آزادسازی تئوفیلین از حامل طبیعی موم زنبورعسل

مجید وکیـــلی — کارشناسی ارشد مهندسی شیمی

ابراهیم واشقانی فراهانی — دانشیار مهندســی شیمی

نادره گلشن ابراهیمی

دانشیار مهندسی پلیمر

بخش مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی ۱۴۳-۱۴۱۵۵ - تهران - ایران

چکیده

ریزکره‌های موم زنبورعسل حاوی داروی تئوفیلین با روش امولسیون کردن روغن در آب، به منظور بدست آوردن یک سامانه آزادسازی کنترل شده، تهیه شده است. اثرات متغیرهای فرآیند شامل مقدار داروی بارگذاری شده، مقدار امولسیون کننده، سرعت و زمان امولسیون کردن بر روی کارایی فرمولاسیون و سینتیک آزادسازی برون تنی (InVitro) با استفاده از روش آماری تاگوچی برای طراحی آزمایش‌ها بررسی شد.

نتایج سینتیک آزادسازی داروی تئوفیلین از ریزکره‌های موم زنبورعسل، با چند معادله سینتیکی آزادسازی مقایسه و نتیجه‌گیری شد که از نفوذ فیکی (Fickian Diffusion) تبعیت می‌کند و مدل سینتیکی نیمه تجربی تطابق خوبی با داده‌های آزمایشگاهی دارد.

واژه‌های کلیدی : تئوفیلین، سیستم انتقال دارو، آزادسازی کنترل شده، حامل طبیعی، موم زنبورعسل

Theophylline Release from Honey Bees Wax as A Natural Carrier

Vasheghani-Farahani,E., Ph.D of Chemical Eng. — Vakili,M., M.Sc. of Chemical Eng.

Golshan Ebrahimi,N., Ph.D of Polymer Eng.

Chemical Eng. Dept. Tarbiat Modares University, P.O. Box 14155-143 Tehran, Iran

Abstract

Honey bees wax microspheres loaded with theophylline by oil in water emulsification method were prepared to develop an slow release drug delivery system. The effect of process variables including drug contents, emulsifier volume, stirring speed and emulsification time on in vitro drug release were investigated, by Taguchi method for design of experiments.

Kinetics of theophylline release from honey bees wax microspheres were deteremined by fitting experimental data with some kinetics models. It was found that theophylline release from this natural carrier is Fickian type and can be described by a semi-empirical kinetic model.

Key Words: *Theophylline, Drug Delivery System, Controlled Release, Natural Carrier, Honey BeesWax*

مقدمه :

تئوفیلین یک داروی ضد آسم است که به عنوان گشاد کننده نایژه ها به مقدار زیادی برای درمان آسم مزمن و بیماریهای انسداد ریه بکار می‌رود و به دلیل زمان نیمه عمر کوتاه (حدود ۶ ساعت) و سرعت جذب بالا به عنوان داروی مدل انتخاب شده است[1].

ریزکره‌سازی روشی مناسب برای تهیه اشکال دارویی با رهش کنترل شده است (لوزی،۱۹۷۰ و گوتچو ۱۹۷۶ و ۱۹۷۹)[۲]. انتخاب یک روش خاص از بین انواع روشهای ریزکره سازی، به عوامل زیادی مثل خصوصیات انحلال پذیری دارو و پلیمر بستگی دارد. یک روش عمومی برای ریزکره سازی داروهای نامحلول یا کم محلول در آب در پلیمرهای آب گریز، امولسیون کردن روغن در آب می‌باشد. در این فرآیند، یک محلول یا فاز پراکنده از دارو و پلیمر در داخل یک فاز آبی بصورت امولسیون در می آید که در نهایت منجر به تشکیل ریزکره‌ها می‌شود[۳].

روش مورد استفاده در این تحقیق برای تهیه یک سامانه دارورسانی با استفاده از حامل طبیعی ، امولسیون کردن روغن در آب است که در آن داروی تئوفیلین و موم زنبورعسل برای بدست آوردن یک ماده مذاب همگن با هم مخلوط می‌شوند. در مراحل بعدی، ترکیب در یک فاز آبی بصورت امولسیون در می‌آید و سپس با سرد کردن، ریزکره‌هایی تقریبا کروی تشکیل می‌شوند.

