

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „Д-Р ПАРАСКЕВ
СТОЯНОВ“ – ГР. ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ
КАТЕДРА “ФАРМАЦЕВТИЧНА ХИМИЯ”**

Надежда Антонова Иванова

**НОВИ АСПЕКТИ В АНАЛИЗА НА *DILTIAZEM* БАЗИРАНИ
ПОЛИМЕРНИ ЛЕКАРСТВО-ДОСТАВНИ СИСТЕМИ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен „доктор“ в професионално направление „Фармация“ по научна
специалност „Фармацевтична химия“**

Научни ръководители:

Доц. Илиян Николов Колев, д.х.

Проф. Милен Венциславов Димитров, д.ф.

Варна,

2020

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на катедра по Фармацевтична химия при Медицински Университет – Варна „Проф. Д-р. Параскев Стоянов“ и насочен за защита пред Научно жури.

Дисертационният труд обхваща 134 страници, 52 фигури и 13 таблици. Дисертационният труд включва 5 приложения. Цитирани са 190 заглавия.

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в катедра по Фармацевтична химия при Медицински Университет – Варна „Проф. Д-р. Параскев Стоянов“ и в Университет „Алдо Моро“, Бари, Италия, с който е осъществена колаборация по програма „Еразъм плюс“.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе наот.....в зала.....на открито заседание на Научното жури.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Въведение

II. Цел и задачи

III. Материали и методи

1. Получаване на *Diltiazem* база. Спектрално поведение и разтворимост на *Diltiazem hydrochloride* и база
2. Получаване и изследване на структурата на *Diltiazem*-натоварени полимерни (*Ammonio Metacrylate Copolymer Type B*) лекарстводоставящи системи от *microsponge*-тип
3. Метод на кварцово-кристалната микровезна (QCM-метод). Количествено определяне на *Diltiazem* в полимерна матрица от *Eudragit RS (Ammonio Metacrylate Copolymer Type B)* посредством QCM-метод
4. *In vitro* и *ex vivo* изследвания за прогнозиране на терапевтичния потенциал на *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsponge*-тип частици
5. Оценка на хидролитичната стабилност на *Diltiazem* в различни полимерни среди

IV. Резултати и обсъждане

1. Разтворимост и спектрално поведение на *Diltiazem hydrochloride* и *Diltiazem* база
2. Охарактеризиране на *Diltiazem*-натоварени полимерни лекарстводоставящи системи. Методи за оценка на дисперсионното поведение на *Diltiazem* в полимерни среди
3. Количествен анализ на *Diltiazem* в сложно-съставни полимерни смеси посредством QCM анализ
4. *In vitro* и *ex vivo* изследвания за прогнозиране на терапевтичния потенциал на *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsponge*-тип частици
5. Хидролитична стабилност на *Diltiazem*

V. Изводи

VI. Заключение

VII. Приноси

VIII. Списък на публикациите във връзка с дисертационния труд

Използвани съкращения

ПАВ – повърхностно-активно вещество

ICH – International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use/ Международна конференция по хармонизация на техническите изисквания при регистриране на лекарствени продукти за хуманна употреба

ANOVA - analysis of variance/ дисперсионен анализ

ATR - attenuated total reflection/ пълно вътрешно отражение

c-DTZ 2% - conventional Diltiazem gel 2%/ конвенционален гел с дилтиазем 2%

CDP – cumulative drug permeated/ кумулативно преминало лекарствено вещество

CDR – cumulative drug released/ кумулативно освободено лекарствено вещество

C_{DTZ} – concentration of Diltiazem/ концентрация на дилтиазем

C_{PVA} – concentration of poly (vinyl alcohol)/ концентрация на поливинилов алкохол

Conc. – concentration/ концентрация

DC% - percent drug content/ процентно съдържание на лекарствено вещество

DCM – dichloromethane/ дихлорометан

DEV – deviation/ отклонение

DPR – drug to polymer ratio/ съотношение активно вещество към полимер

DSC – differential scanning calorimetry/ диференциална сканираща колориметрия

DTZ – Diltiazem/ дилтиазем

DTZ·HCL – Diltiazem hydrochloride/ дилтиазем хидрохлорид

E.E. - encapsulation efficacy/ ефикасност на натоварването

EDX – energy-dispersive X-ray spectroscopy/ енергийно-дисперсионен рентгенов анализ

FD – factorial design/ факториален дизайн

FT-IR – Fourier-transform infrared spectroscopy/ инфрачервена спектроскопия с Фурие преобразование

HPLC - high performance liquid chromatography/ високо-ефективна течна хроматография

IR - infrared spectroscopy/ инфрачервена спектроскопия

Mc – methylcellulose/ метилцелулоза

Micro-I-DTZ 2% - microsponge enriched Diltiazem gel 2%/ модифициран гел с дилтиазем 2%, при който лекарственото вещество е въведено посредством *microsponge-min* лекарстводоставящи частици

M_r – relative molecular mass/ относителна молекулна маса

MWCO - molecular weight cut-off/ молекулна пропускливост

P.Y. - production yield/ добив

P.S. – particle size/ размер на частиците

PBS – phosphate buffer solution/ фосфатен буферен разтвор

PES – polyethersulfone/ полиетресулфон

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia/ Европейска Фармакопея

PVA – poly(vinyl alcohol)/ поливинилов алкохол

Px – Poloxamer/ Полоксамер

QCM – quartz crystal microbalance/ кварцово-кристална микровезна

Rpm – rounds per minute/ обороти в минута

RSD – relative standard deviation/ относително стандартно отклонение

SD – standard deviation/ стандартно отклонение

SEM – scanning electron microscopy/ сканираща електронна микроскопия

UV – ultraviolet/ ултравиолетов

UV-Vis – ultraviolet and visible/ ултравиолетов и видим

V_{DCM} – volume of dichloromethane/ обем на дихлорометан

W/w - mass concentration/ тегловна концентрация

I. ВЪВЕДЕНИЕ

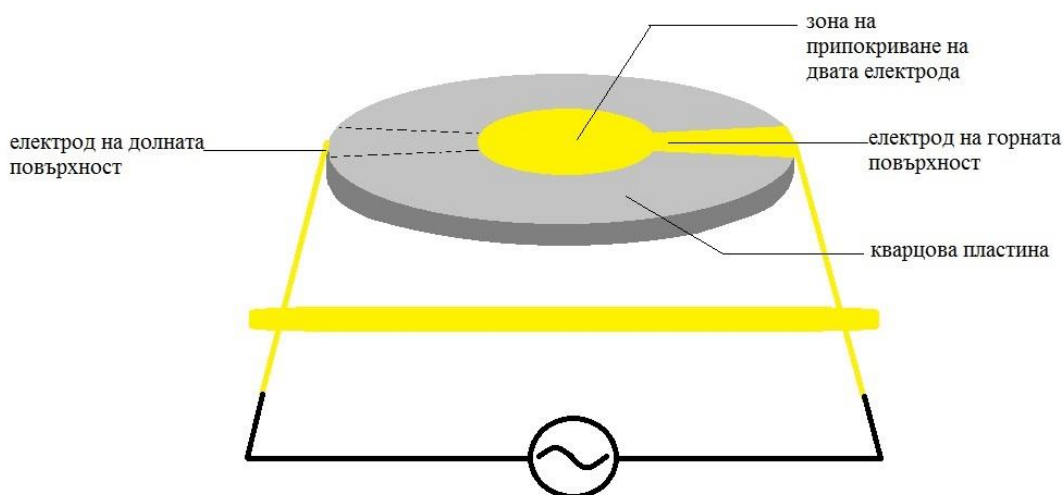
Дисертационният труд се фокусира върху анализа на съвременните лекарстводоставящи системи. Основен обект на изследване е лекарственото вещество *Diltiazem hydrochloride* (блоккер на бавните Ca^{2+} канали) и новосинтезирани негови *Eudragit RS 100*-базирани лекарстводоставящи носители от *microsponge*-тип.

Diltiazem е бензотиазепинов аналог с относително кратък биологичен полуживот и изразена хидролитична нестабилност. Тези негови особености пораждаат необходимост от нови стратегии за повишаване на терапевтичния потенциал и стабилността на лекарственото вещество в хидратно обкръжение, както и от разработване на адекватни аналитични методи за тяхната оценка.

Модифицирането на лекарственото освобождаване е приоритетно и широко застъпено направление в съвременната фармацевтична практика. Иновативните лекарстводоставящи системи с изменено освобождаване имат потенциала да преодолеят основни биофармацевтични и фармакокинетични проблеми на лекарствените вещества, но комплексността и многокомпонентността им поражда редица усложнения в техния анализ. Прогресът в разработването на нови лекарстводоставящи системи води до повишена необходимост от въвеждането на нови високо-чувствителни и селективни аналитични методи, с помощта на които да се гарантира качеството на крайния лекарствен продукт. Изборът на аналитичен метод би следвало да се определи не само от поставената аналитична цел (напр. идентификация, количествено определяне, анализ на стабилността или др.), но също и от вида и количеството на помощните вещества в състава на изследваната лекарствена форма. Последните се характеризират с вариабилна разтворимост, молекулна маса, стабилност и афинитет към лекарствените вещества. В повечето случаи те оказват влияние върху избора на метод за пробоподготовка и значимостта на получените от анализа резултати. В тази връзка, основната цел на настоящото изследване е насочена към адаптирането на конвенционални аналитични техники и въвеждането на нови такива в анализа на сложно-съставни полимерни системи, носители на лекарственото вещество *Diltiazem*.

Методът на кварцово-кристалната микровезна, или т.нар. QCM-метод, предоставя широк спектър от възможности за проследяване на редица

химични или физични промени, настъпващи с промяна в масата на анализа от порядъка на нанонграми (ng). Като пример за такива процеси със значимост във фармацевтичната химия и анализ могат да се посочат окислителни реакции (вкл. и фотоокислителни такива), водещи до отделянето на нискомолекулни газообразни вещества, както и сорбционни взаимодействия между лекарствения анализит и специфични реагенти. QCM-методът използва високочувствителен кварцов резонатор (Фиг. 1), върху който се поставя изследваният анализит. Всяка промяна в масата на пробата се регистрира по настъпилите изменения в честотата на трептене на кварцовия кристал. Методът позволява изследваният анализит да бъде обработен със силно реактивоспособни вещества поради високата степен на инертност на кварца и отложените върху него златни електроди. Промени в масата на пробата могат да се инициират с цел изясняване на структурата, количеството и стабилността на анализа. Високата чувствителност и доказаната индиферентност на кварцовия резонатор спрямо разнообразни по природа анализити са основните характеристики на метода, които го определят като потенциално приложим във фармацевтичния анализ. Особен интерес представляват онези форми на лекарствените вещества (в полимерни или други матрици), които могат да бъдат приложени под формата на тънки хомогенни филми върху QCM резонаторната пластина.



Фигура 1: Принципна схема на кварцов резонатор

В настоящия дисертационен труд за първи път е проведен опит за въвеждане на *Diltiazem* в полимерни частици с *microsponge*-тип морфология. Детайлното аналитично изследване на структурните особености на лекарстводоставящите частици и дисперсността на въведения в техния обем *Diltiazem* е поставено във фокуса на нашата работа. За целта е приложена е комбинация от инструментални методи - SEM, SEM-EDX, ATR-FTIR и DSC. Проучени са възможностите за въвеждането на нов инструментален метод - метода на кварцово-кристалната микровезна (QCM) – за оценка на лекарственото натоварване на новоформираните полимерни микрочастици с *Diltiazem*. Терапевтичният потенциал на така получените лекарстводоставящи структури е прогнозиран посредством *in vitro* и *ex vivo* тестове, както и посредством анализ на стабилността.

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е синтез, структурно и функционално охарактеризиране на новосинтезирани полимерни матрични системи с *Diltiazem* и прогнозиране на потенциалната им приложимост като лекарстводоставящи системи в терапията на *fissura ani*.

Във връзка с поставената цел са формулирани следните задачи:

1. Физикохимично и спектрално охарактеризиране на *Diltiazem* база и *Diltiazem hydrochloride*;
2. Провеждане на факториален дизайн за синтеза на *microsponge*-тип полимерни матрични лекарстводоставящи системи по квази-емулсионен метод с дифузия на разтворителя;
3. Синтез на оптимизирани състави от *Diltiazem*-натоварени *microsponge* полимерни частици по квази-емулсионен метод с дифузия на разтворителя;
4. Структурно охарактеризиране на *Diltiazem*-натоварени полимерни матрични системи посредством FT-IR спектрален анализ с пълно вътрешно отражение (ATR), SEM, EDX и DSC;
5. Изследване на сорбционния капацитет и десорбционното поведение на *Eudragit RS 100 (Ammonio Methacrylate Copolymer Type B)* полимерни матрични системи спрямо *Diltiazem*;
6. Провеждане на експеримент по метода на QCM в оригинална газ-сорбционна проточна камера за количествен анализ на *Diltiazem* в състава на лекарстводоставящи полимерни системи;
7. Провеждане на *in vitro* и *ex vivo* изследвания върху *microsponge*-потенцирани хидрогели. Прогнозиране на потенциалната им приложимост като лекарстводоставящи системи в терапията на *fissura ani*;
8. Изследване на кинетиката на хидролизен разпад на *Diltiazem* до *O-Desacetyl Diltiazem* в състава на *microsponge* базирани хидрогели (HPLC метод).

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

МАТЕРИАЛИ

Всички използвани химикали са с аналитична чистота и използвани във вида, в който са получени. Материалите са снабдени от комерсиални доставчици, както следва:

Diltiazem hydrochloride 99.9% - Puho Pharmaceuticals Co. Limited, Китай; *O-Desacetyl Diltiazem hydrochloride* – LGC GmbH, Германия; *Lidocaine* \geq 98.0%, Sigma Aldrich, САЩ; *Ammonio Methacrylate Copolymer (type B)* (Eudragit RS 100) - Evonik Industries AG, Германия; *Poloxamer 407 (Koliphor P407)* - BASF, Германия; *Poly(vinyl alcohol)*, Mw 49.000 Da - Sigma Aldrich, САЩ; *Methylcellulose* с висок вискозитет (Metolose 90SH – 30000) – Synthapharm Ges, F. Pharmachemi. - Германия; Дихлорометан (HPLC grade $>$ 97.8%), безводен етанол (HPLC grade 99.5%) и метанол (HPLC grade $>$ 99.9%) - Fisher Chemical, Германия; *Орто*-фосфорна киселина $>$ 85%, ди-натриев водороден фосфат \geq 99%, калиев дихидроген фосфат \geq 99.5%, натриев хлорид \geq 99%, натриев водороден карбонат \geq 99.5% и натриева основа \geq 99.8% - Thermo Fisher Scientific, Великобритания; сярна киселина 96% и солна киселина 37% - Panreac, Испания.

Полиетерсулфонови (PES) филтри за спринцовка 0.22 μ m са снабдени от Filters FIORONI, Испания. Диализни мембрани с молекулна пропускливост 10 kDa са предоставени от болнично отделение към МБАЛ „Св. Марина“. QCM резонатори са закупени от Open QCM Store by Novaetech S.r.l.

ИЗПОЛЗВАНА АПАРАТУРА

1. UV-Vis еднолъчев спектрофотометър *Rayleigh UV-9200*, Китай;
2. Сканиращ електронен микроскоп (SEM) Sigma Zeiss FE-SEM, САЩ;
3. Сканиращ електронен микроскоп (SEM) Tescan LYRA I XMU с двойна лъчева система SEM/FIB, оборудван с енергийно-дисперсионен рентгенов анализатор Bruker EDX детектор Quantax 200, Германия;
4. Хистологичен микротом Microtome 1508A, Nanjing Oxy Technology and Trading Co., Ltd, Китай;
5. Диференциален сканиращ калориметър - DSC Q200 TA Instruments, САЩ;
6. Инфрачервен спектрофотометър Tensor II FT-IR спектрофотометър Bruker, Германия;

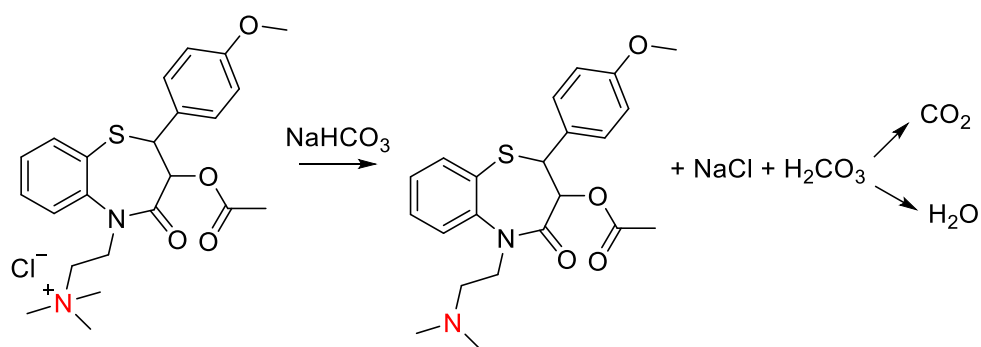
7. *Dissolution* тестер PT-DT 70, Pharmatest, Германия;
8. Високо-ефективен течен хроматограф Thermo Scientific UltiMate 3000 LC, оборудван с Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 VWD-3100 вариабилен UV детектор, САЩ;
9. Аналитична везна с точност 0.0001 g Kern ABT 220-5DM, Германия;
10. Прецизна везна с точност 0.01 g Kern 440-35N, Германия.

МЕТОДИ

1. Синтез и спектрално поведение на *Diltiazem* база. Разтворимост

1.1 Синтез на *Diltiazem* база от *Diltiazem hydrochloride*

За целите на въвеждането на *Diltiazem* в полимерни матрици от *microsponge*-тип, лекарството е превърнато в база от своята хидрохлоридна сол посредством обработка с NaHCO_3 (Фиг. 2).



Фигура 2: Реакционна схема на превръщане на *Diltiazem hydrochloride* в база

Diltiazem hydrochloride - 10.0 g, притеглени на прецизна везна с точност до ± 0.01 g, са разтворени в пречистена вода (100.0 mL) при постоянно разбъркване с помощта на магнитна бъркалка. Към така получения разтвор на порции са прибавени 1.1 еквивалента NaHCO_3 . В процеса на смесване на двата реагента се наблюдава мигновена преципитация на неразтворимата във вода *Diltiazem* база. Получената суспензия е поддържана при разбъркване за приблизително 15 минути. *Diltiazem* база е изолирана посредством филтруване и многократно промиване с пречистена вода. Получената субстанцията е изсушена и съхранена в ексикатор.

1.2 UV-Vis спектрален анализ

Исходни разтвори на *Diltiazem hydrochloride* и *Diltiazem* база са приготвени в пречистена вода и в безводен етанол в концентрация 50 mg/L. Посредством серийни разреждания са получени разтвори с концентрации на активното

вещество в интервала 2.0–32.0 mg/L и използвани за построяването на стандартни калибровъчни прави [34,134]. Последните послужиха за UV-Vis количественото определяне на *Diltiazem* в полимерни матрици, както и във водни и буферни разтвори, използвани като среда за освобождаване на *Diltiazem* от лекарстводоставящи системи.

1.3 Разтворимост

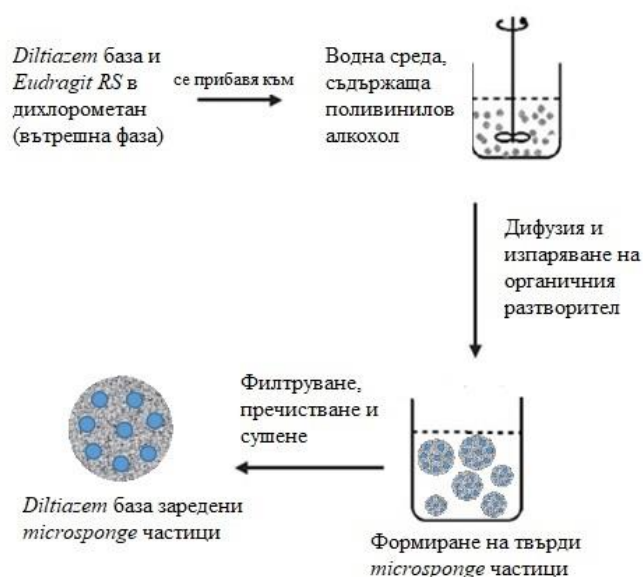
Разтворимостта на двете форми на *Diltiazem* (хидрохлоридна сол и база) във вода, както и в някои избрани буферни системи, е определена експериментално по следната методика: активното вещество (*Diltiazem hydrochloride* или база) е прибавено в излишък към избраните среди за разтваряне при стайна температура ($25\pm 0.5^\circ\text{C}$) и/или при температура, имитираща физиологичната телесна температура ($37\pm 0.5^\circ\text{C}$). Така получените дисперсии са подложени на непрекъснато разбъркване в продължение на 24 h. След това, проба от тях е изтеглена и филтрувана през мембранен филтър с размер на порите 0.22 μm . Концентрацията на насищане на лекарството под формата на сол и база е определена спектрофотометрично след подходящо разреждане във всяка от изследваните среди.

2. Получаване и изследване на структурата на *Diltiazem*-натоварени полимерни (*Ammonio Metacrylate Copolymer Type B*) лекарстводоставящи носители от *microsponge*-тип

2.1 Синтез на полимерни микросфери с *microsponge*-тип морфология

Синтезът на полимерни матрични лекарстводоставящи системи от *microsponge*-тип с *Diltiazem* е осъществен посредством квази-емулсионна техника с дифузия на разтворителя (Фиг. 3). За целта *Diltiazem* е използван под формата на база поради по-подходящата за случая ниска водоразтворимост на тази му форма в сравнение със свободно разтворимата във вода сол (хидрохлорид). По този начин е предотвратена загубата на активно вещество вследствие на дифузия по посока на водната среда, използвана при този тип техника, и осигурена висока степен на “захващане” на *Diltiazem* в полимерните частици. Съставите са приготвени с вариабилни съотношения активно вещество към полимер (DPR), обем на органична фаза в дихлорометан – V_{DCM} - и концентрации на сурфактанта поливинилов алкохол – C_{PVA} . Външната среда е приготвена чрез разтваряне на PVA в 100.0 mL пречистена вода при 80°C . *Diltiazem* база и полимерът *Eudragit*

RS100 (Ammonio Metacrylate Copolymer Type B) са разтворени съвместно в DCM на стайна температура. Така полученият органичен разтвор, наричан още вътрешна органична фаза, е прибавен под формата на капки с приблизителна скорост от 2 mL/min към външната водна среда, след нейното охлаждане до стайна температура. Смесването на двете фази е осъществено при непрекъснато разбъркване със скорост от 650 rpm на магнитна бъркалка. След включване на цялото количество органична фаза, дисперсията е поддържана при същите обороти на разбъркване в лабораторна камина за 3 h. Последва отстраняване на DCM под динамичен вакуум с продължителност 1 h. Микрочастиците са изолирани посредством центрофугиране (5 min при 4000 rpm), филтруване (през мрежа от неръждаема стомана 400 mesh) и многократно промиване с пречистена вода. По същата технология е приготвен и образец от „празни“, ненатоварени с лекарство, частици от *microsponge*-тип. Получените проби са изсушени в ексикатор за 24 h и оценени за добив и ефикасност на лекарственото натоварване. Синтезът на някои оптимизирани състави е повторен най-малко трикратно с цел оценка на повторемостта на резултатите от предложената технология.



