

Evaluation of Polymer Concentration Effect on Doxycycline Hyclate Drug Release from in Situ Forming System based on Poly(lactide-*co*-glycolide)

H. Farrokhzad¹, H. Mobedi^{*1}, J. Barzin¹, A. Poorkhalil²

1. Iran Polymer and Petrochemical Institute, PO Box 14965-115, Tehran, Iran

2. Department of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University,
P.O. Box: 14115-143, Tehran, Iran

Received 25 January 2010, accepted 16 March 2010

ABSTRACT

In this study, doxycycline hyclate release behavior from in situ forming drug delivery systems investigated. These systems based on poly(lactide-*co*-glycolide) 50:50 dissolved in N-methyl-2-pyrrolidone that were evaluated in different concentrations. These systems are useful for local treatment of periodontal diseases. UV spectroscopy is used to determine drug concentration in release medium. Also, a new method to stabilize drug in release medium was developed. The structure of prepared membranes is explained by scanning electron microscopy (SEM) to evaluate the surficial and cross-sectional structures of polymer matrices. With increasing in polymer concentration, surface porosity decreased, membrane structure became denser, burst decreased and drug release time increased.

Key Words

drug release,
doxycycline hyclate,
in situ forming,
poly(lactide-*co*-glycolied),
polymer concentration

(*) To whom correspondence should be addressed.

E-mail: h.mobedi@ippi.ac.ir

بررسی اثر غلظت پلیمر بر رهایش داروی داکسی سایکلین هیكلیت از سامانه تشکیل شونده در محل بر پایه پلی(لاکتید-کو-گلیکولید)

حسن فرخ زاد^۱، حمید موبدی*^۲، جلال برزین^۱، علی پورخلیل^۲

۱- تهران، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، صندوق پستی ۱۱۵-۱۴۹۶۵
۲- تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، صندوق پستی ۱۴۳-۱۴۱۱۵

دریافت: ۸۸/۱۱/۵، پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۵

چکیده

در این پژوهش، روند رهایش داروی داکسی سایکلین هیكلیت از سامانه‌های دارورسانی تشکیل شونده در محل با استفاده از پلی(لاکتید-کو-گلیکولید) با نسبت مونومری ۵۰:۵۰ در حلال N - متیل-۲-پیرولیدون در غلظت‌های مختلف بررسی شده است. این سامانه‌ها برای درمان موضعی بیماری‌های پریدنتال مفید هستند. برای تعیین غلظت دارو در محیط رهایش از روش طیف‌سنجی فرابنفش استفاده شد. همچنین، روشی برای پایداری‌سازی دارو در محیط رهایش نیز ارائه شده است. ساختار غشاهای ساخته شده، به کمک آزمون میکروسکوپی الکترونی برای بررسی ساختارهای سطحی و عمقی زمینه‌های پلیمری توضیح داده شده است. با افزایش غلظت پلیمر، تخلخل سطح کاهش یافته، ساختار غشایی متراکم‌تر شده، رهایش ناگهانی کاهش و زمان رهایش کلی افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی

رهایش دارو،
داکسی سایکلین هیكلیت،
تشکیل شونده در محل،
پلی(لاکتید-کو-گلیکولید)،
غلظت پلیمر

مقدمه

سامانه‌های دارورسانی تزریقی جدید طی چند دهه گذشته پیشرفت‌های قابل توجهی داشته‌اند [۱، ۲]. این توجه به دلیل امتیازاتی است که این سامانه‌ها دارند از قبیل کاربرد ساده، دارورسانی موضعی به نحو مؤثر [۳، ۴]، دوره طولانی مدت دارورسانی، کاهش دوز مصرفی دارو همراه با کاهش مقدار آثار جانبی، افزایش راحتی و پذیرش بیمار. سامانه‌های کاشتنی تزریقی زیست تخریب پذیر نیمه جامد، از پلیمرهای زیست تخریب پذیری ساخته می‌شوند که می‌توانند همراه با دارو به وسیله سرنگ به بدن تزریق شوند. سامانه‌های مزبور به محض تزریق در محل جامد می‌شود تا ذخیره نیمه جامدی را تشکیل دهند [۵]. این سامانه‌ها براساس ساز و کار جامد شدن در بطن زنده به چهار گروه دسته‌بندی می‌شوند:

- خمیرهای گرم‌انرم،

- سامانه‌هایی که در محل تزریق شبکه‌ای می‌شوند،

- سامانه‌هایی که در محل تزریق رسوب می‌کنند و

- جامد شدن ژل‌های آلی در محل تزریق.

در روش تشکیل سامانه از راه رسوب در محلول، این رسوب می‌تواند با خارج شدن حلال [۶]، تغییر در دما [۷] یا تغییر در pH [۸] تولید شود.

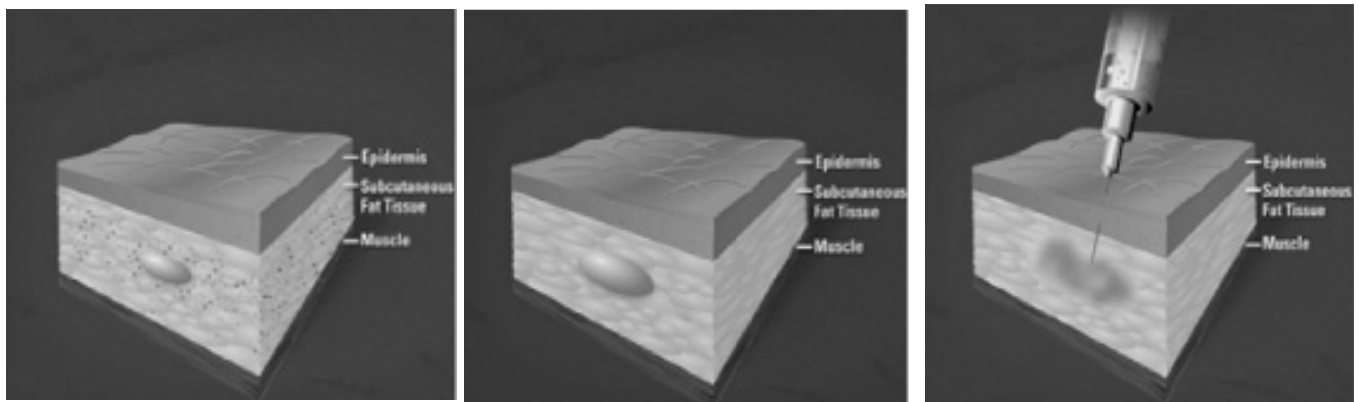
Dunn و همکاران نوعی سامانه دارورسانی از پلیمرهای زیست تخریب پذیر معرفی کردند که می‌توان از آن برای انسان و دام استفاده کرد. این سامانه‌های کاشتنی تزریقی از پلیمرهای زیست تخریب پذیر نامحلول در آب مانند پلی (D،L-لاکتید)، پلی (D،L-لاکتید-کو-ε-کاپرولاکتون) و پلی (D،L-لاکتید-کو-ε-کاپرولاکتون) تشکیل شده‌اند که در حلال زیست سازگار از نظر فیزیولوژیکی و امتزاج پذیر با آب حل می‌شود. با تزریق این سامانه به یک محیط