بدین منظور، اثر ۴ متغیر فرآیند شامل مقدار داروی بارگذاری شده، مقدار امولسیون کننده، سرعت و زمان امولسیون کردن بر نحوه فرمولاسیون و آزادسازی داروی تئوفیلین در شرایط برون تنی مطالعه شد. بدین منظور از روش آماری تاگوچی برای طراحی آزمایشها استفاده شد. سرانجام به منظور تعیین مکانیزم آزادسازی از این سامانه‌های دارورسانی، چند مدل سینتیکی آزادسازی برای برازش داده‌های آزمایشگاهی تئوفیلین مورد آزمون قرار گرفت.

مواد و روشهای آزمایشگاهی

مواد

تئوفیلین انیدرید (شرکت دارویی داروپخش) با اندازه زیر مش ۲۰۰ ، توییین ۸۰ ، Na_2HPO_4 ، KH_2PO_4 ، NaCl، موم زنبورعسل (شرکت دارویی مرک).

روش تهیه ریزکره‌ها

ریزکره‌های موم زنبورعسل حاوی داروی تئوفیلین با استفاده از روش ریزکره سازی فاز پراکنده قابل انجماد و چربی دوست یا امولسیون کردن روغن در آب تهیه شده اند. دارو به شکل پودر، به موم مذاب (۴/۰۰ گرم) اضافه شده و یک فاز مذاب پراکنده شکل می گیرد. دما در حداقل ^{o}C ۱۰ بالاتر از نقطه ذوب موم نگه داشته می شود. وقتی دارو و موم بوسیله یک همزن مغناطیسی آمیخته شدند، یک فاز آبی (۱۵۰ mL) شامل توییین ۸۰ (به عنوان امولسیفایر) که قبلا به دمای ^{o}C ۸۰ رسیده به این فاز پراکنده، در حین همزدن با سرعت ثابت اضافه می شود تا یک محلول امولسیون روغن در آب شکل گیرد. بعد از همزدن امولسیون برای مدت زمانی خاص، برای سخت شدن فاز پراکنده شامل دارو و موم و شکل گیری ریزکره‌ها، ظرف آزمایش در یک حمام آب سرد (^{o}C۴) قرا ر داده می‌شود. ریزکره‌های حاصل را با کاغذ صافی، صاف کرده و ابتدا با mL ۵۰ محلول نمکی فسفات و سپس با mL ۵۰ آب مقطر (سه بار) شسته می‌شوند. ریزکره‌های شسته شده به مدت ۵ ساعت در آون در دمای محیط و سپس در دستگاه خشک کن انجمادی خشک می شوند.

طراحی آزمایشها

برای تعیین اثرهای متغیرهای فرآیند بر فرمولاسیون سامانه دارورسانی از روش آماری تاگوچی برای طراحی آزمایشها استفاده شد. اثر این ۴ متغیر در سه سطح طبق جدول (۱)، با بکارگیری آرایش L_9 تاگوچی در نه آزمایش مختلف مطابق جدول (۲) بررسی شد. در این جدول پاسخ آزمایشها که بر حسب مقدار K (مقدار مشخصه شبکه دارو و پلیمر در معادله سینتیکی نیمه تجربی) بیان شده است، نیز گنجانده شده است.

جدول ۱- مقادیر سطوح برای متغیرهای فرآیندی

متغیر	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
مقدار دارو (گرم)	۰/۸۰۰	۱/۲۰۰	۱/۶۰۰
حجم امولسیفایر (mL)	۰/۳۷۵	۰/۷۵۰	۱/۰۰۰
سرعت همزدن (rpm)	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰
زمان همزدن (دقیقه)	۳	۵	۱۰

