

*Piotr Kulinowski, Przemysław Doróżyński*

## **Rentgenowska mikrotomografia komputerowa w badaniu matrycowych postaci leku o kontrolowanym lub przedłużonym uwalnianiu**

### **Wstęp**

Obrazowanie matryc polimerowych *in vitro* w trakcie uwadniania pozwala na ocenę, a w konsekwencji także na próby modelowania zjawisk w nich zachodzących. Jednak obrazowanie, a następnie jakościowa i ilościowa analiza są tylko środkiem do celu, którym jest projektowanie matryc zachowujących się w sposób oczekiwany przez projektanta/technologa w warunkach *in vivo*.

Artykuł jest trzecim z kolei artykułem zamieszczonym w „Studia Technica” dotyczącym badania uwadnianych matryc polimerowych przeznaczonych do zastosowania jako doustne postaci leku o modyfikowanym uwalnianiu. Pierwszy dotyczył głównie zastosowania tomografii magnetyczno-rezonansowej jako narzędzia do charakteryzacji i porównywania matryc [1]. Drugi koncentrował się na przeglądzie różnych metod służących do ich charakteryzacji w trakcie uwadniania na przykładzie matryc opartych na hydroxypropylometylocelulozie (HPMC) [2]. Niniejszy artykuł prezentuje przegląd możliwości zastosowania rentgenowskiej mikrotomografii komputerowej ( $\mu$ CT) do oceny zmian przestrzennych zachodzących w matrycowych postaciach leku podczas hydratacji. Mikrotomografia rentgenowska jest szeroko stosowana w badaniach materiałowych m.in. do badania właściwości materiałów używanych do wytwarzania doustnych postaci leku, ale także do badania gotowych postaci leku. Szczegóły można znaleźć w bardzo dobrej, przeglądowej pracy Zeitler i Gladden [3]. Jednak artykuł ten nie uwzględnia zastosowań mikrotomografii rentgenowskiej, które pojawiły się w ciągu ostatnich trzech lat, a których celem były próby obrazowania matryc w trakcie uwadniania.

Główną zaletą metody jest duża rozdzielczość – w omawianych badaniach rzędu 4–30 mikronów. Kontrast bazuje na różnicach w absorbancji (współczynnik pochłaniania) promieni X w badanym obiekcie. Daje to między innymi możliwość obrazowania mikro- i mezoporów w matrycy.

## Przegląd zastosowań $\mu$ CT do badania matryc polimerowych

Jak już wspomniano, najczęściej  $\mu$ CT używane jest do badań matryc suchych [3]. Głównym zastosowaniem takich badań jest detekcja defektów powstających w trakcie procesu technologicznego. Typowy przykład tego typu zastosowań przedstawiono w artykule Akseli i wsp. [4] gdzie badano dwuwarstwowe kompresowane matryce (tabletki). Pierwsza warstwa była wykonana z celulozy mikrokrystalicznej (MCC), druga ze skrobi lub z MCC. Określano wpływ siły kompresji na właściwości matrycy. Obserwowano występowanie defektów, którymi były pęknięcia na granicy warstw.

Dopiero w ostatnich 3–4 latach pojawiło się kilka prac dotyczących charakteryzacji matryc w trakcie uwadniania. Artykuł Laity i wsp. [5] jest pierwszą tego typu pracą. Dotyczyła ona matrycowych postaci leku – tabletki opartej na HPMC z dodatkiem celulozy mikrokrystalicznej i laktozy bez dodatku substancji czynnej (lecniczej). Tabletki były uwadniane w buforze fosforanowym użytych jako roztwór symulujący środowisko jelita cienkiego. Głównym celem badania była analiza zmian geometrii układu oraz translokacji pęczniejących obszarów matryc polimerowych. Badania polegały na obserwacji i pomiarze przemieszczania się mikrosfer szklanych o średnicy 106–180  $\mu\text{m}$  inkorporowanych w matrycy, które służyły jako marker transportu masy.