Фигура 3: Синтез на полимерни матрични лекарстводоставящи системи от *microsponge*-тип с *Diltiazem* по квази-емулсионна техника с дифузия на разтворителя

2.1.1 Преформулация

Ефектът на три вариабилни фактора на синтеза – съотношение лекарство към полимер - DPR (X_1), обем на вътрешната органична фаза - V_{DCM} , mL (X_2)

и концентрация на повърхностно-активен агент - C_{PVA} (X_3) – върху добива (P.Y.%, Y_1), ефикасността на натоварване на *Diltiazem* в полимерните частици (E.E.%, Y_2) и техния размер (P.S., Y_3) е оценен посредством 2^3 факториален дизайн (2^3 FD). Статистическият анализ е проведен с помощта на *Statgraphics Centurion XVI.II* софтуер (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Нивата на независимите променливи (X_1 , X_2 , X_3), както и съответния отговор в зависимите променливи (Y_1 , Y_2 , Y_3), са представени в табличен вид в раздел „*Резултати и обсъждане*“. За тяхната оценка е използван множествен регресионен анализ (уравнение 1).

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (\text{уравнение 1})$$

Уравнение 1 представя влиянието на независимите променливи (X_1 , X_2 , X_3), както и тяхното взаимодействие (X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3), върху дадена зависима вариабилна (Y), като b_0 е свободен член в регресионното уравнение (интерсепт), а b_1 , b_2 и b_3 – регресионни коефициенти. Нивото на значимост на модела за всеки фактор е зададено при $p < 0.05$. Стандартизирана диаграма на Парето е използвана за онагледяване на влиянието на статистически значимите независими вариабилни върху зависимите такива. Допълнително, триизмерни графики за всяка зависима променлива са построени с цел демонстриране на ефекта на два независими фактора върху нея, при поддържане на нивото на третия константа.

2.1.2 Добив (P.Y.%)

Добивът (P.Y.%) на *microsponge* частици е изчислен съгласно уравнение 2:

$$P.Y.\% = \frac{\text{Реална маса на изолираните частици [mg]}}{\text{Теоретична маса на партидата (лекарство [mg]+полимер [mg])}} \cdot 100 \quad (\text{уравнение 2})$$

2.2 Структурен анализ на *Diltiazem*-натоварени *Ammonio Metacrylate Copolymer Type B (Eudragit RS)* полимерни лекарстводоставящи системи

2.2.1 Изследване на повърхностните особености на *microsponge* частиците

Формата, големината и други повърхностни особености на *microsponge* частиците са оценени с помощта на SEM. За целта пробите са фиксирани върху двулицеви въглеродни пластини и обвити с паладий (*Pd*). Повторяемостта на резултатите е оценена при минимум трикратно провеждане на анализа за всяка проба. Микрографиите са заснети с

електронен микроскоп Sigma Zeiss FE-SEM при 5-10 kV и 30 μm отвор. Статистически анализ е проведен с помощта на ImageJ Software.

2.2.2 Елементен анализ (SEM-EDX) на срезове от *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsponge*-тип частици

Минимално количество проба от оптимизиран състав от частици е диспергирано в парафинова среда и нарязано на срезове с дебелина 20 μm с помощта на стандартен хистологичен микротом. Отделни срезове са поставени върху графитна основа за последващо SEM наблюдение. Размерът и морфологията, както и елементният състав на така получените срезове, са изследвани с помощта на сканиращ електронен микроскоп, оборудван с енергийно-дисперсионен рентгенов анализатор.

2.2.3 DSC анализ

Термичното поведение на *microsponge* частиците и изходните им съставни компоненти – полимер и лекарствено вещество - е анализирано посредством диференциална сканираща калориметрия. Пробите (~ 6-7 mg) са изследвани в два експериментални режима: 1. режим на нагряване от 0 до 250 $^{\circ}\text{C}$ при скорост на нагряване 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ и 2. режим на нагряване-охлаждане-нагряване в температурния интервал от 0 до 250 $^{\circ}\text{C}$ при скорост на нагряване 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Всички DSC изследвания са проведени в азотен поток (50 mL/min).

2.2.4 FT-IR анализ на *Diltiazem* в полимерното обкръжение на *Eudragit RS*

На ATR-FT-IR спектрален анализ са подложени следните три типа *Diltiazem-Eudragit RS* дисперсии:

1. Физични смеси, получени чрез механично смесване на лекарството и полимера в хаван (PM- серия);
2. Хомогенни молекулни дисперсии, получени чрез разтваряне на лекарството и полимера в дихлорометан и последващо изпаряване (L- серия) и
3. *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsponge* частици.

И трите типа дисперсии са изследвани при най-малко три основни концентрационни нива на *Diltiazem* (5, 15 и 25%), за да се установи влиянието на съотношението лекарство към полимер (DPR) върху степента на проникване на лекарството в полимерната матрица и скоростта му на

дифузия от нея (методиката, използвана за изследване на дифузионното поведение, се докладва в т. 2.3.2). За удобство представяме гореспоменатите тест състави с кодове и детайлна характеристика за метода на тяхното получаване в Табл. 1.

Таблица 1: Тест състави, подложени на FT-IR анализ и анализ на сорбционно поведение спрямо *Diltiazem*

Код	<i>Diltiazem</i> , w/w%	Метод на получаване на дисперсията
PM-25	25	Физични смеси - кристали от <i>Eudragit RS 100</i> са оситнени и хомогенизирани в желаното съотношение с <i>Diltiazem</i> в хаван в продължение на 10 min.
PM-20	20	
PM-15	15	
PM-10	10	
PM-5	5	
L-25	25	Хомогенни филми (твърди разтвори) - <i>Diltiazem</i> 15.0 mg и необходимото количество полимер <i>Eudragit RS 100</i> за постигане на желания DPR (притеглени на аналитична везна с точност до ± 0.0001 g) са разтворени в 5.0 mL DCM. По този начин приготвени, разтворите са прехвърлени в часовникови стъкла и изпарени до сухо в лабораторна камина. В резултат се наблюдава формирането на тънки, хомогенни слоеве от лекарство и полимер върху повърхността на часовниковите стъкла. За целите на FT-IR анализа, проба от слоевете е изолирана чрез внимателно остъргване с метална шпатула.
L-20	20	
L-15	15	
L-10	10	
L-5	5	
F13	25	<i>Diltiazem</i> -натоварени <i>Eudragit RS microsponge</i> частици са получени по метода, описан в т. 2.1.
F14	15	
F15	5	

FTIR спектрите са снети по метода на пълно вътрешно отражение (ATR), при резолюция 4 cm^{-1} и екстракция на спектъра на базата на 32 сканирания. Спектрите са получени при стайна температура. Специализиран софтуер OPUS 8.0 е използван за автоматично коригиране на снетите спектри.

2.3 Функционален анализ на *Diltiazem*-натоварени *Ammonio Metacrylate Copolymer Type B (Eudragit RS)* полимерни лекарстводоставящи системи

2.3.1 Ефикасност на натоварването на *microsponge* частици с *Diltiazem* (Е.Е.%)

Степента на включване на *Diltiazem* в полимерните частици е оценена чрез показателя ефикасност на лекарственото натоварване (Е.Е.%), изчислен по уравнение 3.

$$\text{Е. Е. \%} = \frac{\text{Реално установено съдържание на } Diltiazem \text{ в частиците [mg]}}{\text{Теоретично заложено съдържание на } Diltiazem \text{ в частиците [mg]}} \cdot 100 \quad (\text{уравнение 3})$$

Реалното съдържание на *Diltiazem* в тест съставите е установено посредством тяхната деструкция в безводен етанол и последващо спектрофотометрично определяне. За целта, на аналитична везна с точност до ± 0.0001 g, е притеглена проба от 20.0 mg от всички тест състави и количествено прехвърлена в мерителна колба от 50.0 mL. След пълното разтваряне на частиците в 15.0 mL етанол, обемът в колбата е приведен до марката със същия разтворител.

2.3.2 Анализ на сорбционното поведение на *Eudragit RS* спрямо *Diltiazem*

Анализът на сорбционното поведение на трите типа *Diltiazem/Eudragit RS 100* дисперсии (оказани в Табл. 1) е проведен с помощта на *Dissolution* тестер Апарат 2 по Ph.Eur. (Метод с лопатковидна бъркалка). Всички образци (от РМ-, L- и F-серия) са използвани в количество, еквивалентно на 15.0 mg *Diltiazem*. Проби от РМ- и F серии са прехвърлени в диализни торбички от целулозен ацетат (MWCO 10 kDa), съдържащи 1.0 mL пречистена вода. Диализните торбички са прикрепени към роторите (тип въртяща се лопатка) на *Dissolution* тестера. Пробите от серия L са въведени чрез директно потапяне на импрегнираното с лекарство и полимер часовниково стъкло в средата за освобождаване.

Всички тест модели са оставени да набъбнат в средата за освобождаване (400.0 mL пречистена вода) за 24 h при статични условия и стайна температура преди началото на сорбционния експеримент. Количество *Diltiazem*, разтворено в средата вследствие на продължителното набъбване, е определено спектрофотометрично и приспаднато от заложените 15.0 mg. След периода на набъбване, апаратът е настроен на скорост на разбъркване 30 rpm и температура $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ и към средата за освобождаване е прибавено еквимоларно на съдържащия се *Diltiazem* количество концентрирана солна киселина (необходимото количество концентрирана солна киселина 37% за целта е 3.7 mg, отговарящи на 3,08 μl при 25°C ; прибавено към 400.0 водна среда, това количество солна киселина създава рН 4.04). Концентрацията на

Diltiazem hydrochloride в средата е определена на равни интервали от време за период от 9 h.

3. Метод на кварцово-кристалната микровезна (QCM-метод). Определяне на съдържание на *Diltiazem* в матрични системи от *Eudragit RS* посредством QCM-метод

В дисертационния труд е направен опит да се въведе метода на кварцово-кристалната микровезна (QCM) във фармацевтичния анализ. Методът е пригоден да анализира количествено лекарствени съединения (с базични свойства) в полимерно обкръжение (от *Ammonio Metacrylate Copolymer Type B - Eudragit RS*). За валидирането на метода са използвани стандартни разтвори на полимера (*Eudragit RS*) и лекарственото вещество. Като тест проби са изследвани *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS* микрочастици (оптимизирани състави). Точността и прецизността на предложения аналитичен метод са съпоставени с тези на стандартно използвания UV-Vis спектрален метод в същия анализ.

3.1 Приготвяне на стандартни разтвори на лекарство и полимер

Серия от стандартни разтвори на *Diltiazem* и *Eudragit RS* са приготвени в ацетон за целите на QCM анализа (A-F) и в безводен етанол за целите на UV-Vis спектралния анализ (G-L), поради оптична непропускливост на ацетона в областта, където се проявява абсорбционният максимум на поглъщане на *Diltiazem* [135]. (Табл. 2).

Таблица 2: Стандартни разтвори на *Diltiazem* и *Eudragit RS 100*

Код	Разтворител	Сдтз в разтворителя, mg/L	Сдтз в полимерната смес, %
A	Ацетон	0.0	0.0
B	Ацетон	210.5	5.0
C	Ацетон	444.4	10.0
D	Ацетон	705.9	15.0
E	Ацетон	1000.0	20.0
F	Ацетон	1333.3	25.0
G	безводен етанол	0.0	0.0
H	безводен етанол	210.5	5.0
I	безводен етанол	444.4	10.0
J	безводен етанол	705.9	15.0
K	безводен етанол	1000.0	20.0
L	безводен етанол	1333.3	25.0

Проби от всички разтвори са прехвърлени и съхранени в удобни за пробовземане широкогърлени, стъклени, добре затварящи се флакони. Стандартните разтвори са използвани за построяването на стандартни калибровъчни прави.

3.2 Приготвяне на тест разтвори. Пробоподготовка и нанасяне на проби от *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsponge*-тип частици за QCM анализ

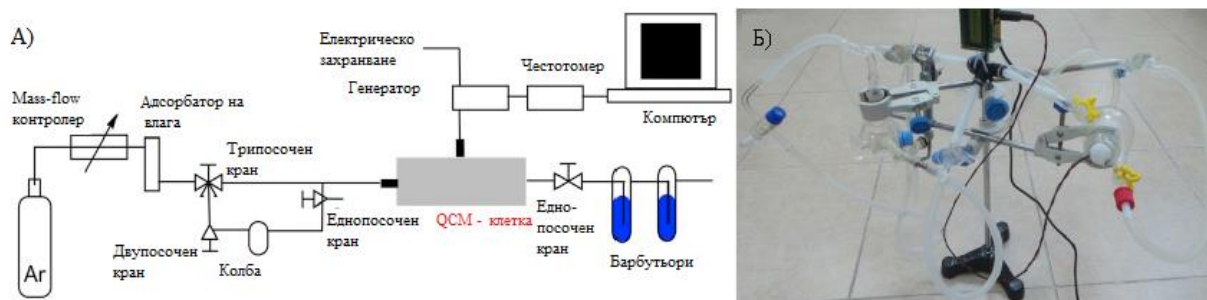
Проучени са възможностите за нанасяне на проби от лекарство-натоварени частици от оптимизирани състави (F13 и F14) върху QCM резонатора по няколко начина, с цел оптимизиране на пробоподготовката и осигуряване на максимални нива на точност и възпроизводимост на анализа:

1. Недеструктивен подход (1) - нанасяне на частиците под формата на водна дисперсия и последващо изсушаване с цел фиксиране на пробата;
2. Недеструктивен подход (2) – нанасяне на частиците под формата на предварително филтрувана през филтър от неръждаема стомана с размер на светлия отвор 75 μm водна дисперсия;
3. Деструктивен подход (1) - нанасяне на частиците под формата на предварително филтрувана през филтър от неръждаема стомана с размер на светлия отвор 75 μm водна дисперсия и последващо въвеждане на ацетонови пари в QCM проточната камера;
4. Деструктивен подход (2) – нанасяне на пробите под формата на ацетонови разтвори на частиците с оптимален за целта вискозитет. 40.0 mg частици, притеглени на аналитична везна с точност до 0.0001 g, са разтворени в 7.5 mL ацетон и нанесени върху пластината под формата на капки с обем от 10 μL . Наслаяване след изпаряване на нанесената капка е проведено чрез 3-4кратно повторение на процедурата.

Тест разтвори на проби от състави F13 и F14 за целите на UV-Vis спектралния анализ са приготвени в безводен етанол. Методиката за приготвяне на тест разтвори за UV-Vis спектрален анализ е описана по-подробно в т. 2.3.1.

3.3 QCM метод

Съдържанието на *Diltiazem* в стандартните полимерни смеси (разтвори А-Г), както и в синтезираните полимерни микрочастици, е оценено чрез оригинален газ-сорбционен QCM анализатор (Фиг. 4).



Фигура 4: А) Принципна схема на газ-сорбционен QCM – анализатор; Б) Реална снимка на използваната QCM апаратура

За целите на анализа са използвани кварцови кристални резонатори (с АТ-отрез) с операционна честота от 10 MHz и дебелина от 160 μm , метализирани със златни (Au)-електроди с диаметър 6.0 mm върху горната и долната повърхност. Кварцовият кристален резонатор е прикрепен към горната част на куха пластмасова тапа чрез подходящ държач и по този начин монтиран хоризонтално в проточна камера (стъклена клетка *Pyrex* с обем 200 mL, оборудвана с две връзки за маркуч и стандартен страничен съединителен кран). Заредената с аналит пластина е поставена в условия на непрекъснат аргонов (Ar) поток (50 mL/min) и температура 20°C до пълното изсушаване на пробата. След установяване на постоянно тегло (и константна честота на трептене на резонатора), камерата е наситена с HCl газ за няколко минути. Въвеждането на HCl газ е осъществено чрез инициране на реакция между натриев хлорид (NaCl) и концентрирана сярна киселина (к.Н₂SO₄) в отделна колба, свързана с кран с проточната камера на QCM анализатора. В рамките на този експериментален стадий пробата е подложена на директна обработка с хлороводород. Последва етап на елиминиране на излишъка от HCl в камерата и евакуиране на по-слабо свързания (физисорбиран от инертната полимерна матрица) газ чрез подновяване на аргоновия поток (50 mL/min). Всички промени в честотното трептене на резонатора, свързани със сорбцията на HCl, са регистрирани и преизчислени като промяна в масата на пробата по уравнение 4, предложено от *Sauerbrey*:

$$\Delta m = \left(\frac{\rho N A}{f^2} \right) \Delta f \quad (\text{уравнение 4}),$$

където Δm е промяната в масата на пробата (g), f – честота на трептене на кварцовата пластина (Hz), ρ – плътността на кварцовия кристал ($\rho=2.468$ g/mL), N – честотна константа на кварцов кристал с АТ-отрез (1.668×10^5

Hz.cm), A – активната повърхностна площ на пиезокристалата (cm^2) и Δf – промяната в честотата на трептене на кварцовата пластина (Hz).

С цел да бъдат избегнати нежелани изменения в честотата на трептене на кварцовия резонатор от температурни флуктуации, анализите са проведени при постоянна температура от $20 \pm 1^\circ\text{C}$ в предварително темперирано при същата температура помещение.

В допълнение, в предварителен сорбционен експеримент е установена индиферентността на използвания полимер *Eudragit RS* спрямо *HCl* чрез нанасяне на лекарство-несъдържащ слой върху резонатора.

3.4 UV-Vis метод

Концентрацията на *Diltiazem* в стандартните и тестовите разтвори е определена спектрофотометрично при дължина на вълната 244 nm.

3.5 Статистически анализ и валидиране на QCM метода за количествено определяне на *Diltiazem* в матрични системи от *Eudragit RS*

Всички измервания са проведени в три повторения, при спазването на константни експериментални условия. Статистическата значимост на получените резултати е оценена чрез t -тест. Прагът на значимост на резултатите е зададен при p -стойност < 0.05 . Селективността на предложението от нас метод е оценена чрез анализ на две принципно различни по структура и молекулярна маса базични лекарствени съединения – *Diltiazem* – основен обект на изследване в настоящия дисертационен труд и *Lidocaine*, резултатите от изследването на който са описани в приложение към дисертационния труд. Валидирането на QCM метода е проведено според препоръките на ICH - Международната конференция по хармонизация на техническите изисквания при регистриране на лекарствени продукти за хуманна употреба (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) [136]. Методът е калибриран на 4/5 концентрационни нива (4 за *Lidocaine* и 5 за *Diltiazem*). Калибровъчните графики са построени на база зависимостта на получените QCM резултати от номиналната лекарствена концентрация в пробите. Линейността на метода е гарантирана при минимална стойност на коефициента на детерминация $R^2 \geq 0.998$. Втрелабораторната точност и междинна прецизност на метода са оценени чрез показателите средно относително отклонение от действителна (номинална) стойност (DEV%) и

относително стандартно отклонение (RSD%). Точността (DEV%) и прецизността (RSD%) са изчислени съгласно уравнения 5 и 6 [137]:

$$DEV\% = 1 - \bar{x}/x_n \cdot 100 \text{ (уравнение 5)}$$

$$RSD\% = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \text{ (уравнение 6)}$$

където \bar{x} е средно аритметична стойност от всички измервания, x_n е номинална (действителна) стойност, а SD е стандартното отклонение на стойностите.

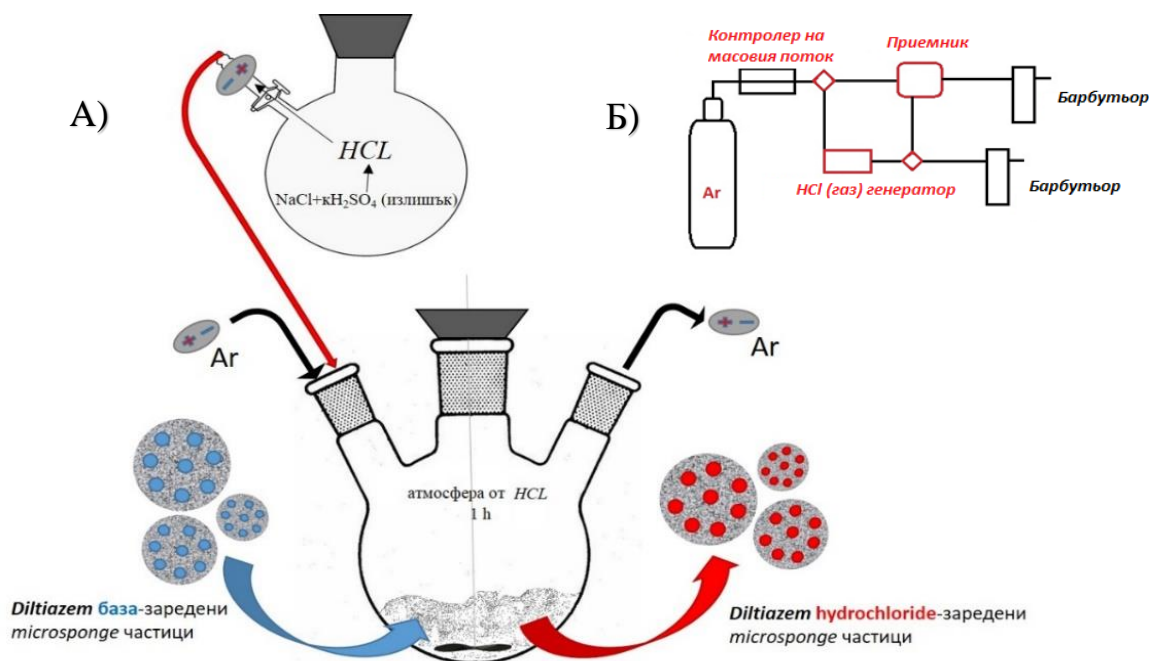
Статистически анализ на линейността и хомогенността на получените от QCM и UV-Vis спектралното изследване резултати е проведен чрез дисперсионен анализ (ANOVA) и тест на *Levene*.

4. *In vitro* и *ex vivo* изследвания за прогнозиране на терапевтичния потенциал на *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsphere*-тип частици

Синтезираните от нас *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsphere* частици са приложени като лекарстводоставящи системи в състава хидрогели с предназначение за лечение на хронична анална фисура. Предварително, частиците, включени в *in vitro* и *ex vivo* експерименти, са подложени на обработка с *HCl* газ с цел превръщане на *Diltiazem* база обратно в биологично активната му хидрохлоридна сол.

4.1 Обратно превръщане на *Diltiazem* база в хидрохлорид в структурата на лекарство-натоварените *Eudragit RS microsphere* частици

Натоварените с *Diltiazem* база *microsphere* частици са подложени на недеструктивна обработка с *HCl* газ в специално приспособена за целта експериментална обстановка (Фиг. 5).



Фигура 5: А) Илюстрация на превръщането на *Diltiazem* база-натоварени частици в *Diltiazem hydrochloride*-натоварени частици; Б) Схематично представяне на постановката, използвана за превръщането на натоварената в частиците *Diltiazem* база обратно в хидрохлорид

Партида от микрочастици е поставена в облодънна колба с шлиф и спирателен кран (**приемник**) под постоянен поток на аргон (Ar) (50 mL/min) с цел евакуация на остатъчна влага и други адсорбирани се газове. **Приемникът** е свързан с **HCl (газ) генератор** - втора облодънна колба, където е инициирана йонообменна реакция между натриев хлорид и концентрирана сярна киселина (в излишък) с образуване на HCl газ. След насищане на **приемника** с HCl (за около 1 min), той е изолиран чрез затваряне на спирателния кран и отделяне от **генератора**. Микрочастиците са поддържани в атмосфера от HCl при периодично разбъркване в продължение на 1 h, през който базичната аминок група в молекулата на *Diltiazem* да отреагира изчерпателно с HCl. В края на процедурата частиците отново са оставени под постоянен аргонов поток (50 mL/min) за 1 h с цел евакуиране на неотреагирания хлороводород.