جدول ۲- آرایش متعامد L۹ تاگوچی

No. of Trial	مقدار دارو (گرم)	حجم امولسیفایر (mL)	سرعت همزدن (rpm)	زمان همزدن (دقیقه)	k
۱	۰/۸	۰/۳۷۵	۱۰۰	۳	/۵۲
۲	۰/۸	۰/۷۵۰	۲۰۰	۵	/۴۲
۳	۰/۸	۱/۰۰۰	۳۰۰	۱۰	/۶۳
۴	۱/۲	۰/۳۷۵	۲۰۰	۱۰	/۵۳
۵	۱/۲	۰/۷۵۰	۳۰۰	۳	/۶۲
۶	۱/۲	۱/۰۰۰	۱۰۰	۵	/۶۸
۷	۱/۶	۰/۳۷۵	۳۰۰	۵	/۷۵
۸	۱/۶	۰/۷۵۰	۱۰۰	۱۰	/۷۷
۹	۱/۶	۱/۰۰۰	۲۰۰	۳	/۶۵

در این آزمایشها، مقادیر کمتر K به منظور افزایش زمان آزادسازی دارو به عنوان پاسخ در نظر گرفته شده و مطلوب است.

اندازه گیری میزان داروی بارگذاری شده در ریزکره‌های تئوفیلین- موم

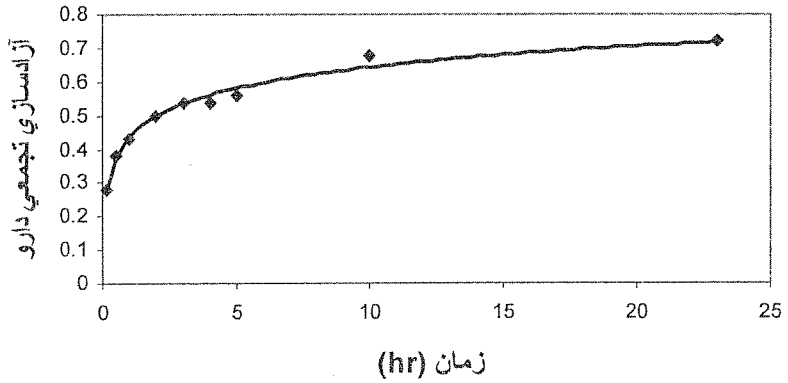
۵۰mg از ریزکره‌های هرنمونه آزمایش توسط ترازوی دیجیتالی به طور دقیق وزن شده و به mL ۵۰ محلول نمکی فسفات بافر ۱M /۰ با pH= ۷/۴ اضافه می شوند. محتویات ظرف آزمایش در حمام آب گرم $۸۰^{o}C$ به مدت ۵ دقیقه، ذوب می شوند. بعد از سرد شدن، موم‌های منجمد شده صاف می شوند و غلظت تئوفیلین در محلول صاف باقیمانده، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV در طول موج ۲۷۴ nm تعیین می شود.

آزادسازی تئوفیلین از ریزکره‌ها در محیط برون تنی (In Vitro)

برای آزادسازی برون تنی تئوفیلین از ریزکره‌های موم زنبورعسل، از محلول نمکی فسفات بافر pH= ۷/۴ به عنوان محیط شبیه بدن (سیال روده ای) استفاده شد. بدین منظور، ۵۰ mg از ریزکره‌های حاوی داروی تئوفیلین به ۵۰ mL محلول نمکی فسفات بافر اضافه می شود. ظرف آزمایش کاملا آب‌بندی شده و در یک دستگاه انکوباتور لرزان که به طور افقی در دمای $37 \pm 1^{\circ}C$ با سرعت ۱۸۰ rpm می‌لرزد، قرار داده می‌شود. در فاصله‌های زمانی مشخص و متوالی از ظرف آزمایش، نمونه های ۱ mL برداشته و با محلول نمکی فسفات بافر تازه جایگزین می‌شود و غلظت تئوفیلین در نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV در طول موج nm ۲۷۴ اندازه‌گیری می‌شود.

نتایج آزمایشگاهی و بحث

در شکل (۱) آزادسازی تجمعی تئوفیلین از ریزکره‌های موم زنبورعسل بر حسب $\frac{M_t}{M_\infty}$ در مقابل زمان برای آزمایش شماره ۲ نشان داده شده است.

