszej pracy zawiesiny mikrosfer lipidowych będą sporządzane metodą emulgowania fazy lipidowej w fazie wodnej na gorąco, w temperaturze przewyższającej temperaturę topnienia lipidu. W fazie wodnej rozpuszczano emulgator. Chłodzenie powstałej emulsji prowadzi do krzepnięcia lipidu i otrzymania zawiesiny lipidowych cząstek stałych stabilizowanej użytym emulgatorem. Opisany w literaturze naukowej i patentach proces sporządzania nanosfer lipidowych obejmuje etap homogenizacji wysokociśnieniowej [1]. Aby uzyskać cząstki większe, w formie mikrosfer, pominięto ten etap wytwarzania. Natomiast emulgowanie prowadzono z wykorzystaniem mieszadła wysokoobrotowego.

Jako lipidu podstawowego tworzącego matrycę liposfer użyto palmitostearynianu glicerolu występującego pod nazwą handlową Precirol. Według deklaracji producenta jest to mieszanina mono-, di- i triglicerydów ze znacznym udziałem diglicerydów. W pierwszym etapie badań sporządzano zawiesiny liposfer zawierające 10% fazy lipidowej.

Prowadzono szereg doświadczeń wstępnych w celu ustalenia parametrów technologicznych procesu: szybkości i czasu mieszania, temperatury emulgowania, szybkości chłodzenia, tak by otrzymać liposfery o wielkości kilku-kilkudziesięciu mikrometrów w postaci stabilnej płynnej zawiesiny w fazie wodnej. Oceniano również możliwość zastosowania dodatkowego etapu – homogenizacji układu z użyciem ultradźwięków.

Mikrosfery lipidowe przeznaczone byłyby do wstrzykiwań podskórnych, domięśniowych, jak również mogłyby być wykorzystane w lekach do oczu lub do podania dopochwowego czy doodbytniczego. W lekach do wstrzykiwań dopuszcza się, by cząstki zawieszone miały wielkość do 30 μm, a nawet więcej, jeżeli jest to uzasadnione farmakokinetyką substancji leczniczej. W toku prowadzonych badań uzyskiwano liposfery o wielkości 1-20 μm i tę wielkość uznawano za odpowiednią.

Stosując Precirol jako samodzielny lipid tworzący matrycę liposfer ustalono optymalne warunki sporządzania układów: emulgowanie faz powinno odbywać się w temp. 80ºC, a czas emulgowania z użyciem mieszadła szybkoobrotowego nie powinien przekraczać 5 min. Niższa temperatura emulgowania (65ºC) prowadziła zazwyczaj do powstania liposfer większych (ryc. 20, Tabela 14), natomiast przedłużenie mieszania do 10 min wiązało się ze zbyt dużym napowietrzeniem układu i skutkować to mogło niestabilnością zawiesiny liposfer (żelowaniem). Następujące odpowietrzanie układu nie zwiększało jego stabilności fizycznej.

Wbrew przewidywaniom nie stwierdzono istotnego wpływu szybkości chłodzenia liposfer, a więc szybkości krystalizacji lipidu, na właściwości fizyczne otrzymywanych

zawiesin Z1-Z4 (str. 79-82). Zostało to potwierdzone w późniejszych badaniach z udziałem substancji leczniczych. Ostatecznie za regułę przyjęto chłodzenie powolne w temperaturze pokojowej, bez mieszania.

Dużo uwagi poświęcono ustaleniu, czy korzystne dla właściwości liposfer jest zastosowanie po mieszaniu mieszadłem szybkoobrotowym dodatkowo etapu sonikacji. Pod wpływem sonikacji, tak jak przewidywano, powstawały liposfery o mniejszych rozmiarach – w dużej części były to cząstki, które mogły być klasyfikowane jako nanosfery lipidowe (Tabela 14, Tabela 17). W zależności od składu zawiesiny liposfer, w czasie procesu sonikacji dochodziło często do destabilizacji układu objawiającej się zwiększeniem wielkości cząstek, szybkim żelowaniem lub rozdziałem faz (Tabela 14). Z drugiej jednak strony zawiesiny liposfer Z12 (Precirol i Miglyol) wykazywały większą trwałość fizyczną, w porównaniu z zawiesinami liposfer sporządzanych bez etapu sonikacji, w których dochodziło szybciej do aglomeracji cząstek podczas przechowywania (Tabela 16). Ostatecznie liposfery z substancją leczniczą sporządzano bez etapu sonikacji.

Podstawowym czynnikiem decydującym jednak o trwałości fizycznej zawiesiny liposfer zbudowanych z danego lipidu jest rodzaj emulgatora, co udowodniono wprowadzając do liposfer z Precirolem różne emulgatory: polisorbat 80, lecytynę jajową, poloksamer, Span 40 (Tabela 4). Na podstawie krótkoterminowych (do 7 dni) badań trwałości (Ryc. 20) jako najbardziej stabilne wytypowano zawiesiny liposfer zawierające 3% polisorbatu (Z9, po sonikacji) lub co najmniej 2% polisorbatu w mieszaninie z poloksamerem lub lecytyną jajową (Z2, Z4). Niestety we wszystkich tych układach dochodziło w czasie dłuższego przechowywania (1-2 miesiące) do żelowania. W obrazie mikroskopowym już wcześniej obserwowano „łańcuchowe" sieciowanie cząstek liposfer (Ryc. 22), co ostatecznie prowadziło do budowania struktury żelu.

Zjawisko żelowania opisane w zawiesinach nanosfer lipidowych (str. 19-22) stanowi więc również problem w zawiesinach mikrosfer lipidowych, jest więc niezależne od wielkości cząstek lipidowych. Prowadzone były, nieopisane w niniejszej pracy, doświadczenia polegające na rozdziale metodą ultrawirowania liposfer na poszczególne frakcje pod względem wielkości w celu ustalenia, czy żelowanie następuje z powodu obecności w układzie nanosfer lipidowych. Nie potwierdzono tej hipotezy, ponieważ żelowaniu ulegały również układy w dużej części pozbawione frakcji nanosfer lipidowych. Ostatecznie nie zaobserwowano korelacji pomiędzy wielkością cząstek a szybkością żelowania. Westesen i Siekmann [53] wykazali, że użycie fosfolipidów prowadzi do żelowania SLN, lecz zjawisko to można wyeliminować stosując dodatek emulgatora pomocniczego. Takiego efektu nie uzyskano jednak w przypadku zbudowanych z Precirolu mikrosfer lipidowych łącząc w układach Z1, Z4, Z6

i Z7 lecytynę jajową z polisorbatem, chociaż układy te były trwalsze niż zawiesina Z5 stabilizowana wyłącznie lecytyną (Tabela 15).

Uznając, że niesatysfakcjonująca stabilność fizyczna zawiesin mikrosfer lipidowych może być związana z typem lipidu sporządzano liposfery z lipidu mieszanego: Precirolu z alkoholem cetylowym lub Miglyolem. Dodatek stałego lipidu nie zapobiegał aglomeracji liposfer objawiającej się żelowaniem układu, natomiast płynne zawiesiny nie żelujące nawet w czasie 2 lat uzyskiwano wprowadzając do matrycy liposfer 20% ciekłych triglicerydów w postaci Miglyolu. W ten sposób uzyskiwano, przez analogię do NLC (str. 40) nanostrukturalne mikrosfery lipidowe. Miglyol jest półsyntetycznym olejem farmaceutycznym posiadającym monografię farmakopealną (Ph. Eur.), złożonym z triglicerydów nienasyconych kwasów tłuszczowych o średnio długich łańcuchach węglowych (C8-C12) i jest akceptowany w podaniu pozajelitowym. Wybór stosunku ilościowego Precirolu i Miglyolu oparto na doniesieniach z piśmiennictwa [20, 90, 93].

Satysfakcjonującą stabilność zawiesiny liposfer osiągnięto używając polisorbatu w stężeniu 2%. Jednak nie było możliwe otrzymanie zawiesiny zawierającej to samo stężenie emulgatora ze wzrastającym stężeniem fazy lipidowej do 20%, gdyż zawiesiny ulegały żelowaniu w czasie 24 h [100].

