

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE
Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte
Vispārējās ķīmijas tehnoloģijas katedra

Dagnija LOČA
Materiālzinātnes doktora programmas doktorante

**ŪDENĪ ŠĶĪSTOŠU HIDRAZĪNIJA BETAĪNU
IEKAPSULĒŠANAS METODES UN IEGŪTO
PRODUKTU ĪPAŠĪBAS**

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskie vadītāji:
Dr.hab.chem., profesors I.KALVIŅŠ
Dr.sc.ing., profesore L.BĒRZIŅA-CIMDIŅA

Rīga 2009

UDK 615.275(043.2)
Lo-080 ū

Loča D. Ūdenī šķīstošu hidrazīnija betaīnu iekapsulēšanas metodes un iegūto produktu īpašības. Promocijas darba kopsavilkums.- R.:RTU,2009.-26 lpp.

| Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu Nacionālās programmas „Atbalsts doktorantūras programmu īstenošanai un pēcdoktorantūras pētījumiem” projekta „Atbalsts RTU doktorantūras attīstībai” ietvaros ar A/S “Grindeks” atbalstu.

ISBN



**PROMOCIJAS DARBS
IZVIRZĪTS RĪGAS TEHNISKĀS UNIVERSITĀTES
INŽENIERZINĀTŅU
DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI**

Promocijas darbs inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2009. gada Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Āzenes ielā 14/24, 271. auditorijā.

OFICIĀLIE OPONENTI

Profesors, Dr.habil.sc.ing. Mārtiņš Kalniņš
Polimērmateriālu institūts, Rīgas Tehniskā universitāte

Dr.med. Ilmārs Stonāns
Jauno produktu attīstības nodaļas vadītājs, AS "Grindeks"

Dr.chem. Solveiga Grīnberga
Vadošais pētnieks, Latvijas Organiskās sintēzes institūts

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi doto promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs nav iesniegts nevienā citā universitātē zinātniskā grāda iegūšanai.

Dagnija Loča

Datums:

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā, satur ievadu, literatūras apskatu (3 nodaļas), eksperimentālo daļu (3 nodaļas), rezultātus un to izvērtējumu (10 nodaļas), secinājumus, izmantotās literatūras sarakstu un pielikumus. Promocijas darba saturs izklāstīts uz 129 lappusēm. Darbs satur 78 attēlus, 19 tabulas un izmantotās literatūras sarakstu, kas ietver 133 literatūras avotus.

PATEICĪBA

Izsaku pateicību promocijas darba zinātniskajiem vadītājiem profesorei, Dr.sc.ing. Līgai Bērziņai-Cimdiņai un profesoram, Dr.hab.chem. Ivaram Kalviņam par sapratni, atbalstu un neizmērojamu uzticību. Paldies par objektīvu darba kritiku un vērtīgajiem padomiem.

Vēlos izteikt visdziļāko pateicību promocijas darba konsultantam Dr.chem. Osvaldam Pugovičam par prasmi atrast laiku, lai apspriestu aktuālākos jautājumus, atrisinātu zinātniski nozīmīgas un sarežģītas problēmas, kā arī morālu un praktisku atbalstu promocijas darba izstrādes laikā.

Paldies Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītājai Dr.pharm. Maijai Dambrovai un laboratorijas kolektīvam par dzīvnieku eksperimentu veikšanu.

Liels paldies Organiskās sintēzes Bioloģiski aktīvo savienojumu laboratorijas darbiniekiem, RTU Rīgas Biomateriālu Inovāciju un Attīstības centra darbiniekiem un VĶT katedras kolektīvam par atbalstu un palīdzību visus šos gadus.

Liels paldies M.sc.ing. Veltai Tupureinai par palīdzību DSC pētījumu veikšanā, kā arī zinātnisko konsultāciju sniegšanā.

Vissirsnīgākais paldies manam vīram un dēlam par izturību, sapratni, ticību un iedvesmu.

DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte. Farmaceutiskais preparāts mildronāts (3-(2,2,2-trimetilhidrazīnī)propionāts) ir a/s Grindeks oriģinālprodukts. Preparāta pieprasījums ir sasniedzis ievērojamus pārdošanas apjomus kā Baltijas, tā arī Krievijas, Ukrainas, Austrumu un Rietumu valstu zāļu tirgos (apgrozījums tiek vērtēts ap 100 miljoniem ASV dolāru).

Mildronāta aktīvā viela strauji uzsūc mitrumu, kas izvirza papildus prasības iepakojuma hermētiskumam un uzglabāšanas apstākļiem. Ūdeni necaurļaidīga pārklājuma izmantošana, iespējams, varētu šos trūkumus mazināt vai novērst.

Literatūras datu analīze ļauj secināt, ka līdz šim praktiski nav pētītas zem molekulu augsti higroskopisku (šķīdība ūdenī $\geq 2\text{g/ml}$) vielu mikroiekapsulēšanas iespējas, it īpaši, ja aktīvās vielas saturam mikroiekapsulās un iekapsulēšanas efektivitātei jābūt maksimāli augstiem ($\geq 50\%$).

Mildronātam līdz šim nav izstrādāta mikroiekapsulēta forma, tāpēc **darba mērķis** bija izstrādāt laboratorijas metodiku mildronāta iekapsulēšanai un izpētīt iegūto produktu fizikālās īpašības.

Mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši **uzdevumi**:

- noskaidrot būtiskos parametrus, kas ietekmē mikroiekapsulēta mildronāta iegūšanu un, izvērtējot iegūtos rezultātus, izstrādāt laboratorijas metodiku aktīvās vielas mikroiekapsulēšanai;
- izstrādāt analīzes metodes iegūto produktu īpašību novērtēšanai;
- noskaidrot mikroiekapsulēšanas ietekmi uz mildronāta biopieejamību un izdalīšanos kuņģa sulā;
- izvērtēt un salīdzināt mikroiekapsulēto preparātu un šobrīd ražotās aktīvās vielas higroskopiskumu.

Izvirzītie darba uzdevumi radīja nepieciešamību izstrādāt trīs jaunas analītiskās metodes – metodi preparātu šķīšanas profila kontrolei, metodi mildronāta satura noteikšanai mikroiekapsulās un metodi, kas ļauj kontrolēt mildronāta līmeni asins plazmā un citās bioloģiskās matricās.

Darba zinātniskā nozīmība un novitāte. Pirmo reizi izstrādāta mikroiekapsulēta mildronāta forma, kas samazina aktīvās vielas higroskopiskumu. Izmantojot izstrādātās mikroiekapsulēšanas metodes, iegūti mikroiekapsulēti preparāti, kuros aktīvās vielas saturs atrodas robežās

no 40% līdz 80% no kopējās mikrokapsulu masas un mildronāta iekapsulēšanas efektivitāte sasniedz 60%.

Konstatēts, ka aktīvās vielas izdalīšanos no mikrokapsulām *in vivo* nosaka polimēra matricas ietekme. Ja mildronāts no pašreiz tirgū pieejamās gatavās zāļu formas maksimālo koncentrāciju trušu asins plazmā sasniedz pēc 2h no perorālās ievadīšanas brīža, tad polistirola matricā iekapsulēta mildronāta gadījumā aktīvās vielas koncentrācijas maksimums trušu asins plazmā novērojams 8h līdz 10h pēc ievadīšanas.

