

Д. Т. Бобокалонов<sup>1</sup>, З. К. Мухидинов<sup>1</sup>, И. Ф. Рахимов<sup>1</sup>, Ф. М. Ходжаева<sup>1</sup>,  
Г. Ф. Касимова<sup>1</sup>, L. S. Liu<sup>2</sup>

## КИНЕТИКА ВЫХОДА ПИРОКСИКАМА ИЗ ЗЕИН-ПЕКТИНОВЫХ НОСИТЕЛЕЙ В ОПЫТАХ *EX VIVO*

<sup>1</sup> Институт химии им. В. И. Никитина Академии наук РТ, Душанбе, Таджикистан.

<sup>2</sup> Eastern Regional Research Center ARS USDA, 600 East Mermaid line, Wyndmoor, PA 19038, U.S.A.

Исследована кинетика высвобождения пироксикама из зеин-пектиновых систем доставки лекарств в условиях *ex vivo* с использованием содержимого кишечника лабораторных крыс. Кинетические параметры выхода пироксикама были рассчитаны по уравнению реакции первого порядка и уравнению Пепасса. Полученные данные свидетельствуют о том, что лимитирующую роль в процессе высвобождения пироксикама из гидрогелевых микросфер играет диффузия терапевтического агента. Созданные терапевтические формы на основе биоразрушающихся полимеров являются альтернативным вариантом для перорального назначения большинства ЛВ с ограниченной биодоступностью.

**Ключевые слова:** пектин, зеин, гидрогель, система доставки лекарства, *ex vivo*, пироксикам.

Перспективы развития фармацевтической технологии определяются требованиями современной фармакотерапии, которые предполагают создание максимально эффективных препаратов, содержащих минимум лекарственных субстанций, не обладающих побочным действием.

Традиционное введение лекарственных форм характеризуется быстрым и неконтролируемым высвобождением активных компонентов лекарственных веществ (ЛВ) в организме с назначением максимальных количеств для достижения терапевтической дозы в крови. Разработка лекарственных форм с направленной доставкой и контролируемым высвобождением ЛВ позволяет повысить эффективность, удерживать постоянный уровень их терапевтической концентрации в плазме крови, и, тем самым, открывает возможность использования принципиально новых групп действующих веществ.

В предыдущих сообщениях, в плане поиска новых терапевтических систем, нами были представлены результаты разработки и исследования систем доставки лекарств (СДЛ) в виде гидрогелей на основе биодegradирующих биополимеров пектина и зеина кукурузы [1, 2], а также исследования кинетики высвобождения ЛВ в опытах *in vitro* [3].

Цель данной работы заключалась в исследовании кинетики высвобождения пироксикама из зеин-пектиновых СДЛ в условиях *ex vivo* для лучшего понимания механизма транспорта модельного ЛВ в среде желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

### Экспериментальная часть

В работе использовали низкометилованный пектин — НМЦСПК, выделенный из цитрусовых (GENU 12CG, CP Kelco, USA) и низкометилованный яблочный пектин — НМЯПШ (Шахринав, Таджикистан). Зеин выделяли из обезжиренной муки кукурузы по ранее описанному методу [4]. Способ получения и характеристика зеин-пектиновых СДЛ приведена в работе [2].

Крысы линии Вистар массой 200 – 250 г (6 – 7 животных) содержались на обычном пищевом рационе. В течение 3 дней животным с помощью тefлоновой трубки (или канюли) ежедневно вводили 2,5 мл 2 % водного рас-

твора пектина с целью образования пектолитических ферментов в кишечнике. Протокол проведения процедуры экспериментов был подготовлен в соответствии с инструкцией работы с животными [5], представленной лабораторией Госдепартамента США по сельскому хозяйству и одобренной Этическим комитетом при АН РТ.

По истечении 3 дней после введения 2 % раствора пектина в количестве 10 мл/кг массы животные были умерщвлены. Эвтаназию проводили в отдельной комнате в клетке, снабженной штурцером, через который подавался CO<sub>2</sub>. Во избежание неожиданных реакций со стороны животных, которые могут привести к ненужному стрессу, медленно начинали подачу CO<sub>2</sub> (примерно 25 % от объема клетки) для замещения воздуха в клетке (20 % эквивалентно 1 л в мин для маленьких клеток). После умерщвления животных производили вскрытие брюшной полости, затем путем препарирования выводили весь кишечник наружу, нарезая по 3 отрезка размером в 2 – 4 см из тонкого и толстого кишечника. Образцы органов для исследования помещали в пробирки, заполненные солевым раствором фосфатного буфера (по 5 мл, pH 6,4).