4.2 Приготвяне на конвенционални и *microsponge*-потенцирани хидрогели с *Diltiazem hydrochloride*

4.2.1 Хидрогелни основи

За приготвянето на хидрогели с *Diltiazem hydrochloride* и *Diltiazem hydrochloride*-натоварени *microsponge* частици са използвани два типа

хидрогелни основи – *Methylcellulose* 2% (Mc 2%) и *Poloxamer 407* 20% (Px 20%), получени по описания начин: *Methylcellulose* с висок вискозитет (Metolose 90SH – 30000) е диспергирана в пречистена вода, загрята до 90°C, при постоянно разбъркване. Набъбналият полимер е оставен да се разтвори в хладилник (4°C) за едно денонощие до формирането на прозрачна хидрогелна маса; *Poloxamer 407* (Koliphor P407) е хомогенизиран с необходимото количество пречистена вода и оставен да се разтвори на студено, в хладилник (4°C), за едно денонощие [138]. Получените хидрогелни основи са съхранени в хладилник до по-нататъшна употреба.

4.2.2 Конвенционални гели с *Diltiazem hydrochloride*

Конвенционални гели с *Diltiazem hydrochloride* 2% (c-DTZ 2%) са приготвени като активното вещество е разтворено в минимално количество пречистена вода, а полученият лекарствен разтвор е прибавен и хомогенизиран на малки порции към предварително приготвената хидрогелна база (Mc 2% или Px 20%) [139,140]. Съставите, с точни количества, са посочени в Табл. 3.

4.2.3 *Microsponge*-потенцирани хидрогели с *Diltiazem hydrochloride*

Microsponge-потенцирани хидрогели с *Diltiazem hydrochloride* 2% (*micro-l-DTZ* 2%) са приготвени с помощта на оптимизирана формулация от *Diltiazem*-натоварени *microsponge* частици – състав F13. Микрочастиците са предварително пресети през ситова повърхност с размер на светлия отвор $d=200 \mu\text{m}$, след което хомогенно диспергирани в предварително приготвената хидрогелна основа (Mc 2% или Px 20%). Количеството на използваните *microsponge* частици е съобразено с тяхната степен на натоварване с *Diltiazem*, така че да се постигне крайна лекарствена концентрация от 2% в хидрогела. Така получените гели са съхранени в херметически затварящи се стъклени флакони при стайна температура, защитени от пряка слънчева светлина. Съставите, с точни количества, са посочени в Табл. 3.

Таблица 3: Състави на конвенционални и *microspunge*-потенцирани хидрогели с *Diltiazem hydrochloride*

Тип Гел	Код	<i>Diltiazem hydrochloride</i> , %	<i>Diltiazem hydrochloride</i> -натоварени <i>microspunge</i> -частици, % ^a	<i>Methylcellulose</i> (Metolose 90SH – 30000), %	Poloxamer 407 (Koliphor P407), %	Пречистена вода за разтвор на <i>Diltiazem hydrochloride</i> , %	Пречистена вода за хидрогелна основа, %
c-DTZ 2%	Mc-DTZ	2	-	2	-	15	до 100
	Px-DTZ	2	-	-	20	15	до 100
micro-l-DTZ 2%	F13-Mc-DTZ	-	~8 ^a	2	-	-	до 100
	F13-Px-DTZ	-	~8 ^a	-	20	-	до 100

^a Оптимизиран състав от *microspunge* частици F13, използван за приготвянето на *microspunge*-потенцирани хидрогели, е приготвен с DPR 1:3 (т.е. с теоретично съдържание на *Diltiazem* в частиците 25%). Справка за реалното съдържание на *Diltiazem* в частиците от различни партии на състав F13 (което е определящо за точно необходимото концентрация на полимерни микрочастици в хидрогелите), може да бъде направена със стойността, представена за „ефикасност на натоварването“ – Е.Е.% - в Табл. 7.

4.3 *In vitro* и *ex vivo* прогнозиране на терапевтичния потенциал на хидрогелите в терапията на *fissure ani chronica*

Прогнозиране на терапевтичния потенциал на така формулираните гели за лечението на хронифицирала анална фисура (*fissure ani chronica*) е извършено на базата на *in vitro* тест за освобождаване и *ex vivo* тест за пермеация и абсорбция на *Diltiazem*. И двата теста са проведени с помощта на клетка на Франц, устройството и техническите параметри на която са посочени на Фиг. 6 след описанието на методиката за провеждането им.

4.3.1 *In vitro* освобождаване

Лекарственото освобождаване от разработените гели (c-DTZ 2% и micro-l-DTZ 2%) е изследвано с помощта на клетка на Франц, като в качеството на полупропусклива бариера между донорния и рецепторния компартимент на клетката е използвана диализна мембрана от целулозен ацетат [141]. Експерименталната обстановка е темперирана при 37±0.5°C посредством циркулиращ воден термостат. Като среда за лекарствено освобождаване в рецепторния отдел е използван фосфатен буфер с рН 7.4 (приготвен според препоръките на Ph.Eur.8.0 4.1.3 *Phosphate buffer solution pH 7.4*). Изследваната лекарствена форма е приложена в количество от 400.0 mg

(притеглени на прецизна везна с точност до 0.01 g) в донорното отделение и внимателно уплътнена върху целулозната мембрана. Инициирано е разбъркване в рецепторната среда (300 grm), с което е поставено и началото на изследването. Проби за анализ от рецепторния компартимент са изтеглени на равни интервали от време и заменени с аликвотни части чист буфер. Количественият анализ на *Diltiazem* в средата за освобождаване е проведен спектрофотометрично. На базата на получените резултати е построена графичната зависимост на кумулативния процент освободено лекарство в средата (CDR%) от времето.

4.3.2 *Ex vivo* изследване през свинска ректална мукоза

Ex vivo изследване за пермеация и абсорбция на *Diltiazem* от тест гелите е проведено през моделна мембрана от изолирана свинска ректална мукоза.

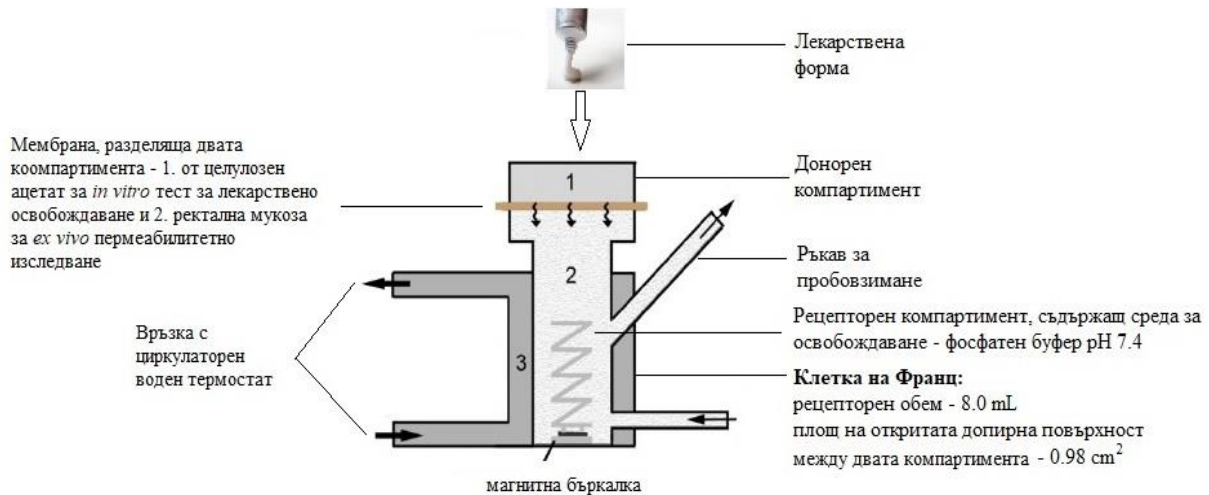
- Подготовка на мукозната мембрана

Мукозна мембрана е изолирана от свински ректум с дължина 10 cm (снабден от кланица). Луменът на ректума е отворен с надлъжен разрез, обстойно промит с фосфатен буфер с рН 7.4 и замразен при -80°C (в дълбоко замразяващ фризер) за 24 h [142]. След 24 h ректумът е размразен и поставен в охладен фосфатен буфер с рН 7.4 (15°C). Мукозната тъкан е дисецирана от ректума под стереомикроскоп (увеличение 15x) с помощта на островърх дисекционен форцепс за захващане на подлежащите слоеве (*lamina propria*, *tela submucosa*, *tela muscularis* и *tunica adventitia*) и De Bakey форцепс за захващане и нетравматично отлепяне на мукозната тъкан. След дисекция, отделената лигавична тъкан е отново наблюдавана при същото увеличение за останали прикрепени кръвоносни съдове и други немукозни структури. Дебелината на отделената мукоза е установено да е 0.080 ± 0.005 cm. След промивка с буфер, мукозната тъкан е сегментирана на части с площ 2x2 cm с помощта на скалпел. Подготвените фрагменти са замразени във фосфатен буфер с рН 7.4 и съхранени по този начин до своето използване.

- *Ex vivo* определяне на пермеация и абсорбция на *Diltiazem* от *c-DTZ 2%* и *micro-l-DTZ 2%* тип гели през свинска ректална мукоза

Ex vivo пермеационното изследване е проведено отново с помощта на клетка на Франц, използвайки изолираната свинска ректална мукоза като бариера между донорния и рецепторния компартимент (Фиг. 6) [142-144]. Мукозата е поставена така, че гладката и повърхност да е насочена към донорния компартимент. Изследваната лекарствена форма е приложена върху нея в количество от 400.0 mg (притеглени на прецизна везна с точност до 0.01 g).

Всички останали параметри на експеримента, като температура, обороти на разбъркване и вид и количество на използваната средата за освобождаване, са аналогични с описаните в т. 4.3.1. Количеството *Diltiazem*, преминало през мукозата (CDP%), е установено спектрофотометрично, на равни интервали от време, в проби от рецепторната среда. С помощта на получените данни са построени графики, описващи профила на абсорбция на *Diltiazem* през мукозата за всеки един от тестовите състави.



Фигура 6: Експериментална постановка с клетка на Франц, използвана за провеждане на *in vitro* тест за освобождаване и *ex vivo* тест за пермеация и абсорбция

- Анализ на данните

Линейната регресия на получените профили на абсорбция на *Diltiazem* през мукозата (*in steady-state*) е използвана за определяне на фармакокинетичните параметри: дифузионен поток (J_{ss}), коефициент на проникване (K_p) и време на задържане – *lag time* (T_L) [142,145]. В случая приложим е първият закон на Фик:

$$J_{ss} = K_p \cdot \Delta C \quad (\text{уравнение 7})$$

където J_{ss} е дифузионният поток, K_p е коефициент на проникване на лекарството, а ΔC е концентрационният градиент, представляващ разликата в концентрациите на активното вещество между донорния (C_d) и рецепторния (C_r) компартимент [145].

Дифузионният поток (J_{ss}) е изчислен по наклона на линейната регресия и представен като $mg \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$. Коефициентът на проникване, K_p , е изчислен по уравнение 8:

$$K_p = J_{ss}/C_d \text{ (уравнение 8)}$$

с допускането, че ΔC се променя незначително в хода на *steady-state* дифузия, предвид високата начална концентрация, и следователно $\Delta C \approx C_d$.

Вземайки предвид средната дебелината на използваната от нас мукозна тъкан (0.08 cm), е изчислено и взаимодействието на коефициента на разпределение (P) с дифузионния коефициент (D) по закономерността:

$$K_p = P.D/h \text{ (уравнение 9) [143]}$$

където h е дебелината на мукозата. Следователно, $P.D = K_p.h$ е представено на следващо място в резултатите като $\text{cm}^2.h^{-1}$.

Времето на задържане, T_L , представлява времето след нанасянето на лекарствената форма, необходимо за установяване на *steady-state* дифузия. T_L е изчислено от уравнението на линейната регресия за $y=0$ (където y на ординатата представлява количеството преминало вещество).

Анализът на всички данни е проведен с помощта на Excel 2013. Всички изчислени фармакокинетични параметри са представени като средна стойност от две измервания с приложено стандартно отклонение (SD).

- **Задържане на *Diltiazem* в мукозната мембрана**

В края на пермеационния експеримент съдържанието на задържалия се в мукозната тъкан *Diltiazem* е определено по директен и индиректен метод:

Метод I (директен): След приключване на експеримента, мукозната тъкан е отделена от клетката на Франц, многократно промита с фосфатен буфер с pH 7.4, след което потопена в етанол 10.0 mL и раздробена на възможно най-малки фрагменти с помощта на ножица и пинцета [143,146,147]. Така полученият етанолен препарат е съхранен на тъмно и при стайна температура за 24 h. Наситеният за този период с лекарство екстрагент е отдекантиран в мерителна колба от 25 mL (приемник за екстракцията) и заменен с 4-5 mL чист извлечител (етанол). След това, отдекантиране и подмяната на екстрагента с чист етанол е извършвано на всеки два часа до запълване на обема от 25 mL в мерителната колба. Така полученият етанолен екстракт е филтруван през 0.22 μm порьозен PES филтър за спринцовка и анализиран за съдържание на *Diltiazem* спектрофотометрично при дължина на вълната 244 nm.

Метод II (индиректен): След приключване на пермеационния експеримент, всички елементи от клетката на Франц и мукозата са обстойно промити с фосфатен буфер с рН 7.4 над приемник - бехерова чаша. Събраният обем буфер от тази процедура е прехвърлен в мерителна колба от 250 mL и разреден до марката. Същата процедура на промиване е повторена и с етанол. Двата извлека (буферен и етанолен) са анализирани за съдържание на *Diltiazem*. Сборът от количеството *Diltiazem*, открито в двете проби - буферна и етанолна, представляващ неосвободената от гела част от лекарството ($DTZ_{\text{Неосв.24}}$), е използван за индиректно изчисляване на количеството лекарствено вещество, депозирало се в мукозата, по уравнение 10:

$$DTZ_{\text{МК}} = M_0 - DTZ_{\text{Осв.24}} - DTZ_{\text{Неосв.24}}, \text{ (уравнение 10) [148]}$$

където $DTZ_{\text{МК}}$ е количеството *Diltiazem*, задържано в мукозата, M_0 – началното количество *Diltiazem*, приложено върху мукозата, $DTZ_{\text{Осв.24}}$ - *Diltiazem*, преминал в рецепторната среда след 24 h, и $DTZ_{\text{Неосв.24}}$ - *Diltiazem*, установен в гела след края на изследването (неосвободен).

Резултатите, получени по двата метода, са сравнени и представени като количество активно вещество, съдържащо се в единица обем мукоза [$\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$], приемайки обема на използваната от нас мукоза за 0.078 cm^3 (вътрешен диаметър на клетката на Франц (0.98) cm x дебелина (0.08 cm) = обем от 0.078 cm^3).

5. Хидролитична стабилност на *Diltiazem* в конвенционални и *microspunge*-потенцирани хидрогели

Хидролитичната стабилност на *Diltiazem* в състава на получените гели е съпоставена с тази на лекарството във воден разтвор с цел на оценка на влиянието на използваните полимери – *Poloxamer 407* и *Eudragit RS 100* - върху кинетиката на хидролиза на лекарственото вещество до неговата дезацетилирана форма (*O-desacetyl Diltiazem*). Проби от изследваните гели (Рх-DTZ и F13-Рх-DTZ), както и воден разтвор със същата лекарствена концентрация (2%), са съхранени при температура $25 \pm 2^\circ\text{C}$ на тъмно в продължение на 10 месеца. Стабилитетният анализ е осъществен с помощта на високо ефективна течна хроматография (*HPLC*).

5.1 Приготвяне на стандартни разтвори

Изходните стандартни разтвори на *Diltiazem* и *O-desacetyl Diltiazem* са приготвени в метанол в концентрация 100 mg/L. Серийни разреждания са

проведени чрез смесване на двата изходни разтвора в различни процентни съотношения от 0 до 100% през 10%. Стандартни калибровъчни графики на *Diltiazem* в присъствието на *O-desacetyl Diltiazem* и на *O-desacetyl Diltiazem* в присъствието на *Diltiazem* са построени въз основа на площта на хроматографските пикове.

5.2 Приготвяне на тест разтвори

0.500 g гел (притеглен на аналитична везна с точност до 0.0001 g) е разтворен в достатъчно количество метанол и количествено прехвърлен в мерителна колба от 25.0 mL. Така полученият разтвор е приведен до марката със същия разтворител. Подходящо разреждане с метанол (за измерване в обхвата на калибрационната права) е проведено преди всяко измерване.

Водният разтвор на *Diltiazem* 2% е подложен на хроматографски анализ след подходящо разреждане с пречистена вода, при еднакви времеви периоди с изследваните тест гели.

5.3 HPLC аналитична процедура

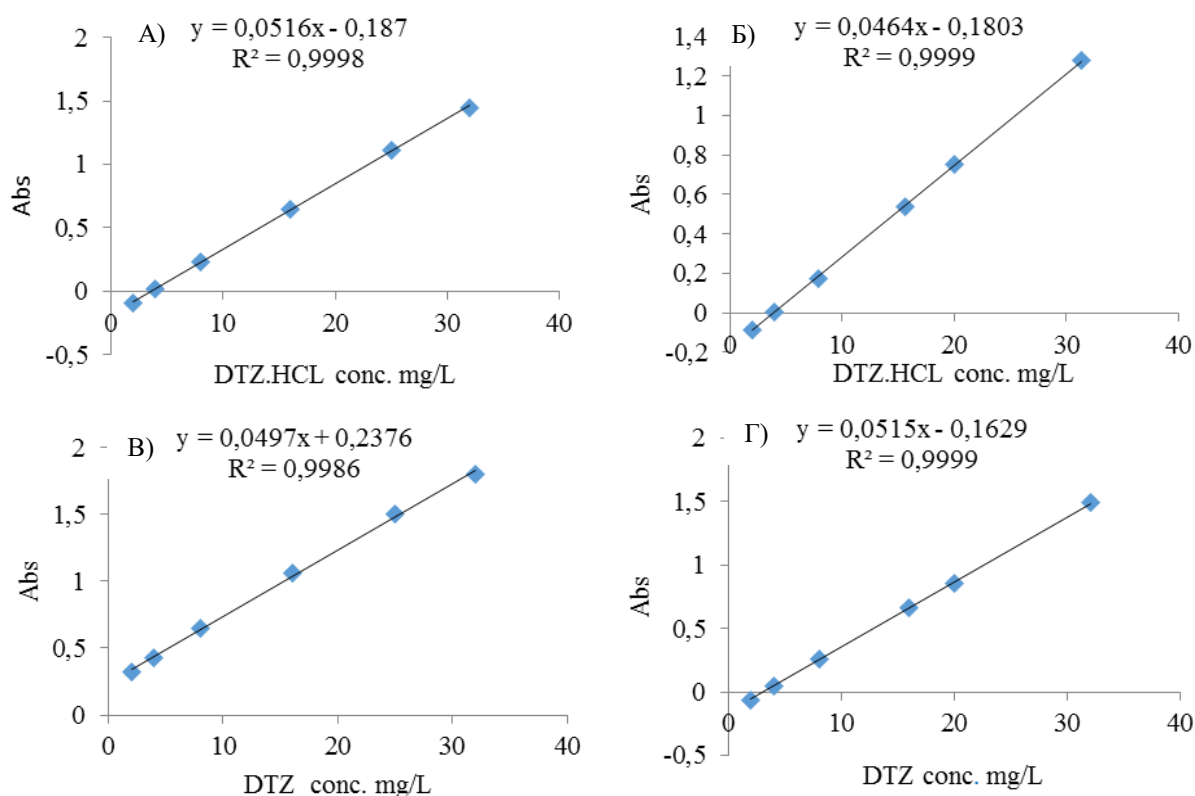
Количественият анализ на *Diltiazem* и *O-desacetyl Diltiazem* в изследваните проби е проведен с помощта на HPLC метод, следвайки валидирана от *Sadeghiet* и съавтори експериментална процедура [149]. Колоната - Thermo Scientific AQUASIL C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m), с предпазна колона - AQUASIL C18 (10 mm x 4.6 mm, 5 μ m) – е темперирана при 50°C. Разтворът за анализ е въведен в обем от 10 μ L. Подвижната фаза (етанол/ разтвор на фосфорна киселина с рН 2.2 - 35/65) е пропусната в изократичен режим с постоянен дебит от 1.2 mL/min. Тестовите са зададени с продължителност от 8 минути след предварителна оценка на времената на задържане на изследваните вещества. Вариабилният UV детектор е настроен на 238 nm, където са открити максимумите на абсорбция на *Diltiazem* и *O-desacetyl Diltiazem*. Площта на пиковете е автоматично интегрирана с помощта на Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.2 софтуер.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Разтворимост и спектрално поведение на *Diltiazem hydrochloride* и *Diltiazem* база

1.1 UV-Vis спектрален анализ

Абсорбционният максимум на поглъщане (λ_{\max}) на *Diltiazem* в ултравиолетовата област е открит при 240 nm (в пречистена вода) и 244 nm (в среда от безводен етанол). Получените калибрационни прави показваха отлична линейност ($R^2 > 0.998$) в изследвания концентрационен интервал 2.0 ÷ 32.0 mg/L (Фиг. 7)



Фигура 7: Стандартни калибрационни прави на *Diltiazem hydrochloride* за UV-Vis спектрофотометрия в **А)** пречистена вода и **Б)** безводен етанол и *Diltiazem* база в **В)** пречистена вода и **Г)** безводен етанол

1.2 Разтворимост

Резултатите от теста за разтворимост на *Diltiazem* база (DTZ база) и хидрохлоридната му сол (DTZ·HCl) са представени на Табл. 4. Според нормите на Ph.Eur., получените резултати класифицират *Diltiazem hydrochloride* като свободно разтворим във вода и умерено разтворим във PBS 7.4, а *Diltiazem* база като малко разтворим във PBS 5.5, много малко

разтворим във PBS 7.4 и практически неразтворим във вода при съответните упоменати температури.

Таблица 4: Разтворимост на *Diltiazem* под формата на база и хидрохлорид във вода и избрани буферни системи

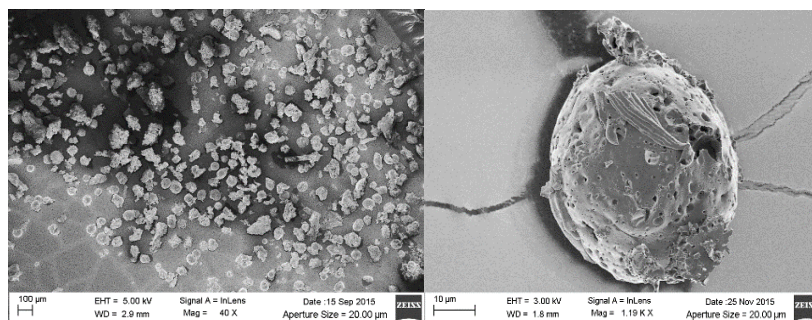
Форма на <i>Diltiazem</i>	Среда	Температура, °C	Разтворимост, mg/mL
DTZ·HCl	пречистена вода	25±0.5	452.97
DTZ·HCl	пречистена вода	37±0.5	1038.0
DTZ·HCl	PBS 7.4	37±0.5	58.23
DTZ база	PBS 7.4	37±0.5	0.202
DTZ база	PBS 5.5	37±0.5	2.766
DTZ база	пречистена вода	25±0.5	0.0789

2. Охарактеризиране на *Diltiazem* в състава на полимерни матрици от *Ammonio Metacrylate Copolymer Type B (Eudragit RS)*

От интерес за нас бе да проучим основни морфологични и функционални характеристики на синтезираните *microsponge* частици, както и детайлни техни структурни особености. Основен акцент е поставен върху изследването на степента на навлизане и взаимодействие на *Diltiazem* с полимерните вериги на *Eudragit RS*. Структурните особености на лекарственатоварените частици следва да окажат значимо влияние върху техните функционални характеристики като лекарствено захващане, десорбция, освобождаване и пр.