Darba gaitā pierādīts, ka mikroiekapsulēšanas procesa parametri ietekmē ne tikai aktīvās vielas kopējo saturu mikrokapsulās un iekapsulēšanas efektivitāti, bet arī mikrokapsulu morfoloģiju, iekšējo struktūru un granulometrisku sastāvu.

Darba aprobācija. Par darba rezultātiem ziņots trīs starptautiskajās konferencēs: *Posteris RTU 49. starptautiskajā zinātniskajā konferencē*, Rīga, Latvija, **2008**, *Posteris 3rd International Conference "Smart Materials, Structures and Systems"*, Akriāle, Sicīlija, Itālija, **2008**, *referāts 14th Nordic – Baltic Conference on Biomedical Engineering and Medical Physics – NBC-2008*, Rīga, Latvija, **2008**.

Svarīgākie darba zinātniskie rezultāti izklāstīti 5 publikācijās (skat. nodaļu „PUBLIKĀCIJAS UN KONFERENČU TĒZES”).

LITERATŪRAS APSKATS

Izvērtējot literatūras apskatu, konstatēts, ka aktīvās vielas iekapsulēšana polimēra matricā ir viena no progresīvākajām metodēm kontrolētu zāļu piegādes sistēmu izveidē. Šādas sistēmas ne tikai nodrošina modificētu zāļu izdalīšanos, bet arī aizsargā iekapsulēto materiālu pret oksidēšanos un mitrumu (īpaši svarīgi higroskopiskām aktīvām vielām). Lai gan mikroiekapsulēšanas procesi ir labi izpētīti, tomēr daļiņu veidošanās mehānisms ir diezgan sarežģīts un to ietekmē daudzi procesa parametri, tāpēc mainīgo ietekme uz sistēmu ir jānosaka un jāoptimizē eksperimentāli katrai aktīvās vielas un polimēra kombinācijai atsevišķi.

Mikrodaļiņas iegūst izmantojot dažādas mikroiekapsulēšanas tehnoloģijas, tomēr vairums mikroiekapsulēšanas procesu ir trīs iekapsulēšanas pamattehnoloģiju - organiskās fāzes atdalīšana, žāvēšana izsmidzinot un šķīdinātāja aizvadišana - modifikācijas.

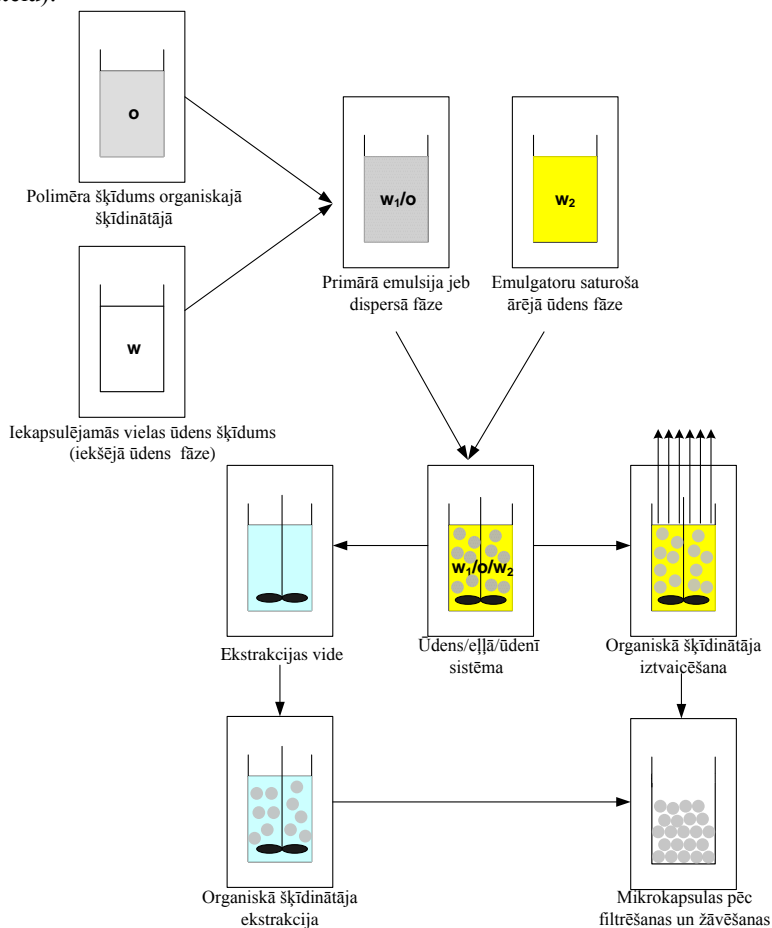
Vecākais un, iespējams, visizplatītākais mikroiekapsulēšanas paņēmiens ir organiskās fāzes atdalīšanas metode. Koacervācijas metodēm ir raksturīga plaša organiskā šķīdinātāja izvēle, bet nepieciešams liels daudzums organisko komponentu, kurus grūti aizvadīt no gala produkta, kā arī šī tehnoloģija nav piemērota mikrometru diapazona izmēru daļiņu iegūšanai.

Žāvēšanu izsmidzinot parasti izmanto ķīmijas, farmācijas un pārtikas rūpniecībā. Salīdzinot ar koacervācijas un emulģēšanas metodēm, žāvēšana izsmidzinot ir ātrs un nepārtraukts process. Tas ir mazāk atkarīgs no aktīvās vielas un polimēra šķīdības parametriem, kā arī dod iespēju neizmantojot organiskos šķīdinātājus. Tomēr procesa laikā mikrodaļiņām ir tieksme aglomerēties, kā arī temperatūra, kas nepieciešama, lai izžāvētu daļiņas, pārsniedz 100°C.

Emulģēšanas jeb šķīdinātāja iztvaicēšanas/ekstrakcijas metožu galvenās priekšrocības ir iespēja iekapsulēt hidrofilas aktīvās vielas vai arī aktīvo vielu ūdens šķīdumus izmantojot ļoti maigus apstrādes apstākļus, tajā pašā laikā sasniedzot augstu aktīvās vielas iekapsulēšanas efektivitāti un mikrodaļiņu iznākumu.

Emulģēšanas metodes dalās trīs grupās – „ūdens-eļļa”, „eļļa-eļļa”, „ūdens-eļļa-ūdenī”. Tā kā divas pirmās grupas ir vairāk piemērotas ūdenī nešķīstošu vai daļēji šķīstošu aktīvo vielu mikroiekapsulēšanai, tad darbā pētīta metode „ūdens-eļļa-ūdenī”. Saskaņā ar šo metodi iekapsulējamo vielu izšķīdina ūdenī (iekšējā ūdens fāze, w_1 fāze) un iegūto šķīdumu disperģē polimēru saturošā organiskā šķīdinātājā. Pagatavoto maisījumu (dispersā fāze jeb w_1/o fāze) disperģē ūdens fāzē, kas satur emulgatoru, tādējādi iegūstot “ūdens-eļļa-ūdenī” sistēmu ($w_1/o/w_2$ emulsija). Organisko

šķīdinātāju no sekundārās emulsijas aizvada vai nu iztvaicējot vai ekstrahējot, kā rezultātā rodas mikrokapsulas, kuras filtrē un žāvē (skat. 1. attēlu).