Konsystencja zawiesin liposfer zbudowanych z Precirolu i Miglyolu pozostawała płynna pomimo stosunkowo szybkiej aglomeracji cząstek, co wykazano badaniem z użyciem dyfraktometru laserowego (Tabela 16). Początkowo zmianę wielkości cząstek obserwowaną w obrazie układów uzyskiwanym metodą dyfrakcji laserowej wiązano ze wzrostem wielkości pojedynczych cząstek lipidowych. Jednak badania mikroskopowe wskazywały tylko na nieliczne pojedyncze cząstki o wielkości kilkudziesięciu mikrometrów. Uznano więc, że wzrost wielkości cząstek w układach przechowywanych oznaczany metodą dyfrakcji laserowej obrazuje proces aglomeracji. Aglomeracja cząstek następowała wolniej, gdy stosując etap sonikacji tworzono w układzie znaczną frakcję nanosfer lipidowych (Tabela 16). Badania mikroskopowe i instrumentalne wykazały, że aglomeraty cząstek lipidowych są likwidowane podczas ekstruzji układów przez igłę strzykawki (Ryc. 25 i 32).

Zjawisku aglomeracji cząstek liposfer próbowano zapobiec wprowadzając do układów polimery hydrofilowe zwiększające lepkość fazy rozpraszającej. Wykryto, że w czasie 1 miesiąca nie dochodzi do aglomeracji cząstek lipidowych, jeżeli dodawano do fazy wodnej 1% karmelozy sodowej lub 0,5% hydroksyetylocelulozy (Ryc. 26). Należy jednak zwrócić uwagę, że układy sporządzane z dodatkiem tych polimerów, zawierały zwykle liposfery o rozmiarach większych niż układy bez substancji zwiększających lepkość lub tylko z małym ich dodatkiem (Tabela 17). Nieprzydatnym polimerem dla

stabilizacji liposfer otrzymywanych bez etapu sonikacji okazał się karbomer, gdyż w jego obecności następowało żelowanie układu (str. 90).

W przeciwieństwie do korzystnego wpływu polimerów hydrofilowych na stabilność układów nie wyjaławianych, nie zaobserwowano takiego efektu w zawiesinach liposfer wyjaławianych w autoklawie (Ryc. 27). W układzie z hydroksyetylocelulozą, niezależnie od jej stężenia dochodziło do znacznego zwiększenia wielkości liposfer po etapie wyjaławiania. W układzie Z12 (poddawany sonikacji), bez polimeru hydrofilowego nie obserwowano istotnej zmiany wielkości cząstek liposfer, chociaż podczas przechowywania tego układu dochodziło do aglomeracji liposfer szybciej niż w układzie nie podawanym wyjaławianiu (Tabela 16). Proces wyjaławiania termicznego nie prowadził do żelowania liposfer z matrycą Precirol : Miglyol.

Podsumowując część badań poświęconą technologii mikrosfer lipidowych i ich stabilności należy stwierdzić, że nie udało się uzyskać trwałych fizycznie układów z Precirolem jako samodzielnym lipidem, pomimo stosowania różnych emulgatorów i sposobów sporządzania zawiesin liposfer. Warunkiem uzyskania układów płynnych w czasie długotrwałego przechowywania było zastosowanie matrycy lipidowej z Precirolu z dodatkiem Miglyolu. Takie liposfery, stabilizowane polisorbatem 80 (2%), można wyjaławiać termicznie i stanowią one potencjalnie preparaty, które mogą być podawane pozajelitowo pomimo obserwowanej aglomeracji cząstek podczas przechowywania, ponieważ aglomeraty są likwidowane w czasie wstrzykiwania z użyciem strzykawki z odpowiednio cienką igłą.

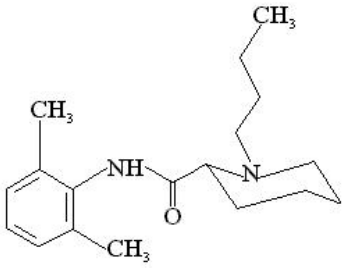
Kolejny etap pracy poświęcono możliwości zastosowania mikrosfer lipidowych w zawiesinach jako nośników substancji leczniczych.

Jako modelowe lipofilowe substancje lecznicze wybrano bupiwakainę i indometacynę. Wszystkie układy sporządzano stosując w roli emulgatora polisorbat 80 w stężeniu 2% oraz glicerol jako środek doprowadzający do izotonii.

W obecności użytych substancji leczniczych stabilność fizyczna zawiesin liposfer nie ulegała istotnej zmianie. Na przykład zawiesiny liposfer z bupiwakainą na bazie Precirolu z Miglyolem pozostawały płynne przez co najmniej 6 miesięcy. W zawiesinach liposfer zawierających substancje lecznicze cząstki liposfer pozostawały kuliste, a ich wielkość była zbliżona do obserwowanej w układach podstawowych (str. 99, 109).

Bupiwakaina (wzór poniżej) jest substancją leczniczą miejscowo znieczulającą o budowie amidowej (pochodna ksylidyny). Jest słabą zasadą o stałej dysocjacji pK_a

8,1, łatwo tworzy rozpuszczalne w wodzie sole (np. chlorowodorek bupiwakainy). Charakteryzuje się zdolnością wywoływania długotrwałego znieczulenia ($t_{0,5}$ 3,5 h). Długi czas działania bupiwakainy jest wynikiem zarówno jej lipofilności jak i silnego wiązania z białkami osocza (95%) [101].



Bupiwakaina

1-butylo[(2,6-dimetylofenylo)-1-karbamoilo] piperydyna

Ponieważ bupiwakaina zasada charakteryzuje się jedynie umiarkowaną lipofilnością (log P 1,60), użyto w badaniach również bardziej lipofilową jej pochodną – stearynian bupiwakainy. Stearynian bupiwakainy otrzymywano metodą stapiania [79, 80] zasady bupiwakainy z kwasem stearynowym w stosunku 1:1. Termogram DSC (ryc. 28) wykazał, że otrzymano związek o właściwościach termodynamicznych odmiennych od charakteryzujących substancje wyjściowe. Potwierdzono w ten sposób, że nastąpiła reakcja kwasu stearynowego z bupiwakainą. Nie prowadzono dalszych badań identyfikacyjnych otrzymanego stearynianu bupiwakainy, uznając, że termogram DSC, a także zwiększona rozpuszczalność substancji w lipidach, a mniejsza w wodzie (str. 96) uzasadniają użycie tej substancji do dalszych badań jako modelowej substancji o zwiększonej lipofilności. Należy dodać, że metodą współwytrącania z etanolem uzyskano substancję wykazującą taki sam przebieg termogramu DSC (nie przedstawiony w pracy), co stanowiło dodatkowy dowód, że otrzymano zamierzony produkt reakcji.

W porównaniu z innymi lipidami stałymi Precirol zapewniał największą rozpuszczalność bupiwakainy zasady (Tabela 19). Rozpuszczalność w tym lipidzie wynosząca ponad 200 mg/g powinna teoretycznie umożliwiać uzyskanie zawiesiny liposfer i koncentratu o stężeniu bupiwakainy odpowiednio 2% i 10%. Rozpuszczalność stearynianu bupiwakainy w Precirolu była również duża i przekraczała 250 mg/g.

Pomimo odpowiedniej rozpuszczalności tych substancji w Precirolu nie powiodła się próba ich inkorporacji w liposferach zbudowanych z tego lipidu. W

zawiesinie liposfer zawierającej 10% lipidu i 1% bupiwakainy w formie zasady krystalizacja była widoczna natychmiast po ochłodzeniu liposfer, a w liposferach zawierających 0,25% lub 0,5% bupiwakainy – w ciągu 24 h (Tabela 20). Zawiesiny te również żelowały w czasie 24 h.

Obserwowana krystalizacja bupiwakainy (Ryc. 29), pomimo jej dostatecznej rozpuszczalności w lipidzie oraz korzystnego współczynnika podziału lipid/woda (str. 94), to wynik wykluczania substancji leczniczej z matrycy stałego lipidu podczas jego krystalizacji na etapie chłodzenia. Zjawisko to omówiono w części teoretycznej pracy (str. 27-29). Intensywne wykluczanie bupiwakainy z jej krystalizacją w fazie wodnej obserwowali również Toongsuwan i wsp. [55] tworząc liposfery o większych rozmiarach (50 μm) zbudowane z różnych triglicerydów nasyconych kwasów tłuszczowych.