Кинетику высвобождения ЛВ изучали путем инкубации содержимого кишечника вместе с СДЛ. Набухшие комплексы массой 50 – 100 мг, в зависимости от дозы ЛВ, заливали в диализные мешки с содержимым кишечника в фосфатном буфере и помещали в аппарат, предназначенный для изучения растворения ЛВ (DT 600 NH Dissolution Tester LB-550, ERWEKA, Germany). Аппарат снабжался на линии с проточным спектрофотометром (UV spectrophotometers UA-5 ISCO, USA) и заполнялся фосфатным буфером (400 мл) при 37 °С. Через определенные промежутки времени измеряли экстинкцию растворов при 337 нм и по калибровочному графику, построенному по стандартному пироксикаму, определяли количество высвобожденного ЛВ. Общее количество вовлеченного лекарства в гидрогелевые комплексы  $M_0$  и количество высвобожденного ЛВ по времени из гидрогелей  $M_t$  определяли, как описано в работе [3].

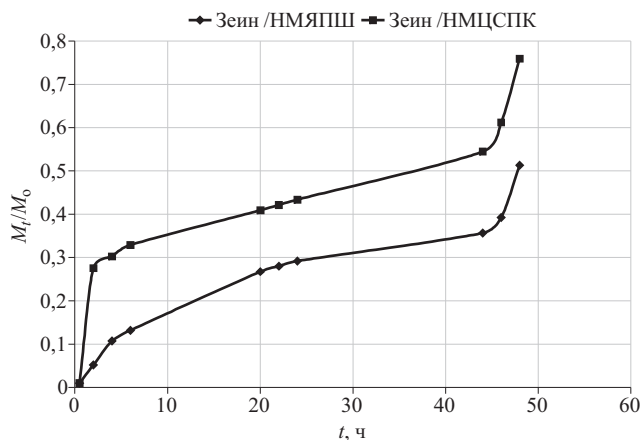


Рис. 1. Выход пироксикама из гидрогелевых зеин-пектиновых микрофер в опытах *ex vivo*.

### Результаты и их обсуждение

В табл. 1 приводится дозировка СДЛ и время, за которое высвобождалось 50 % ЛВ. Как видно, полученные гидрогелевые носители при одинаковых соотношениях протеин/пектин имеют различную степень набухания, дозу и время выхода пироксикама.

На рис.1 представлена кинетика высвобождения пироксикама из зеин-пектиновых микрофер на основе яблочного и цитрусового пектинов при инкубации их с содержимым кишечника.

Кинетические кривые, за исключением начального и конечного периода, имеют линейный характер в большом интервале времени (около 40 ч). Для микрофер на основе цитрусового пектина они схожи с кривыми, полученными в экспериментах *in vitro* [3], — проявляют начальный “взрывной” эффект, переходящий в прямолинейный выход ЛВ. Для микрофер из яблочных пектинов они несколько отличаются от кривых *in vitro*, где выход пироксикама протекает по кинетике нулевого порядка. В данном эксперименте выход ЛВ замедляется, достигая 50 % за 48 ч. В обоих случаях за 45 ч инкубации происходит разрушение микрофер, что заметно по резкому выходу ЛВ. Если до этой точки диффузия ЛВ во внешнюю среду происходит за счет релаксации полимерной сетки, вследствие набухания пектина, то ферментативный распад сетки приводит к заметному высвобождению пироксикама. Разница между выходом ЛВ из микрофер на основе яблочного и цитрусового пектинов объясняется образова-

Таблица 1  
Соотношение зеин/пектин, количество сухого носителя, доза пироксикама в нем и время высвобождения 50 % препарата

Опыт	СДЛ	Соотношение зеин/пектин	Количество сухого носителя, мг	Доза пироксикама в СДЛ, мкг	$T_{50\%}$ , ч
<i>In vitro</i>	Зеин/НМЯПШ	1,3	4,90	1000	35,0
<i>Ex vivo</i>	Зеин/НМЯПШ	1,3	6,34	1000	48,0
<i>In vitro</i>	Зеин/ НМЦСПК	1,3	7,20	1000	17,0
<i>Ex vivo</i>	Зеин/ НМЦСПК	1,3	8,30	1000	36,0