1.att. Mikroiekapsulēšanas metodes “ūdens-eļļā-ūdenī” principiālā shēma

Mikroiekapsulēšana ir process, kura rezultātā iegūst aktīvo vielu un polimēru saturošas mikrodaļiņas. Visbiežāk ar terminu „mikrodaļiņa” saprot

daļiņas, kuru izmēri atrodas intervālā no 1 μm – 2mm. Visas mikrodaļiņas iedalās divās pamatgrupās: mikrokapsulās, kas sastāv no vismaz viena aktīvās vielas domēna, kas apņemts ar polimēra apvalku un mikrosfērās, kas tiek definētas kā mikroporaina matricas sistēma, kurā aktīvā viela ir vienmērīgi disperģēta polimēra matricā.

Iegūto mikrokapsulu īpašību pētīšanai izmanto sekojošas metodes:

- gaismas mikroskopiju: iespējams noteikt mikrokapsulu formu, daļiņu izmēru sadalījumu, kā arī konstatēt izveidojušos aglomerātus;
- skenējošo elektronu mikroskopiju (SEM): pēta gan mikrokapsulu virsmas morfoloģiju, gan arī to iekšējo struktūru;
- pulveru rentgenstaru difraktometriju (PRD): izmanto, lai identificētu kristāliskus savienojumus daudzkomponentu maisījumos;
- diferenciāli skenējošo kalorimetriju (DSC): detektē dažādu termisko procesu norisi. Novērtējot polimēra stiklošanās temperatūru (T_g), iespējams noteikt vai molekulāri disperģētā viela veido īstu šķīdumu ar polimēru, tādējādi to plastificējot un pazeminot tā stiklošanās temperatūras vērtību.

EKSPERIMENTU METODOLOĢIJA

1. Izejmateriālu izvēle

Mildronāta mikroiekapsulēšanai izmantotas četras polimēru matricas:

- polihidroksibutirāts (PHB), kas ir farmācijā plaši lietots bionoārdāms un biosaderīgs polimērs. Saskaņā ar literatūras datiem izmantots gan lipofilu, gan ūdenī šķīstošu aktīvo vielu mikroiekapsulēšanai;
- polilaktāts (PLA), kuru pārsvarā lieto farmācijā gan lipofilu, gan ūdenī šķīstošu aktīvo vielu mikroiekapsulēšanai. Bioloģiski noārdoties veido pienskābi, kas ir dabisks organisma metabolīts;
- polistirols (PS), kas ir stabils, izteikti lipofils polimērs, kuru izmanto kā bāzi farmācijā lietotu sorbentu ražošanā. Nav bioloģiski noārdāms. Raksturīga zema ūdens un gaisa caurlaidība;
- polikaprolaktons (PKL), kura bionoārdīšanās notiek daudz lēnāk kā polilaktāta gadījumā, tāpēc tas ir perspektīvs polimērs palēninātas izdalīšanas zāļu piegādes sistēu izveidei.

Kā organiskās fāzes šķīdinātāji izmantoti praksē visbiežāk pielietotie - metilēnhlorīds un hloroforms. To priekšrocības ir samērā lielā gaistamība, daļēja metilēnhlorīda (~2%) šķīdība ūdenī, kā arī labas šķīdināšanas spējas attiecībā uz izmantotajiem polimēriem.

Emulgatora loma mikrokapssulu pagatavošanā ir emulsijā suspendēto polimēra pilieniņu īslaicīga stabilizācija, novēršot to aglomerāciju. Svarīgi ir izveidot stabilu emulsiju, pretējā gadījumā iekapsulēšanas efektivitāte var kļūst samazināta, vai pat būt vienāda ar nulli. Veicot vairākus eksperimentus, secinājām, ka stabilu emulsiju eksperimentālajās sistēmās veido polivinilspirts.

2. PHB/mildronāta mikrokapssulu pagatavošana, izmantojot hloroformu kā dispersās fāzes šķīdinātāju

50ml 1% 3-polihidroksibutirāta (PHB) šķīduma hloroformā sajauc ar 10ml piesātinātu mildronāta šķīdumu. Izveidoto disperso fāzi emulgē 30ml 0,5% polivinilspirta ūdens šķīdumā un 10 minūtes maisa, reakcijas maisījumu nepārtraukti sildot un pievadot tam inerto gāzi. Pēc 10 minūtēm reakcijas maisījumam pievieno 30ml acetnitrila un turpina maisīšanu. Pēc 20 minūtēm izveidojušās mikrokapssulas nofiltrē un žāvē istabas temperatūrā 24 stundas.

3. PHB/mildronāta mikrokapsulu pagatavošana, izmantojot metilēnhlorīdu kā dispersās fāzes šķīdinātāju

50ml 1% 3-polihidroksibutirāta šķīduma metilēnhlorīdā sajauc ar 10ml piesātināta mildronāta šķīduma. Izveidoto disperso fāzi emulģē 30ml 0,5% polivinilspirta ūdens šķīdumā un 5 minūtes maisa, reakcijas maisījumu nepārtraukti sildot un pievadot tam inerto gāzi. Pēc 5 minūtēm reakcijas maisījumam pievieno 30ml izopropanola un turpina maisīšanu. Pēc 20 minūtēm izveidojušās mikrokapsulas nofiltrē un žāvē istabas temperatūrā 24 stundas.

4. PLA/mildronāta mikrokapsulu pagatavošana

Polilaktātu (1g) izšķīdina 10ml metilēnhlorīda. 1g mildronāta izšķīdina 0,5ml ūdens. 4g polivinilspirta (PVS) izšķīdina 100 ml ūdens. PLA šķīdumu sajauc ar mildronāta šķīdumu un iegūto w_1/o emulsiju pievieno 100 ml 4% PVS šķīduma, kurš iepriekš piesātināts ar 2ml metilēnhlorīda. Pagatavoto $w_1/o/w_2$ emulģē 60s, izmantojot mehānisko maisītāju. Pēc 60s iegūto emulsiju momentāni pārnes vārglāzē ar 3,5l destilēta ūdens. Metilēnhlorīdu no iegūtās suspensijas ekstragē 25 minūtes, pēc tam izveidojušās mikrokapsulas filtrē un žāvē istabas temperatūrā 24 stundas.

5. PS/mildronāta mikrokapsulu pagatavošana

Polistirolu (1g) izšķīdina 10ml metilēnhlorīda. 1g mildronāta izšķīdina 0,5ml ūdens. 4g polivinilspirta izšķīdina 100 ml ūdens. Polistirola šķīdumu sajauc ar mildronāta šķīdumu un iegūto w_1/o emulsiju pievieno 50 ml 4% PVS šķīduma, kurš iepriekš piesātināts ar 1ml metilēnhlorīda. $w_1/o/w_2$ emulģē 10s, izmantojot mehānisko maisītāju. Pēc 10s iegūto emulsiju momentāni pārnes vārglāzē ar 3,5l destilēta ūdens. Metilēnhlorīdu no iegūtās suspensijas ekstragē ūdens fāzē 25 minūtes, pēc tam izveidojušās mikrokapsulas filtrē un žāvē istabas temperatūrā 24 stundas.

6. PKL/mildronāta mikrokapsulu pagatavošana

Polikaprolaktonu (1g) izšķīdina 10ml metilēnhlorīda. 1g mildronāta izšķīdina 0,5ml ūdens. 4g polivinilspirta izšķīdina 100ml ūdens. PKL šķīdumu sajauc ar mildronāta šķīdumu un iegūto w_1/o emulsiju pievieno 50ml 4% PVS šķīduma, kurš piesātināts ar 1ml metilēnhlorīda. $w_1/o/w_2$ emulģē 10s, izmantojot mehānisko maisītāju. Pēc 10s iegūto emulsiju momentāni pārnes vārglāzē ar 3,5l destilēta ūdens. Metilēnhlorīdu no iegūtās suspensijas ekstragē 25 minūtes, pēc tam izveidojušās mikrokapsulas filtrē un žāvē istabas temperatūrā 24 stundas.