2.1 Морфология, добив и лекарствено натоварване с *Diltiazem* на полимерни микрочастици от *microsponge*-тип

Резултатите от проведените синтези на натоварени с *Diltiazem* микрочастици са обобщени на Табл. 5. Сред съставите са включени такива, получени за целите на факториалния анализ на синтеза (FD 2³), както и такива, използвани за други цели (упоменати в Табл.5). Получените SEM микрографии демонстрираха желаната сферична и високопореста морфология като присъща само за някои от съставите, получени при оптимални стойности на съотношението лекарство към полимер (DPR), обем на дихлорометан (V_{DCM}) и концентрация на поливинилов алкохол (C_{PVA}) (Фиг. 8). Същите състави демонстрираха висок добив ($P.Y.>82\%$) и процент на захващане на лекарственото вещество ($E.E.>91\%$) (Табл. 5).



Фигура 8: SEM микрографии на *microsponge* частици (състав F13)

Таблица 5: Резултати от проведените синтеси на *Diltiazem*-натоварени полимерни микросфери от *microsponge*-тип

Код на състава	<i>Eudragit RS 100</i> , mg, DPR (ниво във FD 2 ³)	Теоретично лекарство о съдържание, %	V _{DCM} , mL	CPVA, %	Е.Е.%	P.Y.%	P.S., μm	Морфология от <i>microsponge</i> -тип
Състави за провеждането на 2³ FD								
FD1	67, 3:1 (+1)	75	4 (-1)	0.25 (+1)	87.77±0.35	58.3	16.9±7.1	не ^c
FD2	67, 3:1 (+1)	75	4 (-1)	0.05 (-1)	88.95±0.83	63.3	4.0±1.9	не ^c
FD3	67, 3:1 (+1)	75	12 (+1)	0.25 (+1)	85.87±1.26	61.2	14.5±11.8	не ^c
FD4	67, 3:1 (+1)	75	12 (+1)	0.05 (-1)	88.07±1.84	67	24.4±5.4	не ^c
FD5	600, 1:3 (-1)	25	4 (-1)	0.25 (+1)	88.32±1.83	63.1	239.4±105.3	да ^d
FD6	600, 1:3 (-1)	25	4 (-1)	0.05 (-1)	81.25±0.51	71.1	140.1±55.4	да ^d
FD7	600, 1:3 (-1)	25	12 (+1)	0.25 (+1)	86.41±1.18	69.4	48.9±17.6	да
FD8	600, 1:3 (-1)	25	12 (+1)	0.05 (-1)	79.63±1.67	76.8	33.1±12.5	да
Състави извън рамките на 2³ FD, използвани за проверка на достоверността на данните, получени от него, и емпирична оптимизация								
F9	67, 3:1 (+1) ^a	75	8 (0)	0.25 (+1)	86.26±1.21	65.5	0.78±0.22	не ^c
F10	600, 1:3 (-1) ^a	25	8 (0)	0.25 (+1)	86.85±0.67	79.9	1.56±0.60	да
F11	600, 1:3 (-1) ^a	25	8 (0)	0.05 (-1)	80.54±0.67	86.3	58.8±16.4	да
F12	200, 1:1 (0) ^a	50	8 (0)	0.25 (+1)	86.96±0.32	70.9	0.64±0.24	не ^c
Оптимизирани състави, използвани в сорбционни или <i>in vitro</i> и <i>ex vivo</i> дифузионни проучвания								
F13 ^e	600, 1:3 (-1) ^a	25	8 (0)	0.15 (0)	91.46±0.57	82.9	59.1±13.0	да
F14	600, 1:5.7	15	8 (0)	0.15 (0)	97.07±0.40	83.3	n/a ^b	n/a ^b
F15	600, 1:19	5	8 (0)	0.15 (0)	99.03±0.42	83.9	n/a ^b	n/a ^b
„Празна“ проба (без <i>Diltiazem</i>)								
F0	600	0	8 (0)	0.15 (0)	n/a	83.3	2.4±1.3	да

^a нивото на състава спрямо параметрите на 2³ FD е само информативно, т.к съставите след FD8 не са част от 2³ FD

^b морфологичен анализ не е проведен

^c морфологията на резултатните частици е различна от сферичната и порьозна структура, характерна за *microsponge*-тип частици, напр. пръчковидни или нерегулярни по форма агрегати

^d *microsponge* частици се формират заедно с други различни по морфология агрегати
^e състав с емпирично установен оптимум в нивата на независимите променливи за постигане на *microsponge* структура с максимално високи добив (P.Y.%) и лекарствено натоварване (E.E.%)

Влиянието на независимите променливи върху изследваните зависими характеристики на резултатните частици и демонстрираните в Табл. 5 стойности са дискутирани в следващите подраздели, представящи резултатите от проведения статистически анализ.

2.1.1 Преформулация посредством факториален дизайн (2^3 FD)

Влиянието на три независими променливи фактора на синтеза – съотношение лекарство към полимер - DPR (X_1), обем на дихлорометан - V_{DCM} (X_2) и концентрация на поливинилов алкохол във водната фаза - C_{PVA} (X_3) – върху добива - P.Y.% (Y_1), ефикасността на лекарствено натоварване - E.E.% (Y_2) и размера на частиците - P.S. (Y_3) е оценено посредством 2^3 факториален дизайн (FD 2^3). **Целите на преформулацията са сведени до намирането на статистически оптимум в стойностите на независимите променливи (X_1 , X_2 и X_3) за постигането на максимално високи добив и натоварване (Y_1 и Y_2) и възможно най-малък размер на частиците (Y_3).** Полиномиалните уравнения са генерирани така, че да покажат връзката между независимите вариабилни на синтеза с всяка от зависимите променливи (Y_1 , Y_2 и Y_3). Табл. 6 обобщава резултатите от регресионния анализ за Y_1 , Y_2 и Y_3 , а пълните полиномиални уравнения са показани с уравнения 11÷13.

$$Y_1 (\text{P.Y. \%}) = 70.41 - 2.43 X_1 + 0.79 X_2 - 39.05 X_3 - 0.12 X_1 X_2 + 4.18 X_1 X_3 - 0.06 X_2 X_3 \quad (\text{уравнение 11})$$

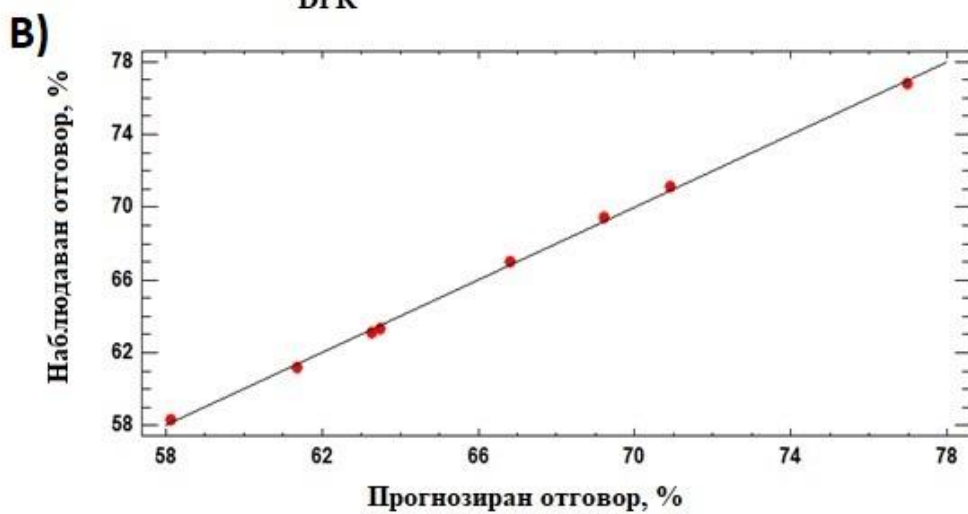
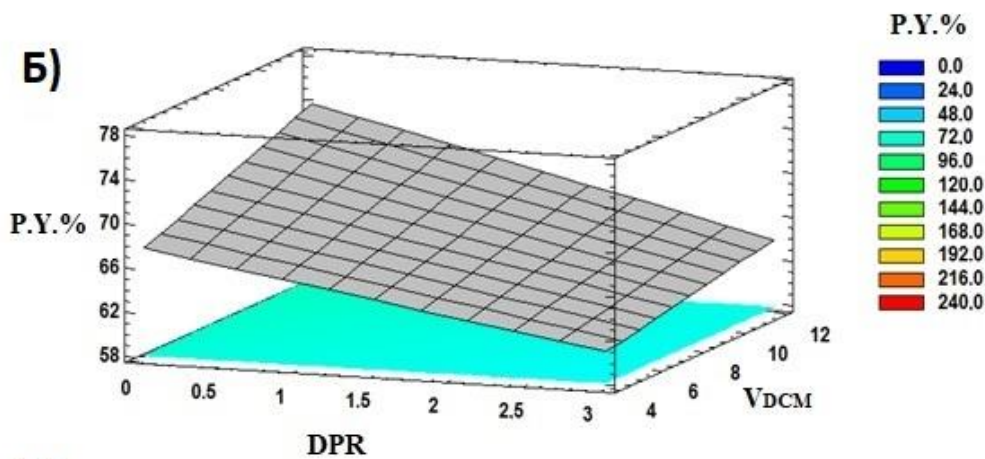
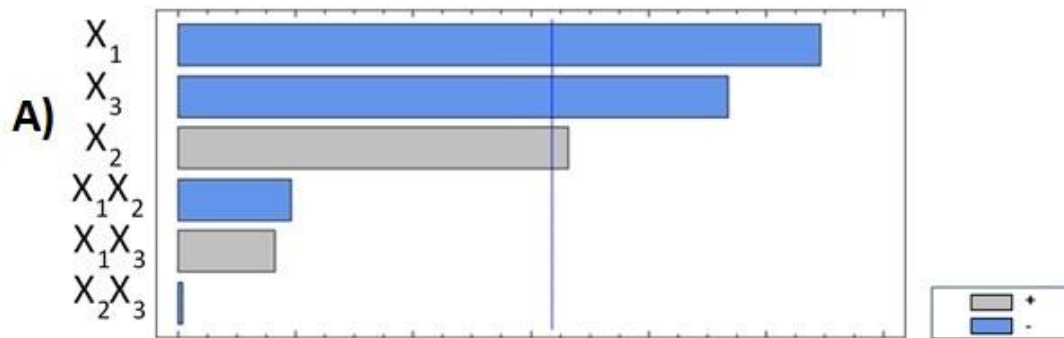
$$Y_2 (\text{E.E. \%}) = 79.09 + 3.58 X_1 - 0.16 X_2 + 41.82 X_3 + 0.017 X_1 X_2 - 15.66 X_1 X_3 - 0.41 X_2 X_3 \quad (\text{уравнение 12})$$

$$Y_3 (\text{P.S.}) = -14.67 - 0.82 X_1 + 23.36 X_2 - 153.86 X_3 - 6.82 X_1 X_2 + 125.46 X_1 X_3 - 20.63 X_2 X_3 \quad (\text{уравнение 13})$$

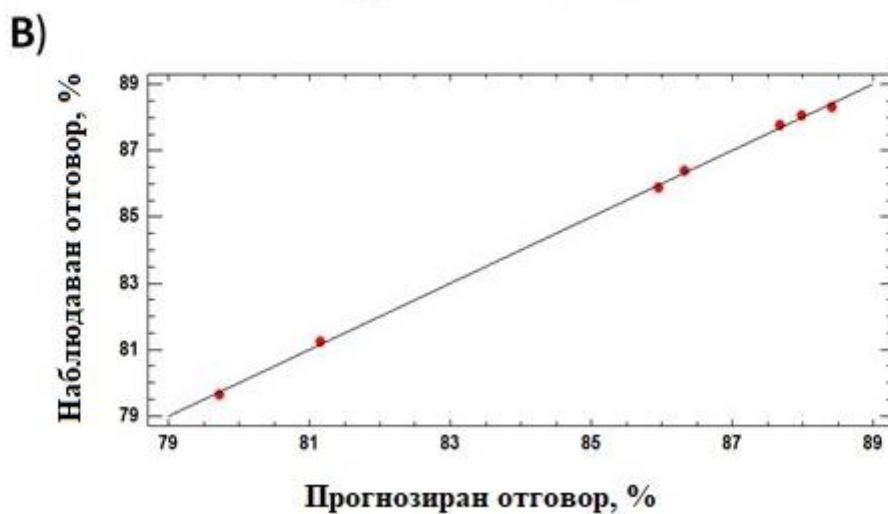
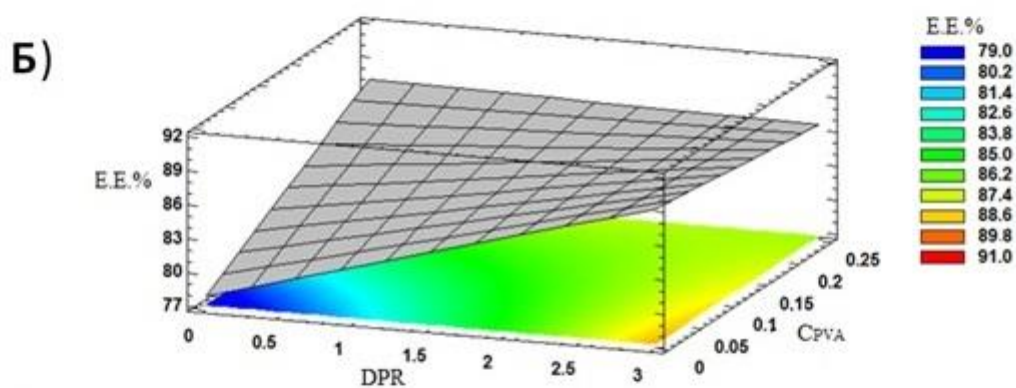
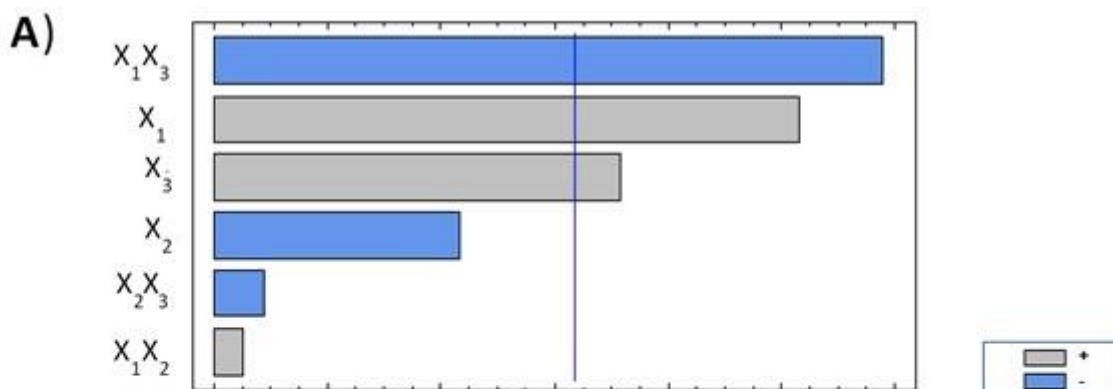
Таблица 6: FD 2³ за синтез на *Diltiazem*-натоварени полимерни микросфери от *microspunge*-тип

Отговор	Y ₁ P. Y. (%)		Y ₂ E. E. (%)		Y ₃ P. S. (µm)	
	x-коэффициент	p-стойност	x-коэффициент	p-стойност	x-коэффициент	p-стойност
Константа (b ₀)	70.41		79.09		-14.67	
X ₁ (b ₁)	-2.43	0.0291	3.58	0.0309	-0.82	0.1552
X ₂ (b ₂)	0.79	0.0478	-0.16	0.0733	23.36	0.2087
X ₃ (b ₃)	-39.05	0.0340	41.82	0.0443	-153.86	0.5265
X ₁ X ₂ (b ₁₂)	-0.12	0.1615	0.017	0.4914	-6.82	0.2048
X ₁ X ₃ (b ₁₃)	4.18	0.1881	-15.66	0.0270	125.46	0.3992
X ₂ X ₃ (b ₂₂)	-0.06	0.9097	-0.41	0.3237	-20.63	0.6286
R ²	0.9990		0.9992		0.9737	
Adj R ²	0.9932		0.9945		0.8157	

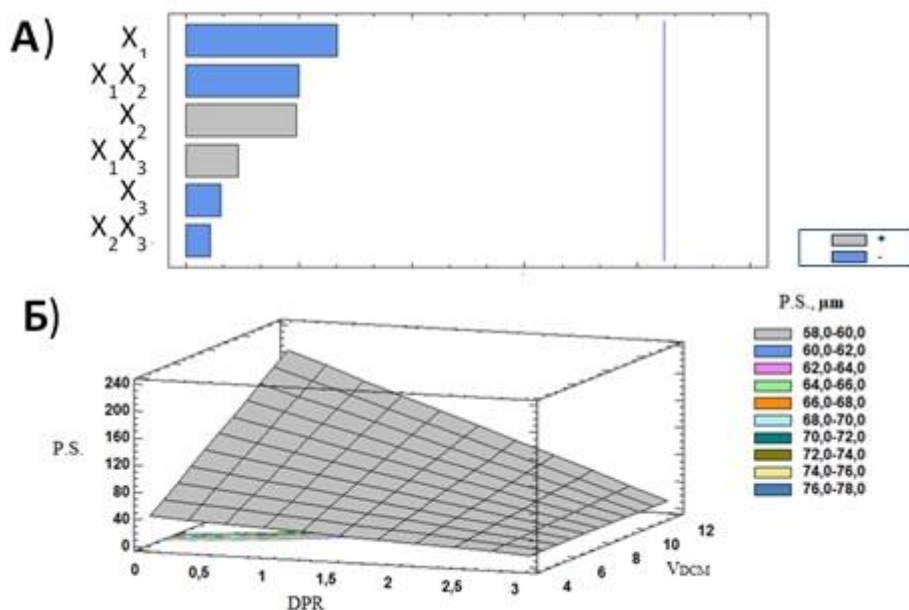
Стойността на изравнения коефициент на детерминация (Adj R²) е показател за степента на корелация между независимата променлива и получения отговор, с което индикира и пригодността на променливата в статистическия анализ. Високата стойност на Adj R² за добива - P.Y.% (Y₁) и лекарствено натоварване - E.E.% (Y₂) (>0.99) свидетелства за по-голяма статистическа значимост на съответните модели в сравнение с този, установен за размера на частиците - P.S (Y₃) (Adj R² <0.99). X-коэффициентите в полиномиалните уравнения представят количествена оценка за влиянието на дадена независима променлива върху отговора, наблюдаван в Y₁, Y₂ и Y₃, а тяхната индивидуална статистическа значимост е демонстрирана с p-стойността, приложена в Табл. 6. Резултатите от статистическия анализ са онагледени и с диаграма на Парето и триизмерна (3D) графика на повърхността (Фиг.9, 10, 11).



Фигура 9 А) Стандартизирана диаграма на Парето за зависимата променлива P.Y.% (Y_1); Б) 3D графика на повърхността за ефекта на независимите променливи X_1 и X_2 върху Y_1 , при X_3 константа 0.15%; В) Корелация между наблюдаван и прогнозиран отговор в P.Y.% (Y_1).



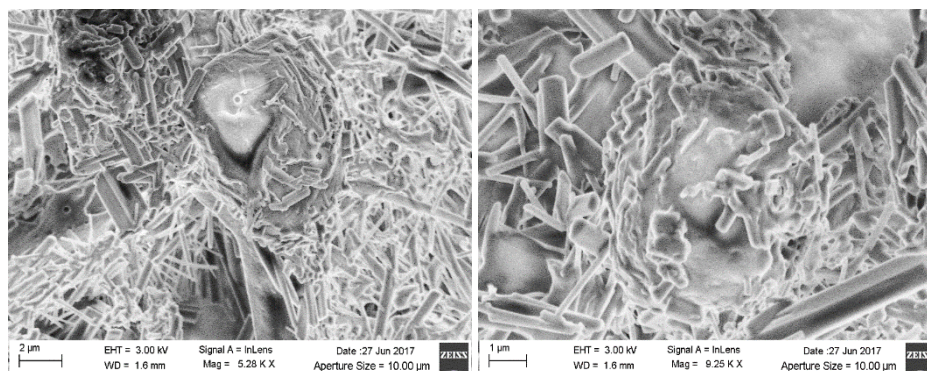
Фигура 10: **A)** Стандартизирана диаграма на Парето за зависимата променлива Е.Е.% (Y_2); **Б)** 3D графика на повърхността за ефекта на независимите променливи X_1 и X_3 върху Y_2 при X_2 константа 8.0 mL; **В)** Корелация между наблюдаван и прогнозиран отговор в Е.Е.% (Y_2).



Фигура 11: А) Стандартизирана диаграма на Парето за зависимата променлива P.S.% (Y_3); Б) 3D графика на повърхността за ефекта на независимите променливи X_1 и X_2 върху Y_3 при X_3 константа 0.15%

2.1.1.1 Оптимизиране на отговора

Функцията „Оптимизиране на отговора“ на софтуерната програма *Centurion XVI.11* ни позволи да изведем статистически оптимизирани нива на независимите променливи (X_1 , X_2 и X_3) за постигането на максимално висок добив и лекарствено натоварване и минимален размер на частиците. Това са именно: съотношение лекарство към полимер - DPR (X_1) = 3 (3:1), обем на органичната фаза - V_{DCM} (X_2) = 12 mL и концентрация на поливинилов алкохол във водната фаза - C_{PVA} (X_3) = 0.05%. Прогнозираните отговори в зависимите променливи (Y_1 , Y_2 и Y_3) при тези нива на независимите променливи са: добив (P.Y.%) = 66.83% (с доверителен интервал 60.94÷72.71%) и ефикасност на лекарствено натоварване (E.E.%) = 87.98% (с доверителен интервал 84.91÷91.05%). Въпреки отличната корелация между прогнозираните и реално установените добив и лекарствено натоварване за частици, синтезирани при тези нива на независимите променливи (състав FD4 – DPR (X_1) = 3 (3:1), V_{DCM} (X_2) = 12 mL и C_{PVA} (X_3) = 0.05%), при този състав не е установено формирането на сферични и порьозни *microsp sponge* агрегати (Фиг. 12). В допълнение, както и при други състави с $DPR \geq 3$, са срещнати някои затруднения при изолиране на партидата.