Użyto tomografu Sky-Scan 1072 ze źródłem promieniowania pracującym przy 100 kV i 98  $\mu\text{A}$ . W przypadku suchych matryc akwizycja danych trwała godzinę, a w trakcie uwadniania (zwłaszcza na początku) 10 minut, podczas gdy rozdzielczość przestrzenna wynosiła 18,8 x 18,8 x 18,8  $\mu\text{m}^3$ .

Rezultatem przeprowadzonych badań było stwierdzenie, że w rejonie matrycy, który według badania inną metodą (obrazowanie magnetyczno-rezonansowe) jest nieuwodniony, występuje ruch markerów, co oznacza, że matryca w tym rejonie się uplastycznia i pęcznieje.

Na pionowych przekrojach przez matryce zaobserwowano obszar o niższej absorpcji promieni X. Obszar ten początkowo obramowywał profil matrycy, a następnie zwiększał swoją grubość, przemieszczając się do wewnątrz matrycy. Ponieważ tylko dwie przyczyny istnienia takiego obszaru są możliwe, tj. lżejsze cząstki lub mniejsza gęstość, a tylko ta druga wchodzi w rachubę, autorzy postulują obecność pęcherzyków powietrza w pęczniejącym żelu (dosłownie *bubbles in the swollen gel*) o rozmiarze poniżej rozmiaru piksela (w tym przypadku poniżej 18,3  $\mu\text{m}$ ). Ze względu na ekspansję tego, co autorzy nazywają rdzeniem, stawiają oni hipotezę, że śladowe ilości wody pojawiają się wewnątrz matrycy. Jednak nie potrafili tego wykazać użytymi do tego celu metodami obrazowania magnetyczno-rezonansowego, ze względu na użycie sekwencji pomiarowych z długim czasem echa. Warto w tym momencie zaznaczyć, że w naszym artykule Kulinowski i wsp. [6] metodą przestrzennie zlokalizowanej relaksometrii magnetyczno-rezonansowej pokazaliśmy, że niewielkie ilości wody o małej mobilności molekularnej (bardzo krótkie czasy relaksacji  $T_2$ ) rzeczywiście pojawiają się wewnątrz matrycy. To minimalne uwodnienie wyprzedza front pełnej hydratacji matrycy.

Z kolei artykuł Klaja i wsp. [7] prezentuje wstępne wyniki obrazowania  $\mu$ CT na skompresowanych matrycach (tabletkach) HPMC oraz HPMC z dodatkiem substancji czynnej (leczniczej) rozpuszczalnej (L-Dopa) oraz bardzo słabo rozpuszczalnej (Ketoprofen) w 0,1 M roztworze HCl. Do badań użyto mikrotomografu typu „bench-top” X-Tek CT 160 Xi, uzyskując rozdzielczość przestrzenną 4,5  $\mu$ m. Czas trwania pomiaru wynosił 12 min. Obrazowano małe matryce o średnicy 4 mm po 0,5, 1,2 i 3 godzinach hydratacji w roztworze. Obserwowano obszar o mniejszej gęstości między „rdzeniem” a zewnętrzną uwodnioną warstwą, podobnie jak w pracy Laity i wsp. [5], ale z większą rozdzielczością przestrzenną. Wykazano, że mniejsza gęstość jest rezultatem powstawania mikroporów wypełnionych powietrzem, a nie „pęcherzyków powietrza” w hydrożelu. Jednocześnie wykazano różnice jakościowe między matrycami. Strefa o mniejszej gęstości jest widoczna we wszystkich trzech układach, jakkolwiek w każdym z nich jest ona w inny sposób uformowana. W przypadku matrycy HPMC bez dodatku substancji czynnej obszar porowaty jest wyraźny i zajmuje większość wnętrza matrycy z wyjątkiem niewielkiego obszaru w samym centrum już po 30 min. W układzie z rozpuszczalną substancją czynną po 30 min. uwadniania obszar o mniejszej gęstości jest wąski, regularny z dość wyraźnie zaznaczonymi granicami. W układzie z bardzo słabo rozpuszczalną substancją czynną obszar ten ma rozmyte granice. Po dwu godzinach uwadniania w matrycy HPMC oraz HPMC z dodatkiem L-Dopy obszar porowaty zajmuje całą przestrzeń wewnątrz całkowicie uwodnionej otoczki. Dla układu HPMC z ketoprofenem obszar mikroporowaty jest widoczny, jakkolwiek nie posiada wyraźnych granic. Autorzy pracy nie wyciągają daleko idących wniosków, traktując wyniki jako wstępne.

