Atorvasztatin oldékonyságnövelése mikroméretű gyógyszerhordozóba történő beágyazással

Rédai Emőke¹, Zsombori Mónika¹, Székely-Szentmiklósi Blanka², Sipos Emese³

¹Marosvásárhelyi Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Gyógyszertechnológia és kozmetológia tanszék

²Marosvásárhelyi Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Gyógyszerészeti kémia tanszék

³Marosvásárhelyi Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Ipari gyógyszerészet és gyógyszerészeti management tanszék

AUTHOR AFFILIATION

¹ University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Targu Mures, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Technology and cosmetology discipline

² University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Targu Mures, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical chemistry discipline

³ University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Targu Mures, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical industry and management discipline

CORRESPONDING AUTHOR

Blanka Székely-Szentmiklósi

Institution, Department University of Medicine, Pharmacy, Sciences and Technology of Targu Mures, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical chemistry discipline

Postal address 540139 Tîrgu Mureş, Gh. Marinescu street no. 38, Mureş county, Romania

Email:

blanka.szekely-szentmiklosi@umfst.ro

ARTICLE HISTORY

Received: 28-Feb-2019

Accepted: 2-Apr-2019

DOI: 10.2478/orvtudert-2019-0004

Solubility enhancement of atorvastatin by embedding in micro sized carrier

ABSTRACT

The aim of this experimental work was the enhancement of water solubility of the lipid lowering atorvastatin, by embedding it in polymer based micro sized fibers obtained by electrospinning. We prepared a polyvinylpyrrolidone (Kollidon 90F®) dispersion and added the active substance. By setting the experimental parameters we obtained four different microfibers containing atorvastatin, and one without the drug. The pH, viscosity and conductivity of the dispersions have been measured. The drug content and dissolution of atorvastatin had been studied by capillary electrophoresis. The size and thermal behavior of the fibers was determined. The parameters of the microfibers are influenced by the experimental parameters of electrospinning. The micro-method for dissolution showed a twofold solubility enhancement.

Keywords: atorvastatin, microfiber, Kollidon 90F®

KIVONAT

Jelen kísérletes munka célja a koleszterin-szint csökkentő atorvasztatin vízdékonyságának növelése polimer alapú, mikroméretű szálba történő beágyazással. A gyógyszerhordozó alapját polivinil-pirrolidon (Kollidon 90F®) képezte, előállítása electrospinning módszerrel valósult meg. Előkísérleteink során meghatároztuk a hatóanyag tartalmú és csupán polimert tartalmazó diszperzió pH-ját, viszkozitását, vezetőképességét. A kísérleti paraméterek változtatásával négy próbát és hatóanyag nélküli szálát nyertünk. Változtattuk a diszperzió áramlási sebességet és a távolságot. Vizsgáltuk a szálak fizikai-kémiai tulajdonságait: a morfológiát optikai mikroszkóppal tanulmányoztuk, a hatóanyag kristályos-amorf átalakulását termoanalitikai módszerrel, a hatóanyagtartalmat kapilláris elektroforézissel mértük. A képződött szálak paramétereit jelentősen befolyásolták az előállítás körülményei, mint például a diszperzió adagolásának sebessége. A mikromódszeres kioldódásvizsgálat kétszeres oldékonyság-növekedést mutatott.

Kulcsszavak: atorvasztatin, mikroszál, Kollidon 90F®

Bevezető

Az atorvasztatin a koleszterin-szint csökkentő hidroximetil-glutaril koenzim A redukáz inhibitorok csoportjába tartozik. Kalcium só formájában alkalmazzák a terápiában (1. ábra).

Vízoldékonysága 0,1mg/ml, orális biodisponibilitása 12 % [1, 2]. A BCS osztályozás szerint a II. osztályba tartozik, biohasznosulásának meghatározója alacsony vízoldékonysága [3, 4].

Hatásait tekintve elsődlegesen koleszterin-szint csökkentésére alkalmazzák, de számos plejotróp hatása is ismert: csontsűrűség fokozása, erek szintjén gyulladás-csökkentő hatás stb. [5-9].