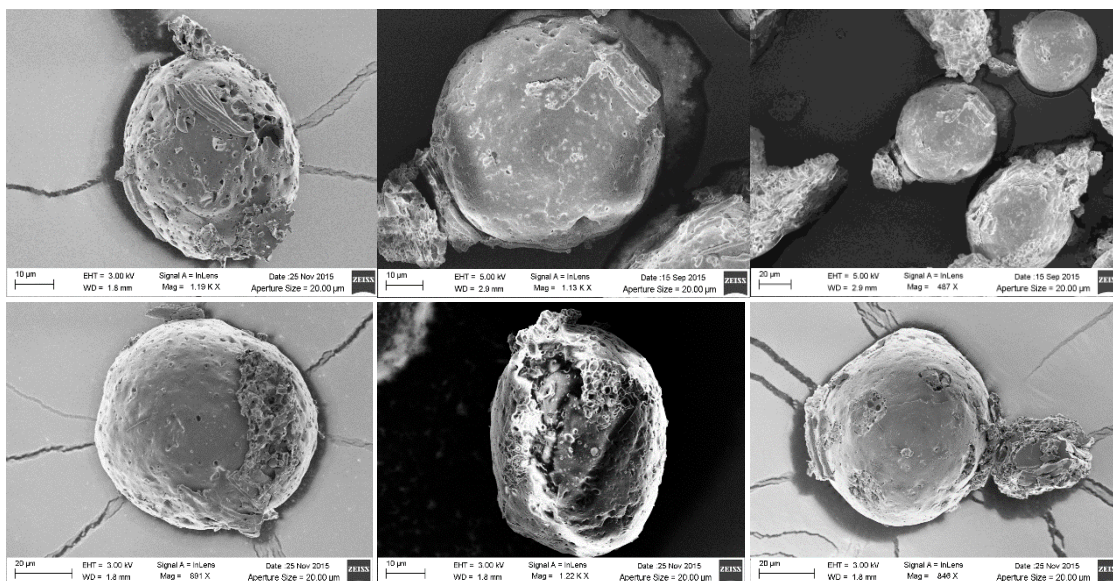


Фигура 12: SEM микрографии на състав FD4 (статистически оптимизиран)

Формирането на сферични и порести агрегати от *microsp sponge*-тип бе демонстрирано да изисква определени оптимални стойности на вискозитета на вътрешната органична фаза, т.е. е силно зависимо както от обема на органичния солвент, така и от количеството на полимера. В противен случай, както показаха и нашите резултати, е възможно лекарство-полимерната смес да преципитира под формата на друг тип агрегати (Фиг. 12) или да не се формират отделни частици. Подобен резултат не би могъл да бъде прогнозиран от проведения факториален дизайн, тъй като формата на частиците е качествен признак и не е зададен като критерий за оптимизиране на отговора. Образуването на нерегулярни полимерни преципитати и кристализация на лекарственото вещество извън структурата на полимера са описани и от други автори [75,100].

В случая на синтезираните от нас партии от частици, желаната сферична и силно порьозна *microsp sponge* морфология е наблюдавана за състави със съотношение лекарство към полимер 1:3 (DPR 1:3) и обем на дихлорометан ≥ 8.0 mL (стойности, отговарящи на концентрация на полимера в дихлорометан от 50 до 75 mg/mL).

След провеждане на допълнителни синтези (състави от F9 до F13), емпиричен оптимум за постигане на таргетираната структура с максимални стойности за добив - P.Y.% (Y_1) и лекарство натоварване - E.E.% (Y_2) - е установен при съотношение лекарство към полимер - DPR (X_1) 1:3 (0.33), обем на дихлорометан - V_{DCM} (X_2) 8.0 mL и концентрация на поливинилов алкохол във водната фаза - C_{PVA} (X_3) 0.15% (състав F13) (Табл. 5, Фиг. 8 и показаната тук Фиг. 13).



Фигура 13: SEM микрографии на частици от състав F13 (емпирично оптимизиран)

2.1.1.2 Повторяемост на синтеза на *microsp sponge* частици по квази-емулсионна техника с дифузия на разтворителя

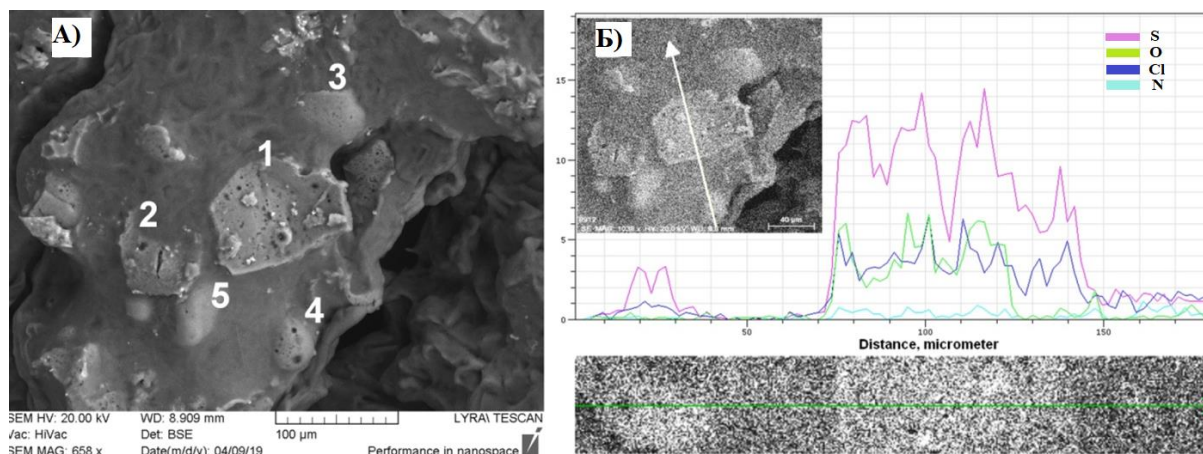
Резултатите от 3 повторения на синтеза на оптимизиран състав F13 са представени на Табл. 7. Съставът е получен с DPR 1:3, V_{DCM} 8.0 mL и C_{PVA} 0.15%. Установеното стандартно отклонение (RSD%) - $0.41 \div 1.75\%$ в добива, лекарственото натоварване и размера на частиците в трите партии, свидетелства за добра повторяемост на резултатите от предложения синтез.

Таблица 7: Повторяемост на синтеза на натоварени с *Diltiazem microsp sponge* частици (състав F13) по квази-емулсионна техника с дифузия на разтворителя

Състав F13	Е.Е.%	Р.У.%	Р.С. μm
Партида №:			
1	91.46±0.57	82.88	59.090±13.002
2	89.32±0.64	83.05	57.059±21.415
3	91.21±0.15	82.4	57.883±19.391
Средна стойност	90.66	82.78	58.01
SD	1.17	0.34	1.02
RSD%	1.29%	0.41%	1.75%

2.2 Елементен анализ (SEM-EDX) на срезове от *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsponge*-тип частици

Техниката SEM-EDX ни позволи да определим елементния състав на срез от *Diltiazem*-натоварени *microspsonge* частици (състав F13). Първичните морфологични характеристики на получения срез са показани на Фиг. 14. В така получената микрография ние отбелязахме наличието на три различни по текстура участъка: 1. ясно изразени участъци от срязани микрочастици, отбелязани на фигурата с номера 1 и 2; 2. неразрушени, интактни полимерни частици (отбелязани с 3, 4 и 5), и 3. участъци от парафинова основа, използвана като среда за фиксиране на полимерните частици. С цел се добие информация за елементния състав в тези структури е проведен енергийно-дисперсионен рентгенов анализ в зоната, означена с бяла стрелка на Фиг. 14-Б.



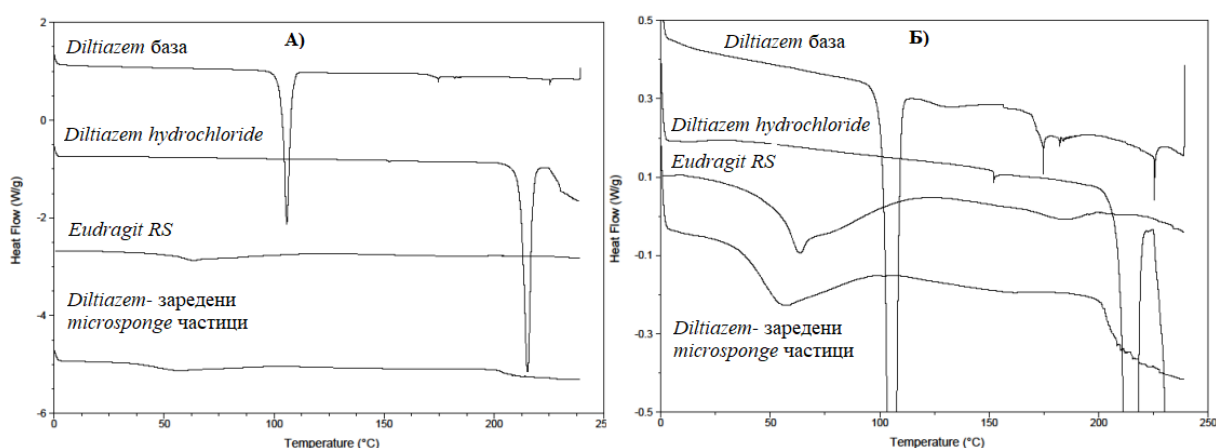
Фигура 14: А) SEM микрография на частици от състав F13, фиксирани в парафинова матрица, след срез с микротом; Б) EDX анализ на получения срез

Вниманието ни бе насочено предимно към динамичната промяна в съдържанието на сяра (S) в хода на сканирания участък, което следва еднозначно да информира за разпределението на *Diltiazem* в изследваната зона. На Фиг. 14-Б се наблюдават две зони на покачване на сярното съдържание, които съответстват на преминаването на лъча през елемент номер 4 (неразрушена полимерна частица - $15\div 35\ \mu\text{m}$) и елемент номер 1 (срез на частица - $70\div 150\ \mu\text{m}$). Предвид получените резултати, следва да се заключи, че депозицията на S-съдържащия *Diltiazem* в структурата на полимерните частици е сравнително равномерно и без ясно разграничени зони на натрупване или агрегация. Наблюдаваните флуктуации в съдържанието на S, O и Cl в изследваната зона, и най-вече в подобластта от $70\div 150\ \mu\text{m}$, следва да се отдадат на морфологичните особености на

синтезираните частици. Поради високата си порьозност те могат да се разгледат като структура с произволно редуващи се „стени“ и „кухини“, които се характеризират с различен елементарен състав и, в допълнение, променят дълбочината на проникване на лъча при неговото преминаване.

2.3 DSC анализ

На Фиг. 15 са показани термограмите, получени в режим на нагриване, на *Diltiazem* база, *Diltiazem hydrochloride*, *Eudragit RS 100* и състав от частици F13.



Фигура 15: Термограми на *Diltiazem* база, *Diltiazem hydrochloride*, *Eudragit RS 100* и *Diltiazem*-натоварени *microsponge* частици, получени в режим на нагриване в температурния интервал $0 \div 250^{\circ}\text{C}$, представени с различно мащабиране – А) и Б)

От получените термограми ясно се виждат ендотермични пикове при 103.8°C за *Diltiazem* база и при 214.5°C за *Diltiazem hydrochloride*, илюстриращи процеса на стапяне на солта и чистата база. Стапянето на *Diltiazem hydrochloride* е придружено с декомпозиция на веществото, която става видна от термограмата при температура над 230°C . Получените резултати са в корелация с наличните литературни данни [1,5,14].

Два ендотермични пика – при 63.1°C и 183.6°C – се проявяват в термограмата на полимера *Eudragit RS 100*. Първият пик съответства на температурата на встъкляване на полимера, която по литературни данни се открива в интервала между 61.9°C и 64.9°C [152,153], а вторият - на температурата му на стапяне, която се докладва да бъде около 187°C [154].

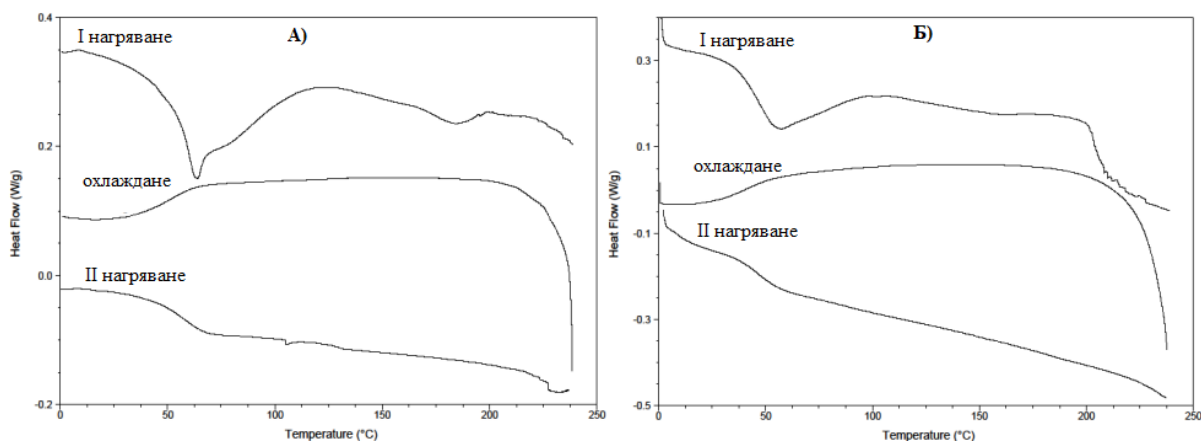
В термограмата на състав F13 пиковете при 103.8°C и 183.6°C , характерни за температурата на стапяне на лекарствената база и полимера, съответно, не се проявяват. Този резултат свидетелства за висока степен на

аморфизация на лекарството в състава на частиците, както и за молекулен тип дисперсност между полимера и активното вещество. Подобни наблюдения са характерни за високо молекулно-дисперсни лекарстводоставящи системи (от типа на твърди разтвори), като тези получени по метода на стапяне и гореща екструзия, например [155,156].

Друга важна промяна, която се наблюдава в термограмата на лекарственатоварените частици, е появата на нов пик при температура, по-висока от температурата на топене на двата компонента - *Diltiazem* база и *Eudragit RS* (>200°C). Последният е възможно да е резултат от реакция на йонообменен между *Diltiazem* база и хлоридните йони (Cl⁻) на полимера в стопилката. Ако такава бъде осъществено, то всяка *in situ* „новосинтезирана“ порция от *Diltiazem hydrochloride* ще започне да се топи в температурния интервал, характерен за солта, а именно този от 212 до 214 °C.

Видно от термограмата на частиците от състав F13 става и повишението в температурата на встъкляване на полимера (в сравнение с тази, характерна за чистия *Eudragit RS 100*) с приблизително 13°C. Подобно явление вероятно е резултат от нарастването на броя на свободните пространства в структурата на полимера вследствие на присъствието на лекарствената база [157,158].

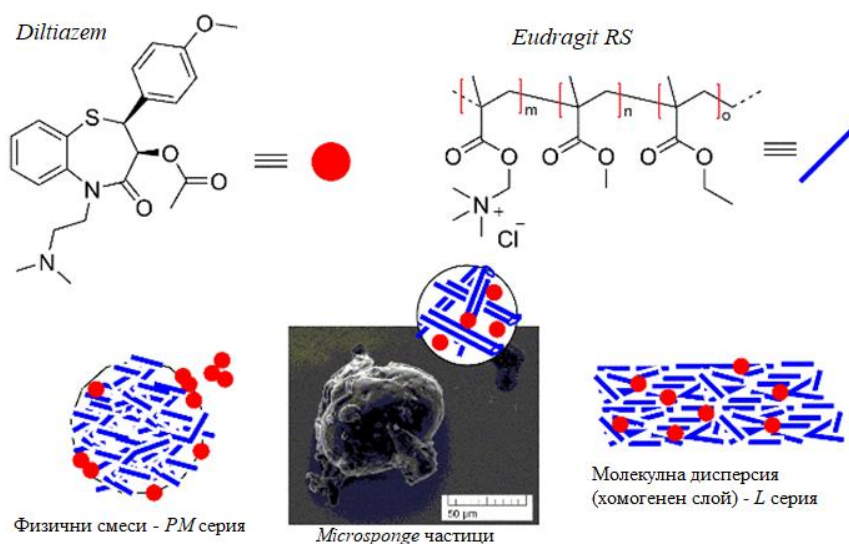
Изследването в режим нагряване-охлаждане-нагряване (Фиг. 16) потвърждава гореописаните наблюдения. При второто нагряване след охлаждане, първият пик в термограмата на полимера, отговарящ на температурата му на встъкляване (при 63.1°C), изчезва, като на негово място се появява характерна „чупка“ (Фиг. 16).



Фигура 16: Термограми на А) *Eudragit RS 100* и Б) *Diltiazem*-натоварени *microsponge* частици, получени в режим на нагряване-охлаждане-нагряване в температурен интервал 0÷250°C

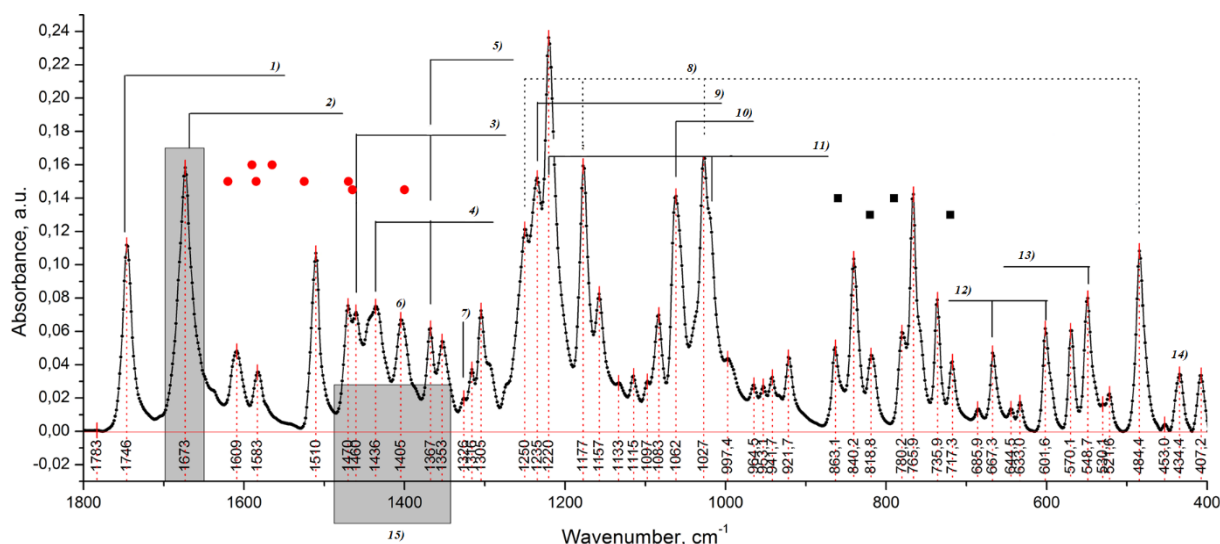
2.4 FT-IR анализ на *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsponge*-тип частици и други дисперсии от *Diltiazem* и *Eudragit RS*

За да установим степента на молекулно диспергиране на лекарственото вещество (*Diltiazem*) в полимерната матрица, ние разработихме в допълнение към основния модел (*microsponge* частици), още два модела с изключително различни текстурни характеристики, но със същия принципен състав. С единия от тях, означен като РМ (от *physical mixture*), имахме за цел да получим представителна серия от проби с частична (минимална) диспергираност на лекарственото вещество в полимерната матрица (Фиг. 17). Втория модел, означен с код L (от *homogeneous layer*), проектирахме като близък до т.нар. истински разтвор (с максимална степен на молекулна дисперсност) (Фиг. 17).



Фигура 17: Схематично илюстриране на степента на дисперсност на *Diltiazem* в трите типа *Eudragit RS*-структурирани матрици – РМ- серия , *microsponge* частици и L- серия

На Фиг. 18 са представени характерните ивици на отделни функционални групи на *Diltiazem* база. За интерпретацията на получения спектър бе използван референтният трансмисионен IR спектър на *Diltiazem hydrochloride* [1]. С червени маркерни точки са отбелязани зоните, в която се очаква да се проявят характерните за 1,4- и 1,2-дизаместени феноли пръстенни трептения, а с черни квадратни маркери - зоните на очаквана проява на ветрилните деформационни Н-трептения от *орто*- и *пара*-заместените ароматни ядра [137].

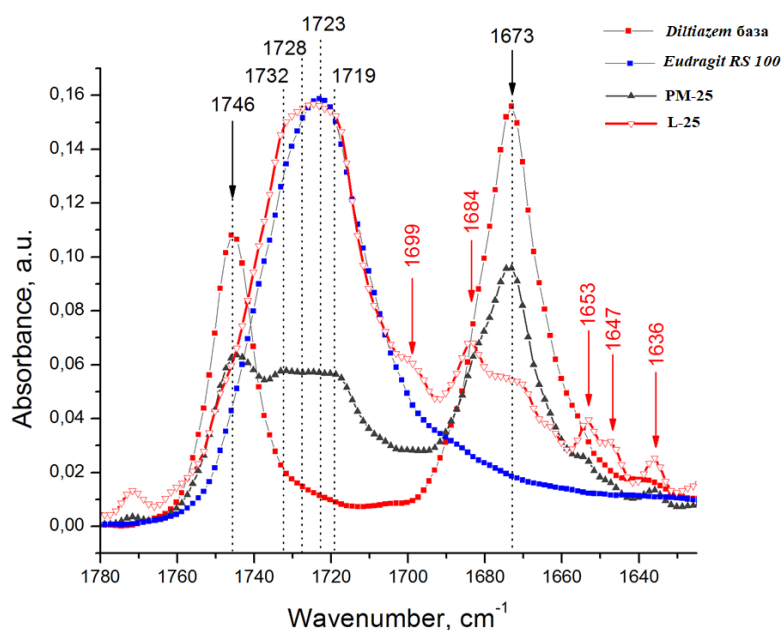


Легенда: 1) Валентно C=O трептене (ацетатна група); 2) валентно C=O трептене (лактимен пръстен); 3) деформационно трептене (-CH₂-); 4) деформационно трептене (-OCH₃); 5) деформационно трептене (-C(O)-CH₃); 6) махално деформационно трептене (-CH-); 7) деформационно трептене (-CH-); 8) валентни C-N трептения (C-NH₂); 9) асиметрично валентно C-O-C трептене от C-O-C(O)CH₃ група; 10) симетрично валентно C-O-C трептене от C-O-C(O)CH₃ група; 11) симетрично валентно C-O-C трептене; 12) валентно C-S трептене; 13) и 14) деформационни C-O-C трептения; 15) зона на симетрични и асиметрични деформационни трептения от CH₃ групи.

Фигура 18: ATR-FTIR спектър на *Diltiazem* база

В хода на интерпретацията на получените спектри на трите различни типа *Diltiazem-Eudragit RS* дисперсии установихме задоволителни нива на чувствителност и селективност в сравнително тесен спектрален диапазон от около 50 cm⁻¹ (1700÷1650 cm⁻¹). По аналогия с анализа на други карбонил-съдържащи вещества, вниманието и тук е насочено към особеностите в измененията на вибрационни трептения на именно тези функционални групи (означени по-долу като νCO).

На Фиг. 19 е показан представителен участък от спектъра на *Diltiazem* база, *Eudragit RS 100*, както и на техни смеси (1780÷1630 cm⁻¹).