آبی، حلال به محیط آبی اطراف نفوذ کرده و آب به زمینه پلیمر نفوذ می‌کند. پلیمر به دلیل نامحلول بودن در آب، در تماس با آب رسوب می‌کند و یک سامانه کاشتنی پلیمری جامد تشکیل می‌دهد. حلال‌هایی که در این روش استفاده می‌شوند، شامل N-متیل-۲-پیرولیدون (NMP)، پروپیلن گلیکول، استون، دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)، تتراهیدروفوران (THF)، ۲-پیرولیدون و تری‌استین است. اما، بهترین حلال‌های ترجیح داده شده به دلیل امتیازات دارویی DMSO و NMP هستند [۹، ۱۰]. ضمن آن که NMP تأییدیه FDA را هم دارد [۱۱]. در شکل ۱ عملکرد این سامانه نشان داده شده است.

یکی از مشکلات این سامانه امکان رهایش ناگهانی دارو به ویژه در چند ساعت اولیه پس از تزریق به بدن است. چون این سامانه کاشتنی تزریقی به شکل مایع تجویز می‌شود، کاملاً معقول است که فرض شود، تأخیری بین تزریق و تشکیل کاشتنی جامد وجود دارد. در مدت زمان تأخیر، رهایش ناگهانی دارو ممکن است غلظت آن را در پلاسمای خون در مقایسه با سامانه‌های کاشتنی متداول افزایش دهد. رهایش ناگهانی دارو باعث التهاب بافت و در مواردی سمیت سامانه‌ای می‌شود. به دلیل وجود چنین پدیده‌های ناخواسته، از این سامانه‌ها فقط برای درمان‌های خاص استفاده می‌شود.

به منظور کنترل آثار رهایش ناگهانی دارو عوامل مختلفی بررسی شده‌اند. چهار عامل مهم آزمایش شده عبارتند از: غلظت پلیمر در حلال [۵]، وزن مولکولی پلیمر [۵]، حلال استفاده شده [۵] و افزودن مواد فعال سطحی [۱۲]. همه این عوامل روی سرعت رسوب کردن پلیمر اثر می‌گذارد.

پلیمر پلی (لاکتید-کو-گلیکولید) اسید (PLGA) کوپلیمر تشکیل شده از دو مونومر لاکتید و گلیکولید است که بسته به مقدار لاکتید



(ج)

(ب)

(الف)

شکل ۱- فرایند تشکیل و عملکرد سامانه‌های دارورسانی رسوب کننده در محل تزریق با خروج حلال: (الف) تزریق، (ب) تشکیل رسوب و (ج) دارورسانی.

داکسی سایکلین، به لحاظ فیزیکی پودری زرد رنگ متمایل به سبز، جاذب رطوب، حساس به نور و کاملاً محلول در آب است که از شرکت Fluka تهیه شد. پلیمر PLGA ۵۰ : ۵۰ با انتهای کربوکسیلیک اسید نوع RG 503H (Mw = ۳۸۰۰۰ Da) محصول شرکت Boehringer Ingelheim، N-متیل-۲-پیرولیدون (NMP) حلال قطبی و امتزاج پذیر در آب، محصول شرکت Riedel-deHaën، پتاسیم دی هیدروژن فسفات محصول شرکت Aldrich، سدیم کلرید، سدیم متابی سولفیت، دی سدیم هیدروژن فسفات، سدیم هیدروکسید و فسفریک اسید همگی محصول شرکت Merck بودند.

دستگاه‌ها

در این پژوهش، طیف‌نورسنج UV-Vis نوع تک‌پرتویی مدل CE-1021 از شرکت CESIL انگلیس، میکروسکوپ الکترون پوششی مدل VEGA II از شرکت TESCAN کشور چک، pH سنسج مدل MP220 از شرکت Mettler Toledo سوئیس، گرم‌خانه معمولی دمای ۳۷°C مدل STERICELL از شرکت Medcenter آلمان و گرم‌خانه خلاء مدل ۱۱، ۵۵، ۲۲ VACUCCELL از شرکت Medcenter آلمان به کار گرفته شد.

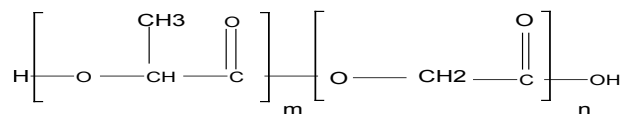
روش‌ها

تعیین و تهیه فضای انعقاد سامانه

با توجه به این که سامانه دارویی مورد نظر به شکل تشکیل شونده در محل و شامل محلول پلیمری در حلال آلی است، برای تشکیل و جامد شدن در محل نیاز به یک محیط حاوی ضدحلال قطبی دارد که این ماده آب است. حال بسته به شرایط آزمایش (آزمایشگاهی، حیوانی و انسانی) از محیط‌های انعقاد متفاوت استفاده می‌شود.

این محیط می‌تواند آب خالص، بافر، سرم اسب و مایع میان بافتی باشد. برای آزمایش در شرایط در بطن زنده (in vivo) با هدف نزدیک بودن به شرایط در آزمایشگاه (in vitro) و شرایط مایع میان بافتی بدن، از محلول بافر فسفات سالین (salin phosphate buffer, PBS) با pH برابر ۷/۴ استفاده شد.

بدین منظور، ابتدا ۲/۳۸ g دی سدیم هیدروژن فسفات، ۰/۱۹ g پتاسیم دی هیدروژن فسفات و ۸ g نمک سدیم کلرید در ۱۰۰ mL آب مقطر حل و حجم محلول به ۱۰۰۰ mL رسانده شد. سپس به کمک فسفریک اسید و سود، pH روی عدد ۷/۴ تنظیم شد. بافر مورد استفاده، با روش یاد شده در فارماکوپه بریتانیا (BP) تهیه شد [۱۶]. در مرحله بعد، با توجه به ناپایدار بودن دارو در محیط رهایش (بافر) و از بین رفتن صحت نتایج رهایش دارو در حالت ناپایداری



شکل ۲- فرمول ساختاری پلی (لاکتید-کو-گلیکولید).