W celu zwiększenia zdolności matrycy lipidowej do zamykania bupiwakainy wykorzystano najnowszą koncepcję zaburzania jej krystalicznej struktury poprzez wprowadzanie płynnego lipidu (str. 40). Tworzono więc matryce lipidowe zawierające mieszaninę Precirolu z Miglyolem 4:1. Badania te uznano tym bardziej za celowe, że wcześniej wykazano większą trwałość fizyczną tych układów (str. 121).

Rozpuszczalność bupiwakainy w Miglyolu jest ponad 2-3-krotnie mniejsza niż w Precirolu (str. 94-95), natomiast rozpuszczalność w mieszaninie tych lipidów jest wielokrotnie mniejsza i wynosi tylko 10-20 mg/ml (Tabela 19). Pomimo to krystalizacja bupiwakainy w liposferach z lipidem mieszanym była opóźniona i następowała po 2 dniach. Opóźnienie to potwierdza, że Miglyol może hamować krystalizację Precirolu, lecz fakt wykluczenia bupiwakainy z matrycy lipidowej dowodzi, że nie następuje budowanie struktury krystalicznej zdolnej do inkorporacji substancji leczniczej. Wykluczenie praktycznie całej dawki bupiwakainy z matrycy liposfer udowodniono oznaczając jej stężenie w fazie wodnej (Tabela 20).

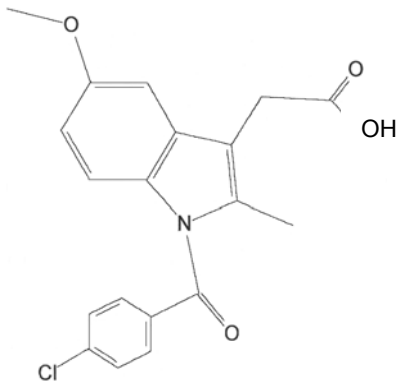
Zastosowanie bupiwakainy w postaci stearynianu zwiększyło inkorporację tylko w niewielkim stopniu – około 6,5% bupiwakainy mogło pozostawać związanej z liposferami, co oznacza możliwość otrzymania zawiesiny liposfer zawierającej tylko 0,03% bupiwakainy.

Dodatek polimerów hydrofilowych, karmelozy sodowej i hydroksyetylocelulozy, do fazy wodnej zawiesin liposfer opóźniał o kilka dni krystalizację bupiwakainy, czego nie obserwowano w przypadku poloksameru (Tabela 20). Opóźnienie krystalizacji insektycydu w zawiesinach liposfer stabilizowanych polimerami hydrofilowymi (alkohol poliwinylowy, powidon, poloksamer) obserwowali również Frederiksen i wsp. [102]. W fazie wodnej układu zawierającego karmelozę sodową wykryto tylko 87% bupiwakainy, co oznaczałoby inkorporację 13% substancji leczniczej. Być może większe cząstki liposfer (średnio 8,02 μm) obserwowane w tym układzie (Ryc. 30) pozwalały na

zamykanie niewielkiej ilości bupiwakainy (6 mg/g lipidu), lecz nadal stężenie inkorporowanej substancji leczniczej w otrzymanej w ten sposób zawiesinie liposfer nie przekraczało 0,06%.

Zwiększenia inkorporacji bupiwakainy nie uzyskano stosując różne warunki chłodzenia zawiesiny liposfer: w lodzie, ciekłym azocie, przechowując długoterminowo układy w temp. -30ºC (badań tych nie opisano w niniejszej pracy). Podjęto również próbę tworzenia liposfer wyłącznie ze stearynianu bupiwakainy lub jego mieszaniny z kwasem stearynowym, lecz składniki te przy zastosowanym stężeniu emulgatora nie pozwalały na uzyskanie układu stabilnego fizycznie (str. 100).

Ponieważ nie uzyskano zadowalającej inkorporacji bupiwakainy w matrycy lipidowej liposfer, do kolejnego etapu badań wytypowano indometacynę, substancję o dużej lipofilności (log P 4,2). Indometacyna (wzór poniżej) jest substancją leczniczą o silnym działaniu przeciwzapalnym, nieco słabszym przeciwbólowym i słabym przeciwgorączkowym [43]. Indometacyna, substancja praktycznie nierozpuszczalna w wodzie, jest słabym kwasem o stałej dysocjacji pK_a 4,5 [103]



Indometacyna
kwas 1-(4-chlorobenzoilo)-5-metoksy-2-metylo-1H-indolo-3-octowy

Chociaż indometacyna została wybrana ze względu na dużą lipofilność, jednak przeprowadzone badania wykazały, że jej rozpuszczalność w lipidach jest znacznie mniejsza niż bupiwakainy. Największą rozpuszczalność uzyskano w mieszaninie Precirolu z alkoholem cetostearylowym oraz Precirolu z alkoholem cetylowym w stosunku 4:1. Przy stężeniu indometacyny 100 mg/g lipidu, krystalizacja substancji leczniczej w obu przypadkach nie zachodziła (Tabela 23). W innych mieszaninach lipidów rozpuszczalność była wyraźnie niższa: dla mieszaniny Precirolu z Miglyolem

(4:1) uzyskano rozpuszczalność jedynie 2 mg/g lipidu, a z Compritolem - poniżej 1 mg/g.

Sporządzano zawiesiny liposfer stosując różne lipidy (Tabela 10), niezależnie od wykrytej w nich rozpuszczalności indometacyny. Stężenie indometacyny w tych układach wynosiło 0,2 i 0,5% (20 i 50 mg/g lipidu).

Przeprowadzone doświadczenie jeszcze raz wykazało, że jedynie układy zawierające Miglyol nie ulegały szybkiej zmianie konsystencji na półstałą i półpłynną (str. 107). W zawiesinach zawierających Miglyol z Precirolem obserwowano wprawdzie skupianie się liposfer w struktury łańcuchowe, lecz układy pozostawały płynne w czasie co najmniej 6 miesięcy. Liposfery zawierające oprócz Precirolu i Miglyolu także alkohol cetostearylowy wykazywały aglomerację cząstek widoczną w obrazie rozkładu wielkości cząstek (Ryc. 35).

Pomimo że rozpuszczalność indometacyny w lipidach: Precirol, Precirol z kwasem stearynowym oraz Precirol z alkoholem cetylowym dawała teoretycznie możliwość sporządzania zawiesin liposfer o stężeniu indometacyny co najmniej 0,2%, lecz okazało się, że w zawiesinach liposfer tworzonych z powyższymi lipidami krystalizacja substancji leczniczej przy tym stężeniu następowała natychmiast po sporządzeniu liposfer (Tabela 24, Ryc. 34). Nie powiodła się próba wprowadzania indometacyny (0,4%) do liposfer w postaci roztworu etanolowego, co mogłoby wpływać na zmianę stopnia jej inkorporacji w liposferach. Także w tym układzie podczas chłodzenia zawiesiny liposfer następowała krystalizacja indometacyny (str. 108).

W zawiesinach liposfer zawierających indometacynę w stężeniu 0,2% natychmiastowa krystalizacja substancji leczniczej nie następowała, jeżeli w składzie matrycy lipidowej znajdował się Miglyol (Tabela 24). W obecności ciekłego lipidu, dochodziło do krystalizacji indometacyny dopiero po 7 dniach. Ponieważ w fazie wodnej układu już po sporządzeniu oznaczano całkowitą dawkę indometacyny, nie można uznać, że Miglyol zapobiegał szybkiemu wykluczaniu substancji leczniczej z matrycy liposfer. Bardziej prawdopodobne jest, że indometacyna pozostawała dłużej na powierzchni liposfer, zapewne w kompartmencie utworzonym przez Miglyol, skąd powoli dyfundowała do fazy wodnej. Dowodziłoby to słuszności modelu przedstawionego na str. 42-44 proponowanego przez Jores i wsp. [91-93].