7. Mikrokapsulu īpašību novērtēšanas metodes

Sekundārā mildronāta satura novērtēšanai mikrokapsulās izstrādāta augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas metode uz NH_2 -kolonnas. Detektēšanai izmantots UV-absorbcijas spektrofotometrs, nosakot absorbciju pie viļņa garuma $\lambda=210\text{nm}$.

Mildronāta noteikšanai bioloģiskos paraugos izstrādāta augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas metode ar paraugu derivatizāciju. Detektēšanai izmantots fluorescentais detektors pie ierosas viļņa garuma $\lambda=248\text{nm}$ un fluorescences viļņa garuma $\lambda=418\text{nm}$.

CoQ_{10} koncentrācijas noteikšanai izstrādāta augsti efektīvās šķidrums hromatogrāfijas metode uz Hypersil ODS kolonnas. Detektēšanai izmantots UV-absorbcijas spektrofotometrs pie viļņa garuma $\lambda=275\text{nm}$.

Kopējais mildronāta saturs mikrokapsulās noteikts izmantojot Carlo Erba 1106 elementanalizatoru ar DP 110PRC integratoru, paraugu termiskā analīze veikta izmantojot diferenciāli skenējošo kalorimetru METTLER DSC-30. PHB/mildronāta mikrokapsulu rentgendifraktogrammas uzņemtas izmantojot DRON difraktometru, PLA/mildronāta un PS/mildronāta rentgendifraktogrammas uzņemtas izmantojot PANalytical X'Pert PRO difraktometru.

Vispārīgiem morfoloģijas pētījumiem izmantots Leica Wild Microscope M 420 un Leica MZ 16 A, DFC490 stereomikroskopi, mikrokapsulu virsmas morfoloģija un aktīvās vielas atrašanās mikrokapsulās pētīta, izmantojot SEM Mira\LMU skenējošo elektronmikroskopu. PHB/mildronāta mikrosfēru izmēru noteikšanai izmantota daļiņu izmēru noteikšanas programma "Image – Pro Plus Version 5.0". PLA/mildronāta un PS/mildronāta mikrokapsulu izmēru sadalījums noteikts izmantojot stereomikroskopu Leica MZ 16 A, DFC490, kas aprīkots ar Image-Pro Plus 6.1 attēlu apstrādes programmu.

Mikroiekapsulēto preparātu un mildronāta higroskopiskums novērtēts eksikatorā $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūrā un $75\% \pm 3\%$ relatīvajā mitrumā.

Aktīvās vielas *in vitro* šķīšanas profils noteikts ar Eiropas farmakopejas šķīšanas testu standartmetodi (šķīšanas testa aparāts: VK 7000). Mikrokapsulu biopieejamības pētījumi veikti bezsugas trušos, svarā no 2kg līdz 2,8kg. Preparāti ievadīti perorāli, daudzumos, kas atbilst tīra mildronāta devai 100mg/kg polilaktāta matricas gadījumā un 50mg/kg pārējo matricu gadījumā.

8. Mildronāta satura noteikšana mikrodaļiņās

Mildronāta saturs pagatavotajos mikroiekapsulētajos preparātos novērtēts, izmantojot divas metodes:

- izmantojot augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju (HPLC), noteikts sekundārais mildronāta saturs mikrokapsulās, kas parāda, cik daudz aktīvās vielas no pagatavotā preparāta izdalās vienas minūtes laikā 50mg mikrokapsulu šķīdinot 50ml ūdens;
- izmantojot elementanalīzi, noteikts kopējais mildronāta daudzums mikrokapsulās. Tā kā vienīgais savienojums, kas pagatavotajās mikrodaļiņās satur slāpekli, ir mildronāts, tad, izmantojot paraugā atrasto slāpekļa saturu, var aprēķināt mikrodaļiņās esošo aktīvās vielas daudzumu no kopējās preparāta masas.

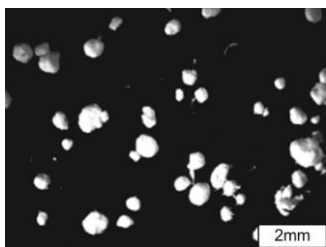
REZULTĀTU IZVĒRTĒJUMS

1. Mikrodaļiņu pagatavošana un īpašības

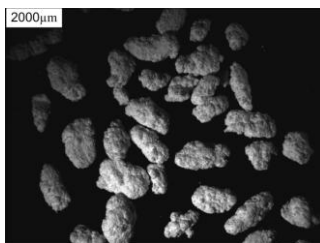
PHB/mildronāts mikrodaļiņas

Emulsijas pagatavošanai izmantots 0,5% polivinilspirta šķīdums ūdenī, 1% PHB šķīdums hlороformā un piesātināts mildronāta ūdens šķīdums. Variējot komponentu tilpuma attiecības, secināts, ka, stabilas emulsijas iegūšanai, polimērs, emulgators un iekapsulējamā viela jāņem tilpuma attiecībās 5:3:1.

PHB/mildronāta mikrodaļiņu pagatavošanā kritiskais parametrs ir organiskā šķīdinātāja aizvadišanas ātrums. Nepietiekami ātri aizvadot hlороformu vai metilēnhlorīdu no $w_1/o/w_2$ emulsijas, notiek daļiņu aglomerācija. Visefektīvākais organisko šķīdinātāju aizvadišanas veids izrādījās acetonnitrila pievienošana reakcijas maisījumam hlороforma gadījumā un izopropanola pievienošana metilēnhlorīda gadījumā. Tādā veidā mikroiekapsulēšanas procesam nepieciešamais laiks samazinājās no 4h līdz 30min, un iegūtie produkti bija monolītas, cietas mikrodaļiņas, kas pēc žāvēšanas neveidoja plēvi un neaglomerējās (skat. 2. un 3. attēlu)



2. att. Stereomikroskopijas mikrofotoģrāfijas: mikrodaļiņas pēc reakcijas maisījuma apstrādes ar acetonnitrilu



3. att. Stereomikroskopijas mikrofotoģrāfijas: mikrodaļiņas pēc reakcijas maisījuma apstrādes ar izopropanolu

Izmantojot izstrādāto mikroiekapsulēšanas pamatmetodi, iegūti preparāti ar kopējo mildronāta saturu 76%, mikroiekapsulēšanas procesa atkārtojamība ir $\pm 2\%$, aktīvās vielas iekapsulēšanas efektivitāte nepārsniedz 30% un daļiņu vidējie izmēri atrodas intervālā no 200 μm līdz 300 μm .