نسبت به گلیکولید استفاده شده در کوپلیمر شدن، شکل‌های مختلفی از PLGA می‌تواند حاصل شود. ساختار این پلیمر در شکل ۲ نشان داده شده است.

از این پلیمرها در ساخت نخ‌های بخیه، سامانه‌های رهایش دارو، پروتزه‌های رگ خونی، ساخت داربست‌های مورد نیاز در مهندسی بافت و قطعات مخصوص شکسته‌بندی استخوان استفاده می‌شود [۱۳]. با توجه به خاصیت زیست تخریب پذیری پلیمر PLGA و قابلیت تشکیل شدن در موضع سامانه پلیمری آن، از این پلیمر به عنوان بستر رهایش دارو برای بیماری‌های پرئودنتال استفاده می‌شود. بیماری‌های پرئودنتال یا بیماری‌های لثه، جزء شایع‌ترین بیماری‌های دهان و دندان است که می‌توانند لثه و استخوان اطراف دندان را مبتلا سازند. محدودیت‌های ناشی از تجویز نظام مند آنتی بیوتیک باعث شده است، دارو درمانی به روش‌های دیگری از جمله تجویز موضعی مورد توجه قرار گیرد [۱۴]. یکی از داروهای این بیماری، داکسی سایکلین هیكلیت است که به شکل نظام مند و موضعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نوع موضعی آن به حالت ژل پلیمری حاوی داکسی سایکلین هیكلیت است که به شکل سامانه رهایش موضعی عمل می‌کند و دارو را تا مدت زمان مشخصی آزاد می‌کند. انواع موضعی این ترکیبات با وجود ویژگی‌های برتری که دارند برای درمان بیماری‌های پرئودنتال، در ایران یافت نمی‌شوند [۱۵].

در این پژوهش، سامانه تشکیل شونده در محل داروی داکسی سایکلین هیكلیت به شکل سامانه پلیمری تزریق شونده تهیه شده است. این سامانه با استفاده از حلال زیست‌سازگار و قابل اختلاط با آب، در محیط آبی مناسب (بافر فسفات سالین یا مایعات فیزیولوژیک بدن)، ساختار نیمه جامد تشکیل می‌دهد. پلیمر PLGA ۵۰ : ۵۰ با انتهای زنجیر کربوکسیلیک اسید، در غلظت‌های مختلف، برای ارزیابی اثر غلظت پلیمر بر روند رهایش دارو مورد استفاده قرار گرفته است.

تجربی

مواد

داروی داکسی سایکلین هیكلیت (هیدروکلرید) از گروه دارویی

مختلف تا ۴ روز مقدار تخریب دارو در آنها با استفاده از دستگاه UV از نوع تک پرتویی اندازه گیری شد.

آزمون رهایش دارو

برای بررسی رهایش دارو در آزمایشگاه از محلول بافر فسفات (PBS) با pH برابر با ۷/۴ به عنوان محیط رهایش استفاده شد. پیش از تزریق سامانه دارویی در محیط بافر، به منظور پایداری داروی داکسی سایکلین هیکلیت در محیط رهایش، مواد پایدار کننده با ترکیب درصد بهینه به محلول بافر اضافه شد.

برای تهیه سامانه دارویی ابتدا پلیمر PLGA نوع RG 503H در غلظت های مختلف در حلال NMP مخلوط و ترکیبات برای اختلاط کامل به مدت ۱ h در تکان دهنده قرار داده شد. محلول با هدف نزدیک بودن به شرایط در بطن زنده که ترکیبات پیش از به کارگیری در بدن، استریل می شوند، در برابر تابش گاما با دوز ۲۵ kGy قرار گرفت. سپس در ۰/۲ g از هر محلول پلیمری، ۰/۲۲ g از دارو (به شکلی که دارو ۱۰٪ ترکیب را تشکیل دهد) به طور کامل و یکنواخت مخلوط شد.

محلول های دارویی تهیه شده با سرنگ ۵ mL در ظرف های شیشه ای تیره رنگ حاوی ۲۰ mL بافر PBS تزریق شد و پس از تشکیل جامد دارویی، ظرف شیشه ای در گرم خانه با دمای ۳۷°C (دمای بدن) قرار داده شد. در زمان های مختلف، مقدار رهایش دارو با استفاده از اندازه گیری جذب UV با دستگاه تک پرتویی و مقایسه جذب با تابع درجه بندی بررسی شد. البته در هر اندازه گیری، تمام محیط بافر اطراف جامد دارویی به طور کامل تخلیه شده و با بافر جدید جایگزین شد تا شرایط آزمون به شرایط بدن نزدیک تر باشد، که مایع میان بافتی اطراف ماده تزریق شده مدام در حال جا به جایی و تازه شدن است (شرایط سینک).

تعیین تابع درجه بندی

برای تعیین غلظت دارو در محلول بافر و در شرایط رهایش، دستگاه UV به کار گرفته شد. با توجه به نتایج به دست آمده درباره اثر طول موج جذب سایر مواد موجود در محلول، دورترین طول موج نسبت به طول موج های جذب سایر مواد برای دارو در نظر گرفته شده و با جست و جوی طول موج جذب محلول دارو در بافر، طول موج بیشینه ۳۴۴ nm برای دارو به دست آمد.

با ساخت محلول ذخیره (stock) با غلظت ۱۰۰ ppm و رقیق کردن آن غلظت های مختلف به دست آمد و برای هر غلظت، مقدار جذب دارو در پیک های بیشینه اندازه گیری شد. به منظور حذف خطاهای تصادفی و بهبود صحت نتایج حاصل تعداد سه نمونه از هر

دارو در شرایط آزمایش، مقدار ناپایداری و تخریب دارو در این شرایط ارزیابی و روشی برای پایداری سازی دارو در محیط رهایش ارائه شده است.

تعیین روش تخریب داروی داکسی سایکلین هیکلیت

با این که داکسی سایکلین هیکلیت در برابر آب کافت پایدار است، اما با دو ساز و کار اکسایش و واپلیم شدن تخریب می شود. در نتیجه، این دارو در برابر عواملی که بر این دو پدیده اثرگذار هستند، مانند نور، رطوبت، pH، افزایش دما و اکسیژن ناپایدار است [۱۹-۱۷].