Jak zaznaczono, pojedynczy pomiar w pracy Laity i wsp. [5] trwał 10 min., zaś w pracy Klaja i wsp. [7] 12 min. W pomiarach tego typu istotne jest uzyskanie zarówno dużej rozdzielczości przestrzennej, jak i czasowej. Badania nastawione na relatywnie dużą rozdzielczość czasową pomiarów wiążą się z koniecznością skrócenia akwizycji sygnału. Mikrotomografy typu „bench-top” nie pozwalają na dalsze skrócenie pomiaru. Takie możliwości daje zastosowanie promieniowania synchrotronowego.

W przeciwieństwie do poprzednio omawianych doświadczeń, autorzy pracy Laity i wsp. [8] do obrazowania użyli promieniowania synchrotronowego, co pozwoliło na uzyskiwanie obrazów w relatywnie krótkim czasie, a autorzy skoncentrowali się na początkowym okresie uwadniania (pęcznienia) matrycy. Pomiaru wykonano na synchrotronie ESRF w Grenoble. Użyto wiązki ID19, która jest monochromatyczną wiązką promieni X o energii 30 KeV. Pojedyncza akwizycja trwała 2,36 min. Uzyskano rozdzielczość przestrzenną 30,6  $\mu$ m przy polu widzenia (FOV) 30 x 10,7 mm. Pomiaru prowadzono do 70 min. uwadniania próbki, a tylko niektóre wykonywano do 6 godzin uwadniania.

Celem pracy było obrazowanie pęcznienia formulacji tworzących warstwę żelową (pseudożelową), opartych na hydroksypropylometylocelulozie (HPMC) i jej mieszaninach z celulozą mikrokrystaliczną (MCC) lub skrobią przeżelowaną (PGS). Podobnie jak wcześniej, badano matryce polimerowe bez dodatku substancji czynnej.

Ekspansja (pęcznienie matrycy) w kierunku zgniotu matrycy zaczynała się począwszy od 14 minuty uwadniania, podczas gdy pęcznienie w kierunku prostopadłym do zgniotu (kierunek radialny matrycy) zaczynał się po 72 minutach uwodnienia. Podobnie jak w poprzednich pracach obserwowany jest obszar przejściowy o niższej gęstości. Autorzy sugerują, że występowanie obszarów o niższej gęstości można związać z czymś, co zostało nazwane jako strefa ekspansji matrycy (ang. *expansion zone*), w której następuje relaksacja resztkowych naprężeń związanych z kompresją matrycy. Wynikiem ilościowym był wynik pomiaru grubości tzw. rdzenia, czyli odległości między obszarami o mniejszej gęstości w kierunku zgniotu.

Według autorów najważniejszą obserwacją jest powstawanie pęcherzyków powietrza w strefie ekspansji matrycy. Obecność powietrza była pomijana w interpretacji wcześniejszych pomiarów dyfuzji (wnikania) roztworu w matrycę. We wcześniejszych badaniach metodami magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) na podstawie przesuwania się frontów wnioskowano co do mechanizmu penetracji wody w matrycę HPMC. Autorzy pracy Laity i wsp. [8] stwierdzają, że dyfuzja zgodna z prawem Ficka byłaby w tym przypadku zjawiskiem zaskakującym. Powietrze może odcinać obszary żelu zwiększając krętość układu. W związku z tym dyfuzja w takim przypadku jest tak naprawdę dyfuzją typu II (anomalna). Ponownie autorzy podkreślają niemożność rozróżnienia poszczególnych „pęcherzyków powietrza”, co sugeruje ich rozmiar poniżej rozdzielczości, czyli w tym przypadku poniżej 60  $\mu\text{m}$ .