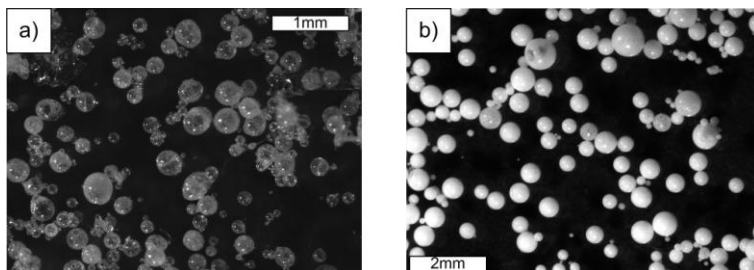
Salīdzinot kopējo atrasto mildronāta daudzumu (W_{kop}) ar sekundāro mildronāta daudzumu (W_{sek}), iegūtie rezultāti parādīja, ka abi šie lielumi ir praktiski vienādi ($W_{\text{kop}}=76.95\%$; $W_{\text{sek}}=76,21$), tādējādi visa aktīvā viela

ūdens vidē no PHB/mildronāta mikrodaļiņām izdalās vienas minūtes laikā, un līdz ar to šāda zāļu sistēma nav piemērota lēnai aktīvās vielas izdalīšanai.

PS/mildronāts un PLA/mildronāts mikrodaļiņas

Apkopojot un adaptējot literatūrā atrodamo informāciju par augsti higroskopisku aktīvo vielu mikroiekapsulēšanas iespējām, izveidotas pamatmetodes polistirola/mildronāta un polilaktāta/mildronāta mikrodaļiņu iegūšanai. Vispārēja mikrodaļiņu morfoloģija parādīta 4. attēlā.

Izmantojot PS/mildronāta mikrodaļiņu iegūšanas pamatmetodi, pagatavoti preparāti, kuros kopējais mildronāta saturs mikrodaļiņās ir 39%, bet sekundārais mildronāta saturs atbilst 1%, mikroiekapsulēšanas procesa atkārtamība ir $\pm 3\%$, aktīvās vielas iekapsulēšanas efektivitāte sasniedz 61% un daļiņu vidējie izmēri atrodas intervālā no 150 μm līdz 200 μm .



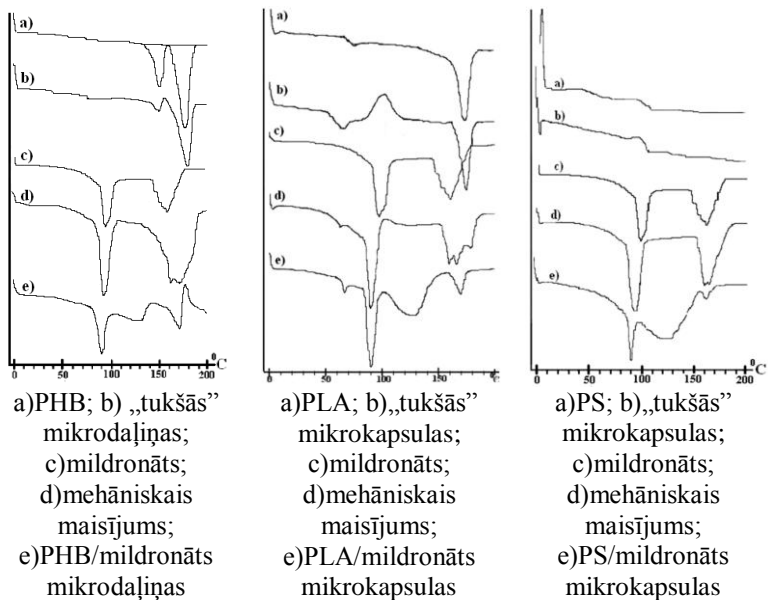
4. att. Stereomikroskopijas mikrofotogrāfijas: a) PS/mildronāta mikrodaļiņas; b) PLA/mildronāta mikrodaļiņas

Izmantojot PLA/mildronāta mikrodaļiņu iegūšanas pamatmetodi, pagatavoti preparāti, kuros kopējais mildronāta saturs mikrodaļiņās ir 45%, bet sekundārais mildronāta saturs atbilst 6%, mikroiekapsulēšanas procesa atkārtamība ir $\pm 4\%$, aktīvās vielas iekapsulēšanas efektivitāte sasniedz 58% un daļiņu vidējie izmēri atrodas intervālā no 200 μm līdz 400 μm .

2. Mildronāta un polimēra savstarpējās mijiedarbības novērtēšana

Mildronāta un polimēru mijiedarbība novērtēta, izmantojot diferenciāli skenējošo kalorimetriju, pulveru rentgenstaru difraktometriju un skenējošo elektronu mikroskopiju.

DSC pētījumos salīdzināti tīru komponentu, tukšo mikrokapulu, mehāniska tukšo mikrokapulu un mildronāta maisījuma, kā arī pagatavoto mikrokapulu termiskie efekti (skat. 5.attēlu).



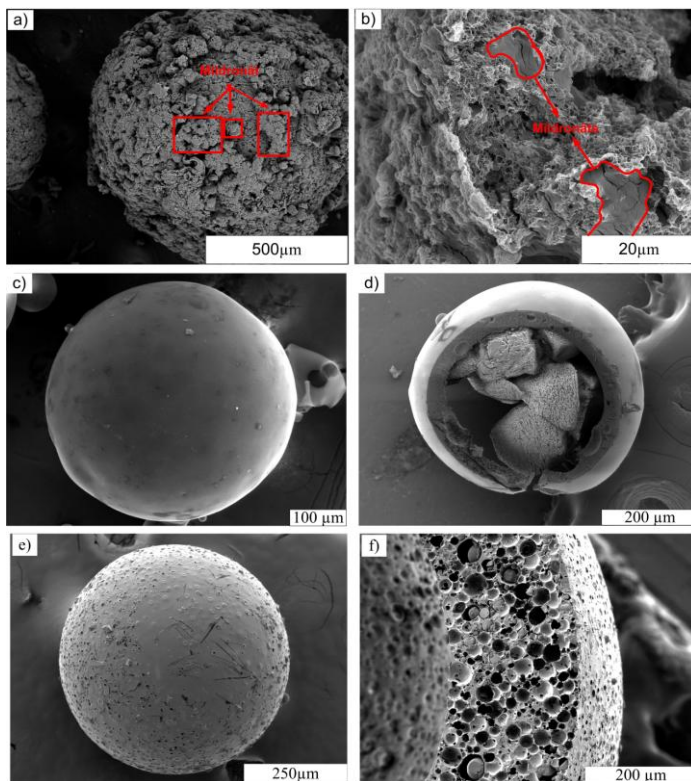
5. att. Termisko efektu salīdzinājums DSC līknēs

Smaiļu kopas, kas atrodas temperatūru intervālā no 150°C līdz 180°C norāda, ka komponenti, kas veido mehānisko maisījumu ir savstarpēji termodinamiski nesavietojami. Tajā pašā laikā izteikti atsevišķi maksimumi mikrokapsulu termogramās liecina par termodinamiski savietojamas sistēmas veidošanos un iespējamo polimēra/mildronāta mijiedarbību. Mikrokapsulu termogrammās temperatūru intervālā no 100°C līdz 150°C parādās jauns endotermisks efekts, kas varētu būt saistīts ar mildronāta ķīmiski saistītā ūdens atbrīvošanos un norādīt uz polimērs/mildronāts šķīduma veidošanos. To, ka iegūtie PS un PLA produkti ir iespējams mildronāta šķīdums polimērā, norāda arī polimēru stiklošanās temperatūras samazināšanās mikroiekapsulētajos preparātos.