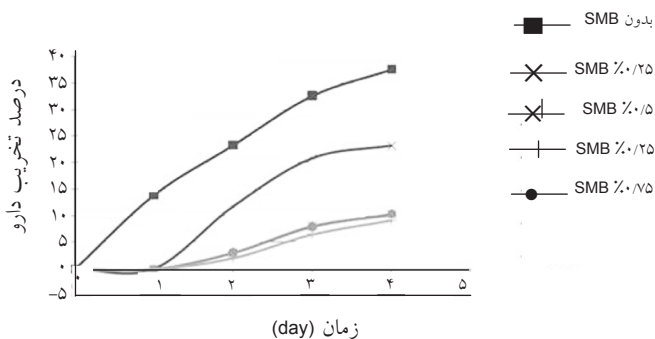
تعیین شرایط پایداری دارو در محلول

رهایش داروی داکسی سایکلین هیکلیت، در محیط بافر انجام می گیرد که محیطی آبی است و یکی از عوامل اصلی تخریب دارو تماس آن با آب است. آزمایش های رهایش دارو همگی در دمای بدن (۳۷°C) انجام می شود که نسبت به دمای محیط بیشتر بوده و تخریب دارو در آن سریع تر است. محیط رهایش دارو که در تماس با هواست، با اکسیژن هوا نیز مخلوط می شود که نقش اصلی را در اکسایش و تخریب دارو دارد. هم چنین، در شرایط معمولی محلول می تواند در معرض نور قرار گیرد که از عوامل تخریب داروست. با توجه به این مطالب و این که در شرایط مزبور پایداری دارو کاهش می یابد، شرایط لازم برای پایداری دارو شامل موارد زیر است:

- محلول بافر که دارو در آن حل می شود. پیش از قرار گرفتن دارو در آن با روش فراصوت، از اکسیژن هوا عاری می شود.
- محلول دارویی که برای بررسی رهایش دارو نگهداری می شود. این محلول در ظروفی نگهداری می شود که در برابر نور دارای محافظ است و از رسیدن نور به دارو جلوگیری می شود.
- از افزودنی های دارویی که نقش پایدارکننده و ضد اکسنده دارند، مانند سدیم متابی سولفیت استفاده شد.

اثر افزودنی سدیم متابی سولفیت (SMB)

با بررسی اثر مقدار این افزودنی پایدارکننده بر مقدار نگهداری دارو سعی شد، بهترین درصد ترکیب برای این افزودنی مشخص شود. با توجه به احتمال اثر غلظت های زیاد از افزودنی بر شکل گیری غشا و روند رهایش دارو، از کمترین غلظت ممکن با حفظ شرایط نگهداری استفاده شد. بدین منظور، محلول هایی با ترکیب درصدهای متفاوت از این افزودنی در ترکیب درصد مشخص از دارو تهیه و تمام نمونه ها در ظروفی پوشش دار برای محافظت در برابر نور در گرم خانه با دمای ۳۷°C قرار داده شدند. در زمان های



شکل ۵- اثر غلظت های مختلف افزودنی سدیم متابی سولفیت در مقدار تخریب داروی داکسی سایکلین هیکلیت در PBS و دمای ۳۷ °C

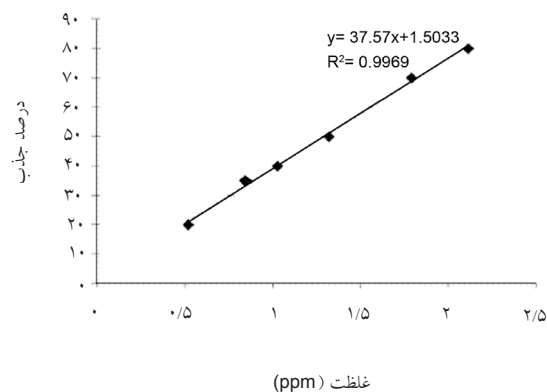
آهستگی داخل ظرف شیشه ای استوانه ای در ۲۰ mL محیط بافر قرار گرفت و در گرم خانه با دمای ۳۷ °C وارد شدند. پس از گذشت ۳ روز زمینه های پلیمری تشکیل شده، خارج و به منظور ثابت ماندن شکل شناسی بلافاصله در نیتروژن مایع قرار داده شدند. نمونه ها به مدت ۲۴ h در دمای محیط در خلاء قرار داده شدند، تا حلال و رطوبت آنها به طور کامل خارج شود. سپس، دوباره به مدت ۱۵ min در نیتروژن مایع قرار گرفته و شکسته شدند. این کار برای تهیه عکس های مناسب از مقطع عرضی سامانه ماتریسی انجام شد. پس از روکش دادن نمونه ها با طلا به کمک دستگاه میکروسکوپ الکترونی، عکس ها تهیه شدند.

نتایج و بحث

تعیین روش پایدارسازی دارو در محیط رهایش

اثر افزودنی سدیم متابی سولفیت (SMB)

با توجه به این که داروی داکسی سایکلین هیکلیت در شرایط آزمایش (انحلال در بافر، گرم خانه با دمای ۳۷ °C و اکسیژن محلول در بافر) ناپایدار است، به منظور ایجاد پایداری دارو برای اندازه گیری غلظت صحیح رهایش در بافر، از افزودنی های ضد اکسند دارویی در محیط رهایش استفاده شد. با پژوهش های انجام شده مشخص شد، سدیم متابی سولفیت افزودنی مناسبی بدین منظور است [۲۰]. طول موج بیشینه (λ_{max}) جذب برای دارو بدون افزودنی سدیم متابی سولفیت و نیز ترکیب این دو در محلول بافر اندازه گیری شد. همان طور که شکل ۴ نشان می دهد، در حالت ترکیب، پیک های دارو و افزودنی اثر خاصی از یک دیگر نگرفته اند. در ضمن، با توجه به دور بودن پیک افزودنی با پیک مورد نظر دارو (که مقدار متوسط

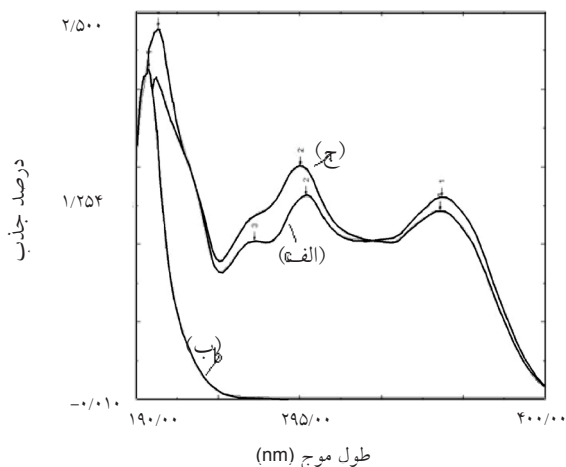


شکل ۳- تابع درجه بندی داکسی سایکلین هیکلیت در بافر فسفات سالیین (PBS).