Wprowadzenie do fazy wodnej zawiesiny liposfer (Precirol : Miglyol; 0,2% indometacyny) poloksameru opóźniło krystalizację substancji leczniczej o kolejne 2 tygodnie (Tabela 24). Należy zaznaczyć, że poloksamer nie opóźniał krystalizacji bupiwakainy (Tabela 20), tak więc jego działanie na stabilność układów może być złożone i zapewne ogranicza się do stabilizacji roztworu przesyconego substancji leczniczej w fazie wodnej zawiesin, gdyż pod wpływem ultradźwięków dochodziło do

szybkiej krystalizacji indometacyny również w układzie z poloksamerem. Warto zwrócić uwagę, że szybka krystalizacja indometacyny następowała w zawiesinach liposfer szybko żelujących, a więc tworzenie układu o zwiększonej lepkości nie opóźnia krystalizacji substancji czynnej. Biorąc pod uwagę powyższe obserwacje można wnioskować, że wykluczanie indometacyny i jej krystalizacja następuje zbyt szybko, by żelująca zawiesina cząstek lipidowych mogła opóźnić ten proces.

Na pewno wykluczanie substancji leczniczej z matrycy lipidowej zależy od typu lipidu. Jednak przeprowadzone badania wykazują, że nie obserwuje się zależności pomiędzy rozpuszczalnością substancji leczniczej w makroskopowej warstwie lipidu, a jej rozpuszczalnością w lipidzie krystalizującym w układzie dyspersyjnym. Zarówno w przypadku indometacyny jak i bupiwakainy zaobserwowano, przynajmniej pozornie, najlepszą inkorporację liposferach zawierających Miglyol, chociaż rozpuszczalność w warstwach lipidowych tworzonych z jego udziałem była najmniejsza. Dowodzi to, że nawet jeśli optymalny skład matrycy lipidowej może dawać strukturę krystaliczną, która byłaby zdolna inkorporować cząsteczki substancji leczniczej, nie będzie łatwe znalezienie takiej kombinacji na podstawie rozpuszczalności ocenianej w lipidach.

Badania Müllera i wsp. [19, 20] świadczą, że koncentraty nanosfer lipidowych mogą stanowić nową postać aplikacyjną lipidowych nośników leku (str. 15, 44). Podjęto więc w pracy badania nad koncentratami mikrosfer lipidowych, sporządzając układy zawierające 50% (wag/wag) lipidu. W odróżnieniu do płynnych zawiesin układy te były półstałe. Sporządzano koncentrat liposfer zawierający jako fazę lipidową mieszaninę Precirolu z Miglyolem (4:1). Zastosowano tę samą metodę sporządzania jak w przypadku zawiesin zawierających 10% fazy lipidowej, z tą różnicą, że na etapie mieszania emulsji układ dodatkowo ogrzewano, by nie dopuścić do przedwczesnego krzepnięcia lipidu (str. 63). Koncentrat liposfer poddawany był wyjaławianiu i dochodziło w trakcie tego procesu do rozdziału faz. Wstrząśnięcie gorącego układu pozwalało na uzyskanie jednak stabilnej emulsji, bez ponownego rozdziału faz podczas chłodzenia.

Podczas przechowywania w czasie do 2 lat (temp. 4°C) nie zaobserwowano zmian wizualnych koncentratów. Układy te przypominały konsystencją żele typu kremu, więc oceniono ich właściwości reologiczne. Wykryto, że koncentraty wykazują pseudoplastyczną strukturę żelową, o czym świadczy zależność pomiędzy szybkością ścinania a naprężeniem ścinającym wykazująca istnienie tzw. pętli histerezy (Ryc. 36). Pola powierzchni pętli histerezy obserwowane dla koncentratów zawierających 2% lub 10% polisorbatu były zbliżone (Tabela 27), lecz niższe stężenie emulgatora wymagało przyłożenia większych sił w celu uzyskania porównywalnego odkształcenia. Pozornie stabilne fizycznie układy ulegały przemianom w czasie przechowywania, zależnym od

temperatury i zawartości emulgatora. W koncentracie zawierającym 2% polisorbatu, przechowywanym w temperaturze pokojowej przez 1 miesiąc, dochodziło do dalszego usieciowania fazy lipidowej, o czym świadczy przesunięcie pętli histerezy i zwiększenie jej powierzchni (Ryc. 36, Tabela 27). Struktura wewnętrzna koncentratu stabilizowanego wyższym stężeniem polisorbatu stawała się wprawdzie sztywniejsza, o czym świadczy przesunięcie krzywej wstępującej, lecz jej odbudowywanie było łatwiejsze, jak na to wskazuje zmniejszone pole powierzchni pętli histerezy. W tym koncentracie następowała więc częściowa degradacja struktury żelowej podczas przechowywania w temp. 20ºC. Wyniki tych doświadczeń wskazują, że w koncentratach dochodzi do budowania struktury szkieletowej układu i zjawisko to jest odwracalne. Na istnienie charakterystycznej dla żeli struktury wewnętrznej w koncentratach wskazywali inni autorzy [19, 31-33] i przedstawione zostały reogramy wskazujące na właściwości tiksotropowe wyrażane pętlą histerezy [33], lecz porównanie wyników niniejszej pracy z wynikami publikowanymi jest utrudnione z powodu różnej metodyki badań.

Obecność substancji leczniczych, indometacyny lub bupiwakainy, zmienia przebieg krzywych płynięcia koncentratów i w układach badanych po sporządzeniu praktycznie nie obserwowano pętli histerezy świadczącej o cechach reologicznych układów (Ryc. 36). W czasie przechowywania dochodziło jednak do budowy struktury wewnętrznej, w sposób zależny od rodzaju dodanej substancji leczniczej. Po 28 dniach największą sztywnością charakteryzował się koncentrat zawierający indometacynę, przechowywany w temperaturze pokojowej. Być może obserwowane zmiany strukturalne koncentratów nie będą miały istotnego znaczenia dla właściwości ich aplikacyjnej formy (po rozcieńczeniu), chociaż dalsze badania byłyby wskazane.

Koncentraty są tworzone z myślą o ich aplikacji po rozcieńczeniu. Podczas rozcieńczania wodą w stosunku 1+4 z koncentratu sporządzano płynne zawiesiny liposfer (str. 63). Układy przeznaczone do aplikacji klinicznej powinny być rozcieńczane rozpuszczalnikiem izotonicznym, np. 2,3% roztworem glicerolu. W badaniach wstępnych nie stwierdzono różnic pomiędzy koncentratami rozcieńczonymi wodą lub wodą z glicerolem. Sposób wykonania rozcieńczenia decydował natomiast o wielkości cząstek liposfer.

Krótkotrwałe wytrząsanie ręczne pozwało na otrzymanie wprawdzie cząstek o średniej wielkości ok. 20 µm (Tabela 21, Ryc. 31), lecz wykrywano również aglomeraty cząstek o wielkości do 80 µm. Zastosowanie ultradźwięków lub ekstruzja przez igłę strzykawki prowadziła do likwidacji aglomeratów i ostateczna wielkość cząstek mieściła się w zakresie 0,5-10 µm. Podczas wyjaławiania termicznego dochodziło do znacznej aglomeracji liposfer i dyspergowanie ultradźwiękami nie było tak skuteczne (Tabela

21), jednak ekstruzja przez igłę strzykawki przywracała liposferom ich pierwotną wielkość, co przedstawia ryc. 32. Tak więc ustalono, że mieszanie ręczne z następującą ekstruzją zawiesiny liposfer przez igłę strzykawki (np. podczas wstrzykiwania) to optymalny sposób sporządzania zawiesin liposfer z koncentratów.

Cząstki lipidowe w rozcieńczonych koncentratach były kuliste, chociaż w układzie stężonym pojawiały się cząstki owalne lub zdeformowane (Ryc. 31). Rozmiar liposfer w zakresie 1-10 µm obserwowany w rozcieńczonych koncentratach pozwala na ich podanie pozajelitowo (podskórnie, domięśniowo). Zaletą koncentratów rozcieńczanych „*ex tempore*" w porównaniu z zawiesinami sporządzanymi *de novo*, jest 5-krotnie mniejsze stężenie emulgatora, co wynika z faktu, że koncentraty sporządzano zwiększając stężenie lipidu bez zwiększania stężenia surfaktanta.