A szakirodalom számos atorvasztatin tartalmú, különböző polimerből készült nanoméretű rendszer előállítását és vizsgálatát írja le. Így például a poli-glikol-tejsavval (PLGA) készült nanorészecskéket Yao és munkatársai [10], poly-e-kaprolaktán nanorészecskéket Ahmed és munkatársai [9], nano-kristályokat és nano-szivacsokat Mathur és munkatársai állítottak elő [11]. A nanorészecskék méretének fontosságára biohasznosulás során Ahmed és munkatársai hívták fel a figyelmet egészen végzett állatkísérletek során [6].

A nanoszálak szintén a nanorészecskék csoportjába tartoznak. Egyik lehetséges előállítási módszerük az electrospinning [12, 13]. A módszerrel a gyógyszeriparban hatóanyagok oldékonyságnövelését lehet elérni [14].

Az előállított gyógyszerhordozók tulajdonságait a felhasznált polimer fizikai-kémiai tulajdonságai, koncentrációja, valamint az előállítás körülményei befolyásolják [15].

Desai és munkatársai az atorvasztatin tartalmú orodiszperszabilis tabletták előállításakor Kollidon CL-FS segítségével növelték a hatóanyag oldékonyságát. [16].

Jelen kísérletes munka célja az atorvasztatin kalcium

sójának oldékonyságnövelése hidrophil polimerrel készült mikro- vagy nanoméretű szál, mint gyógyszerhordozó előállításával. Az electrospinning előállítási módszer paramétereinek változtatásával többféle szálát állítottunk elő, próbáltunk összefüggéseket találni az előállítás körülményei és a termékek tulajdonságai között.

Anyag és módszer

Felhasznált anyagok: atorvasztatin kalcium sója (Morepen Laboratories, New Delhi, India), metanol (Chemical Company, Románia), etanol (Chemical Company, Románia), Kollidon 90 F® (BASF, Németország),

Módszerek

A mikroszálak előállítása

Mikroszál előállításakor az első lépés az atorvasztatin oldatba vitele. 12,5 g etanol és 6,5 g metanol keverékben oldottuk fel a 0,5 g hatóanyagot (2,5 %-os koncentrációban). A kiválasztott polimer 1 grammját (Kollidon 90 F®) ugyanabban az oldatban diszpergáltuk mágneses keverő segítségével 10-15 perc alatt. Párhuzamosan előállítottunk hatóanyag nélküli diszperziót is, ugyanazzal az előállítási módszerrel.

Az elkészített hatóanyag nélküli és hatóanyag tartalmú diszperziót egy 20 ml-es fecskendőbe szívtuk fel, amelyet az infúziós pumpába helyeztünk (Ascor AP12). A diszperziót egy 1,2 mm átmérőjű injekciós tűn adott sebességgel (0,7 és 1,5 ml/h) préseltük át. A gyűjtőfólia és a tű hegye közötti távolságot 10 és 15 cm-re állítottuk be. 25 kV feszültségen szálakat állítottunk elő. Négy különböző próbát nyertünk (1. táblázat).

A polimer diszperziók pH-jának és vezetőképességének mérése

A hatóanyag nélküli és hatóanyag tartalmú diszperzióknak Consort C831 készülékkel mértük a pH-ját és vezetőképességét.

1. ábra. Atorvasztatin szerkezeti képlete

1. táblázat. A próbák előállítási körülményei és jelölése

Próba jelölése	Áramlási sebesség (ml/h)	Távolság (cm)
I.	1,5	15
II.		10
III.	0,7	15
IV		10

A polimer diszperziók viszkozitás mérése

A viszkozitás mérése Fungilab Viscolead Adv. készülékkel történt, 100 rpm sebességnél, 23,5°C-on, S4 feltétellel.