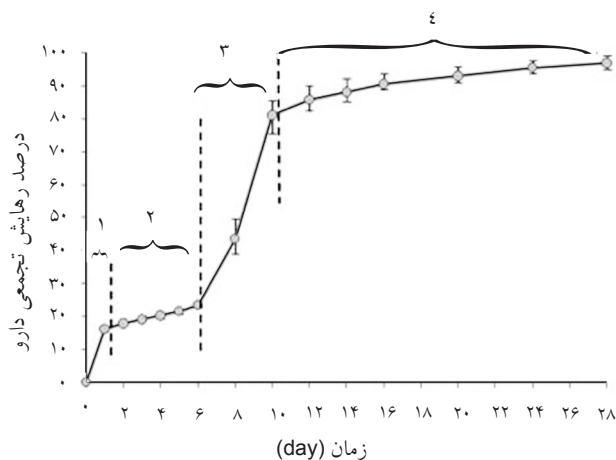
غلظت دارو تهیه شد. بدین ترتیب، نمودار غلظت بر حسب مقدار جذب داکسی سایکلین هیکلیت در محلول بافر فسفات (PBS) با pH برابر ۷/۴ به دست آمد. تابع درجه بندی بر اساس نتایج اندازه گیری جذب ها برای غلظت های مختلف دارو، در شکل ۳ نیز نشان داده شده است.

بررسی ساختار غشا با میکروسکوپ الکترونی

برای انجام مطالعات شکل شناسی، آزمون میکروسکوپی الکترونی برای بررسی ساختارهای سطحی و عمقی زمینه های پلیمری انجام شد. در مطالعات شکل شناسی دست یابی به سطح بکر و مقطع عرضی دست نخورده ضروری است. برای تهیه نمونه ها و گرفتن عکس میکروسکوپ الکترونی، مقدار ۰/۱ g از فرمول بندی های مختلف در بافر PBS تزریق شده و پس از شکل گیری کامل، به



شکل ۴- طیف های UV: (الف) محلول حاوی ۵۰ ppm داکسی سایکلین هیکلیت، (ب) محلول حاوی ۵۰ ppm از SMB و (ج) محلول حاوی ۴۰ ppm داکسی سایکلین هیکلیت و ۵۰ ppm از SMB.



شکل ۶- منحنی رهایش دارو از سامانه با ترکیب داکسی سایکلین هیکلیت: PLGA: NMP با نسبت وزنی ۱۰:۲۷:۶۳.

تزریق پذیری (syringability) و شکل پذیری، در سه غلظت پلیمری ۲۲/۵، ۲۷ و ۳۶٪ تهیه شد و آزمون رهایش طبق روش شرح داده شده انجام شد. در جدول ۱ اجزای مختلف و درصد مواد موجود در هر فرمول بندی مشخص شده است.

در این سامانه‌ها، پدیده رهایش ناگهانی، زمان آزادسازی کامل و نیز روند رهایش دارو مورد ارزیابی قرار گرفته است. در شکل ۶ روند رهایش کلی این فرمول بندی‌ها نشان داده شده است. در این شکل، منحنی رهایش از یکی از نمونه‌ها شامل پلیمر 503H با غلظت ۲۷٪ نشان داده شده است. براساس این شکل، روند رهایش دارو از سامانه تزریقی تشکیل شونده در محل از چهار مرحله تشکیل شده است. در فاز اول، رهایش ناگهانی دارو، در فاز دوم شکل‌گیری زمینه پلیمری، در فاز سوم تخریب پلیمر و در فاز چهارم یا فاز تخلیه (تهی شدن سامانه از دارو) به وقوع می‌پیوندد. البته این الگوی رهایش در هر سه غلظت پلیمر یکسان است.

مرحله رهایش ناگهانی دارو، مرحله اول است که در تمام سامانه‌های تزریقی مشاهده می‌شود. علت امر احتمالاً این است که این نوع سامانه‌های تزریقی به حالت محلول در داخل محیط رهایش قرار می‌گیرند و طی مدت جامد شدن سامانه، آزادسازی دارو به سرعت و به آسانی انجام می‌شود. در این مرحله، مقدار قابل توجهی

اندازه‌گیری شده برای آن (۳۴۴ nm است)، اثری بر طول موج بیشینه و نتایج مشاهده شده برای مقایسه با تابع درجه بندی که بر اساس λ_{max} و جذب داروی داکسی سایکلین هیکلیت در محیط بافر در نظر گرفته شده، نمی‌توان قائل شد.

همان طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، محلول حاوی داکسی سایکلین هیکلیت، پیک‌های ۳۴۶ و ۲۷۴/۲ nm را نشان می‌دهد، در حالی که محلول حاوی ۵۰ ppm سدیم متابی سولفیت λ_{max} برابر با ۱۹۶/۴ nm دارد. این دور بودن پیک‌های جذب دلیلی بر اثر ناچیز بر پیک جذب دارو در مجاورت افزودنی است. این مسئله در طیف مربوط به محلول حاوی ۴۰ ppm داکسی سایکلین هیکلیت و ۵۰ ppm از SMB با پیک‌های ۳۴۶/۸، ۲۷۷/۲ و ۲۰۱/۲ nm مشاهده می‌شود.

در ادامه، جذب دارو در λ_{max} آن (۳۴۴ nm) در غلظت ثابت از دارو (۵۵/۲ ppm) و غلظت‌های مختلف پایدارکننده سدیم متابی سولفیت اندازه‌گیری و نسبت به جذب نمونه شاهد مقایسه شد. نمونه شاهد شامل دارو و حلال است و هیچ افزودنی برای آن در نظر گرفته نشده است تا مقدار تخریب بدون وجود پایدارکننده ارزیابی شود. با توجه به این که جذب UV به طور مستقیم نشان دهنده مقدار غلظت داروست، از این داده‌ها می‌توان برای تعیین درصد تخریب دارو استفاده کرد که این نتایج در نمودار شکل ۵ نشان داده شده‌اند.

ارائه روش پایدارسازی دارو

با توجه به نمودارها می‌توان نتیجه گرفت، گاززدایی محلول و افزودن ۱٪ افزودنی سدیم متابی سولفیت به محلول محتوی دارو در شرایط رهایش (دمای ۳۷ °C و دور از نور) می‌تواند مناسب‌ترین شرایط برای اندازه‌گیری مقدار رهایش داروی داکسی سایکلین هیکلیت در محیط رهایش با حفظ پایداری دارو باشد.

مطالعه رهایش کنترل شده دارو

روند کلی رهایش: برای بررسی رهایش داروی داکسی سایکلین هیکلیت از زمینه پلیمری، فرمول بندی‌ها با در نظر گرفتن شرایط

جدول ۱- اجزای مختلف و درصد مواد موجود در هر فرمول بندی.