Podjęto próbę wprowadzenia bupiwakainy i indometacyny do koncentratów liposfer, spodziewając się uzyskania pożądanej inkorporacji substancji leczniczych w fazie lipidowej, czego nie osiągnięto w zawiesinach liposfer.

Sporządzano koncentraty liposfer zawierające 2% i 10% bupiwakainy (40 i 200 mg/g lipidu). W przeciwieństwie do zawiesiny liposfer w układach tych nie obserwowano kryształów bupiwakainy ani wizualnie, ani mikroskopowo. Jednak po sporządzeniu rozcieńczenia, w zakresie pH powyżej 6,5 dochodziło do niemal natychmiastowej krystalizacji bupiwakainy (Ryc. 33). Zjawisko to było opóźnione (do 2 dni) w koncentratach zawierających stearynian bupiwakainy.

Powyższe obserwacje wskazują na obecność w koncentratach liposfer nieinkorporowanej bupiwakainy. Być może półstały charakter koncentratów pozwala na jej zatrzymanie na granicy fazy lipidowej, przez co nie dochodzi do krystalizacji w fazie wodnej przed rozcieńczeniem.

Początkowo, gdy przygotowywano próby do ultrafiltracji z użyciem mieszania ręcznego ustalono, że możliwe jest zamykanie w liposferach, dzięki zastosowaniu formy koncentratu, nawet 60-70% dodanej substancji leczniczej (Tabela 22) i korzystne jest zastosowanie większego stężenia bupiwakainy lub postaci chemicznej stearynianu. Niestety, podobnie jak w przypadku zawiesiny liposfer, intensywne wytrząsanie (Vortex lub sonikacja) prowadzi do wykrywania całej dawki bupiwakainy w fazie wodnej. Wynik ten to kolejny dowód, że również w koncentratach, pomimo wzrostu stosunku lipid : lek, bupiwakaina nadal lokalizuje się na powierzchni liposfer i nie dochodzi do jej inkorporacji w matrycy lipidowej.

W czasie przechowywania (8 dni) dochodziło tylko do niewielkiej zmiany ilości bupiwakainy oznaczanej w fazie wodnej i porównanie stężeń wykrywanych po sporządzeniu i po 8 dniach pozwala sądzić, że układ pod tym względem jest stabilny, tak więc wykluczanie bupiwakainy z matrycy liposfer nie następuje w czasie

przechowywania, lecz w trakcie chłodzenia podczas sporządzania (Tabela 22). Wykluczanie substancji leczniczej nie wiąże się więc z ewentualnym zjawiskiem opóźnionej krystalizacji lipidów i przemiany polimorficznej zależnej od czasu [58, 61, 64]. Zjawisko wykluczania następuje niezależnie od postaci chemicznej bupiwakainy.

Podjęto również próbę sporządzania koncentratów liposfer zawierających indometacynę w stężeniu 1% i 5% (20 i 100 mg/g lipidu). Skład lipidowych matryc był taki sam, jak w przypadku zawiesin: tworzono nie tylko liposfery z Precirolu lub mieszaniny Precirolu z Miglyolem, lecz także mieszaniny Precirolu z kwasem stearynowym, alkoholem cetylowym i alkoholem cetostearylowym. Jeżeli matrycę liposfer w koncentracie stanowił samodzielnie Precirol, już bezpośrednio po sporządzeniu zaobserwowano w nierozcieńczonych koncentratach krystalizację substancji leczniczej (Tabela 25). Po tygodniu przechowywania koncentratów indometacyna wykrystalizowała również w układach z dodatkiem kwasu stearynowego i alkoholu cetostearylowego z Miglyolem. Najtrwalsze pod tym względem okazały się koncentraty, których matryce tworzył Precirol i Miglyol (4:1) lub Precirol z alkoholem cetylowym. O ile największą stabilność tego drugiego układu można uzasadnić dobrą rozpuszczalnością indometacyny w mieszaninie tych lipidów (Tabela 23), to z kolei nie ma tej zależności dla koncentratu z Precirolem i Miglyolem, ponieważ w tym lipidzie rozpuszczalność indometacyny była bardzo mała (0,2-0,5%).

Niestety, niezależnie od szybkości krystalizacji w koncentratach nierozcieńczonych w układzie po rozcieńczeniu kryształy pojawiały się w ciągu 24 h, jeżeli stosowano intensywne mieszanie za pomocą Vortex (Tabela 25). Badania zawartości indometacyny w fazie wodnej wykazały, że indometacyna nie ulegała zamykaniu w matrycy liposfer. Podobnie jak w przypadku zawiesin i koncentratów z bupiwakainą, zależnie od intensywności mieszania, w fazie wodnej oznaczano nawet całkowitą dawkę indometacyny (Tabela 26). Wynik taki uzyskiwano przy zastosowaniu do rozcieńczenia koncentratu metanolu 60%. Wcześniej ustalono doświadczalnie, że w czasie rozcieńczania koncentratu tym rozpuszczalnikiem nie dochodzi do rozpuszczania liposfer [104].

Badania dowodzą więc jedynie powierzchniowej lokalizacji inkorporowanej substancji leczniczej w liposferach. Właściwy byłby więc, zarówno dla zawiesin jak i koncentratów mikrosfer lipidowych model rdzeń-powłoka I opisany przez Müllera i wsp. [1] dla SLN (str. 26). O ile jednak w modelu tym zakłada się, że powłoka jest wzbogacona substancją leczniczą, a więc dochodzi do inkorporacji powierzchniowej w matrycy, o tyle nasze badania nie potwierdzają inkorporacji w lipidzie, nawet powierzchniowo, a raczej wskazują na bardzo słabe związanie substancji leczniczej z powierzchnią liposfer. W przeciwieństwie do zawiesin liposfer (10% fazy lipidowej) w

koncentratach, z powodu zwiększonej do 50% zawartości fazy lipidowej, zwiększonego stosunku ilościowego lipid/substancja lecznicza oraz z powodu półstałej konsystencji, możliwe jest silniejsze związanie substancji leczniczej na powierzchni liposfer, być może w kompartmencie tworzonym przez Miglyol (str. 125). Podczas rozcieńczania z silniejszym wytrząsaniem dochodzi do przejścia tej frakcji substancji leczniczej do fazy wodnej.

Taka powierzchniowa lokalizacja substancji leczniczej może jednak wystarczyć, by uzyskać jej przedłużone uwalnianie w warunkach *in vivo*, szczególnie po podaniu pozajelitowym. Oceniano szybkość uwalniania indometacyny z rozcieńczonego i nierozcieńczonego koncentratu w modelu *in vitro* z użyciem błony dializacyjnej. Przedłużone uwalnianie substancji leczniczej w czasie 48 godzin wykryto jedynie z koncentratu nierozcieńczonego, natomiast indometacyna bardzo szybko uwalniała się z koncentratu rozcieńczonego z zastosowaniem stosunkowo intensywnego wytrząsania (Ryc. 38). Oczywiście trudno jest łączyć przedłużone uwalnianie z koncentratu jedynie z adsorpcją powierzchniową indometacyny na liposferach, gdyż nawet większe znaczenie może mieć w tym przypadku półstała konsystencja preparatu i w ten sposób utrudniona dyfuzja indometacyny.

Ponieważ brakuje standardowych metod badania uwalniania z postaci leku przeznaczonych do wstrzykiwań domięśniowych lub podskórnych, nie można przewidzieć, czy szybkie uwalnianie indometacyny z rozcieńczonego koncentratu obserwowane w warunkach *in vitro* zaistnieje również w warunkach *in vivo*. Z kolei interesujące byłoby badanie możliwości wstrzyknięcia domięśniowo koncentratu liposfer. Byłaby to zapewne forma szybko biodegradującego się implantu.