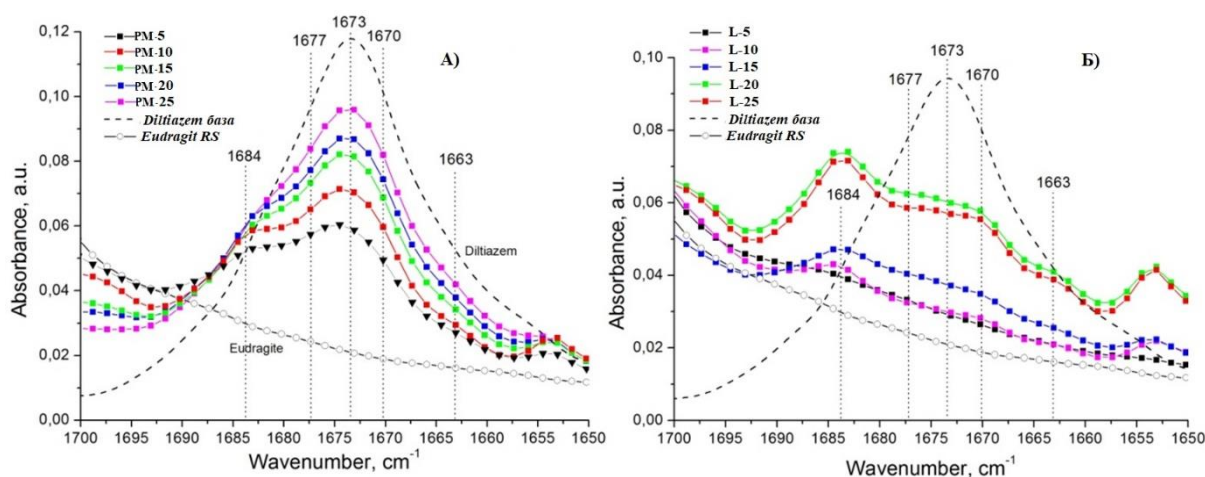


Фигура 19: ATR-FTIR спектри на *Diltiazem* база, *Eudragit RS 100* и техни смеси – PM- серия и L- серия

Във FT-IR спектъра на *Diltiazem* база се отчитат две силно изразени и добре разпознаваеми ивици в посочения спектрален диапазон. Ивицата с максимум при 1746 cm^{-1} асоциираме с трептенията на ацетатния C=O функционал, а по-ниско разположената такава - при 1673 cm^{-1} – с трептения на C=O функционала на седемчленния лактамен пръстен [1]. В същия спектрален интервал се регистрира също и широка и силно интензивна ивица с максимум при 1723 cm^{-1} в спектъра на *Eudragit RS 100*. Последната следва да се разглежда като съставена от най-малко три припокриващи се ивици, характерни за трите различни вида карбонилни (естерни) групи в структурата на полимера (структурата на полимера е приложена на Фиг. 35, стр. 58).

Според общоприетата теория, когато се изследват смеси или разтвори от/на вещества (както тук условно полимера може да се разглежда като разтворител/дисперсна среда за изследвания аналит - *Diltiazem*), то се очаква да настъпят значителни изменения в сигнала на карбонилните групи вследствие на междумолекулни взаимодействия. Обикновено използваният разтворител (нискомолекулно органично вещество/ течност или високомолекулна органична матрица) може да повлияе както положението, така и интензитета на карбонилните ивици. Този ефект в литературата се означава като солватохромен. Изследването тук показва появата на значителни промени в профила на νCO ивиците и при двата вида дисперсии - PM- и L- серия (Фиг. 19). Наблюденията върху по-нисколежащата субзона

в разглеждания участък от спектъра – $1690-1660\text{ cm}^{-1}$ – показваха проявата на нова абсорбционна ивица с максимум при 1684 cm^{-1} при всички видове лекарство-полимерни смеси. В случая на физичните смеси (PM-серия), както се вижда по-ясно от Фиг. 20-А, тази ивица е слабо изразена и бива откривана като ясно очертано рамо към основата на νCO -ивицата при 1673 cm^{-1} . В спектрите на пробите от серия L, от друга страна, новопоявилата се ивица при 1684 cm^{-1} е преобладаваща и следователно показателна за успешното хомогенно диспергиране на лекарствените молекули в полимерната матрица (Фиг. 20-Б).



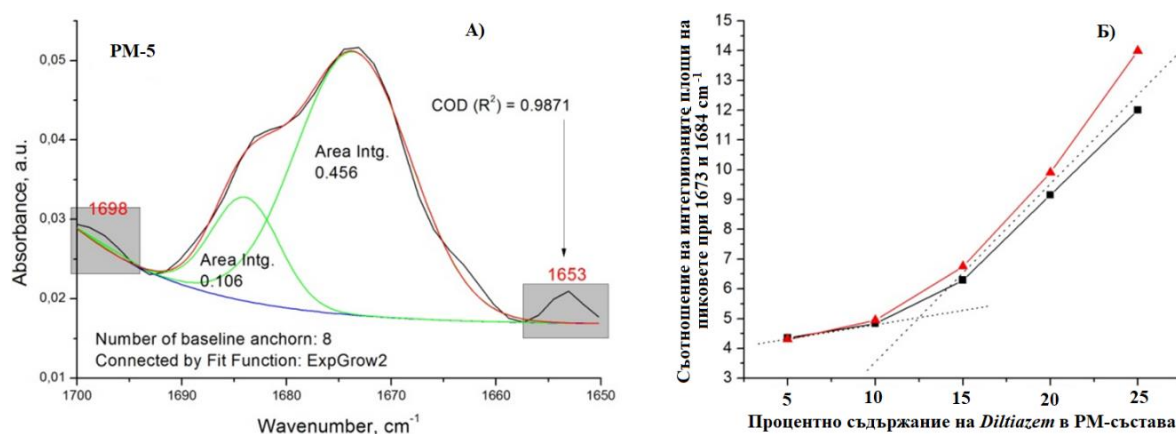
Фигура 20: ATR-FTIR спектри на А) физични лекарство-полимерни смеси (PM-серия) и Б) молекулни лекарство-полимерни дисперсии (L-серия) при различна лекарствена концентрация

Разумно е да се предположи, че интензитета на тази нова ивица е функция от степента на хомогенно диспергиране на лекарствените молекули в полимерния обем – процес, който неминуемо води и до отслабване на присъщата за чистото лекарствено вещество (*Diltiazem*) по-ниско лежаща ивица при 1673 cm^{-1} . Изместването в позицията на νCO ивица с приблизително 11 cm^{-1} може да се отдаде на силното дипол-диполно взаимодействие между молекулите на използвания разтворител - *Eudragit RS 100* - и диспергираното лекарствено вещество - *Diltiazem*.

От казаното дотук следва да се обобщи, че колкото по-висока е степента на дисперсност на *Diltiazem* в полимерната матрица, толкова повече нараства и интензитетът на νCO при 1684 cm^{-1} и съответно намалява този на ивицата с максимум при 1673 cm^{-1} .

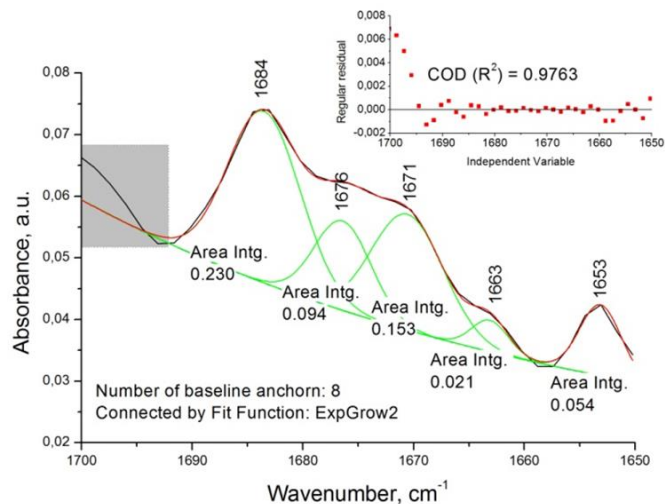
Различия в интензитетите на посочените ивици се наблюдават не само в резултат от избора на метод на получаване на дисперсиите, а също и при

промяна в съотношението лекарство към полимер (Фиг. 20). Така например, механичното смесване (при физичните дисперсии) предполага ниска степен на включване на *Diltiazem* в структурата на полимера в резултат на механично триене и взаимнообмен в точките на контакт между двата компонента. Очакването е *Diltiazem* да функционализира повърхността на оситнените полимерни частици, а излишъкът от лекарството да запази интактни своите спектрални свойства (т.е. абсорбционна ивица при 1673 cm^{-1}). На базата на тази интерпретация и след разлагане на получените спектри с помощта на специализиран софтуер - *Origin 8.1*, ние успяхме да дефинираме точка на насищане на полимерната повърхност с *Diltiazem*, над която интензитета на ивицата при 1684 cm^{-1} в спектрите на механичните смеси се запазва постоянна (спира да нараства), а тази на ивицата при 1673 cm^{-1} се увеличава (Фиг.21). Получените резултати потвърдиха горепосочената работна хипотеза за механизъм на взаимодействие на *Diltiazem* и *Eudragit RS* в състава на така получените механични смеси.



Фигура 21: А) Пример за разлагане на ATR-FTIR спектър на физични лекарство-полимерни смеси (PM- серия) с помощта на *Origin 8.1* софтуер и Б) Определяне на точка на насищане на полимерната повърхност с *Diltiazem*

Опит за подобен анализ е проведен аналогично и за спектрите, получени от молекулните дисперсии (L- серия) с различни концентрации на *Diltiazem* (Фиг.22).

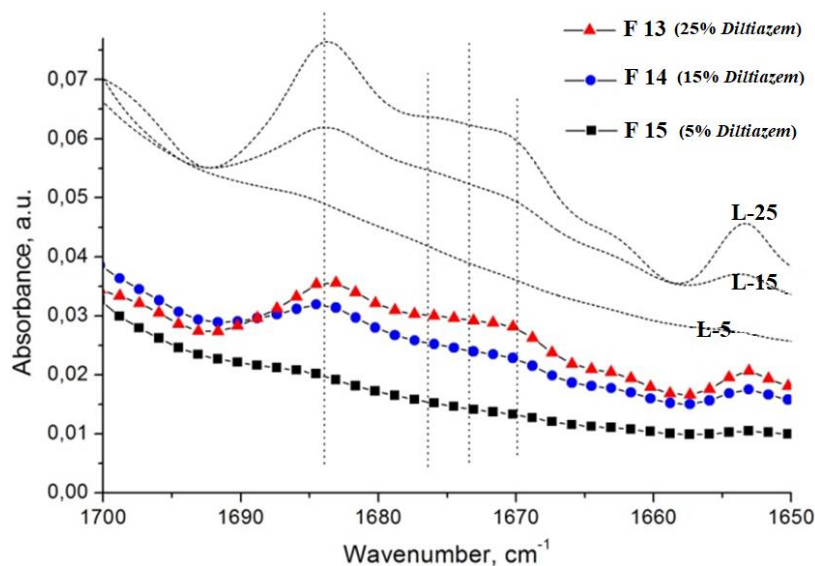


Фигура 22: Пример за разлагане на ATR-FTIR спектър на молекулна лекарство-полимерна дисперсия (L- серия) с помощта на *Origin 8.1* софтуер

В IR спектрите на реалните (молекулни) дисперсии на *Diltiazem* в полимерната матрица се отчита проявата и на множество други нови абсорбционни ивици в разглежданата спектрална подобласт, в допълнение към гореуказаната ивица с абсорбционен център при 1684 cm^{-1} . Всяка една от тези новопоявили се ивици би могла да бъде отнесена към сложни междумолекулни взаимодействия между двата компонента. Разумно е да се приеме, че по време на процеса на хомогенно диспергиране на лекарствените молекули в полимерната матрица, те заемат участъци в нея с различна степен на кристалност и респективно – диелектричност; това също следва да е предпоставка за отчетените вариации във νCO на изследвания аналит - *Diltiazem*. Следва да се отбележи, че както новопоявилите се νCO ивици при 1663 , 1671 , 1676 и 1684 cm^{-1} , така и отчетената редукция в интензитета на ивицата с максимум при 1673 cm^{-1} , свидетелстват за добрата взаимна разтворимост на двата компонента – лекарство и полимер. Въпреки това, появата им усложнява спектралната картина на всички проби от посочената серия (молекулни дисперсии) и прави последвалата им интерпретация изключително трудна.

Спектралното поведение на пробите от F- серия (лекарство-натоварени *microsponge* частици) е демонстрирано на Фиг. 23. Интересно е да се отбележи, че по своя вид спектрите на тази серия **почти напълно имитират наблюдавания абсорбционен профил на пробите от L- серия**, макар и популацията на диспергираните лекарствени молекули при тях да е сравнително по-малка. Този резултат свидетелства за **висока степен на молекулно диспергиране на *Diltiazem* в новосинтезираните *microsponge***

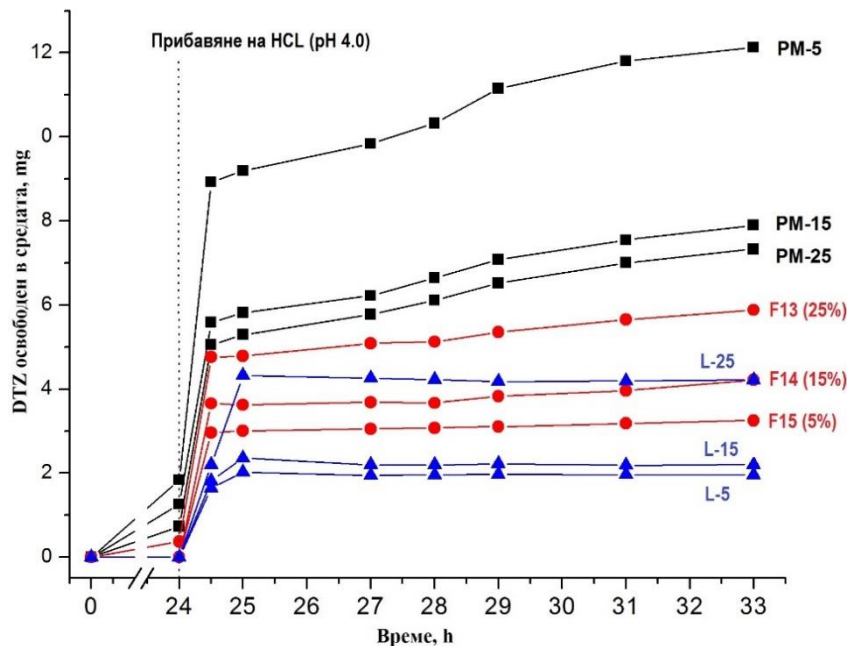
частици. Разликата в броя на разтворените молекули *Diltiazem* в полимерната матрица (видна най-вече от разликата в интензивността на ивиците при 1684 cm^{-1} за L- и F- серия) вероятно се дължи на факта, че реалното съдържание на *Diltiazem* в лекарстводоставящите системи е винаги по-ниско от теоретично заложеното такова от 5, 15 и 25% (Табл. 5).



Фигура 23: ATR-FTIR спектри на *Diltiazem*-натоварени *microsponge* частици (F-серия), съпоставени със спектрите на молекулни лекарство-полимерни дисперсии (L-серия) при различни лекарствени концентрации

2.5 Анализ на сорбционното поведение на *Eudragit RS* спрямо *Diltiazem*

Резултатите от сорбционния анализ на трите изследвани типа дисперсии лекарство-полимер (серии PM, L и F) са представени на Фиг. 24. Известно е, че полимерът *Eudragit RS* притежава рН-независимо набъбване във водна среда [159,160]. Предварителното набъбване на матриците ни позволи да разгледаме процеса на лекарствено освобождаване (десорбция), наблюдаван впоследствие, като изцяло дифузионно-контролиран.



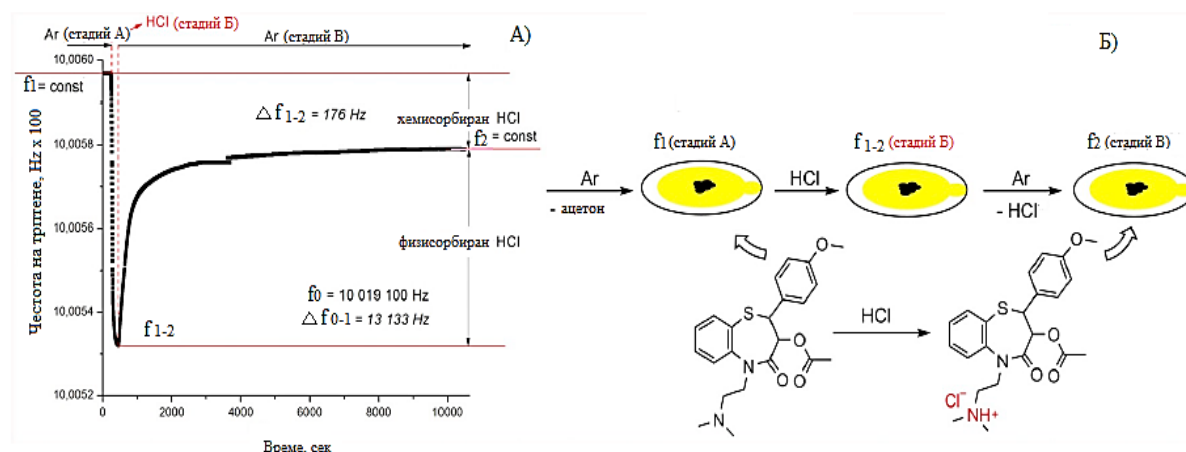
Фигура 24: Десорбция на *Diltiazem* от РМ-, F- и L-серия лекарство-полимерни смеси

В серия РМ (при която лекарственото вещество е въведено чрез механично смесване) се установи преимуществено разпределение на *Diltiazem* по повърхността без навлизане във вътрешния обем на оситнените полимерни частици. По тази причина, този тип дисперсии демонстрираха най-висок процент на десорбция на лекарството. В допълнение, колкото по-високо е полимерното съдържание в тези състави, толкова по-голяма се явява резултатната повърхностна площ на *Diltiazem*, и степента му на десорбция намалява в реда РМ-5>РМ-15>РМ-25 (Фиг. 24). Противоположна тенденция се наблюдава за освобождаването на *Diltiazem* от *microsponge* частици, където бе доказана висока степен на хомогенност и равномерно разпределение на лекарството в целия обем на полимерната частица. С нарастване на полимерното обкръжение около лекарственото вещество, степента му на десорбция намалява, тъй като се удължава неговият ефективен дифузионен път (F13 /25%/>F14/15%/>F15/5%/). Най-ниска степен на освобождаване на *Diltiazem* демонстрираха слоевете от лекарство и полимер, получени чрез разтваряне и изпаряване върху часовниково стъкло (L- серия). Освен доказаната висока степен на молекулно диспергиране на *Diltiazem* в полимерната структура, при използването на този тип техника на получаване се очаква полимерът да приеме най-висока степен на кристалност. Резултатите от сорбционното изследване потвърждават тази хипотеза, тъй като голяма част от лекарственото

вещество (>90%) остава имобилизирана в организираната структура на слоя и неосвободена в средата (Фиг. 24). Максимум в освобождаването на *Diltiazem* при пробите от L- серия се достига още на първия час от изследването, а количеството на десорбция *Diltiazem* намалява в реда L-25>L-15>L-5. Последното наблюдение насочи нашите разсъждения по посока на намаляващата разтворимост на *Diltiazem* в полимерния слой с увеличаване на неговото процентно съдържание. Може да бъде допуснато, че съдържанието на лекарство над концентрацията на насищане в полимера би довело до наличие на суспендирана фракция (по-слабо свързана с полимера фракция), която следва да бъде по-лесно освободена и десорбирана от структурата на хомогенния слой. Резултатите от FT-IR анализа на състав L-25 са в подкрепа на това предположение.

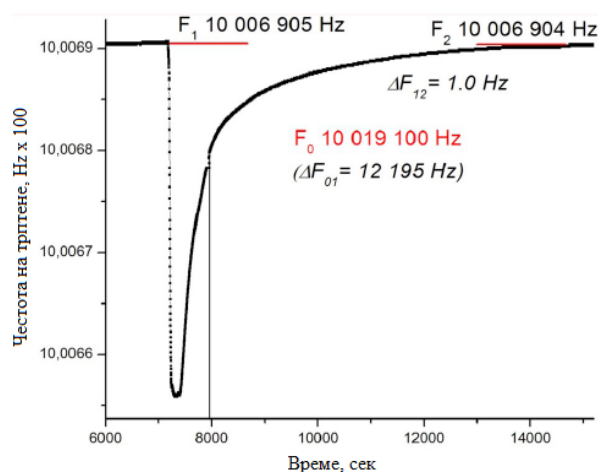
3. QCM анализ на *Diltiazem* в полимерни матрици от *Eudragit RS*

Предложения от нас QCM метод има за цел да установи еднозначно съдържанието на *Diltiazem* в състава на полимерни матрични системи от *Ammonio Methacrylate Copolymer Type B (Eudragit RS)*. За целта, след нанасяне на пробата (Стадий А, Фиг. 25), в проточната камера е въведен излишък от *HCl* газ (Стадий Б, Фиг. 25). Неотреагираният хлороводород е евакуиран посредством пропускане на постоянен аргонов поток (Стадий В, Фиг. 25)



Фигура 25: А) Изменение в честотата на трептене на резонатора през трите стадия на QCM изследването на лекарство-натоварени полимерни матрици: стадий А – установяване на константна честота на трептене на резонаторната пластина след нанасяне на пробата чрез пропускане на постоянен Ar поток (f_1); стадий Б - експониране на пробата с *HCl*; стадий В – евакуиране на *HCl* от проточната клетка до установяване на константна крайна честота на трептене (f_2); Б) Схематична илюстрация на трите етапа на QCM изследването (А, Б и В) на *Diltiazem* в полимерни матрици от *Eudragit RS*

Взаимодействието на изследваната проба с *HCl* се осъществява по два принципино различни механизма – 1. необратима хемисорбция в активните центрове на матрицата, съдържащи органична база *Diltiazem* (pK_a 7.7) [161,162] и 2. обратима физичесорбция с химически инертната *Eudragit RS* полимерна матрица. Обратимостта на втория процес е предварително доказана с наблюдаваното пълно възстановяване на масата на проба от полимер след отстраняване на действието на *HCl* (Фиг. 26).



Фигура 26: Реакция в честотата на трептене на резонаторната пластина към пропускането на *HCl* газ след нанасяне на слой от чист полимер

Разликата между изходната честота на трептене на пластината с анализа (F_1) и тази след отстраняване на *HCl* от проточната клетка (F_2) се равнява на 1.0 Hz, което попада в обхвата на случайната грешка на осцилатора. Следователно, методът може да бъде използван за еднозначното определяне на *Diltiazem* в полимерната матрица – обстоятелство, предопределено от способността на лекарството да се свързва необратимо с *HCl* и да доведе до необратими промени в масата на пробата и честотата на трептене на кварцовата пластина.

В случаите на лекарство-натоварените проби, разликата в изходната и крайната честотата на трептене на резонатора, означена като f_{1-2} , е тълкувана изцяло като следствие от необратима хемисорбция на *HCl* с пробите и преизчислена като лекарствено съдържимо (DC%) по уравнение 14.

$$DC\% = \frac{\Delta m_{1-2} \cdot S}{\Delta m_{0-1}} \cdot 100 \quad (\text{уравнение 14})$$

където с Δm_{0-1} и Δm_{1-2} са отбелязани промените в масата преди и след нанасяне на анализа (0-1) и преди и след взаимодействие на пробата с *HCl*

газ (1-2), съответно, изчислени съгласно уравнението на *Sauerbrey* (уравнение 4), а с *S* е означено отношението на молекулните маси на *Diltiazem* база и *HCl* газ.