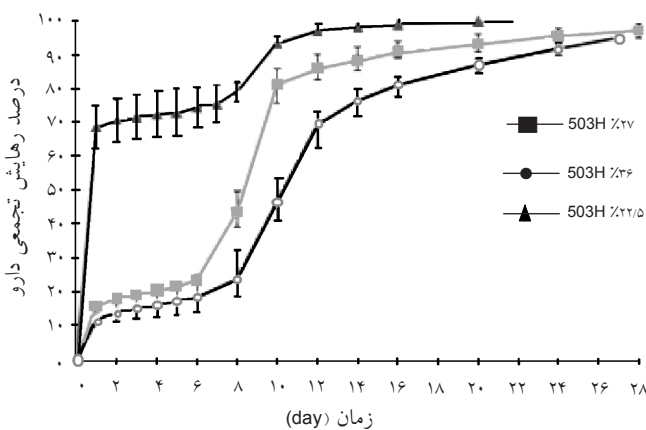
تعداد	دارو		حلال NMP		پلیمر PLGA (RG 503H)		فرمول بندی
	مقدار (mg)	درصد (w/w)	مقدار (mg)	درصد (w/w)	مقدار (mg)	درصد (w/w)	
۳	۲۰	۱۰	۱۰۸	۵۴	۷۲	۳۶	۱
۳	۲۰	۱۰	۱۲۶	۶۳	۵۴	۲۷	۲
۳	۲۰	۱۰	۱۳۵	۶۷,۵	۴۵	۲۲,۵	۳

به منظور بررسی عوامل مختلف اثرگذار بر نحوه رهایش شامل غلظت پلیمر در سامانه‌ها، اثر این عامل بر رهایش ناگهانی و رهایش کلی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

بررسی اثر غلظت پلیمر

بر اساس منحنی‌های شکل ۷، در غلظت‌های ۲۲/۵، ۲۷ و ۳۶٪ رهایش دارو برای غلظت‌های مختلف با هم مقایسه شده‌اند. مطابق شکل ۷، با افزایش غلظت پلیمر، رهایش ناگهانی کاهش یافته و زمان کلی آن نیز افزایش می‌یابد. مقدار رهایش ناگهانی، بیشتر مربوط به آزادسازی دارو از سطح به واسطه جا به جایی حلال با ضدحلال و در کنار آن شکل‌پذیری اولیه سامانه است. افزایش غلظت پلیمر باعث افزایش گرانیوی محلول پلیمری می‌شود. این افزایش گرانیوی، باعث کاهش سرعت خروج حلال و در نتیجه کاهش سرعت شکل‌گیری سامانه می‌شود که خود موجب فشرده‌تر شدن و کاهش تخلخل توده زمینه و تخلخل سطح غشای در حال تشکیل می‌شود. این دو مسئله موجب می‌شود که رهایش ناگهانی، با افزایش غلظت پلیمر به شدت کاهش یابد. کاهش تخلخل سطحی در اثر افزایش غلظت پلیمر برای دو غلظت ۲۷ و ۳۶٪ در تصاویر SEM مربوط به شکل‌شناسی سطح غشاهای تشکیل شده در شکل ۸ نشان داده شده است.

همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت پلیمر، زمان رهایش کلی افزایش می‌یابد. افزایش غلظت پلیمر در سامانه سبب افزایش گرانیوی و کاهش آب‌دوستی محلول و در نتیجه کاهش سرعت خروج حلال از آن می‌شود. با کند شدن سرعت خروج حلال، زمان برای تشکیل زمینه‌ای مستحکم‌تر و با خلل و



شکل ۷- منحنی‌های رهایش دارو از سامانه‌های با ترکیب داکسی سائیکلین هیكلیت: PLGA:NMP و با نسبت‌های وزنی ۱۰:۵۴:۳۶، ۱۰:۶۳:۲۷ و ۱۰:۶۷:۲۲/۵.

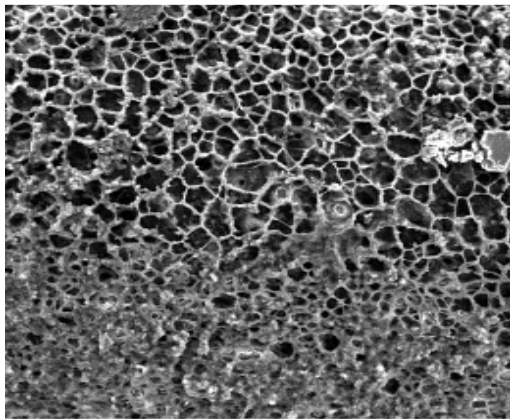
از دارو با سرعت زیاد آزاد می‌شود. این مرحله در واقع مرحله شست و شوست که تمام داروهای سطحی و قابل دسترس به کمک محیط آبی اطراف شسته شده و با سرعت زیاد از حفره‌ها و کانال‌های موجود در زمینه پلیمر به محیط آبی رانده می‌شود. این پدیده با ایجاد حفره‌های سطحی و حفره‌های در زمینه پلیمر در اثر تشکیل سریع غشا با جا به جا شدن حلال و ضدحلال مشاهده می‌شود.

مرحله دوم در رهایش دارو از سامانه‌ها، مرحله توقف رهایش ناگهانی در آزادسازی دارو و روند آرام رهایش داروست. در این مرحله ساز و کار خروج دارو بر اساس نفوذ است. اما، با توجه به این که بخش زیادی از دارو در مرحله اول شسته شده است، در این مرحله، داروهایی که درگیر نیستند و قابل دست‌یابی هستند، با ساز و کار نفوذ آزاد شده و همراه حلال با سرعت کم و تقریباً ثابتی از تخلخل‌ها و کانال‌ها عبور کرده و وارد محیط رهش می‌شوند.

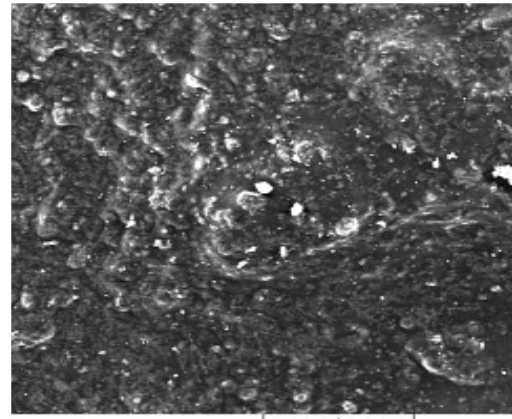
پس از مرحله دوم، مرحله آزادسازی داروهایی است که در زمینه پلیمری به دام افتاده‌اند. در این مرحله، داروهای عمقی به علت تخریب پلیمر و شکسته شدن پیوندهای استری و تولید اولیگومرها و مونومرها آزاد شده و همراه با جریان بافر وارد محیط رهش می‌شوند. در این مرحله نیز سرعت آزادسازی دارو به طور ناگهانی افزایش می‌یابد. لازم به ذکر است، بین این مراحل نمی‌توان مرز مشخصی معین کرد، بدین معنی که پس از شروع آزمایش، پلیمر به تدریج شروع به تخریب می‌کند، ولی بیشترین نمود را پس از مرحله دوم نشان می‌دهد. پدیده نفوذ در مرحله سوم نیز ادامه خواهد داشت.