Kolejnym wynikiem było wykazanie korelacji między współczynnikiem dyfuzji (szybkość penetracji) a gęstością matrycy. Pokazano, że wraz ze zwiększeniem względnej gęstości matrycy (związanej z większą siłą zgniotu) maleje współczynnik dyfuzji (wnikania) cieczy do wnętrza matrycy. Dodatkowo autorzy pokazali i przedyskutowali wpływ dodatku celulozy mikrokystalicznej i skrobi preżelowanej na właściwości matrycy HPMC. Mimo że sami użyli do obrazowania promieniowania synchrotronowego, autorzy w dyskusji przewidują szersze zastosowanie skanerów  $\mu\text{CT}$  typu „bench-top”.

Drugim przykładem zastosowania promieniowania synchrotronowego jest praca wykonana przez Yin i wsp. [9]. Mikrotomografia synchrotronowo-rentgenowska (SR- $\mu\text{CT}$ ) została wykonana na wiązce BL13W1 synchrotronu SSRF (Shanghai Synchrotron Radiation Facility) w Szanghaju. Obrazowano układ z felodypiną jako substancją czynną (substancja praktycznie nierozpuszczalna w wodzie). Matryca obrazowanego układu oparta była na hydroksypropylometylocelulozie (HPMC) i glikolu polietylenowym (PEG) z dodatkami (min. laktoza, barwniki).

W przeciwieństwie do metodyki poprzednio omawianych pomiarów, uwodnione matryce były liofilizowane (ang. *freeze-drying*). Autorzy wybrali taką metodę, uzasadniając, że zachowuje ona mikrostrukturę „na ile to możliwe” (*as much as possible*) poprzez szybkie schładzanie próbki. Według nich liofilizacja w niewielkim stopniu wpływała na strukturę rdzenia matrycy.

W odróżnieniu od poprzednio omawianych prac grupy angielskiej (Laity i wsp. [5], Laity i wsp. [8]), którzy zwracają uwagę nie tylko na zalety wykonanych pomiarów, ale także na ich słabe strony, autorzy pracy Yin i wsp. [9] przenoszą w sposób

nieuzasadniony na wyniki swoich pomiarów interpretację sporządzoną przez Bettini i Colombo do pomiarów przeprowadzonych za pomocą makrofotografii [10]. Problem polega na tym, że front dyfuzji w pracy Bettini i Colombo związany był z pojawieniem się w matrycy rozpuszczonego leku. Front ten był przez nich określony jako front między obszarem, w którym lek jest w stanie stałym, a obszarem, gdzie występuje w roztworze (*solid drug-drug solution boundary*). Natomiast w pracy Yin i wsp. [9] w matrycy występuje lek praktycznie nierozpuszczalny w wodzie, a autorzy sami sugerują erozyjny mechanizm uwalniania leku. Kolejną wątpliwość budzi fakt, że wyraźnie zaznaczają, że stosują ilościowe kryterium wyróżniania frontów erozji, dyfuzji i pęcznienia (ang. *erosion front/ diffusion front/ swelling front*), natomiast kryterium w artykule nie jest opisane. Są podane tylko wartości bezwzględne progów intensywności do segmentacji obrazu oddzielające w pełni uwodnioną warstwę erodującą, częściowo uwodnioną warstwę oraz obszar polimeru w stanie szklistym.

Co więcej, autorzy twierdzą, że obrazują translokacje cząsteczek leku w uwodnionej części matrycy, chociaż nie mogą obserwować pojedynczych cząstek, nie stosują też żadnego znacznika przemieszczeń w matrycy jak autorzy prac Laity i wsp. [5, 8].

## Konkluzje

Rentgenowska mikrotomografia komputerowa ( $\mu$ CT) staje się jednym z narzędzi do badania uwadnianych matryc polimerowych używanych jako postacie leku o przedłużonym/kontrolowanym uwalnianiu. Ze względu na swoją specyfikę dobrze nadaje się do obrazowania różnic w gęstości badanego ośrodka, w tym do obrazowania obszarów porowatych. Żeby uzyskać spójny obraz struktury (morfologii) matrycy oraz jej ewolucji w trakcie hydratacji, wyniki pomiarów  $\mu$ CT powinny być zestawiane z wynikami uzyskanymi innymi metodami. Metodą komplementarną jest obrazowanie, dyfuzometria i relaksometria magnetyczno-rezonansowa, które pozwalają na jakościową i ilościową charakterystykę mobilności wody i polimeru w badanym układzie.