PRD pētījumi parādīja, ka PHB un PLA mikrokapsulās novērojami intensīvi maksimumi un difrakcijas ainas kopumā ir identiskas mehāniskā maisījuma difraktogrammām, kas norāda, ka mikroiekapsulēšanas procesa laikā mildronātam kristalizējoties no ūdens šķīduma, tas vismaz daļēji saglabā sev raksturīgo kristālisko režģi. Savukārt PS/mildronāta mikrokapsulās novērojama būtiska difrakcijas maksimumu intensitātes samazināšanās, kas varētu norādīt, ka brīdī, kad aktīvās vielas koncentrācija

pārsniedz tās šķīdību polimērā, notiek mildronāta mikrokristalizācija PS matricā.

Novērtējot PHB/mildronāta mikrodaļiņu virsmas morfoloģiju, atklāts, ka gandrīz visa mikrosfēras virsma ir pārklāta ar sīkiem mildronāta kristāliem, iegūtie preparāti ir nenoteiktas formas veidojumi ar raupju un grubuļainu virsmu un, ņemot vērā mikrodaļiņu morfoloģiju, šādus veidojumus varētu klasificēt kā matricas tipa mikrokapsulas jeb mikrosfēras (skat. 6. attēlu a un b).



6. att. SEM mikrofotogrāfijas: a)PHB/mildronāta mikrosfēras; b)PHB/mildronāta mikrosfēru šķērsgriezums; c)PS/mildronāta mikrokapsulas; d)PS/mildronāta mikrokapsulu šķērsgriezums; e)PLA/mildronāta mikrokapsulas; f)PLAB/mildronāta mikrokapsulu šķērsgriezums

PS/mildronāta preparāti ir apaļas formas un tām raksturīga gluda virsma. Saskaņā ar mikrodaļiņu morfoloģiju PS/mildronāta preparātus var klasificēt kā viena domēna mikrokapsulas, kur visa aktīvā viela atrodas iekapsulētā stāvoklī polimēra matricā (skat. 6. attēlu c un d). Polilaktāta matricas gadījumā iegūtās mikrodaļiņas sastāv no nehomogēna polimēra un mildronāta maisījuma, kā arī vairākiem aktīvās vielas pildītiem domēniem, kuru vidējais diametrs ir intervālā no 2µm līdz 45µm. Saskaņā ar mikrodaļiņu morfoloģiju PLA/mildronāts preparātus var klasificēt kā vairāku domēnu mikrokapsulas (skat. 5. attēlu e un f).

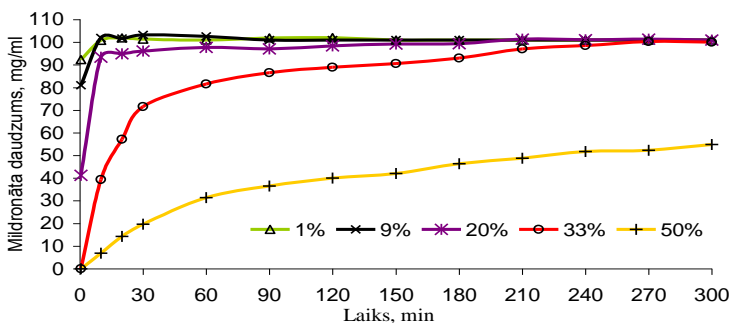
3. PHB/mildronāta mikroiekapsulēšanas procesa parametru maiņas ietekme uz iegūto preparātu īpašībām

Mainot polimēra koncentrāciju organiskajā fāzē robežās no 1% līdz 5%, mildronāta saturs preparātos samazinās no 76% līdz 50%, pieaugot iekapsulēšanas efektivitātei no 15% līdz 43%.

Kā organiskās fāzes šķīdinātāju izmantojot mazāk toksisko metilēnhlorīdu, atrasts, ka analogiskas polimēra koncentrācijas izmaiņas neietekmē mildronāta saturu pagatavotajos preparātos, bet aktīvās vielas iekapsulēšanas efektivitāte pieaug no 5% līdz 42%.

4. Palēninātas PHB/mildronāta mikroiekapsulēšanas formas izveide

PHB/mildronāta mikrosfēru struktūra pēc būtības nav piemērota palēninātas izdalīšanās zāļu sistēmas izveidei, tādēļ, lai iegūtu palēninātas izdalīšanās zāļu formu, izveidotās mikrosfēras pārklātas ar lipofīlu palīgvielu – koenzīmu Q₁₀. Izmantojot lipofila materiāla (koenzīms Q₁₀) pārklājumu iespējams iegūt preparātus, kas *in vitro* pakāpeniski atbrīvo aktīvo vielu. Variējot pārklāšanai izmantoto koenzīma Q₁₀ daudzumu, iespējams kontrolēt aktīvās vielas atbrīvošanās ātrumu (skat. 7.attēlu).

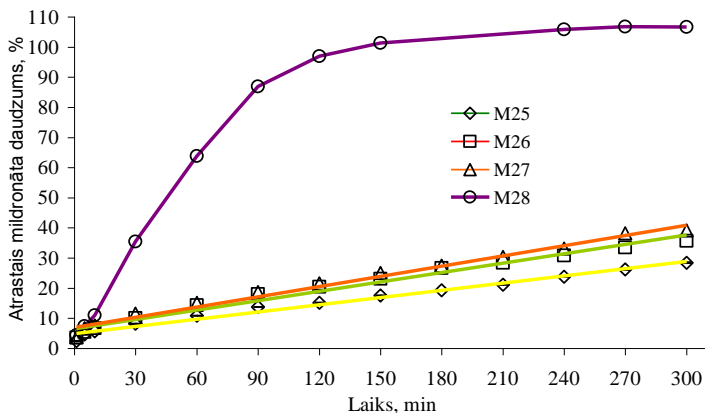


7. att. CoQ₁₀ pārklājuma biezuma ietekmes novērtēšana uz mildronāta atbrīvošanās kinētiku (koenzīma Q₁₀ daudzums preparātā mainīts no 1% (zaļā līkne) līdz 50% (dzeltenā līkne) no preparāta masas)

5. Mildronāta atbrīvošanās kinētikas novērtēšana PS/mildronāta un PLA/mildronāta mikrokapsulām *in vitro*

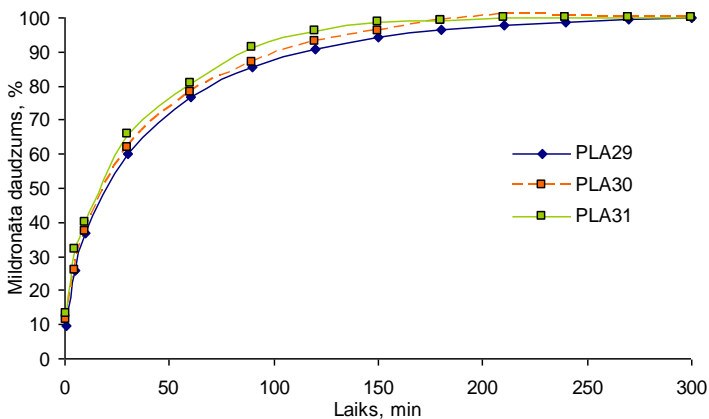
Nosakot mildronāta atbrīvošanās ātrumu ar Eiropas Farmakopejas šķīšanas standartmetodi, tendences paralēlajos eksperimentos M25, M26 un M27 ir praktiski vienādas. Mildronāts no polistirola kapsulām izdalās ar gandrīz konstantu ātrumu, pie kam, pēc 5 stundu šķīdināšanas, mākslīgajā kuņģa sulā pārgājuši nedaudz vairāk kā 30% no kapsulās esošās aktīvās vielas (skat. 8. attēlu).