3.1 Валидиране на QCM метода

Методът е валидиран на базата на три измервания на всяко от петте концентрационни нива на стандартните лекарство-полимерни разтвори, резултатите от които са представени в Табл. 8. Връзката между реално измерените и номиналните стойности на концентрацията на *Diltiazem* се описва с линейно-регресионното уравнение $y=0.99x+0$ с коефициент на детерминация $R^2=0.9986$, където на *x* отговарят номиналните концентрации, а на *y* – концентрациите на анализа, измерени по метода на QCM. Получените резултати свидетелстват за отлична корелация между теоретично очакваните и експериментално измерените стойности в изследвания концентрационен интервал. Статистическият анализ показва, че нивото на междинна прецизност (RSD%) и точност (DEV%) на получените резултати попада в допустимия доверителен интервал от $\pm 5\%$, с изключение на измерванията на най-ниското концентрационно ниво (5% *Diltiazem*) (Табл. 8). Отклонението в точността на резултатите следва да се отдаде на наличието на системни грешки, допуснати в процеса на пробоподготовка.

Точността и прецизността на предложения от нас QCM метод са съпоставени с тези на фармакопейния UV-Vis спектрофотометричен метод. Резултатите ни позволиха да проследим солватохромния ефект на използвания разтворител и полимера върху абсорбционното поведение на *Diltiazem* и да сравним точността и прецизността на предложения от нас QCM метод с аналогичните характеристики на широко използвания инструментален UV-Vis фармакопееен метод. Спектралния метод избрахме за референтен при валидиране на QCM метода по няколко причини – 1. Стандартният HPLC метод е сметен за неподходящ поради невъзможност за тотална екстракция на анализа; 2. солватохромният ефект на полимерната матрица, отчетен в сметите FT-IR спектри, се явява причина този метод също да не бъде избран; 3. изборът на UV-Vis спектрален метод задоволява необходимостта от евтин и лесно достъпен референтен метод. В Табл. 8 са представени отчетените резултати за RSD% и DEV%, получени по метода на QCM и UV-Vis спектрофотометрия.

Таблица 8: Резултати от измерването на концентрацията на *Diltiazem* в полимерни матрици от *Eudragit RS* чрез QCM метод и UV-Vis спектрофотометричен метод

Номинална концентрация на <i>Diltiazem</i> , % ^a	QCM измерване							UV-Vis спектрофотометрично измерване						
	DC%		Средна стойност, %		SD	RSD %	DEV %	DC%		Средна стойност, %		SD	RSD %	DEV %
0	0.092	n/a ^b	n/a ^b	0.092	n/a ^b	n/a ^b	n/a ^c	0.0475	0.045	0.046	0.046	0	2.88	n/a ^c
5	4.5	4.4	4.6	4.5	0.1	1.9	9.8	n/a ^d	n/a ^d	n/a ^d	n/a ^d	n/a ^d	n/a ^d	n/a ^d
10	10.1	10.5	10.3	10.3	0.2	2.0	-2.8	10.5	10.8	10.9	10.7	0.2	2.1	-7.0
15	15.0	14.9	15.4	15.1	0.3	1.7	-0.5	15.2	15.7	15.4	15.5	0.2	1.4	-3.0
20	20.0	19.9	19.4	19.8	0.3	1.6	1.3	19.9	19.3	19.8	19.7	0.3	1.6	1.6
25	25.4	24.7	24.7	24.9	0.4	1.5	0.3	24.3	24.5	24.1	24.3	0.2	0.8	2.8

^a концентрация на *Diltiazem* в полимерната матрица

^b експериментът е проведен еднократно

^c показателят не може да бъде изчислен, тъй като номиналната концентрация, на която се дели във формулата за изчисление, е 0

^d изследване на това концентрационно ниво не е проведено с UV-Vis спектрален метод

QCM методът показва по-висока точност от използвания за референтен инструментален метод. Въпреки това, UV-Vis спектралният метод прояви задоволителни нива на точност и прецизност (<5%) при измерването на концентрацията на *Diltiazem* в полимерни матрици, демонстрирайки необходимата индиферентност спрямо присъстващия полимер. Следва да бъде отбелязано, че адекватността на UV-Vis метода се гарантира от изпълнението на още две необходими експериментални условия – 1) избраният солвент да е оптично пропусклив и с подходящ капацитет за пълното разтваряне на всички компоненти в изследваните проби и 2) използваният полимер да не маскира спектралната проява на изследвания аналит. Подобен негативен ефект от страна на полимера е отчетен при UV-Vis количествения анализ на *Lidocaine* (база) в присъствието на *Eudragit RS*, където QCM методът демонстрира статистически значимо преимущество. Резултатите от този експеримент са описани в приложение към дисертационния труд.

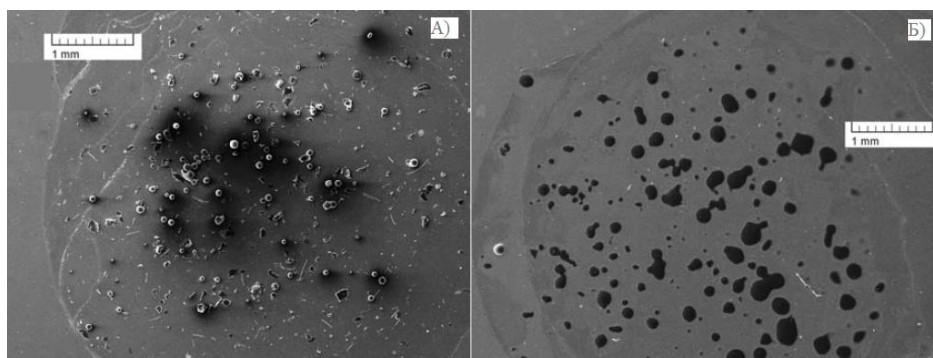
3.2 Приложение на QCM метода за количествено определяне на *Diltiazem* в проби от *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsponge* частици

3.2.1 Оптимизиране на пробоподготовката за QCM анализ на лекарство-полимерни смеси

Първоначалният стремеж на нашия експеримент с QCM бе да използваме недеструктивен метод за установяване на лекарствено съдържание в синтезираните *Diltiazem*-натоварени лекарстводоставящи частици. За целта:

1. Като **първи вариант**, лекарство-натоварените частици са диспергирани в минимално количество пречистена вода и депозирани върху резонаторната пластина под формата на суспензия чрез накапване (капки с минимален обем $5\div 10\ \mu\text{L}$). След изпаряване до сухо при нагряване до 80°C , последва стадий на наслояване до получаване на сравнително хомогенен и симетричен около центъра на пластината слой. Въпреки многократните опити за оптимално нанасяне на частиците по този начин, винаги бе наблюдаван срив в работната честота на осцилатора и невъзможност за възвръщането и в работен режим. Тъй като Δf при тези експерименти е от порядъка на 30 kHz (Табл. 9), а $\Delta f/f \ll 0.05$, то потенциално претоварване на пластината не бе разгледано като възможна причина за наблюдавания ефект. Сред възможните причини са **неравномерност** на плътността и дебелината на нанесения слой, **неподходящи виско-еластични свойства** на слоя или **недостатъчна адхезия** на слоя върху QCM пластината.
2. **Вариант 2:** За да тестваме валидността на горепосочената хипотеза (относно неравномерността на слоя), суспензията от частици бе подложена на предварително филтруване през филтър от неръждаема стомана с размер на светлия отвор $75\ \mu\text{m}$. Средният размер на тестваните от нас полимерни частици (състав F13) е установен да бъде $59.1\ \mu\text{m}$ (Табл. 5); следователно тази подготвителна класификация на частиците позволи отстраняване на по-големи агрегати, които нарушават равномерността на депозирания слой. Така приложеният подход доведе до положителен резултат, тъй като успешно бе нанесена проба върху резонаторната пластина без да я извежда извън работната ѝ честота на трептене (10 mHz). Въпреки това, при серия от повторения на така предложената процедура, не са отчетени статистически значими резултати. Това наложи да се предприемат допълнителни експериментални мерки, с цел оптимизиране на пробоподготовката в анализа.

3. **Вариант 3:** С цел да се подобри еднородността на слоя от полимерни частици върху резонаторната пластина, както и да се повлияят неговите виско-еластични свойства и адхезия към резонатора, в проточната камера на сорбционния QCM анализатор са въведени ацетонови пари. При това се наблюдава мигновен ефект на възвръщане към операционната честота на трептене на пластината. Обяснение за получените резултати дават електронно-микроскопските снимки (Фиг. 27), както и измерването на динамичното съпротивление на пластината с нанесените полимерни слоеве (посредством 250C Roditi Inc. Co Ltd. Network analyzer) – Табл. 9.



Фигура 27: SEM микрографии на А) полимерен слой, нанесен върху пластината по *Вариант 2* и Б) полимерен слой след въвеждане на ацетонови пари (*Вариант 3*)

Микрографиите разкриват ясно разликата в морфологията на полимерния слой преди и след внасянето на ацетонови пари. При **вариант 1** на нанасяне на полимерните частици те изцяло запазват своята структурна цялост, поради това, че използваният полимер, *Eudragit RS*, е водонеразтворим. Вследствие от това е отчетена висока степен на разнородност и значими различия в плътността на слоя в различните му точки. Дори и след филтруване на частиците (**вариант 2**), установяването на стабилна работна честота на пластината е непостоянно и случайно явление. По-детайлно разяснение за причините за неуспеха е открито в необичайно високата стойност на динамичното съпротивление на пластината, която се наблюдава при нанасянето на интактни частици (Табл. 9). Въвеждането на ацетонови пари в проточната камера на QCM анализатора (**вариант 3**) частично разтваря полимерните частици и ги „разстила“ по повърхността на пластината (Фиг. 27-Б), възвръщайки плътността и виско-еластичните свойства на слоя към собствените такива за полимера. В допълнение, стойността на

динамичното съпротивление също се възвръща в порядъка, характерен за пластината без нанесен аналит (Табл. 9). Тази намеса върху частиците е деструктивна, поради което стремежът за недеструктивно установяване на лекарственото съдържание на *Diltiazem*-натоварени *microsponge* частици чрез QCM анализ на този етап бе отхвърлен. Вместо това, предвид неизбежното разрушаване на частиците в етапа на пробоподготовка за анализа, предприехме изпълнението на **вариант 4**.

4. **Вариант 4:** Нанасяне на проби от частиците върху пластината под формата на ацетонови разтвори. **Оптимален вискозитет на ацетоновите разтвори за лесно нанасяне чрез накапване върху пластината и същевременно бързо изпаряване на ацетона и имобилизиране на слоя е установен при концентрация на полимера от 4 mg/mL.**

Таблица 9: Динамично съпротивление на резонаторната пластина след нанасяне на тест образец от лекарство-натоварени полимерни частици по различни методи

Начин на нанасяне на полимерния слой от частици	Исходна честота на трептене (kHz)	Честота на трептене след нанасяне на проба (kHz)	Динамично съпротивление, Ω^a
Водна суспензия (Вариант 2)	10 020	10 050	333
Водна суспензия, ацетонови пари (Вариант 3)	10 077	10 060	14
Ацетонов разтвор (Вариант 4)	10 026	10 017	23

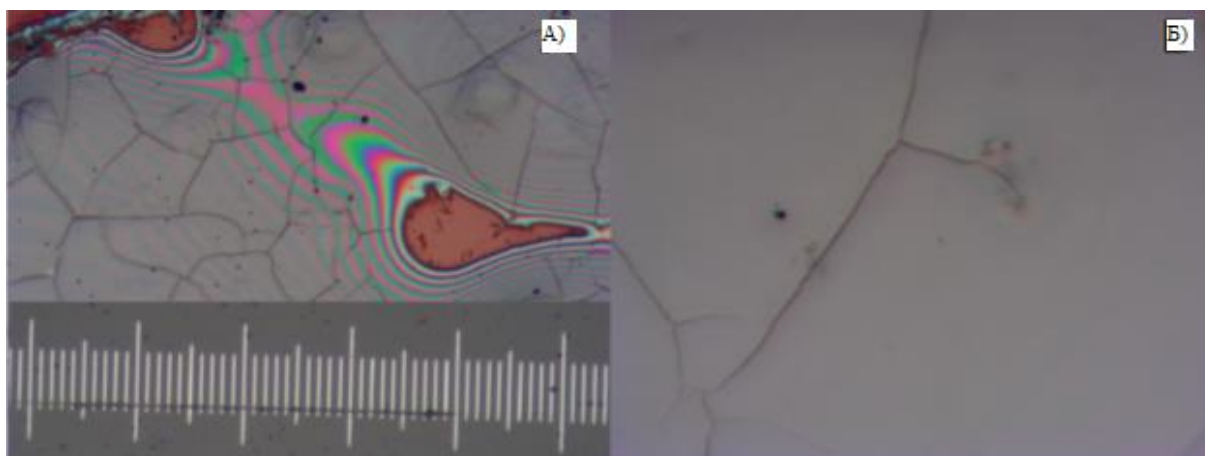
^a Динамичното съпротивление на резонаторната пластина без нанесен образец е от порядъка на 10 Ω

При подхода, предложен във **вариант 4**, са наблюдавани най-добри условия за провеждане на експеримента, както и най-добра повторемост на резултатите. При този начин на нанасяне на пробите от лекарство-натоварени частици са спазени всички необходими условия за прилагане на уравнението на *Sauerbrey*, с цел преизчисляване на честотните промени в трептенето на QCM резонатора като промяна в масата на аналита:

- Фиксирането на пробата е осигурено чрез изпаряване на ацетона след нанасяне на лекарство-полимерния разтвор върху резонатора;
- Хомогенността на формирания слой е осигурена посредством нанасяне на пробите (лекарство-полимерни смеси или разтвори на

лекарство-натоварени полимерни частици) под формата на капки с минимален обем (10 μL). Резултатния полимерен слой е заснет с оптичен микроскоп и демонстрира отлична еднородност (Фиг. 28);

- Средната дебелина на слоя е измерена да бъде в интервала 1.0-2.5 μm , а честотно изменение в трептенето на резонатора след нанасяне на пробите - в допустимите граници ($\frac{\Delta f}{f} < 0.05$).

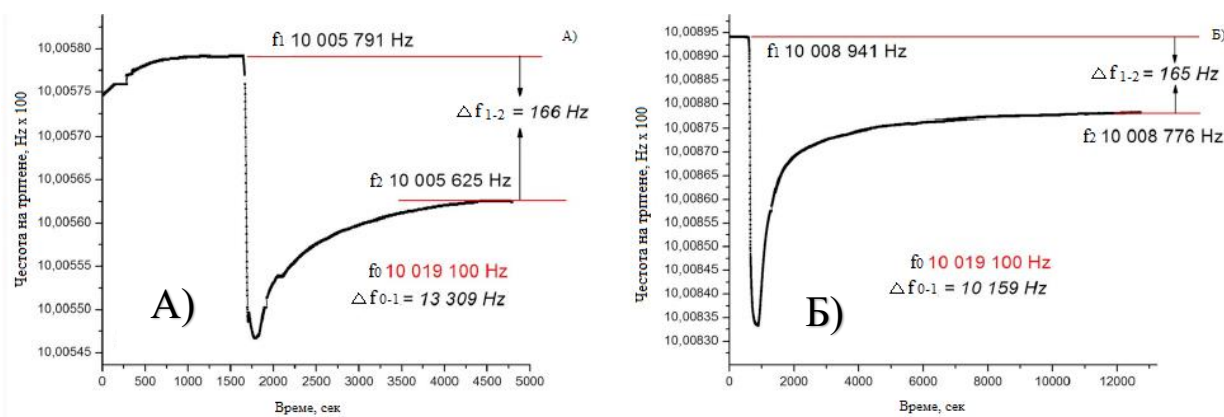


Фигура 28: Оптична микрография на част от нанесения лекарство-полимерен слой върху резонаторната пластина **А)** увеличение 10x; подлежащия златен електрод прозира под лек дефект на изтъняване в слоя; наличието на „пукнатини“ в слоя е резултат от нанасянето на слоя под формата на множество малки капки и демонстрира добрата омокряемост на повърхността; **Б)** увеличение 50x

Вариант 4 бе възприет като оптимален метод за пробоподготовка и нанасяне на образци от *Diltiazem*-натоварени *microsponge* частици върху резонаторната пластина за QCM анализ на лекарствено съдържание.

3.2.2 Резултати от QCM анализа на лекарство-натоварени *microsponge* частици

Резултатите от QCM анализа, представящи сорбционното поведение на тестовите аналити – състави F13 и F14 - спрямо *HCl*, са представени на Фиг. 29. Съдържанието на *Diltiazem* (DC%) е изчислено по *уравнение 14*. С помощта на получените от QCM анализа данни е изчислена и ефикасността на лекарствено натоварване на полимерните частици (Е.Е.%) (*уравнение 3*) и сравнена със стойността за същия показател, получена от данните от UV-Vis анализ (Табл. 10).



Фигура 29: QCM измерване на сорбционното поведение на тест проби спрямо HCl газ – А) състав F14; Б) състав F13

Таблица 10: Концентрация на *Diltiazem* (DC%) и ефикасност на лекарствено натоварване (Е.Е.%) на *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsponge* частици, установени с UV-Vis спектрален метод и QCM метод

Код на тест формулация от <i>Diltiazem</i> -натоварени <i>Eudragit RS microsponge</i> частици	Теоретично съдържание на <i>Diltiazem</i> в състава, %	Реално съдържание на <i>Diltiazem</i> (DC%), установено с UV-Vis спектрален метод (т. 2.1.3) ^a	Е.Е.% (установена с UV-Vis спектрален метод - т. 2.1.3) ^a	Реално съдържание на <i>Diltiazem</i> (DC%), установено с QCM метод	Е.Е.% (установена с QCM метод)
F13	25	22.87	91.46	17.98	71.92
F14	15	14.56	97.07	13.98	93.2

^a приложена е средна стойност от получените резултати (справка с Табл. 5)

4. *In vitro* и *ex vivo* изследвания за прогнозиране на терапевтичния потенциал на *Diltiazem*-натоварени *Eudragit RS microsponge*-тип частици

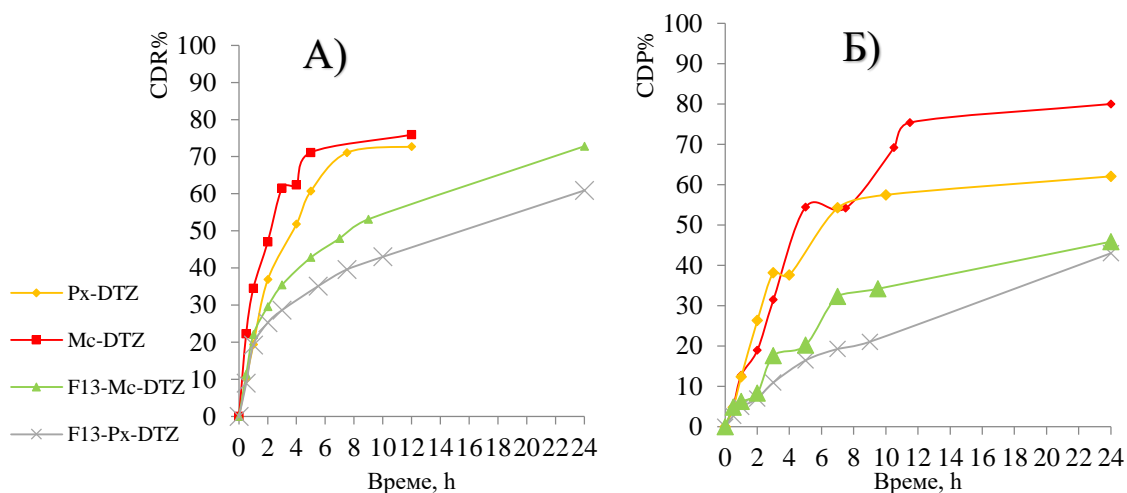
На *in vitro* и *ex vivo* изследвания са подложени конвенционални *Diltiazem hydrochloride* 2% хидрогели и модифицирани посредством *Diltiazem hydrochloride*-заредени *microsponge* частици хидрогели. Ще припомним, че предварителното превръщане на *Diltiazem* от хидрохлоридна сол към база е проведено с цел да се осигури висока степен на „захващане“ на лекарственото вещество в структурата на полимерните частици по описаната в т. 2.1 (раздел „Материали и методи“) технология. Както бе отбелязано, основно изискване към активните вещества, използвани за синтез на лекарстводоставящи частици по тази технология, е те да притежават ниска или отсъстваща разтворимост във вода. Веднъж преодолян този проблем чрез използването на *Diltiazem* база, следва да се

потърси подход за обратното превръщане на лекарството в биологично активната му хидрохлоридна сол. Такава стъпка е предприета за всички партии от частици, включени и използвани в *in vitro* и *ex vivo* изследвания, по описаната в т. 4.1 раздел „*Материали и методи*“ методика.

На Фиг. 30-А са представени резултатите от проведения *in vitro* тест за лекарствено освобождаване от конвенционалните и *microspunge*-потенцирани хидрогели (*c*-DTZ 2% и *micro-l* DTZ 2%). Наблюденията показват значително удължаване на времето за освобождаване на *Diltiazem* от *microspunge*-модифицираните гели (*micro-l*-DTZ 2% - 24 h) в сравнение с конвенционалните такива (*c*-DTZ 2% - 6÷-12 h). Използването на *microspunge* лекарстводоставящи частици в хидрогелите видно редуцира и началния „*burst*“ ефект в освобождаването на лекарството. Сравнение между двата типа гелни бази, използвани за получаването на хидрогелите (*Px* 20% и *Mc* 2%), показва по-бързо и пълно лекарствено освобождаване от метилцелулозните гели, както при конвенционалните, така и при модифицираните гели. Този ефект вероятно е резултат от различията във виско-еластичните профили на двата типа гелни бази. Метилцелулозата е добре известна със своите отлични адхезивни свойства [163-165], а *Poloxamer 407* - със своята термочувствителност [166-168]. При поставяне на полксамерните гели в условия, имитиращи физиологичната температура на тялото – 37°C, тяхната степен на желиране и вискозитет нарастват [166-168]. При това лекарственото освобождаване (дифузират) следва да бъде забавено [168]. Подобен ефект не е характерен за метилцелулозните системи. Тъкмо обратно, с увеличаване на температурата, вискозитета на метилцелулозните гели намалява [169]. В допълнение, добрите адхезивни свойства на този полимер способстват за миграцията на лекарственото вещество в рецепторната среда, с което потенцират освобождаването [164,169].

Резултатите от *ex vivo* изследването през ректална мукоза са показани графично на Фиг. 30-Б. Най-висока степен на проникване и преминаване на *Diltiazem* през мукозната мембрана демонстрира конвенционалният метилцелулозен гел (*Mc*-DTZ), а най-ниска такава – *microspunge*-потенцираният *Poloxamer 407* гел (*F13-Px*-DTZ). Получените резултати отлично корелират с данните от осъщественото *in vitro* изследване. Характерна за всички абсорбционни профили е появата на бимодалност. Тенденцията е валидна само и единствено при използването на мембрана от

свинска ректална мукоза и не се наблюдава при използването на синтетична мембрана от целулозен ацетат.



Фигура 30: А) *In vitro* освобождаване на *Diltiazem* от *c*-DTZ 2% и *micro-l*-DTZ 2%; Б) *Ex vivo* профил на абсорбция на *Diltiazem* през свинска ректална мукоза от *c*-DTZ 2% и *micro-l*-DTZ 2%

За да обясним този феномен, следва да разгледаме ректалната мукоза като не-инертен участник в експерименталната постановка, характеризиращ се със собствен афинитет и коефициент на разпределение за *Diltiazem*. Времето, необходимо за насищане на мукозната тъкан и установяване на равновесие в концентрацията на лекарственото вещество между лекарствената форма и мукозата, е вероятна причина за появата на бимодалност в кривите [170]. Инфлексията настъпва значително по-рано за конвенционалните гели, при използването на които насищането на мукозата с лекарство настъпва значително по-бързо (1-2 h след началото на експеримента), в сравнение с *microsponge*-потенцираните гели (3-6 h след началото на експеримента) – Фиг. 30-Б.