## Literatura

- [1] Kulinowski P., Dorożyński P., *Możliwości różnicowania in vitro układów złożonych z matrycy polimerowej i substancji czynnej metodą Magnetycznego Rezonansu Jądrowego w kontekście układów farmaceutycznych o kontrolowanym uwalnianiu*, „Annales Universitatis Paedagogicae Cracoviensis”, „Studia Technica”, Kraków 2011, IV, s. 64–71.
- [2] Kulinowski P., *Badania struktury uwadnianych hydrofilowych matryc polimerowych z substancjami o różnej rozpuszczalności na przykładzie hydroxypropylmetylocelulozy*. „Annales Universitatis Paedagogicae Cracoviensis”. „Studia Technica”, Kraków 2013, VI, s. 51–56.
- [3] Zeitler J.A, Gladden L.F., *In-vitro tomography and non-destructive imaging at depth of pharmaceutical solid dosage forms*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2009 Jan; 71(1), s. 2–22.
- [4] Akseli I., Abebe A., Sprockel O., Cuitiño A.M., *Mechanistic characterization of bilayer tablet formulations*, Powder Technol. 2013, 236, s. 30–36.

- [5] Laity P.R., Mantle M.D., Gladden L.F., Cameron R.E., *Magnetic resonance imaging and X-ray microtomography studies of a gel-forming tablet formulation*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2010, 74(1), s. 109–19.
- [6] Kulinowski P., Młynarczyk A., Jasiński K., Dorożyński P., Gruwel M.L.H., Tomanek B., Węglarz W.P., *Magnetic Resonance microscopy for assessment of morphological changes in hydrating hydroxypropylmethyl cellulose matrix tablets in situ*, Pharm. Res. 2012, 29(12), s. 3420–3433.
- [7] Klaja J., Przelaskowska A., Dorożyński P., Kulinowski P., *Zastosowanie mikrotomografii rentgenowskiej do analizy pęcznienia i hydratacji zachodzących w matrycowych postaciach leku o przedłużonym działaniu*, Farmacja Polska 2012, 68(2), s. 69–74.
- [8] Laity P.R., Cameron R.E., *Synchrotron X-ray microtomographic study of tablet swelling*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 2010; 75(2), s. 263–76.
- [9] Yin X., Li H., Guo Z., Wu L., Chen F., de Matas M., Shao Q., Xiao T., York P., He Y., Zhang J. *Quantification of swelling and erosion in the controlled release of a poorly water-soluble drug using synchrotron X-ray computed microtomography*. AAPS J. 2013, 15(4), s. 1025–1034.
- [10] Colombo P., Bettini R., Peppas N.A., *Observation of swelling process and diffusion front position during swelling in hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) matrices containing a soluble drug*, J. Control. Release 1999, 61(1–2), s. 83–91.

## X-ray Microtomography for the Investigations of Controlled/Prolonged Release Oral Matrix Dosage Forms

### Abstract

The article presents a short review of the application of X-ray microtomography to imaging of hydrated pharmaceutical matrix systems. They can be performed using “bench-top” scanners or synchrotrons. Data complementary to infrared chemical imaging or magnetic resonance imaging can be obtained. They supply unique information concerning regions of lower density as well as micro and meso-pores.

**Key words:** controlled/prolonged release dosage forms, X-ray computer tomography

Piotr Kulinowski  
Instytut Techniki  
Uniwersytet Pedagogiczny im. KEN  
ul. Podchorążych 2  
30-084 Kraków, Polska

Przemysław Dorożyński  
Katedra Technologii Postaci Leku i Biofarmacji  
Collegium Medicum  
Uniwersytet Jagielloński  
ul. Medyczna 9  
30-688 Kraków, Polska