A mikroszálak átmérőjének mérése

A szálak morfológiáját Breaser Micro mikroszkóppal mértük. A megfelelően nagyított szálakról fényképeket készítettünk az Image J program alkalmazásával, ismert méretű beosztásos skálát használva mértük a szálak átmérőjét. Minden próbából 50 átmérőt határoztunk meg, amelyből átlag értéket és standard deviációt számoltunk.

A mikroszálak differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) vizsgálata

A méréseket Shimadzu DSC 60 készülékkel végeztük, 25-300°C hőmérséklet-tartományban, 5°C/min fűtési sebességgel, levegő atmoszférában. Referencia anyagként alumínium-oxidot használtunk. A próbák tömege 5 mg volt.

A mikroszálak hatóanyagtartalmának meghatározása

Atorvasztatint metanolban oldva (0,025 g atorvasztatint 10 ml metanolban) törzsoldatot állítottunk elő, melyből hígítással elkészítettük a kalibrációs oldatsorozatot 0,25-2,25 mg/ml tartományban. A mikroszálak 0,025 g-ját szintén 10 ml metanolban oldottuk, és az így készült oldatokból elvégeztük a hatóanyag-tartalom meghatározását micelláris elektrokinetikus kapilláris kromatográfiás módszerrel, DAD detektorral ellátott Agilent 1600 CE készülékkel, 48 cm hosszú (tényleges hossza 40 cm) és 50 µm átmérőjű szilícium-dioxid kapillárisban, 25 mM-os bóráx tompítóoldat alkalmazásával, amelyhez 25 mM nátrium dodecil-szulfátot adtunk (SDS, pH=9,3). Mérési paraméterek: hőmérséklet 20°C, alkalmazott feszültség +20 kV, injektálási nyomás 50 mbar/1 sec. A detektálás UV fényben 230 nm hullámhossznál történt [17].

2. ábra. A próbák képe

A szálak kioldódás vizsgálata

A kioldódást mikro-módszerrel végeztük, 5 mg atorvasztatint és 5 mg atorvasztatinnak megfelelő tömegű szálakat használtunk. A kioldó közeg 37±0,5°C-os, 10 ml desztillált víz volt, amelyet 200 fordulat/perc-el kevertünk. Az 1 ml-es minták mintavételi időpontjai: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 perc. A mintákból mértük a kioldódott hatóanyag mennyiségét a mikroszálak hatóanyagtartalmának meghatározásánál leírt módszerrel, amelyhez 0,025-0,4 mg/ml koncentrációjú kalibrációs oldatsorozatot használtunk. Három párhuzamos próbával dolgoztunk.

Eredmények

Az **2. táblázat** a hatóanyag nélküli és az atorvasztatin tartalmú diszperzió pH-jának, vezetőképességének és viszkozitásának eredményeit tartalmazza.

A hatóanyag nélküli szálak és a négy próba méretei a **3. táblázatban** találhatóak.

A **2. ábra** a vizsgált szálak (IV-es próba) 20X-os, illetve 40X-es nagyítású optikai mikroszkópos képe.

2. táblázat. A diszperziók pH-jának, vezetőképességének és viszkozitásának eredményei

Próba		pH	Vezetőképesség (µS)	Viszkozitás (mPas)
Atorvasztatin diszperzió	nélküli	6,06	19,38	92,1
Atorvasztatin tartalmú diszperzió	tartalmú	7,22	67,4	118,4

3. táblázat. A hatóanyag nélküli szálak és próbák méretei

Próba	Átlagméret ± SD (µm)
Atorvasztatin nélküli diszperzió	0,823 ± 0,21
I	0,862 ± 0,38
II	1,082 ± 0,30
III	0,878 ± 0,28
IV	0,763 ± 0,25

3. ábra. A próbák DSC görbéi

A 3. ábra a vizsgált szálak DSC görbéit tartalmazza.