آستانه و همکاران در پژوهشی نشان دادند، وزن مولکولی پلیمر با افت pH و آزادسازی لاکتیک اسید در محیط رهایش (به عنوان محصولات تخریب) ارتباط دارد. در نمودارهای مربوط به افت pH و رهایش لاکتیک اسید، مشخص شد که افت شدید pH و رهایش شدید لاکتیک اسید در زمانی رخ می‌دهد که مرحله سوم رهایش دارو که همان آغاز تخریب زیاد پلیمر است، شروع می‌شود [۲۱]. در مرحله آخر پس از خروج ناگهانی داروهای عمقی بر اثر تخریب پلیمر، داروهای باقی‌مانده خارج می‌شوند. مرحله آخر وابسته به غلظت داروست. در این مرحله غلظت دارو به اندازه‌ای کم می‌شود که حتی با وجود تخریب پلیمر، سرعت آزادسازی دارو خیلی کم است و نسبت تغییرات در رهایش دارو نسبت به زمان بسیار کند می‌شود.

چنین روند چهارمرحله‌ای در رهایش دارو از سامانه‌های تشکیل شونده در محل، در پژوهش آستانه و همکاران در نیم‌رخ‌های رهایش لوپرلاید استات از سامانه‌های متشکل از پلیمر PLGA انواع RG 502H و RG 504H نیز مشاهده شده است [۲۲].



(ب)



(الف)

شکل ۸- شکل شناسی سطحی نمونه‌های تهیه شده از سامانه‌های با غلظت‌های متفاوت پلیمر سه روز پس از ماندگاری در محیط رهایش: (الف) فرمول‌بندی با غلظت ۳۶٪ و (ب) فرمول‌بندی با غلظت ۲۷٪ (بزرگ‌نمایی ۳۰۰X).

را طراحی کردند و یکی از پارامترهای مورد بررسی را تغییر غلظت پلیمر قرار دادند [۲۳].

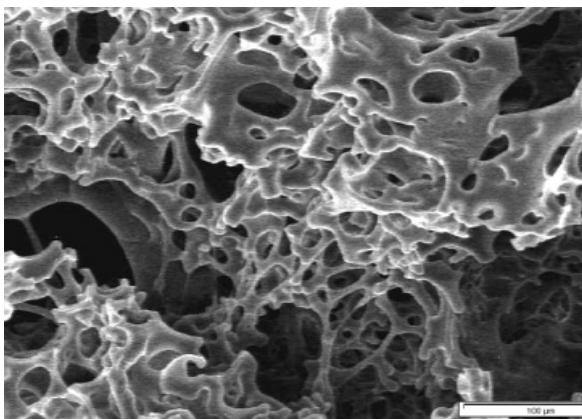
در این پژوهش مشخص شد، افزایش غلظت پلیمر از ۴۰ به ۵۰٪، مقدار رهایش را کاهش می‌دهد. علت این مسئله کاهش سرعت جدایی فاز مایع- مایع در اثر افزایش غلظت پلیمر بیان شده است، زیرا با کاهش شدت نفوذ آب، سامانه از فضای دوگره‌ای دور می‌شود. البته دقیقاً نمی‌توان معین کرد، چه چیزی باعث کاهش شدت نفوذ آب شده است، زیرا افزایش غلظت پلیمر آثار زیادی را منجر می‌شود که شامل کاهش ضرایب نفوذ سامانه، ضخیم شدن پوسته و افزایش آب‌گریزی محلول است و همه این پدیده‌ها می‌تواند در دینامیک مسئله نقش داشته باشند.

هم‌چنین، افزایش غلظت پلیمر باعث تبدیل حالت انگشتی به

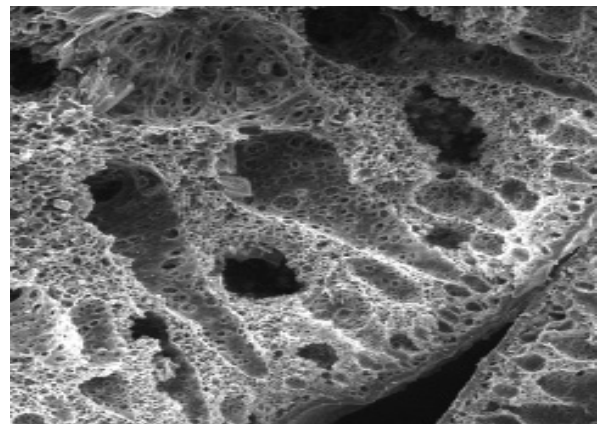
فرج کمتر فراهم می‌شود. در این شرایط سرعت نفوذپذیری آب و تخریب پلیمر کاهش می‌یابد. وجود حفره‌های کمتر در سامانه باعث افزایش فاصله نفوذ دارو، کاهش سطح انتقال جرم و کاهش سرعت رهایش دارو از آن می‌شود. در واقع می‌توان گفت، رهایش کلی دارو به مقدار قابل توجهی تابع شکل توده غشاست.

در شکل ۹ شکل شناسی عمقی برای دو غلظت مختلف نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت پلیمر، شکل غشا فشرده‌تر و از حالت انگشتی شکل به حالت اسفنجی شکل تبدیل شده است.

Graham و همکاران برای تعیین چگونگی اثر تغییر فرمول‌بندی‌ها بر دینامیک جدایی فاز و مشخصات رهایش دارو، سامانه دارورسانی بر پایه PLGA Resomer 502 ($M_w = 10000$) و پروتئین لیزوزیم



(ب)



(الف)

شکل ۹- شکل شناسی عمقی نمونه‌های تهیه شده از سامانه‌های با غلظت‌های مختلف پلیمر سه روز پس از ماندگاری در محیط رهایش: (الف) فرمول‌بندی با غلظت ۲۷٪ و (ب) فرمول‌بندی با غلظت ۳۶٪ (بزرگ‌نمایی ۲۰۰X).

و کاهش سرعت خروج حلال، ساختار غشایی در سطح و توده سامانه متراکم تر شده، رهایش ناگهانی کاهش و زمان رهایش کلی افزایش می یابد.