W niniejszej pracy podjęto próbę określenia szybkości degradacji w warunkach *in vivo* zawiesiny liposfer, a więc układu rozcieńczonego. W literaturze opisano pojedyncze badanie in vivo liposfer po jednorazowym podaniu domięśniowym [105]. Użyto liposfery o wielkości 60 μm (5 mg) i wykrywano ich częściową obecność w tkance nawet po 7 dniach, z wystąpieniem słabego odczynu zapalnego. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doświadczenie wykazało, że przy podaniu mniejszych cząstek lipidu nie dochodzi do ich kumulacji w tkance mięśniowej, pomimo ich 3-krotnego wstrzyknięcia w 3-dniowych przedziałach czasu (Ryc. 39). Brak zmian histologicznych stwierdzano niezależnie, czy podawano nanosfery lipidowe, sporządzane metodą homogenizacji ciśnieniowej (zakres wielkości 0,1-1,03 μm), czy mikrosfery (cząstki 1-10 μm). Oznacza to, z jednej strony biozgodność i bezpieczeństwo tego nośnika leku, z drugiej jednak strony wyniki badań histologicznych wskazują, że zawiesiny liposfer o takim składzie i wielkości nie mogłyby zapewne być postacią leku zapewniająca dłuższe działanie inkorporowanego

leku niż w czasie maksymalnie 3 dni. Dłuższe działanie można byłoby zapewne uzyskać stosując układy skoncentrowane, na co już wskazano powyżej.

Wyniki przeprowadzonych w pracy badań wskazują na ogromną trudność w otrzymaniu liposfer w układach stabilnych fizycznie umożliwiających inkorporację substancji leczniczych. Co więcej, pomimo przeprowadzenia licznych doświadczeń nie jest możliwe na podstawie uzyskanych danych ustalenie zasad doboru składu liposfer (lipidy i emulgatory), tak by otrzymać pożądane układy o właściwościach nośników leku. W ten sposób potwierdzone zostały krytyczne prace dotyczące SLN publikowane w ostatnich 2-3 latach [55, 91-93], a więc równolegle do doświadczeń prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Farmacji Stosowanej. W niniejszej pracy wykazano, że mikrosfery lipidowe charakteryzuje szereg właściwości obserwowanych w przypadku nanosfer lipidowych i mikrosfery nie stanowią nośnika leku umożliwiającego łatwiejszą inkorporację substancji leczniczej, czy większą stabilność fizyczną w porównaniu z nanosferami lipidowymi (SLN).

W kontekście przeprowadzonych badań należy odnieść się do wyników opublikowanej w roku 1998 pracy poświęconej technologii i badaniom skuteczności *in vivo* liposfer z bupiwakainą [83]. Autorzy uzyskali zawiesiny liposfer (do 10% fazy lipidowej) zawierające bupiwakainę zasadę w stężeniu do 5,6% (560 mg/g lipidu), uzyskując wydajność inkorporacji nawet 84%. Jako emulgator zastosowano lecytynę, natomiast matrycę liposfer tworzył tristearynian glicerolu. Średnia wielkość cząstek liposfer wynosiła 10-20 μm. W warunkach *in vitro* uzyskano spowolnione uwalnianie bupiwakainy w czasie 60 h, a w warunkach *in vivo* po podaniu okołonerwowym działanie miejscowo znieczulające bupiwakainy utrzymywało się w czasie 3 dni. W naszych badaniach stosowane były inne lipidy, lecz nie udało się utworzyć układu stabilnego z lecytyną jako samodzielnym emulgatorem. Nie wiadomo z jakiego powodu, inkorporacja bupiwakainy w wyżej wymienionej pracy była tak duża, pomimo że ani w naszych badaniach ani w badaniach Toongsuwan i wsp. [55] nie uzyskano podobnych wyników. Co więcej, autorzy twierdzą, że bupiwakaina całkowicie ulegała inkorprorację w matrycy lipidowej, a nie w jej powłoce. Tak odmienne wyniki publikowanych prac na temat inkorporacji substancji leczniczych, nie tylko bupiwakainy, lecz też innych (str. 27-30), świadczą, że liposfery nadal są postacią leku o nierozpoznanym wpływie czynników technologicznych na ich właściwości, co na pewno jest jedną z podstawowych przyczyn nie pozwalających w chwili obecnej na ich wprowadzenie do lecznictwa.

VI. WNIOSKI

1. Zawiesiny liposfer (10% lipidu) płynne podczas długotrwałego przechowywania otrzymano w prostym procesie technologicznym metodą emulgowania z użyciem mieszadła szybkoobrotowego i chłodzenia w temperaturze pokojowej, stosując Precirol z Miglyolem w stosunku 4:1 jako składnik matrycy liposfer, a polisorbat 80 (2%) jako emulgator. Wielkość tworzonych liposfer zawiera się w zakresie 1-20 μm.

2. Przy zwiększeniu udziału fazy lipidowej do 50%, nie zwiększając ilości emulgatora, otrzymywano koncentraty o półstałej konsystencji i właściwościach reologicznych charakterystycznych dla układów żelowych. Z koncentratów sporządzano przez rozcieńczenie zawiesiny liposfer o wielkości cząstek zbliżonej do oznaczanej w zawiesinach liposfer sporządzanych de novo.

3. Zarówno koncentraty jak i zawiesiny liposfer o proponowanym składzie mogą być wyjaławiane termicznie, a pierwotną wielkość cząstek lipidowych przywraca się podczas ekstruzji przez igłę strzykawki.

4. Po wielokrotnym wstrzyknięciu domięśniowym szczurom nie zaobserwowano zmian histologicznych w tkance, niezależnie, czy wstrzykiwano nanosfery, czy też mikrosfery lipidowe, co świadczy o szybkiej biodegradacji liposfer in vivo.

5. Nie udało się zamknąć w matrycy liposfer badanych substancji leczniczych: bupiwakainy, stearynianu bupiwakainy i indometacyny. Nie stwierdzono zależności pomiędzy ich lipofilnością i rozpuszczalnością w lipidach a zdolnością inkorporacji w liposferach. Wykryto, że substancje lecznicze są wykluczane z liposfer podczas krystalizacji lipidu, niezależnie, czy matrycę tworzy lipid stały, czy jego mieszanina z lipidem ciekłym, a zjawisku temu ma zapobiegać obecność w fazie wodnej polimerów hydrofilowych.

6. Substancje pozostają związane z powierzchnią liposfer w sposób nietrwały i w zależności od intensywności mieszania lub wytrząsania uwalniają się do fazy wodnej. W konsekwencji przedłużone uwalnianie indometacyny w warunkach *in vitro* zaobserwowano jedynie dla koncentratu nierozcieńczonego.

7. Przeprowadzone doświadczenia wskazują na poważne ograniczenia technologiczne mikrosfer lipidowych i potwierdzają ukazujące się ostatnio krytyczne doniesienia dotyczące nanosfer lipidowych. Żelowanie zawiesin liposfer, nieprzewidywalna i bardzo mała inkorporacja substancji leczniczej lub jej brak, trudna do kontroli powtarzalność adsorpcji substancji leczniczej na powierzchni liposfer to podstawowe wady tych układów. Stabilniejszą i bardziej obiecującą formą liposfer wydają się być ich koncentraty.

VII. PIŚMIENNICTWO

1. Müller R.H., Mäder K., Gohla S.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art, Eur. J. Pharm. Biopharm. 50 (2000) 161-177

2. Janicki S.: Urzeczywistnianie idei leku wielokompartmentowego, Farm. Pol. 55 (1999) 139-148

3. Davis S.S.: Coming of age of lipid-based drug delivery systems, Adv. Drug Deliv. Rev. 56 (2004) 1241-1242

4. Benita S., Levy M.Y.: Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization, J. Pharm. Sci. 82 (1993) 1069-1079

5. Sznitowska M., Gajewska M., Janicki S., Radwańska A., Lukowski G.: Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits, Eur. J. Pharm. Biopharm. 52 (2001) 159-163

6. Sznitowska M., Janicki S., Dąbrowska E., Żurowska-Pryczkowska K.: Submicron emulsions as drug carriers. Studies on destabilization potential of various drugs, Eur. J. Pharm. Sci. 12 (2001) 175-179

7. Westesen K.: Novel lipid-based colloidal dispersions as potential drug administration systems – expectations and reality, Colloid Polym. Sci. 278 (2000) 608-618

8. Szulc J., Dudzik M., Woyczikowski B., Sznitowska M., Janicki S.: Liposomy - postęp terapeutyczny i problemy technologiczne, Pol. Merk. Lek. 68 (2002) 164-168