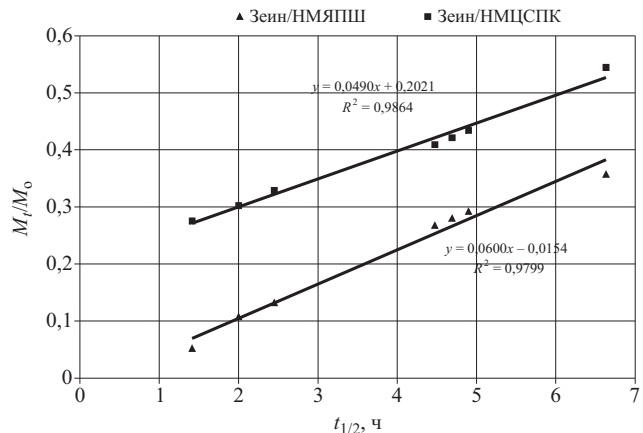


Рис. 2. Зависимость фракции высвободившегося пироксикама от квадратного корня времени (кривые Хигуши), для гидрогелевых микрофер на основе яблочного и цитрусового пектинов с зеином в опытах *ex vivo*.

нием 2 видов связи между зеином и пектином, как было показано методом турбодиметрии [6].

Сравнивая время выхода ЛВ в опытах *in vitro* и *ex vivo*, можно наблюдать диффузионный транспорт ЛВ из гидрогелей вследствие релаксационного механизма полимерной сетки (пектиновые участки), вызванного средой растворителя. Если 50 % пироксикама высвобождалось из микрофер на основе зеина и яблочного пектина в опытах *in vitro* за 35 ч, то время выхода этого препарата в опытах *ex vivo* достигало 48 ч. Для микрофер на основе зеина и цитрусового пектина оно составило 17 ч *in vitro* и 36 ч *ex vivo* соответственно. Значительная протяженность во времени объясняется эффектом набухания ионогенной части полимерной сетки в хорошем (гидрофильный — буферный раствор, *in vitro*) и плохом (гидрофобный — смесь буферного раствора и содержимое кишечника, *ex vivo*) растворителях.

Кинетические параметры выхода пироксикама были рассчитаны по уравнению реакции первого порядка Хигуши [7]:

$$Q = kt^{1/2}, \quad (1)$$

где  $Q$  — количество высвободившегося ЛВ,  $k$  — константа и  $t$  — время. Для оценки механизма диффузии ЛВ в дальнейшем кинетические данные обрабатывались с использованием степенной зависимости кинетики выхода ЛВ по уравнению Пепасса [8]:

Таблица 2  
Физико-химические параметры зеин-пектиновых гидрогелевых микрофер в опытах *in vitro* и *ex vivo*

Опыт	СДЛ	Содержание пироксикама в гидрогеле, мг/г	Степень набухания	$K_h \cdot 10^2$ , ч <sup>-1/2</sup>	$R^2$	$n$ (релиз экспонента)
<i>In vitro</i>	Зеин/НМЯПШ	204,0	6,70	16,6	0,996	0,56
<i>Ex vivo</i>	Зеин/НМЯПШ	158,0	7,22	6,00	0,980	0,61
<i>In vitro</i>	Зеин/НМЦСПК	139,0	16,00	31,0	0,990	0,22
<i>Ex vivo</i>	Зеин/НМЦСПК	120,0	13,72	4,90	0,986	0,21

$$M_t/M_0 = Kt^n, \quad (2)$$

где  $M_t/M_0$  — фракция высвободившегося ЛВ,  $K$  — константа,  $t$  — время и  $n$  — экспонент, показывающий механизм транспорта ЛВ из полимерного матрикса. Для Фиковской диффузии  $n = 0,5$ ; когда  $n = 1,0$  процесс транспорта подчиняется аномальной диффузии, так называемый “случай II”. Это уравнение также может предсказать процессы “Супер случая II” ( $n > 1,0$ ), когда транспорт происходит по механизму нулевого порядка.

Рассчитанные параметры кинетики транспорта пироксикама из зеин-пектиновых микросфер приведены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что изученные СДЛ в виде гидрогелевых микросфер имеют близкие значения степени набухания и количество инкапсулированного пироксикама, но кинетические параметры у них отличаются в зависимости от условий среды эксперимента. В полном соответствии с уравнением Хигуши (1) зависимость количества высвободившегося пироксикама из пленок от корня квадратного времени имеет линейный характер (рис. 2). Кинетическая константа у микросфер с яблочным пектином в опытах *ex vivo* составляет  $6,0 \cdot 10^{-2}/ч^{1/2}$  с коэффициентом корреляции  $R^2 = 0,9799$ . Это значение в 2,5 раза меньше, чем константа высвобождения пироксикама в опытах *in vitro* ( $16,6 \cdot 10^{-2}/ч^{1/2}$ ,  $R^2 = 0,9864$ ).