Eksperimenta M28 šķīšanas tests veikts, izmantojot aptuveni 10 reizes straujāku maisīšanu nekā paredz Eiropas farmakopejas standartmetode, un iegūtie rezultāti parāda, ka mildronāta atbrīvošanās ātrumu no mikrokapsulām nosaka polistirola mikrokapsulu mehāniska noārdīšanās.



8. att. Mildronāta izdalīšanās no polistirola mikrokapsulām mākslīgajā kuņģa sulā

Mildronāts no polilaktāta preparātiem izdalās pakāpeniski, un pēc vienas stundas mākslīgajā kuņģa sulā pāriet jau 80% aktīvās vielas. Pēc 3 stundu šķīdināšanas, mākslīgajā kuņģa sulā pāriet visa kapsulās esošā aktīvā viela (skat. 9. attēlu).



9. att. Mildronāta izdalīšanās no polilaktāta mikroapsulām maksīgajā kuņģa sulā

Apkopojot iegūtos rezultātus, var secināt, ka gan polistirola, gan polilaktāta pārklājums palēnina mildronāta izdalīšanos *in vitro*.

6. Mikroiekapsulēto preparātu un mildronāta higroskopiskuma novērtēšana

Lai novērtētu mikroiekapsulēto preparātu un mildronāta mitruma uzsūkšanas spēju (ΔH , %), veikta higroskopiskuma pārbaude, un iegūtie rezultāti apkopoti 1. tabulā.

1. tabula

Mikroiekapsulēto preparātu un mildronāta higroskopiskuma novērtēšana

Mikroiekapsulētais paraugs	Wkop, %	ΔH pēc 24h, %	ΔH pēc 48h, %	ΔH pēc 168h, %
PLA/mildronāts	43.31	18.12	22.04	26.18
PS/mildronāts	37.09	14.03	17.92	22.04
PHB/mildronāts	60.85	26.01	35.66	43,72
Kontrole				
Mildronāts		12.93	28.69	66.28

Iegūtie rezultāti parādīja, ka polimēra matricu aizsargājošā ietekme vislabāk izpaužas ilglaicīgos eksperimentos, t.i. pēc 168 stundu uzglabāšanas 75% relatīvajā mitrumā. Pēc 24 stundu vai 48 stundu glabāšanas PHB/mildronāts mikrokapsulu higroskopiskums ir salīdzināms ar mildronāta higroskopiskumu, savukārt pēc 48 stundu glabāšanas PS/mildronāts un PLA/mildronāts mikrokapsulu paraugi uzrāda jau mazāku higroskopiskumu nekā kontroles mildronāts.

7. PS/mildronāta un PLA/mildronāta mikroiekapsulēšanas procesa parametru maiņas ietekme uz iegūto preparātu īpašībām

Lai noskaidrotu dažādu mikroiekapsulēšanas procesa parametru maiņas iespaidu uz iegūto produktu īpašībām (skat. 2. tabulu), modificētas izstrādātās mikroiekapsulēšanas pamatmetodes un pārbaudīti sekojoši parametri:

- iekšējās ūdens fāzes ietekme uz mikrokapsulu īpašībām (aktīvās vielas daudzuma maiņa iekšējā ūdens fāzē, iekšējās ūdens fāzes tilpuma maiņa);
- organiskā šķīdinātāja ekstrakcijas procesa parametri (ekstrakcijai nepieciešamais ūdens daudzums, maisīšanas ātrums ekstrakcijas laikā, ekstrakcijas procesa laiks);
- ārējās ūdens fāzes ietekme uz mikrokapsulu īpašībām (polivinilspirta koncentrācija, polivinilspirta molekulmasa)
- organiskās fāzes tilpuma ietekme uz mikrokapsulu īpašībām;
- izstrādātās mikroiekapsulēšanas metodes vispārīgums (emulgatora veida maiņa, aktīvās vielas maiņa, matricas polimēra maiņa).

Pārbaudot izstrādātās mikroiekapsulēšanas metodes vispārīgumu secināts, ka izstrādātā mikroiekapsulēšanas metode ir izmantojama arī citu izcili hidrofilu molekulu (karnitīns, γ -butirobetaīns) mikroiekapsulēšanai. Pārbaudot metodes vispārīgumu attiecībā uz emulgatoru, vēlreiz pārliecinājāmies, ka mikroiekapsulēšanā izmantotais polivinilspirts ir piemērotākais emulsijas stabilizators mūsu izveidotajā sistēmā.

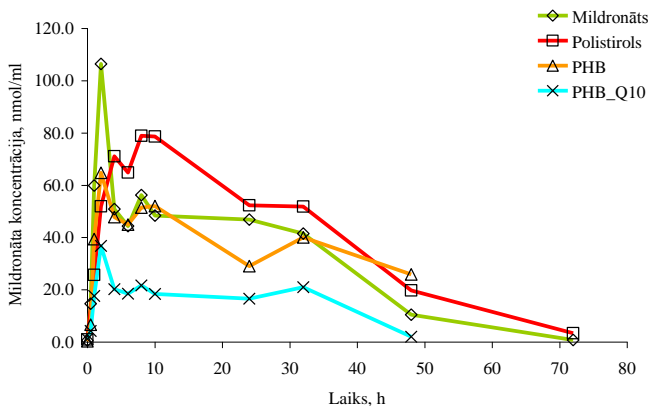
Mikroiekapsulēšanas procesā izmantojot polikaprolaktona matricu, iegūti preparāti ar zemu mildronāta saturu un iekapsulēšanas efektivitāti, norādot, ka šai polimēra matricai nepieciešami citi procesa parametri

Mikroiekapsulēšanas procesa parametru maiņas ietekme uz iegūto preparātu īpašībām

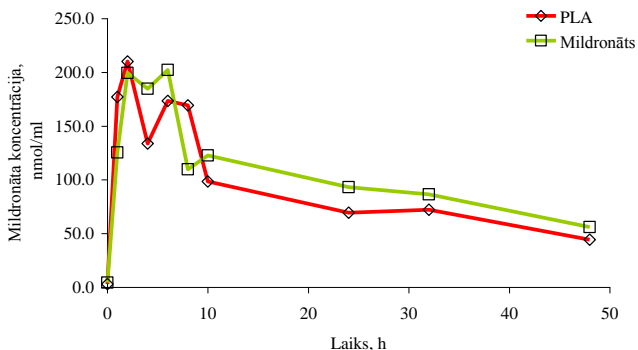
	Parametru maiņas ietekme uz mikrokapulu īpašībām	
Parametrs	PS/mildronāts preparāti	PLA/mildronāts preparāti
Aktīvās vielas daudzuma pieaugums iekšējā ūdens fāzē	Pieaug aktīvās vielas saturs. Samazinās mildronāta iekapsulēšanas efektivitāte. Pieaug mikrodaļiņu vidējais diametrs. Paplašinās daļiņu izmēru intervāls.	
	Aktīvās vielas daudzumam w_1 fāzē pārsniedzot 8g, mildronāta saturs preparātā tuvinās nullei.	Pieaug mikrokapulu virsmas porainība un ar mildronātu pildīto domēnu skaits.
Iekšējās ūdens fāzes tilpuma pieaugums	Nedaudz samazinās mildronāta kopējais saturs un iekapsulēšanas efektivitāte.	Būtiski samazinās mildronāta kopējais saturs un iekapsulēšanas efektivitāte.
Ekstrakcijai nepieciešamais ūdens daudzuma pieaugums	Samazinās mikrokapulu tieksme veidot aglomerātus.	
Maisīšanas ātruma pieaugums ekstrakcijas laikā	Pie maziem ātrumiem veidojas lieli mikrokapulu aglomerāti, pie lieliem ātrumiem veidojas polivinilspirta plēve.	
Ekstrakcijas procesa laiks	Palielinot ekstrakcijas laiku samazinās mikrokapulu tieksme veidot aglomerātus.	
Polivinilspirta koncentrācijas pieaugums	Samazinās mildronāta saturs un iekapsulēšanas efektivitāte.	Samazinās mikrodaļiņu vidējais diametrs un sašaurinās daļiņu izmēru intervāls.
Polivinilspirta molekulasmasas pieaugums	Samazinās mildronāta saturs un iekapsulēšanas efektivitāte. Samazinās mikrodaļiņu vidējais diametrs. Sašaurinās daļiņu izmēru intervāls.	
Organiskās fāzes tilpuma pieaugums	Samazinās mildronāta saturs un iekapsulēšanas efektivitāte. Samazinās mikrodaļiņu vidējais diametrs.	