9. Szczepańska M., Sznitowska M.: Czy wchłanianie liposomów przez skórę jest możliwe?, Pollena TŚPK 37 (1999) 323-327

10. Szulc J., Woyczikowski B., Szczepańska M., Wolniak L., Cal K., Sosada M., Pasker B.: Untersuchung der Penentration liposomal verkapselter Vitamine A und E in die Haut, Pharmazie 48 (1993) 466 – 467

11. Sznitowska M.: Kierunki doskonalenia postaci leku - przegląd aktualności (5), Farm. Pol. 45 (1998) 884-886

12. Sznitowska M.: Technologia mikrocząstek i nanocząstek jako nośników leku, Farm. Pol. 57 (2001) 962 – 969

13. Müller R.H., Menhert W., Lucks J.S., Schwarz C., zur Mühlen A., Weyhers H., Freitas C., Rühl D.: Solid lipid nanoparticles (SLN) - an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery, Eur. J. Pharm. Biopharm. 41 (1995) 62-69

14. Nastruzzi C.: Lipospheres in drug targets and delivery, CRC Press, Boca Raton (2005)

15. Hamdani J., Moës A.J., Amighi K.: Physical and thermal characterisation of Precirol® and Compritol® as lipophilic glycerides used for the preparation of controlled-release matrix pellets, Int. J. Pharm. 260 (2003) 47-57

16. Menhert W., Mäder K.: Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications, Adv. Drug Deliv. Rev. 47 (2001) 165-196

17. Ahlin P., Kristl J., Šmid-Korbar J.: Optimization of procedure parameters and physical stability of solid lipid nanoparticles in dispersions, Acta Pharm. 48 (1998) 259-267

18. Strickley R.G.: Solubilizing excipients in oral and injectable formulations, Pharm. Res. 21 (2004) 201-230

19. Wissing S.A., Lippacher A., Müller-Goymann C.C., Müller R.H.: Highly concentrated solid lipid nanoparticles (SLN): production and transmission electron microscopy (TEM) investigations, Proc.4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV Florence (2002) 811-812

20. Müller R.H., Radtke M., Wissing S.A.: Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, Int. J. Pharm. 242 (2002) 121-124

21. Wissing S.A., Kayser O., Müller R.H.: Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, Adv. Drug Deliv. Rev. 56 (2004) 1257-1272

22. Yang S.C., Lu L.F., Cai Y., Zhu J.B., Liang B.W., Yang C.Z.: Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain, J. Control. Release 59 (1999) 299-307

23. Zara G.P., Cavalli R., Bargoni A., Fundarò A., Vighetto D., Gasco M.R.: Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin-

loaded solid lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and other tissues, J. Drug Target. 10 (2002) 327-335

24. Chen D.B., Yang T., Lu W.L., Zhang Q.: In vitro and in vivo study of two types of long-circulating Solid Lipid Nanoparticles containing paclitaxel, Chem. Pharm. Bull. 49 (2001) 1444-1447

25. Wang J.X., Sun X., Zhang Z.R.: Enhanced brain targeting by synthesis of 3',5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles, Eur. J. Pharm. Biopharm. 54 (2002) 285-290

26. Zara G.P., Bargoni A., Cavalli R., Fundarò A., Vighetto D., Gasco M.R.: Pharmacokinetics and tissue distribution of idarubicin-loaded solid lipid nanoparticles after duodenal administration to rats, J. Pharm. Sci. 91 (2002) 1324-1332

27. Srinath P., Diwan P.V.: Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of lipid microspheres of indomethacin, Pharm. Acta Helv. 73 (1998) 199-203

28. Gasco M.R.: Solid lipid nanoparticles for drug delivery, Pharm. Technol. Eur. 13 (2001) 32-42

29. Demirel M., Yazan Y., Müller R.H., Kiliç F., Bozan B.: Formulation and in vitro-in vivo evaluation of piribedil solid lipid micro- and nanoparticles, J. Microencapsul. 18 (2001) 359-371

30. Cavalli R., Gasco M.R., Chetoni P., Burgalassi S., Saettone M.F.: Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin, Int. J. Pharm. 238 (2002) 241-245

31. Lippacher A., Müller R.H., Mäder K.: Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles, Int. J. Pharm. 214 (2001) 9-12

32. Lippacher A., Müller R.H., Mäder K.: Semisolid SLN ™ dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties, Eur. J. Pharm. Biopharm. 53 (2002) 155-160

33. Lippacher A., Müller R.H., Mäder K.: Liquid and semisolid SLN ™ dispersions for topical application: rheological characterization, Eur. J. Pharm. Biopharm. 58 (2004) 561-567

34. Santos C.M., Menhert W., Schäfer-Korting M.: Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids, Int. J. Pharm. 196 (2000) 165-167

35. Santos C.M., Menhert W., Schaller M., Korting H.C., Gysler A., Haberland A., Schäfer-Korting M.: Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use, J. Drug Target. 10 (2002) 489-495

36. Sivaramakrishnan R., Nakamura C., Menhert W., Korting H.C., Kramer K.D., Schäfer-Korting M.: Glucocorticoid entrapment into lipid carriers - characterisation by parelectric spectroscopy and influence on dermal uptake, J. Control. Release 97 (2004) 493-502

37. Wissing S.A., Müller R.H.: The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity - in vivo study, Eur. J. Pharm. Biopharm. 56 (2003) 67-72

38. Souto E.B., Wissing S.A., Barbosa C.M., Müller R.H.: Developmant of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery, Int. J. Pharm. 278 (2004) 71-77

39. Wissing S.A., Müller R.H.: Solid lipid nanopraticles (SLN) - a novel carrier for UV blockers, Pharmazie 56 (2001) 783-786

40. Wissing S.A., Müller R.H.: The development of an improved carrier system for sunscreen formulations based on crystalline lipid nanoparticles, Int. J. Pharm. 242 (2002) 373-375

41. Yener G., Incegül T., Yener N.: Importance of using solid lipid microspheres as carriers for UV filters on the example octyl methoxy cinnamate, Int. J. Pharm. 258 (2003) 203-207

42. Wissing S.A., Müller R.H.: Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration, J. Control. Release 81 (2002) 225-233

43. Müller R.H., Radtke M., Wissing S.A.: Solid lipid nanopraticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, Adv. Drug Deliv. Rev. 54 Suppl. I (2002) S131-S155

44. Wissing S.A., Müller R.H.: Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN), Int. J. Pharm. 254 (2003) 65-68

45. Patravale V.B., Ambarkhane A.V.: Study of solid lipid nanoparticles with respect to particle size distribution and drug loading, Pharmazie 58 (2003) 392-395

46. Trotta M., Debernardi F., Caputo O.: Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique, Int. J. Pharm. 257 (2003) 153-160

47. Hu F.Q., Yuan H., Zhang H.H., Fang M.: Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization, Int. J. Pharm. 239 (2002) 121-128

48. Hou D.Z., Xie C.S., Huang K., Zhu C.H.: The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs), Biomaterials 24 (2003) 1781-1785

49. Cortesi R., Esposito E., Luca G., Nastruzzi C.: Production of liposheres as carriers for bioactive compounds, Biomaterials 23 (2002) 2283-2294

50. Freitas C., Müller R.H.: Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN^{TM}) dispersions, Int. J. Pharm. 168 (1998) 221-229

51. Freitas C., Müller R.H.: Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN^{TM}) in aqueous dispersion after addition of electrolyte, J. Microencapsul. 16 (1999) 59-71

52. Mao S., Wang P., Bi D.: Investigations on 5-fluorouracil solid lipid nanoparticles (SLN) prepared by hot homogenization, Pharmazie 60 (2005) 273-277

53. Westesen K., Siekmann B.: Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles, Int. J. Pharm. 151 (1997) 35-45

54. Müller R.H., Maassen S., Schwarz C., Menhert W.: Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes, J. Control. Release 47 (1997) 261-269

55. Toongsuwan S., Li L., Erickson B.K., Chang H.: Formulation and characterization of bupivacaine lipospheres, Int. J. Pharm. 280 (2004) 57-65

56. Souto E.B., Wissing S.A., Barbosa C.M., Müller R.H.: Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations, Eur. J. Pharm. Biopharm. 58 (2004) 83-90

57. Üner M., Wissing S.A., Yener G., Müller R.H.: Influence of surfactants on the physical stability of solid lipid nanoparticle (SLN) formulations, Pharmazie 59 (2004) 331-332