В то же время значение константы высвобождения пироксикама из микросфер, полученных на основе цитрусового пектина, отличаются в 6 раз при переходе от *in vitro* к *ex vivo*. Это указывает на то, что релаксационные процессы в гидрофильной среде буфера для данного пектина интенсивнее, и пироксикам из СДЛ транспортируется быстрее.

Однако значение транспортного экспонента  $n$  указывает на более сложный механизм процесса диффузии из зеин-пектиновых микросфер. Значение экспонента  $n < 0,22$  для микросфер с цитрусовым пектином указывает на исключительно фиковский механизм диффузии пироксикама, в то время как значение  $n < 0,5$  для микросфер из яблочного пектина указывает на влияние аномальных процессов в полимерном матриксе. Учитывая, что фракция зеина в полимерном матриксе имеет гидрофобную природу, и пироксикам связывается в основном с этими участками, то отсутствие влияния среды на релиз

параметров вполне можно объяснить амфотерным (дуальным) поведением зеин-пектиновой композиционной сетки.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что лимитирующую роль в процессе высвобождения пироксикама из гидрогелевых микросфер играет его диффузия в матрице, что подтверждается низкой величиной экспонента в уравнении Пепасса. Столь заметная разница кинетических констант в изученных средах указывает на то, что полимерная сетка, образованная за счет пектина и зеина, способна реагировать на внешние стимулы, что делает изученные СДЛ привлекательными для транспорта ЛВ в ЖКТ. Кроме того, созданные терапевтические формы на основе биоразрушающихся полимеров являются альтернативным вариантом для перорального назначения большинства ЛВ с ограниченной биодоступностью, снижая побочные эффекты путем уменьшения их дозировки, и при этом создавая массу удобств пациентам в плане дозировки и безопасности ЛВ. Наконец, такая постановка эксперимента облегчает (упрощает) дальнейшее доклиническое и клиническое исследование СДЛ.

Работа выполнена в рамках проекта МНТЦ Т-1419 при финансовой поддержке Госдепартамента США по сельскому хозяйству.

## ЛИТЕРАТУРА

1. L. S. Liu, M. L. Fishman, K. B. Hicks, et al., *Drug Del.*, **13**, 417 – 423 (2005).
2. Г. Ф. Касьмова, Д. Т. Бобокалонов, А. С. Насриддинов и др., *Изв. АН РТ отд. физ.-мат., хим. и геол. наук*, **134**(1), 59 – 65 (2009).
3. З. К. Мухидинов, Г. Ф. Касьмова, Д. Т. Бобокалонов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **44**(9), 20 – 24 (2010).
4. Г. Ф. Касьмова, Д. Т. Бобокалонов, М. Д. Халикова и др., *Изв. АН РТ. отд. физ.-мат., хим. и геол. наук.*, **127**(2), 42 – 50 (2007).
5. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Washington DC (1996).
6. А. Ш. Штанчаев, А. С. Насриддинов, Х. И. Тешаев и др., *Докл. АН РТ*, **50**, 725 – 730 (2007).
7. T. Higuchi, *J. Pharmacol. Sci.*, **52**, 1145 – 1148 (1960).
8. R. W. Korsmeyer, S. R. Lustig, and N. A Peppas, *Polym. Sci. Polym. Phys.*, **24**, 395 – 408 (1986).

Поступила 17.01.11

## PIROXICAM EX VIVO RELEASE KINETICS FROM ZEIN/PECTIN DELIVERY SYSTEMS

D. T. Bobokalonov<sup>1</sup>, Z. K. Mukhidinov<sup>1</sup>, I. F. Rakhimov<sup>1</sup>, F. M. Khodzhaeva, G. F. Kasymova, and L. S. Liu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Nikitin Institute of Chemistry, Tajik Academy of Sciences, Dushanbe, 834063, Tajikistan

<sup>2</sup> Eastern Regional Research Center, U. S. Department of Agriculture, 19038 Wyndmoor, PA, United States

*Ex vivo* experiments using rat cecum incubated with zein/pectin delivery systems have been carried out. The delivery systems were prepared by gelling corn zein and two different low methoxylated pectins from apple and citrus. The behavior of a delivery system based on citrus pectin differs from that based on apple pectin. The release data were fitted into Higuchi plot and the transport mechanism of model drug (piroxicam) was evaluated through the Peppas' power equation. The results showed that a limiting stage in the piroxicam release from hydrogel microspheres was the drug outdiffusion. Both delivery systems showed retarded drug release over a long period, which make them promising for the delivery of low-water-soluble drugs through oral route.

**Key words:** Pectin, zein, hydrogel, drug delivery system, release kinetics, *ex vivo*, piroxicam