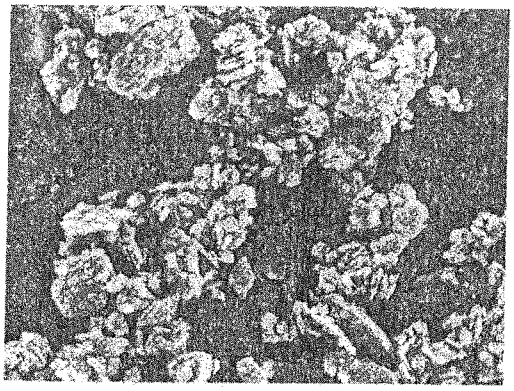


شکل۱- آزادسازی تجمعی تئوفیلین از ریزکره‌های موم زنبورعسل بر حسب $\frac{M_t}{M_\infty}$

در مقابل زمان، آزمایش شماره ۲

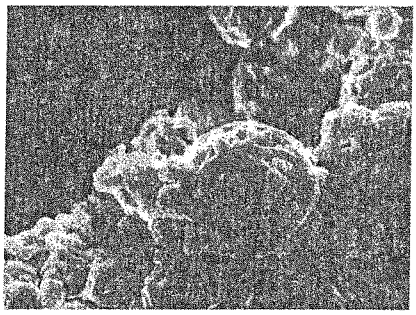
مطابق این نمودار، آزادسازی کل دارو پس از مدت زمان حدود ۲۵ ساعت رخ داده و حدود ۶۰ تا ۸۰ درصد آن عمدتا در ۵ ساعت اولیه فرآیند آزادسازی، آزاد شده است و بنابراین آزادسازی تئوفیلین از ریزکره‌های موم زنبورعسل دارای آزادسازی انفجاری اولیه است.

نتایج حاصل از تعیین میزان داروی بارگذاری شده برای هر نمونه، نشان می‌دهد که حداکثر امتزاج‌پذیری تئوفیلین ۲۳/۳۵ درصد وزنی موم زنبورعسل می‌باشد که در آزمایش شماره ۵ رخ داده است.



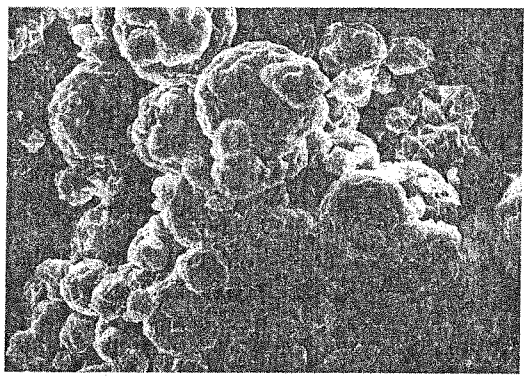
شکل۲- کلوخه‌های حاصل از فرآیند امولسیون کردن بدون اضافه کردن امولسیفایر

شکل(۲) نشان می‌دهد تلاش برای تهیه ریزکره‌ها، بدون اضافه کردن یک امولسیفایر، ناموفق بوده و منجر به تولید کلوخه‌های جدا از هم در فرآیند انجماد موم‌ها می‌شود. به هم پیوستن ذرات موم ناشی از جدایی فازی بین ماده آب‌گریز موم زنبورعسل و فاز آبی خارجی است.



شکل ۳- تصویر میکروسکوپی ریزکره‌های موم زنبورعسل در باروری صفر از تئوفیلین، با بزرگنمایی ۲۵۰

با افزودن تویین ۸۰ به عنوان امولسیفایر، ذرات کروی موم زنبورعسل در بارورری صفر از دارو، با سطحی ناصاف تشکیل می‌شوند (شکل (۳)). ناصافی سطح را می‌توان به شدت انجماد نامناسب موم و یا برخورد همزن مکانیکی با سطح ذرات در حین فرآیند انجماد نسبت داد.ریزکره‌های موم زنبورعسل حاوی داروی تئوفیلین تهیه شده در آزمایش‌های شماره ۲ و ۸، به ترتیب در شکل‌های (۴) و (۵) نشان داده شده‌اند. این ذرات دارای شکل کروی با سطح ناصاف و فرورفتگی می‌باشند و اندازه آنها بین ۲۵ تا ۱۰۰ میکرومتر تغییر می‌کند.