Az atorvasztatin görbéjén éles olvadási csúcs jelenik meg 162°C hőmérsékleten, 207°C felett pedig bomlás észlelhető (18). A Kollidon görbéjét a 95°C-nál megjelenő vízvesztés jellemzi. A hatóanyag nélküli szálak DSC görbéje a polimer görbéjét követi. A mikroszálak DSC görbéi nagyfokú hasonlóságot mutatnak mindenik próba esetében. Széles endoterm csúccsal a víz elpárolgása jelenik meg, majd az atorvasztatin bomlásának megfelelő csúcs.

Az atorvasztatin mennyiségének meghatározása kapilláris elektroforézissel történt. A 4. ábra a hatóanyag 1mg/ml koncentrációjú oldatának elektroferogramja, a kísérlet kezdeti fázisában, amelyen megfigyelhető a rövid migrációs idő, a fent leírt kísérleti körülmények között (25 mM bórxas puffer + 25 mM SDS, 20 °C, 20 kV).

A próbák átlag hatóanyagtartalma $32,3 \pm 2,1$ % volt. Az összetételből számított elméleti érték 33 %.

A 5. ábra a vizsgált szálak hatóanyag kioldódási görbéit szemlélteti.

Megbeszélés

A hatóanyag hozzáadása a polimer diszperzióhoz a pH növekedését, a vezetőképesség fokozódását és a viszkozitás emelkedését okozza. A pH növekedését a kalcium só bázikusságával lehet magyarázni, a vezetőképesség fokozódása a mozgékony kalcium ionoknak köszönhető.

Irodalmi adatok alapján az electrospinninggel előállított szálak méretét a tű és gyűjtőfólia távolsága, valamint a diszperzió adagolásának sebessége befolyásolja. Esetünkben a legkisebb szálmérethez a kisebb adagolási

4. ábra. Az atorvasztatin elektroferogramja

5. ábra. A próbák hatóanyagleadása

sebesség és távolság társítható (a IV próba 0,7 ml/óra adagolási sebesség és tíz centiméter távolság).

A DSC görbék elemzéséből megállapítható az atorvasztatin kristályos vagy amorf formában való jelenléte, a hatóanyag éles olvadási endotermájának eltűnése a polimerbe való beágyazódás következménye vagy az amorfizáció megvalósulása. A hatóanyag nélküli szálak görbéje és az atorvasztatint tartalmazó szálak görbéje annyiban hasonlít egymásra, hogy látható rajtuk a hő hatására bekövetkezett lazán kötött víz elpárolgása.

A szálak hatóanyagtartalma jó egyezést mutat az elméleti értékkel. A kismértékű eltérés magyarázata az oldószer nem teljes mértékű elpárolgása szálak képződése folyamán.

A tiszta hatóanyag feloldódása egy óra alatt legtöbb $16,6 \pm 1,2$ %, a szálakból ennél több atorvasztatin oldódott ki. Az I-es és II-es próba esetén körülbelül $30 \pm 2,1$ %, a IV-es próbából pedig $40,5 \pm 2$ %, ami kétszeres oldékonyság növekedést jelent a tiszta atorvasztatinhoz viszonyítva.

Következtetések

A dolgozat kitűzött célja a koleszterinszint csökkentő atorvasztatin oldékonyságának növelése hidrophil polimer alapú mikroszálak gyógyszerhordozó előállításának révén. A cél érdekében electrospinning módszerrel mikroszálakat állítottunk elő. A DSC vizsgálat bizonyította a hatóanyag amorfizálódását, és a beágyazódást. A képződött szálak paramétereit jelentősen befolyásolta az előállítás paramétere, mint például a disperzió adagolásának sebes-

sége. A kísérletek eredményei azt mutatták, hogy kisebb áramlási sebességhez kisebb szál átmérő társult. A mikromódszeres kioldódásvizsgálat kétszeres oldékonyság növekedést mutatott.

Köszönetnyilvánítás

A dolgozat létrejöttét az EMEOGYSZ és a Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományi Kara támogatta, a 84.2/2017/P.2/EMEOGYSZ szerződés által.