8. Mikroiekapsulēta mildronāta biopieejamības pētījumi

Pētījumu mērķis bija novērtēt polimēru matricās iekapsulētu mildronāta preparātu biopieejamību un salīdzināt to ar tīra mildronāta biopieejamību (skat. 10. un 11. attēlu).



10. att. Mildronāta izdalīšanās trušu asins plazmā pēc vienreizējas ievadīšanas 50mg/kg devā. Zaļā līnija – ievadīts mildronāta dihidrāts, sarkanā līnija – ievadīts mildronāts PS matricā, oranžā līnija – ievadīts mildronāts PHB matricā, zilā līnija – ievadīts mildronāts ar koenzīmu Q10 pārklātā PHB matricā



11. att. Mildronāta izdalīšanās trušu asins plazmā pēc vienreizējas ievadīšanas 100mg/kg devā. Zaļā līnija – ievadīts mildronāta dihidrāts, sarkanā līnija – ievadīts mildronāts PLA matricā.

Pētījumu rezultāti ļauj secināt, ka polilaktāta un polihidroksibutirāta matricas neatstāj būtisku iespaidu ne uz mildronāta izdalīšanās ātrumu, ne kopējo izdalīto daudzumu pēc vienreizējas ievadīšanas. Ar koenzīmu Q10 pārklātās mikrogranulas izdala mazāku daudzumu aktīvās vielas, kas parāda, ka lipofīlā pārklājuma izmantošana samazina mildronāta biopieejamību, bet būtiski neietekmē tā izdalīšanās ātrumu no preparātiem.

Polistirola matrica nodrošina zināmu mildronāta izdalīšanās ātruma palēninājumu, salīdzinot ar nemodificētu aktīvo vielu. Izmantojot polistirola matricu, mildronāta koncentrācijas maksimums trušu asins plazmā pārbīdās no 2h pēc ievadīšanas uz 8h līdz 10h pēc ievadīšanas. Polistirola matrica būtiski neietekmē kopējo asinīs izdalīto mildronāta daudzumu.

SECINĀJUMI

1. Pirmo reizi izstrādāta metode augsti hidrofilu (šķīdība ūdenī $\geq 2\text{g/ml}$) bioloģiski aktīvu vielu iekapsulēšanai polimēra matricā. Izstrādātās metodes pielietojamība ir pārbaudīta mildronāta, karnitīna un γ -butirotbetaīna kristālu mikrokapsulēšanai.
2. Iekapsulējot mildronātu polilaktāta, polistirola un polihidroksibutirāta matricās, aktīvā viela ar polimēriem veido molekulāru šķīdumu.
3. Atkarībā no izmantotās matricas, iegūtas dažāda tipa mikrodaļiņas: PS/mildronāts veido viena domēna mikrokapsulas, PLA/mildronāts - vairāku domēnu mikrokapsulas, un PHB/mildronāts mikrodaļiņas klasificējamās kā matricas tipa mikrokapsulas jeb mikrosfēras.
4. Noskaidrota polimēra matricas un mikroiekapsulēšanas procesa parametru ietekme uz aktīvās vielas kopējo saturu preparātos un iekapsulēšanas efektivitāti, kā arī mikrokapsulu morfoloģiju un granulometrisko sastāvu.
5. Polistirola, polilaktāta un polihidroksibutirāta pārklājumu izmantošana ilglaicīgos eksperimentos samazina mildronāta higroskopiskumu.
6. No visām pētītajām polimēra matricām tikai polistirola mikrokapsulas nodrošina mildronāta palēninātu izdalīšanos *in vivo* biopiejamības eksperimentos, nesamazinot kopējo organismā nonākošo aktīvās vielas daudzumu.

PUBLIKĀCIJAS UN KONFERENČU TĒZES

1. E.Liepins, R.Vilskersts, D.Loca, O.Kirjanova, O.Pugovichts, I.Kalvinsh, M.Dambrova. Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **2006**, 48(6), 314-319.
2. D.Loca, O.Pugovichts, L.Berzina-Cimdina, J.Locs. Preparation and Characterization of Highly Water Soluble Pharmaceutical Loaded PLA Microcapsules. *Advances in Science and Technology*, **2008**, 57, 176-181.
3. D.Loca, O.Pugovichts, L.Berzina-Cimdina. Evaluation of highly-water soluble drug physical state in biodegradable microcapsules. *IFMBE Proceedings*, **2008**, 20, 619-622.
4. D.Loča, L.Bērziņa-Cimdiņa. Ūdenī šķīstošu aktīvo farmaceitisko vielu mikroiekapsulēšana biodegradabla poliestera matricā. *Iesniegts publicēšanai RTU zinātnisko rakstu krājumā*.
5. D.Loca, O.Pugovichts, V.Tupureina, L.Berzina-Cimdina, I.Kalvins. Preparation and characterization of highly-water soluble 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate microcapsules. I: Evaluation of polymer type and preparation conditions on microparticle properties. *Iesniegts publicēšanai Journal of Microencapsulation, manuscript ID: TMNC-2009-0031*.

DALĪBA KONFERENCĒS

1. D. Loča, L. Bērziņa-Cimdiņa, J. Ločs. Ūdenī šķīstošu aktīvu vielu mikroiekapsulēšana biodegradabla poliestera matricā. *Posteris RTU 49. starptautiskajā zinātniskajā konferencē, Rīga, 2008. gada 13. – 15. oktobris*. Tēzes iesniegtas publicēšanai.
2. D.Loca, O.Pugovichts, L.Berzina-Cimdina, J.Locs. Preparation and Characterization of Highly Water Soluble Pharmaceutical Loaded PLA Microcapsules. *Poster presentation in 3rd International Conference "Smart Materials, Structures and Systems", Acireale (Catania District), Sicily, Italy, on June 8 to 13, 2008*.
3. D.Loca, O.Pugovichts, L.Berzina-Cimdina. Evaluation of highly-water soluble drug physical state in biodegradable microcapsules. Oral presentation in *14th Nordic – Baltic Conference on Biomedical Engineering and Medical Physics – NBC-2008, Riga, Latvia, on June 16-20, 2008*.