هم چنین، شکل شناسی غشا نیز فشرده تر شده و از حالت انگشتی به حالت اسفنجی تبدیل می شود. این فشرده شدن شکل شناسی، در تصاویر SEM تهیه شده از نمونه ها تأیید می شود. در نهایت می توان به این نکته اشاره کرد، غلظت پلیمر عامل بسیار مؤثری بر روند رهایش داروست که با کنترل آن می توان به شرایط مطلوب و کنترل شده رهایش دارو در محیط مورد نظر دست یافت. به دلیل ناپایداری بودن داروی داکسی سایکلین هیكلیت، در محیط رهایش برای صحت اندازه گیری غلظت دارو، استفاده از پایدار کننده ها در کنار شرایط پایدارسازی ضرورت دارد. در این پژوهش، استفاده از افزودنی سدیم متابی سولفیت همراه با محافظت محیط رهایش در برابر نور و گاززدایی محلول بافر، به عنوان بهترین راه برای پایدار سازی دارو مشخص شد.

اسفنجی شده است که چنین نتایجی در پژوهش حاضر و تصاویر SEM مشاهده شده است.

نتیجه گیری

پلیمر پلی (لاکتید-کو-گلیکولید) ۵۰:۵۰ در حلال NMP، در نوع 503H در تمام غلظت های بین ۲۲/۵ تا ۳۶٪ برای تهیه سامانه تشکیل شونده در محل برای داروی داکسی سایکلین هیكلیت از نظر شکل پذیری و تزریق پذیری مناسب است. این سامانه ترکیب مناسبی برای درمان موضعی بیماری های پریدنتال محسوب می شود که مربوط به بیماری های لثه و استخوان های اطراف دندان است. برای انتخاب ترکیب درصد مناسب نتایج با نتایج در بطن زنده مقایسه شد. نتایج این پژوهش نشان می دهد، غلظت پلیمر عاملی تعیین کننده در کنترل رهایش ناگهانی و زمان آزادسازی داروست. با افزایش غلظت در وزن مولکولی ثابت، به دلیل افزایش گرانی

مراجع

- Heller J., Polymers for Controlled Parental Delivery of Peptides and Proteins, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **10**, 163-204, 1993.
- Reddy K.R., Controlled Release, Pegylation, Liposomal Formulations: New Mechanisms in the Delivery of Injectable Drugs, *Ann. Pharmacother.*, **34**, 915-922, 2000.
- Tipton A.J., and Dunn R.L., *Sustained Release Injectable Products*, InterPharm, Denver, CO, 2000.
- Levy R.J., Vinod L., Strickberger S.A., Underwood T., and Davis J., Controlled Release Implant Dosage forms for Cardiac Arrhythmias., *Drug Deliv.*, **3**, 137-142, 1996.
- Lambert W.J. and Peck K.D., Development of an In Situ Forming Biodegradable Poly-lactide-co-glycolide System for the Controlled Release of Proteins, *J. control. Rel.*, **33**, 189-195, 1995.,
- Shah N.H., Railkar A.S., Chen F.C., Tarantino R., Kumer S., Murjani M., Palmer D., Infeld M.H., and Malic A.W., A Biodegradable Injectable Im-
- plant for Delivering Micro and Macromolecules Using Poly(lactic-co-glycolic) Acid Copolymers, *J. control. Rel.*, **27**, 139-147, 1993.
- Jeong B., Bae Y.H., and Kim S.W., In-situ Gelation of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer Aqueous Solutions and Degradation thereof, *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 171-177, 2000.
- Siegel R.A. and Firestone B.A., pH-Dependent Equilibrium Swelling Properties of Hydrophobic Polyelectrolyte Copolymer Gels, *Macromolecules*, **21**, 3254-3259, 1988.
- Dunn R.L., Biodegradable In-Situ Forming Implants and Methods of Producing the Same, *US Pat. 4938763*, 1990.
- Dunn R.L., Tipton A.J., Southard G.L., and Rogers J.A., Biodegradable Polymer Composition, *US Pat. 5599552*, 1997.
- Royals M.A., Fujuta S.M., Yewwey G.L., Rodriguez J., Schultheiss P.C., and Dunn R.L., Biocompatibility of a Biodegradable In-Situ Forming Implant System in Rhesus Monkeys,

- J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 231-239, 1999.
12. Chandrashekar B.L., Controlled Release Liquid Delivery Compositions with Low Initial Drug Burst, *US Pat.*, 6143314, 2000.
 13. Darestani Farahani T., Entezami A.A., Mobedi H., and Abtahi M., Degradation of Poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50 Implant in Aqueous Medium, *Iran. Polym. J.*, **14**, 753-763, 2005.
 14. Weinberg M.A. and Bral M., Tetracycline and its Analogues: a Therapeutic Paradigm in Periodontal Disease, *Crit Rev. Oral Biol. Med.*, **9**, 322-332, 1998.
 15. Amooian B., Vahdat M., and Moghadam Nia A.A., Evaluation of Clinical Effects of Local form of Doxycycline Gel with Scaling/Root Planning (SRP) in Treatment of Adult Periodontitis, *J. Med. Sci. (Babol University)*, **6**, 2004.
 16. British Pharmacopoeia, 3, Appendix ID A110, 1999.
 17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 4th ed., Approved Standard NCCLS Document M2-A4, 10, No. 7 NCCLS, Villanova, PA, April 1990.
 18. Haerdi-Landerer M.C., Suter M.M., Steiner A., Wittenbrink M.M., Pickl A. and Gande B.A., In Vitro Cell Compatibility and Antibacterial Activity of Microencapsulated Doxycycline Designed for Improved Localized Therapy of Septic Arthritis, *J. Antimicrob. Chemother.*, **61**, 332-340, 2008.
 19. Rade I., Vukosava D.M., and Branislava S., Thermostability Testing and Degradation Profiles of Doxycycline in Bulk, Tablets, and Capsules by HPL, *J. Chromatograph. Sci.*, **45**, 623-628, 2007.
 20. Rowe R.C., Sheskey P.J., and EQuinn M., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed., Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.
 21. Astaneh R., *Preparation of an In Situ Forming Drug Delivery System and Reduction of Burst Release of a Model Peptide from this system*, School of Pharmacy, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Master Thesis, 2006.
 22. Astaneh R., Moghimi H.R., Erfan M., and Mobedi H., Formulation of an Injectable Implant for Peptide Delivery and Mechanistic Study of the Effect of Polymer Molecular Weight on its Release Behavior, *DARU (in Persian)*, **14**, 2, 2006.
 23. Graham P.D., Brodback K.J., and McHugh A.J., Phase Inversion Dynamics of PLGA Solutions Related to Drug Delivery, *J. Control. Rel.*, **58**, 233-245, 1999.