شکل ۴- تصویر میکروسکوپی ریزکره‌های موم زنبورعسل بارور شده با تئوفیلین، در آزمایش شماره ۲، با بزرگنمایی ۲۵۰

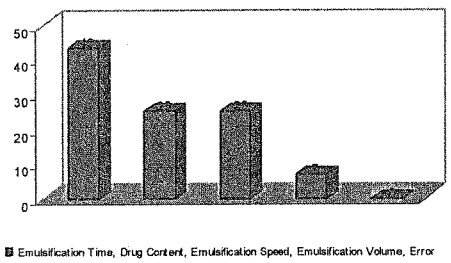
شکل۵- تصویر میکروسکوپی ریزکره‌های موم زنبورعسل بارور شده با تئوفیلین، در آزمایش شماره ۸ ، با بزرگنمایی ۲۵۰

متوسط اندازه ذرات در شکل‌های (۴) و(۵) نشان می‌دهند که ریزکره‌های آزمایش شماره ۲ از ریزکره‌های تهیه شده در آزمایش شماره ۸ بزرگتر هستند. کاهش اندازه ذرات می‌تواند ناشی از افزایش سرعت همزن در آزمایش شماره ۸ باشد. با توجه به کمترین مقدار متوسط K در جدول شماره (۲) برای هر سطح از متغیرها، می‌توان شرایط بهینه را تعیین نمود. جدول(۳) شرایط بهینه فرآیندی امولسیون کردن روغن در آب ریزکره‌های موم زنبورعسل حاوی داروی تئوفیلین را نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که کمترین مقدار برای داروی بارگذاری شده و بیشترین مقدار برای زمان همزن، بهترین شرایط را برای تهیه سامانه دارورسانی تئوفیلین تشکیل می‌دهد.

جدول۳- شرایط بهینه فرآیندی امولسیون کردن ریزکره‌های موم زنبورعسل حاوی تئوفیلین

متغیر	مقدار سطح	سطح
مقدار دارو (گرم)	۰/۸۰	۱
حجم امولسیفایر (mL)	۰/۷۵	۲
سرعت همزدن (rpm)	۲۰۰	۲
زمان همزدن (دقیقه)	۱۰	۳

از بین ۴ متغیر فرآیندی بررسی شده با استفاده از آنالیز واریانس داده‌ها (ANOVA)، زمان همزدن بیشترین تاثیر را در عملکرد سیستم انتقال دارو دارد (شکل (۶). افزایش زمان همزدن باعث اختلاط کامل دارو می‌شود. از آنجا که تئوفیلین، دارویی بسیار کم محلول در آب است افزایش زمان همزدن تاثیر ناچیزی در افزایش انحلال دارو در فاز آبی خارجی دارد و موجب می‌شود دارو بطور یکنواخت‌تر بین مولکولهای موم زنبورعسل به تله بیفتد.



شکل۶- میزان تاثیر متغیرهای فرآیندی در امولسیون کردن ریزکره‌های موم زنبورعسل

برای بررسی رفتار سینتیکی آزادسازی دارو از ریزکره‌ها از سه معادله پتووینسکی(۱)، نیمه تجربی(۲) و درجه صفر (۳) استفاده شده است. نتایج مقایسه داده‌های آزمایشگاهی با این معادلات بر حسب ضریب همبستگی در جدول (۴) نشان داده شده است.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-k(t+b)} \qquad (۱)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \qquad (۲)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt \qquad (۳)$$

$\frac{M_t}{M_\infty}$ جزء آزاد شده دارو در زمان τ ، k ثابت مشخصه شبکه دارو و موم، b ثابت پتووینسکی و n نمای نفوذی است که مکانیسم نفوذ را مشخص می‌نماید.

جدول ۴- خلاصه نتایج مقایسه داده‌های آزمایشگاهی با معادلات سینتیکی آزادسازی دارو

شماره آزمایش	ضریب همبستگی مدل سینتیکی درجه صفر	ضریب همبستگی مدل سینتیکی نیمه تجربی	ضریب همبستگی مدل سینتیکی پتووینسکی
۱	۰/۴۳۵	۰/۹۲۹	۰/۸۵۳
۲	۰/۴۷۰	۰/۹۷۸	۰/۷۸۷
۳	۰/۳۴۷	۰/۹۱۲	۰/۹۰۴
۴	۰/۵۳۳	۰/۹۰۰	۰/۹۱۱
۵	۰/۴۰۷	۰/۸۴۵	۰/۵۸۲
۶	۰/۲۹۵	۰/۹۴۳	۰/۸۱۷
۷	۰/۲۷۷	۰/۹۳۰	۰/۸۶۷
۸	۰/۱۸۶	۰/۹۲۱	۰/۶۸۸
۹	۰/۳۶۱	۰/۹۷۱	۰/۸۹۹