Irodalom

- Panghal D, Nagpal M, Thakur GS, Arora S. Dissolution Improvement of Atorvastatin Calcium using Modified Locust Bean Gum by the Solid Dispersion Technique. *Scientia pharmaceutica*. 2013;82(1):177-91.
- Lau YY, Okochi H, Huang Y, Benet LZ. Pharmacokinetics of atorvastatin and its hydroxy metabolites in rats and the effects of concomitant rifampicin single doses: relevance of first pass effect from hepatic uptake transporter, and intestinal and hepatic metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*. 2006;34(7):1175-81.
- Prabhu P, Patravale V. Dissolution enhancement of atorvastatin calcium by co-grinding technique. *Drug delivery and translational research*. 2016;6(4):380-91.
- Rodde MS, Divase GT, Devkar TB, Tekade AR. Solubility and Bioavailability Enhancement of Poorly Aqueous Soluble Atorvastatin: In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Studies. *BioMed Research International*. 2014;2014:10.
- Han L, Li M, Liu Y, Han C, Ye P. Atorvastatin May Delay Cardiac Aging by Upregulating Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Rats. *Pharmacology*. 2012;89(1-2):74-82.

6. Ahmed IS, El Hosary R, Hassan MA, Haider M, Abd-Rabo MM. Efficacy and Safety Profiles of Oral Atorvastatin-Loaded Nanoparticles: Effect of Size Modulation on Biodistribution. *Molecular pharmaceutics*. 2018;15(1):247-55.
7. Chen Z-g, Cai H-j, Jin X, Lu J-h, Wang J, Fang N-y. Effects of atorvastatin on bone mineral density (BMD) and bone metabolism in elderly males with osteopenia and mild dyslipidemia: A 1-year randomized trial. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2014;59(3):515-21.
8. McGown CC, Brookes ZLS, Hellewell PG, Ross JJ, Brown NJ. Atorvastatin reduces endotoxin-induced microvascular inflammation via NOSII. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2015;388(5):557-64.
9. Ahmed IS, El-Hosary R, Shalaby S, Abd-Rabo MM, Elkhateeb DG, Nour S. PD-PK evaluation of freeze-dried atorvastatin calcium-loaded poly-epsilon-caprolactone nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2016;504(1-2):70-9.
10. Yao GT, Song LP, Xue WH, Su GH, Ning AH, Wang J. Nanoparticle engineered atorvastatin delivery to support mesenchymal stem cell survival in infarcted myocardium. *Saudi journal of biological sciences*. 2018;25(6):1016-21.
11. Mathur M, Devi Vemula K. Investigation of different types of nano drug delivery systems of atorvastatin for the treatment of hyperlipidemia. *Drug development and industrial pharmacy*. 2018;44(12):2048-60.
12. Thenmozhi S, Dharmaraj N, Kadirvelu K, Kim HY. Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications. *Materials Science and Engineering: B*. 2017;217:36-48.
13. Xue J, Xie J, Liu W, Xia Y. Electrospun Nanofibers: New Concepts, Materials, and Applications. *Accounts of Chemical Research*. 2017;50(8):1976-87.
14. Ignatious F, Sun L, Lee C-P, Baldoni J. Electrospun Nanofibers in Oral Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*. 2010;27(4):576-88.
15. Cozza ES, Monticelli O, Marsano E, Cebe P. On the electrospinning of PVDF: influence of the experimental conditions on the nanofiber properties. *Polymer International*. 2013;62(1):41-8.
16. Desai S, Disouza J, Sable A, Hosmani A. Development of Orodispersible Tablet of Atorvastatin Calcium Using Hot Melt Extrusion. *Drug Delivery Letters*. 2015;5(1):19-30.
17. Székely-szentmiklósi B, Hancu G, Székely-szentmiklósi I, Kovács B, Kelemen H. Simultaneous determination of atorvastatin and ezetimibe from combined pharmaceutical products by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Brazilian Journal of Pharmaceutical sciences*. 2017;53(1):e16122.
18. Shete G, Puri V, Kumar L, Bansal A. Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(2):588-609.