58. Freitas C., Müller R.H.: Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN^{TM}) and crystallinity of the lipid phase, Eur. J. Pharm. Biopharm. 47 (1999) 125-132

59. Heurtault B., Saulnier P., Pech B., Proust J-E., Benoit J-P.: Physico-chemical stability of colloidal lipid particles, Biomaterials 24 (2003) 4283-4300

60. Sato K.: Crystallization behaviour of fats and lipids - a review, Chem. Eng. Sci. 56 (2001) 2255-2265

61. Bunjes H., Koch M.H.J., Westesen K.: Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles, J. Pharm. Sci. 92 (2003) 1509-1520

62. Sikorski E.: Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności; Polimorfizm i struktura krystaliczna, WNT Warszawa (1994) 241-243

63. Westesen K., Bunjes H.: Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix?, Int. J. Pharm. 115 (1995) 129-131

64. Bunjes H., Westesen K., Koch M.H.J.: Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles, Int. J. Pharm. 129 (1996) 159-173

65. Lukowski G., Kasbohm J., Pflegel P., Illing A., Wulff H.: Crystalographic investigation of cetylpalmitate solid lipid nanoparticles, Int. J. Pharm. 196 (2000) 201-205

66. Westesen K., Siekmann B.: Biodegradable colloidal drug carrier systems based on solid lipids; w: Benita S., Microencapsulation: methods and industrial applications, Marcel Dekker, New York (1996) 213-258

67. Bunjes H., Drechsler M., Koch M.H.J., Westesen K.: Phase separation within solid lipid nanoparticles loaded with high amounts of ubidecarenone (Q_{10}),

Proceed. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. Controlled Release Society 27 (2000)

68. Ahlin P., Kristl J., Šentjurc M., Štrancar J., Pečar S.: Influence of spin probe structure on its distribution in SLN dispersions, Int. J. Pharm. 196 (2000) 241-244

69. Westesen K., Bunjes H., Koch M.H.J.: Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, J. Control. Release 48 (1997) 223-236

70. Wissing S,A., Müller R.H.; Manthei L., Mayer C.: Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy, Pharm. Res. 21 (2004) 400-405

71. Bunjes H., Drechsler M., Koch M.H.J., Westesen K.: Incorporation of the model drug ubidecarenone into solid lipid nanoparticles, Pharm. Res. 18 (2001) 287-293

72. Jenning V., Gohla S.: Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles, Int. J. Pharm. 196 (2000) 219-222

73. Hu F.Q., Wu M., Zh., Yuan H., Zhang H.H.: A novel preparation of solid lipid nanoparticles with cyclosporin A for prolonged drug release, Pharmazie 59 (2004) 683-685

74. Ugazio E., Cavalli R., Gasco M.R.: Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles, Int. J. Pharm. 241 (2002) 341-344

75. Cavalli R., Caputo O., Carlotti M.E., Trotta M., Scarnecchia C., Gasco M.R.: Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles, Int. J. Pharm. 148 (1997) 47-54

76. Schwarz C., Menhert W.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery II. Drug incorporation and physicochemical characterization, J. Microencapsul. 16 (1999) 205-213

77. Radtke M., Souto E.B., Müller R.H.: Nanostructured lipid carriers: a novel generation of solid lipid drug carriers, Pharm. Technol. Eur. 17 (2005) 45-50

78. Schubert M.A., Müller-Goymann C.C.: Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier, Eur. J. Pharm. Biopharm. 61 (2005) 77-86

79. Olbrich C., Müller R.H.: Lipid-drug conjugate (LDC) nanoparticles for incorporation of hydrophilic drugs into lipid particles, Proc. 4th World meeting ADRITELEF/APGI/APV Florence (2002) 675-676

80. Olbrich C., Gessner A., Kayser O., Müller R.H.: Lipid-drug conjugate (LDC) nanoparticles as novel carrier system for the hydrophilic antitrypanosomal drug diminazenediaceturate, J. Drug Target. 10 (2002) 387-396

81. zur Mühlen A., Schwarz C., Menhert W.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism, Eur. J. Pharm. Biopharm. 45 (1998) 149-155

82. Domb A.J., Bergelson L., Amselem S.: Lipospheres for controlled delivery of substances; w Benita S., Microencapsulation: methods and industrial applications, Marcel Dekker, New York (1996) 377-410

83. Masters D.B., Domb A.J.: Liposphere local anesthetic timed-release for perineural site application, Pharm. Res. 15 (1998) 1038-1045

84. Jenning V., Schäfer-Korting M., Gohla S.: Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties, J. Control. Release 66 (2000) 115-126

85. Müller R.H., Rühl D., Runge S.A.: Biodegradation of solid lipid nanoparticles as function of lipase incubation time, Int. J. Pharm. 144 (1996) 115-121

86. Olbrich C., Müller R.H.: Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures, Int. J. Pharm. 180 (1999) 31-39

87. Olbrich C., Kayser O., Müller R.H.: Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN)-effect of surfactants, storage time and crystallinity, Int. J. Pharm. 237 (2002) 119-128

88. Müller R.H., Radtke M., Wissing S.A.: Nanostructured lipid carriers (NLC)-the next generation after solid lipid nanoparticles (SLN), Proc.4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV Florence (2002) 673-674

89. Jenning V., Thünemann A.F., Gohla S.H.: Characterization of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids, Int. J. Pharm. 199 (2000) 167-177

90. Jenning V., Mäder K., Gohla S.H: Solid lipid nanoparticles (SLN ™) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a ^{1}H-NMR study, Int. J. Pharm. 205 (2000) 15-21

91. Jores K., Menhert W., Mäder K.: Physiochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: a nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study, Pharm. Res. 20 (8) (2003) 1274-1283

92. Jores K., Menhert W., Bunjes H., Drechsler M., Mäder K.: From solid lipid nanoparticles (SLN) to nanospoons. Vision and reality of colloidal lipid dispersions, Proc. Int. Meeting on Pharm. Biopharm. and Pharm. Technology Nuremberg (2004) 439-440

93. Jores K., Menhert W., Drechsler M., Bunjes H., Johann C., Mäder K.: Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, J. Control. Release 95 (2004) 217-227

94. Saupe A., Wissing S.A., Müller R.H.: Nanostructures lipid carriers (NLC) as components of cosmetical formulations: advantages over conventional emulsion-based systems, Proc. Int. Meeting on Pharm. Biopharm. and Pharm. Technology, Nuremberg (2004) 451-452

95. Müller R.H., Rühl D., Runge S., Schulze-Forster K., Menhert W.: Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant, Pharm. Res. 14 (1997) 458-462

96. Müller R.H., Olbrich C.: Solid lipid nanoparticles: phagocytic uptake, in vitro cytotoxicity and in vitro biodegradation, Pharm. Ind. 61 (1999) 564-569

97. Müller R.H., Schuhman R.: Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart (1996)

98. Schramm G.: Reologia. Podstawy i zastosowania, Ośrodek Wydawnictw Naukowych PAN Poznań (1998)

99. Sznitowska M., Janicki S., Dąbrowska E.A., Gajewska M.: Physicochemical screening of antimicrobial agents as potential preservatives for submicron emulsions, Eur. J. Pharm. Biopharm. 15 (2002) 489-495

100. Pietkiewicz J., Sznitowska M.: The choice of lipids and surfactants for injectable extravenous microspheres, Pharmazie 59 (2004) 325-326

101. Zejc. A., Gorczyca M.: Chemia leków, PZWL, Warszawa (1999)

102. Frederiksen H.K., Kristensen H.G., Pedersen M.: Solid lipid microparticle formulations of the pyrethroid gamma-cyhalothrin – incompatibility of the lipid and the pyrethroid and biological properties of the formulations, J. Control. Release 86 (2003) 243-252

103. Dollery C.: Therapeutic Drugs Vol. I, Churchill Livingstone, Edynburg (1991)

104. Pietkiewicz J., Sznitowska M., Placzek M.: The expulsion of lipophilic drugs from the cores of solid lipid microspheres in diluted suspensions and in concentrates, Int. J. Pharm. praca w druku

105. Reithmeier H., Herrmann J., Göpferich A.: Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides, J. Control. Release 73 (2001) 339-350