مقایسه داده‌های آزمایشگاهی با معادلات سینتیکی آزادسازی، نشان می‌دهد که معادله سینتیکی نیمه تجربی مطابقت خوبی با داده‌های آزمایشگاهی دارد ولی معادله سینتیکی پتووینسکی تطابق خوبی ندارد و هیچ تطابقی بین داده‌های آزمایشگاهی و معادله درجه صفر وجود ندارد.

مقادیر محاسبه شده n (نمای نفوذی معادله سینتیکی نیمه تجربی) برای برازش داده‌های آزمایشگاهی در جدول (۵) گزارش شده است. وجود مقادیر کمتر از ۰/۵ نشان می‌دهد که سینتیک آزادسازی تئوفیلین از اغلب ریزکره‌ها، از قانون نفوذ فیک پیروی می‌کند.

جدول ۵- مقادیر n (نمای نفوذی) در معادله سینتیکی نیمه تجربی

شماره آزمایش	۱	2	3	4	5	6	7	8	9
n	/49	/74	/47	/52	/42	/53	/47	/46	/41

نتیجه‌گیری کلی :

نتایج آزمایشگاهی نشان می‌دهد که ریزکره‌های موم زنبورعسل را می‌توان برای آزادسازی تاخیری تئوفیلین با روش امولسیون کردن روغن در آب تهیه کرد. این روش آسان، سریع و ارزان بوده و احتیاج به استفاده از حلالهای آلی که برای سلامت انسان مضرند، نیست. این نتایج پتانسیل موم زنبورعسل را برای استفاده در تولید سامانه‌های آزادسازی بسیاری از داروهای نامحلول یا کم محلول در آب ثابت می‌کند.

مقایسه نتایج آزادسازی داروی تئوفیلین با مدلهای سینتیک آزادسازی دارو نشان داد که مدل نیمه تجربی تطابق خوبی با داده‌های آزمایشگاهی دارد و میزان باروری کم دارو و افزایش زمان همزدن امولسیون تاثیر مثبتی بر تهیه سامانه دارویی با آزادسازی تاخیری دارد. علاوه بر این، مکانیزم آزادسازی دارو از این سامانه، نفوذ فیکی می‌باشد.

مراجع

[1] Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley and Sons Ltd, Vol.22, 1981.

[۲] Hui Chen, Jen-Chin WU and Hui-Ying Chen, "Preparation of ethylcellulose microcapsules containing theophylline by using emulsion non-solvent addition method", L.Microencapsulation, 112 (2), 37-147, 1995.

[۳]Rainer A. and Bodmeier R., "Encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent evaporation method. I.effect of precess and formulation variables on drug entrapment", J.Microencapsulation, 7(3), 347-355, 1990.

[۴] Gianola L.I., DE Caro V.De and Rizzo M.C." Preparation of white beeswax microspheres loaded with valporic acid and kinetic study of drug release", Drug

Dev. and Ind. Pharmacy, 21(7), 793-807, 1995.

[۵] Varshosaz J. and Keihanfar M., "Development and evaluation of sustained-release propranolol wax microspheres", J.,Microencapsulation, 18(2), 277-284, 2001.

[6] Bodmeier R., Wang J. and Bhagwarwar H., "Process and formulation variables in the preparation os wax microparticles by a melt dispersion technique. I.Oil-in-water technique for water-insoluble drugs", J.Microencapsulation, 9(1), 89-98, 1992.

[7] Gianola L.I., Steafano V.De and Caro V.De, "White beeswax microspheres: A comparative in vitro evalution of emulative release of the anticancer agents flurouracil and ftorafur", Pharmazie, 48(2), 123-126, 1993.

[8] Jayan P.G., "Design of experiment using taguchi method", Indian Institute of technology, 2000.

[۹] محمد خرم، «تهیه پلی‌انیدریدهای زیست تخریب‌پذیر جهت استفاده در سیستم‌های آزادسازی کنترل شده دارو»، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۳.