Фармакокинетичните параметри - дифузионен поток (J_{ss}), коефициент на проникване (K_p), коефициент на разпределение (P) и време на задържане (T_L) - са изчислени въз основа на установения след насищане на мукозата с лекарство дифузионен поток (Табл. 11).

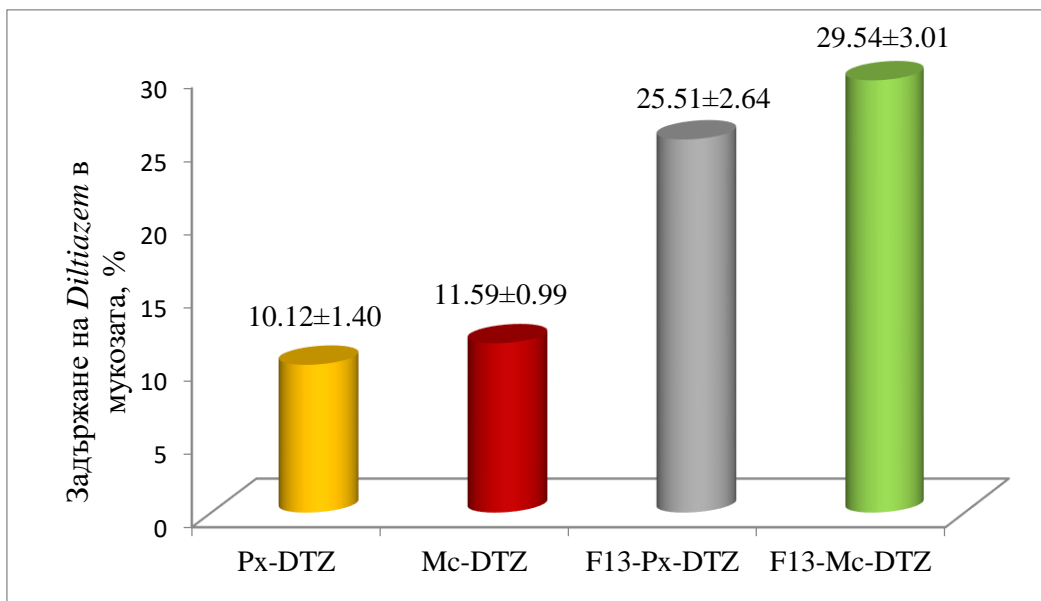
Таблица 11: Фармакокинетични параметри, характеризиращи абсорбцията на *Diltiazem* през свинска ректална мукоза и лекарствено задържане в мукозата

Състав	Дифузионен флукс		Kp 10 ² (cm·h ⁻¹) ±SD	P·D ^b ·10 ² (cm ² ·h ⁻¹) ±SD	T _L (h)±SD	Лекарствено задържане в мукозата, mg·cm ⁻³ ±SD	
	Jss ^a (mg·cm ⁻² ·h ⁻¹) ±SD	R ²				Метод I	Метод II
	<i>Px</i> -DTZ	0.59±0.02	0.937	2.94±0.10	0.24±0.008	-1.01±0.14	12.33±1.70
<i>Mc</i> -DTZ	0.66±0.03	0.914	3.30±0.14	0.26±0.01	-0.66±0.10	12.78±1.09	14.49±4.00
F9- <i>Px</i> -DTZ	0.22±0.02	0.969	1.08±0.12	0.09±0.009	-0.56±0.43	26.16±2.71	23.19±5.47
F9- <i>Mc</i> -DTZ	0.36±0.03	0.963	1.81±0.16	0.14±0.01	-0.35±0.25	32.57±3.32	35.27±8.71

Дифузионният поток на *Diltiazem* от конвенционалните гели (*c*-DTZ 2%) е установено да бъде от 2 до 3 пъти по-висок в сравнение с този от модифицираните гели - *micro-l*-DTZ 2%. Подобен резултат е в корелация с постигнатото удължено лекарствено освобождаване от *micro-l*-DTZ 2% гелите.

На следващо място, вниманието ни бе насочено към отрицателните стойности, получени за време на задържане (T_L). Както е видно и от графиките на Фиг. 30, може да се твърди, че такова време на практика не съществува, тъй като *Diltiazem* започва да преминава в рецепторната среда веднага след прилагането на формите върху ректалната мукоза.

Важен експериментален показател за оценка на ефикасността на локалното действие на ректалните гели е мукозното задържане на *Diltiazem* след приключване на пермеационния тест. Резултатите, получени по двата метода (Метод I и II), еднозначно показахакратно по-висока степен на задържане на лекарството в мукозата при използването на *micro*sponge-потенцираните гели (*micro-l*-DTZ 2%) (Табл. 11, Фиг. 31).

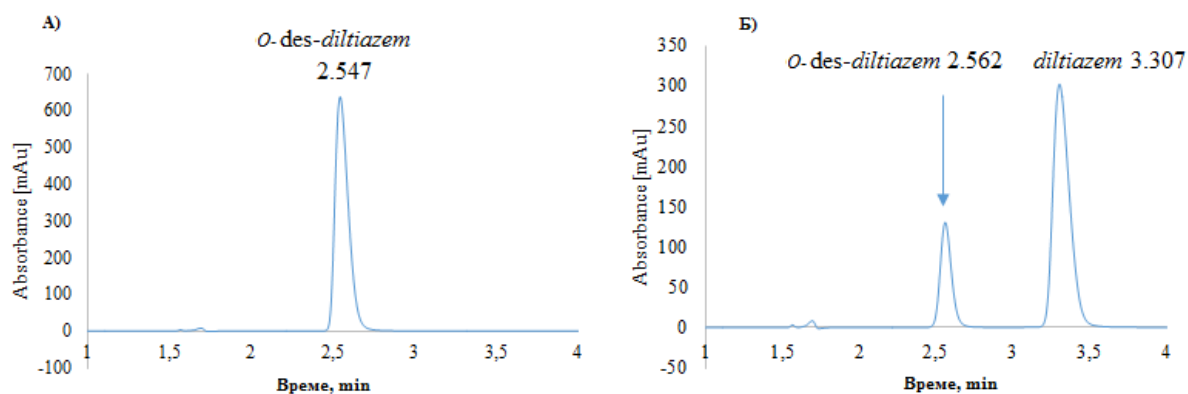


Фигура 31: Лекарствено задържане в мукозната мембрана след приложение на конвенционални гели (*c*-DTZ 2%) - **Px-DTZ** и **Mc-DTZ** и *microsponge*-потенцирани гели (*micro-l*-DTZ 2%) - **F13-Px-DTZ** и **F13-Mc-DTZ**

От получените резултати може да се заключи, че използването на *Diltiazem*-натоварени *microsponge* частици като лекарстводоставящи единици в ректалните хидрогели води до: 1. удължаване на лекарственото освобождаване; 2. забавяне на мукозната пермеация и респективно потенциалната системна абсорбция на *Diltiazem* и 3. потенциране на лекарственото задържане в прицелната тъкан – ректалната мукоза. Формулация F13-Px-DTZ е открояна като най-обещаваща за постигане на максимален локален ефект (25.5% задържане на лекарство в мукозата) с минимална тенденция за системна абсорбция на *Diltiazem* ($J_{ss}=0.22 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) и свързаните с нея системни странични ефекти на лекарството.

5. Хидролитична стабилност на *Diltiazem* в конвенционални и *microsponge*-потенцирани хидрогели

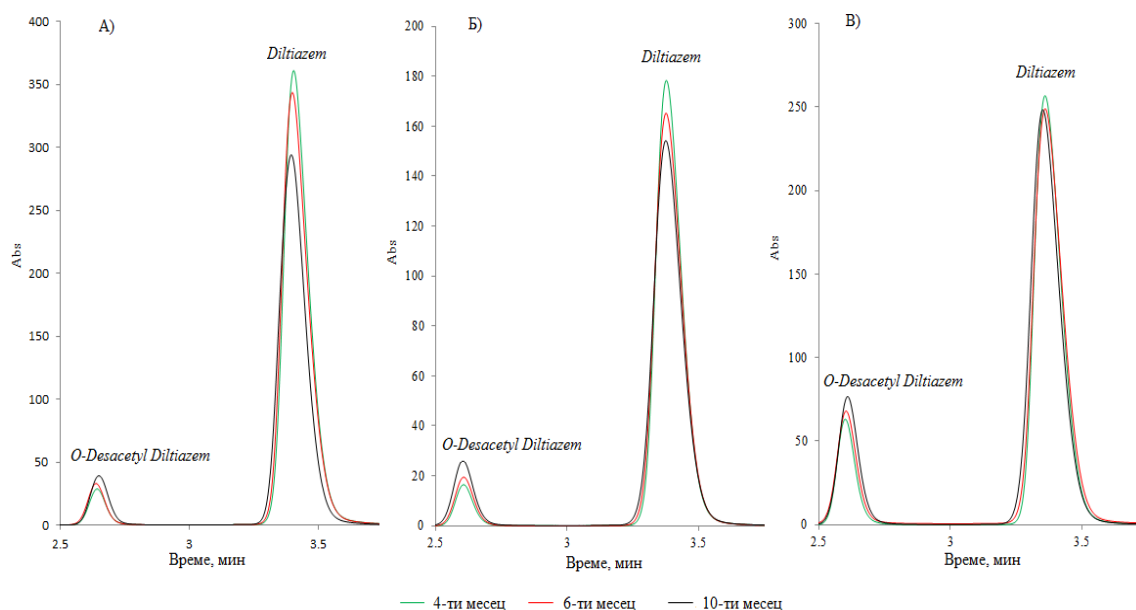
Хроматограмите, получени със стандартен разтвор на *O-desacetyl Diltiazem* (100 mg/L) и стандартен разтвор, съдържащ смес от *Diltiazem* и *O-desacetyl Diltiazem* в съотношение 75:25 (100 mg/L), са показани на Фиг. 32.



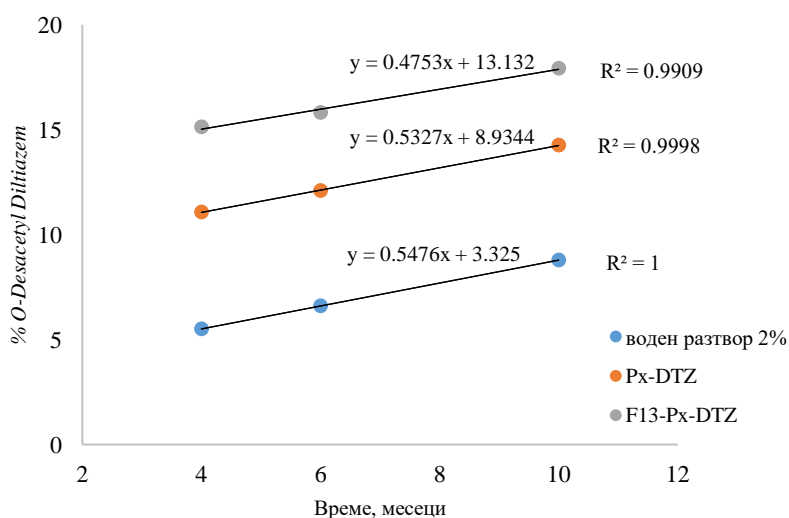
Фигура 32: Хроматограми, получени със **А)** стандартен разтвор на *O-desacetyl Diltiazem* (100 mg/L) и **Б)** стандартни разтвори на *Diltiazem* и *O-desacetyl Diltiazem* в съотношение 75:25 (100 mg/L)

Времената на задържане на *O-desacetyl Diltiazem* и *Diltiazem* са установени съответно на 2.6 и 3.3 min. Стандартните калибрационни прави за двете съединения са получени в концентрационен интервал $10 \div 100$ mg/L.

Наблюденията върху хидролитична стабилност на *Diltiazem* в трите типа изследвани системи - воден разтвор, *Poloxamer 407* хидрогел (Pх-DTZ) и *Poloxamer 407* хидрогел с *microspunge* частици (F13-Pх-DTZ) - показаха значителни различия. Хидролитичната стабилност на *Diltiazem* е установено да намалява в реда - воден разтвор > конвенционален хидрогел (Pх-DTZ) > *microspunge*-потенциран хидрогел (F13-Pх-DTZ). Фиг. 33 проследява спада в концентрацията на изходната молекула и нарастването в концентрацията на разпадния продукт с времето за всяка от системите чрез получените хроматограми на 4-ти, 6-ти и 10-ти месец от изследването. В допълнение, Фиг. 34 представя скоростта на нарастване в концентрацията на деградантния *O-desacetyl Diltiazem* за всяка от средите. При така проведените експериментални условия не се наблюдава формирането на друг разпаден продукт, освен *O-desacetyl Diltiazem*.



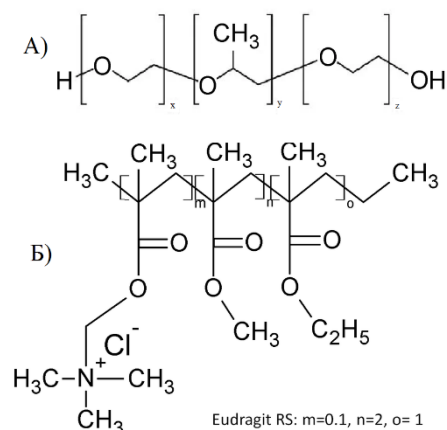
Фигура 33: Хроматограми, проследяващи спада в концентрация на на *Diltiazem* и нарастването в концентрацията на *O-desacetyl Diltiazem* в периода между 4-ти и 10-ти месец от изследването на **А)** воден разтвор на *Diltiazem* 2%; **Б)** конвенционален гел P_x-DTZ и **В)** *microsponge*-потенциран гел F13-P_x-DTZ



Фигура 34: Скорост на нарастване на процентното съдържание на *O-Desacetyl Diltiazem* в средите за периода между 4-ти и 10-ти месец на изследването

Първоначалното нарастване в концентрацията на деградантния продукт *O-Desacetyl Diltiazem* (до 4-тия месец на съхранение) е най-голямо в присъствието на двата полимера - *Poloxamer 407 20%* и *Eudragit RS* - в средата (състав F13-P_x-DTZ), следвано от това във водна среда, съдържаща единствено *Poloxamer 407 20%* (състав P_x-DTZ) и достигащо най-ниски стойности в чистия воден разтвор. Дестабилизиращият ефект на

полиоксиетилен-полиоксипропиленовия съполимер (Фиг. 35-А) върху *Diltiazem* е възможно да настъпва в резултат на внесената с него промяна в диелектричната константа на средата. В случая на *Ammonio Methacrylate Copolymer Type B (Eudragit RS – Фиг. 35-Б)*, е възможно негативно влияние да е свързано и с катионната компонента в структурата му.



Фигура 35: Химична структура на **А) Poloxamer 407** **Б) Eudragit RS**

Впоследствие наблюдаваната скорост на хидролизен разпад (след 4-тия месец на съхранение – Фиг. 34) придобива най-ниска стойност, когато лекарството се намира в хидрогелна среда в полимерното обкръжение на *Eudragit RS* и *Poloxamer 407*. Този феномен потвърждава първоначалното очакване за повишаване на хидролитичната стабилност *Diltiazem* в хидратно обкръжение с увеличаване на вискозитета на средата (P_x-DTZ) и допълнително чрез използване на лекарстводоставящи структури, които да ограничат контакта на лекарственото вещество с хидратните йони (F13-P_x-DTZ) [38].

Сложният кинетичен ход на хидролиза на *Diltiazem* в среда от *Poloxamer 407* и *Eudragit RS* предполага наличието на повече от един фактор, повлияващ процеса. В тези случаи хода на нарастване в концентрацията на разпадния/те продукт/и е по-вероятно да следва полимодална, а не мономодална зависимост [38]. Подобно явление прави математическата екстраполация на данните усложнена и прогнозирането трудно постижимо. Такъв е случаят с наблюденията от нас процес на хидролизен разпад на *Diltiazem* в двата типа гели - P_x-DTZ и F13-P_x-DTZ. По тази причина не е направено категорично заключение за порядъка на хидролизния процес и за стойността на реално наблюдавана скоростна константа на хидролиза (k_{obs}) в тези среди за целия период на изследването. За целите на сравнителния анализ, k_{obs} е

демонстрирана (чрез регресионния анализ, показан на Фиг. 34) само в интервала, където е наблюдавана линейност в покачването на концентрацията на деградантния продукт. Един от най-вероятните фактори, повишаващи порядъка на цялостно наблюдавания хидролизен процес, е концентрацията на активното вещество в гела. Логично е да се потърси обяснение и в ролята на двата полимера в гелните системи. Освен като лекарствени носители, те могат да бъдат разгледани и като участници във фазовото разпределение на активното вещество. Следователно техни физикохимични свойства, като степен на кристалност, химична стабилност, степен на желиране (коацервация) и омрежване, както и изменението на същите в хода на съхранение на гелните форми, ще са сред факторите, детерминиращи хода и повишаването в порядъка на хидролизния процес на *Diltiazem* [38]. От друга страна, предвид трябва да се вземе и вероятността за междумолекулно взаимодействие, свързана с наличието на натоварени кватернерни амониумни групи в структурата на *Eudragit RS*.

V. ИЗВОДИ

На база представените резултати могат да бъдат изведени следните основни заключения:

1. Успешно е реализирано въвеждане на *Diltiazem hydrochloride* в структурата на полимерни *microsponge* лекарстводоставящи системи под формата на база, която, *post factum*, е превърната отново в хидрохлоридна сол;
2. Посредством факториален дизайн е установена връзката между основните променливи в предложения метод за синтез (съотношение лекарство към полимер, обем на органичната фаза и концентрация на сърфактант във водната среда) и интересуващите ни морфологични и функционални характеристики на резултатните частици (добив, лекарствено натоварване и големина);
3. Успешно е осъществен синтезът на статистически и емпирично оптимизирани състави от *Diltiazem*-натоварени *microsponge* лекарстводоставящи системи с желаната морфология и функционалност;
4. Наличието на молекулно диспергиране на активното вещество в обема на синтезираните частици е еднозначно демонстрирано посредством ATR-FTIR, SEM-EDX и DSC анализ;
5. Оптимизирани състави от лекарство-натоварените *microsponge* частици демонстрират висок сорбционен капацитет и адекватно десорбционно поведение спрямо изпитваното лекарствено вещество за постигане на удължено лекарствено освобождаване;
6. Предложеният QCM метод за количествен анализ на *Diltiazem* в състава на така формираните полимерни системи показва много по-високи нива на точност и прецизност от тези на UV-Vis спектрален метод;
7. Проведените *in vitro* и *ex vivo* изследвания върху *microsponge*-потенцирани хидрогели разкриват потенциала на този тип лекарстводоставящи системи в хидрогелни лекарствени форми за локално лечение на *fissura ani*;
8. Въвеждането на *Diltiazem* в състава на полимерните носители не демонстрира очаквания структурно-стабилизиращ ефект.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящия дисертационен труд е осъществено детайлно изследване, включващо методите за синтез и анализ на нови *Diltiazem*-базирани полимерни лекарстводоставящи системи. Оптималните състави за получаване на желаната *Diltiazem*-натоварена, сферична, високо-порьозна и микроразмерна полимерна матрична структура са реализирани след серия от синтези, в които са наложени статистически прогнозираните методологични промени. Анализът на така формираните лекарстводоставящи системи включва ползването на методите: ATR-FTIR спектроскопия, DSC термичен анализ, морфологичен SEM анализ, елементен SEM-EDX анализ, количествен анализ на *Diltiazem*, базиран на метода на QCM, както и *in vitro* и *ex vivo* методи за прогнозиране на терапевтичния им потенциал.

Разработеният от нас QCM метод показва високи нива на точност, прецизност и селективност в количествения анализ на *Diltiazem* в състава на разработените полимерни матрици. От особен интерес за нас представляваше и изследването на депозицията и дисперсността на *Diltiazem* в *microsponge* носителите, поради липсата на такива данни от сходни синтези с други лекарствени вещества. Получените резултати от FT-IR, SEM-EDX и DSC анализите на натоварените с *Diltiazem microsponge* структури доказаха еднозначно хомогенното (молекулно) диспергиране на лекарственото вещество в полимерната матрица. Десорбционно поведение на полимерната матрица спрямо *Diltiazem* показва добра корелация с това и потвърди установената висока степен на дисперсност.

Въвеждането на *Diltiazem hydrochloride* в ректални хидрогели, посредством получените *microsponge* носители, показва потенциал за значителни терапевтични ползи при лечение на *fissure ani*. За това свидетелстват установеното удължено лекарствено освобождаване и двукратно по-висока степен на лекарствено задържане в таргетната ректална мукоза от така модифицираните полутвърди форми в сравнение с конвенционално формулираните гели. Кинетиката на хидролизен разпад на *Diltiazem* в полимерното обкръжение на *Eudragit RS* и *Poloxamer 407* (помощни вещества, използвани за формулирането на *microsponge* модифицираните гели), от друга страна, е доказано да следва комплексен и сложен за интерпретация ход. Подобно поведение не е необичайно, тъй като в този тип сложни системи скоростта и хода на разпадните процеси се явява функция

от много фактори – както от страна на средата, така и от страна на
взаимодействащите в нея структури.

VII. ПРИНОСИ

1. Фундаментални приноси

- 1.1. Успешно е въведен нов инструментален метод за анализ на ефективността на лекарственото натоварване в полимерни носители с *microsponge* морфология;
- 1.2. Представена е нова експериментална техника, позволяваща въвеждането на хидрофилни лекарствени вещества в обема на хидрофобни полимерни матрици;
- 1.3. Представен е методологичен алгоритъм за анализ на дисперсността на лекарственото вещество *Diltiazem* в обема на *Eudragit RS 100*- базирани лекарстводоставящи системи от *microsponge*-тип;
- 1.4. Създаден е нов рационален подход за сравнителен анализ на основните „структурни“ характеристики на лекарстводоставящи частици чрез използването на гранични модели със същия състав.

2. Практически приноси

- 2.1. Успешно е валидиран метода на QCM в количествения анализ на *Diltiazem* в полимерни матрични системи от *Ammonio Metacrylate Copolymer Type B (Eudragit RS)*. Това постижение е един от първите докладвани успехи за въвеждане на метода на QCM във фармацевтичния анализ;
- 2.2. Формулирани са *Diltiazem hydrochloride 2%* хидрогели с изменено освобождаване (посредством *microsponge* лекарстводоставящи системи) със значителни преимущества пред конвенционално използвани полутвърди форми в терапията на *fissure ani*.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

C Impact Factor:

1. Kolev IN, Ivanova NA, Marinov MK, Alexieva GE, Strashilov VL. A QCM-based assay of drug content in Eudragit RS 100-based delivery systems. *Talanta*. Elsevier BV; 2019 Sep;202:531–9 **IF 4.916**

В реферирани издания:

2. Ivanova NA, Franco CD, Trapani A, Petkova V, Dimitrov M. Synthesis and characterization of diltiazem loaded Eudragit RS 100 “microsponges”. *World J Pharm Pharm Sci*. 2017;6(6):32–42.
3. Ivanova NA, Stoeva S, Kolev IN. Hydrolytic stability of diltiazem in the presence of chosen polymers-Poloxamer 407 and Ammonio Metacrylate Copolymer Type B (Eudragit RS): a preliminary study. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*; 2019 Dec;6(1):22-27