

BADANIA KINETYKI UWALNIANIA LEKU Z IMPLANTÓW BIOCERAMICZNYCH W WARUNKACH *IN VITRO* Z ZASTOSOWANIEM MODELI MATEMATYCZNYCH

BEATA MYCEK^{1,A}, ANETA ZIMA^{2,B}, JOANNA SZYMURA-OLEKSIAK¹, ANNA ŚLÓSARCZYK², ANNA KRUPA³

¹ ZAKŁAD FARMAKOKINETYKI I FARMACJI FIZYCZNEJ, COLLEGIUM MEDICUM, UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI, KRAKÓW

^A E-MAIL: MFMYCEK@CYF-KR.EDU.PL

² KATEDRA TECHNOLOGII CERAMIKI I MATERIAŁÓW OGNIOTRWALYCH, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW

^B E-MAIL: AZIMA@AGH.EDU.PL

³ KATEDRA TECHNOLOGII POSTACI LEKU I BIOFARMACJI, COLLEGIUM MEDICUM, UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI, KRAKÓW

Streszczenie

W niniejszej pracy badano profil i kinetykę uwalniania leku w warunkach *in vitro* z tabletek o różnym składzie procentowym mieszaniny α TCP-HAp (98% mas. α TCP – 2% mas. HAp; 94% mas. α TCP – 6% mas. HAp; 90% mas. α TCP – 10% mas. HAp) do medium o pH 7.4 oraz z tabletek o takim samym składzie procentowym mieszaniny α TCP-HAp (98% mas. α TCP – 2% mas. HAp) do medium o różnym pH (5, 7.4, 10). Pentoksyfilina (PTX) – lek przyjęty za modelowy został rozmieszczony homogenicznie w implancie bioceramicznym i uwalniał się z dowolnego jego miejsca. Porowatość całkowita badanych biomateriałów wynosiła około 32-38%. Przeprowadzony eksperyment miał również na celu określenie mechanizmu uwalniania PTX z badanych nośników z zastosowaniem modelu Korsenmeyera – Peppasa oraz opis tego procesu za pomocą modelu Higuchiego. Wyniki badań wykazały, że im większy był udział procentowy proszku hydroksyapatytowego w wyjściowym składzie tabletek, tym szybciej zachodziło uwalnianie PTX. Najszybciej lek ten uwalniał się z tabletek α TCP-HAp do medium o pH 5, natomiast najwolniej do środowiska o pH 10. Korzystając z modelu Korsenmeyera – Peppasa określono dla badanych nośników mechanizm uwalniania badanego leku. Otrzymane wartości wykładnika dyfuzyjnego n (charakteryzującego mechanizm uwalniania leku), były równe lub większe od 1, co świadczy o tym, że uwalnianie PTX zachodziło zgodnie z mechanizmem zerowego lub super zerowego rzędu. Na podstawie modelu Higuchiego wyznaczono stałe szybkości uwalniania PTX. Z praktycznego punktu widzenia stała szybkość uwalniania substancji leczniczej utrzymująca się przez dłuższy okres czasu jest pożądana w długotrwałej farmakoterapii.

Słowa kluczowe: implanty bioceramiczne, nośniki leku, modele matematyczne

[Inżynieria Biomateriałów, 76, (2008), 6-12]

IN VITRO STUDIES OF THE KINETICS OF DRUG RELEASE FROM BIOCERAMIC IMPLANTS USING MATHEMATICAL MODELS

BEATA MYCEK^{1,A}, ANETA ZIMA^{2,B}, JOANNA SZYMURA-OLEKSIAK¹, ANNA ŚLÓSARCZYK², ANNA KRUPA³

¹ DEPARTMENT OF PHARMACOKINETICS AND PHYSICAL PHARMACY, FACULTY OF PHARMACY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, CRACOW, POLAND

^A E-MAIL: MFMYCEK@CYF-KR.EDU.PL

² DEPARTMENT OF CERAMICS AND REFRACTORY MATERIALS, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

^B E-MAIL: AZIMA@AGH.EDU.PL

³ DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY AND BIOPHARMACEUTICS, FACULTY OF PHARMACY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, CRACOW, POLAND

Summary

In the work, profile and kinetics of *in vitro* drug release from the tablets composed of α TCP-HAp mixtures containing various amounts of constituents (98 wt. % α TCP – 2 wt. % HAp; 94 wt. % α TCP – 6 wt. % HAp; 90 wt. % α TCP – 10 wt. % HAp) to the medium of pH = 7.4 as well as from the tablets with constant amounts of α TCP and HAp (98 wt. % α TCP – 2 wt. % HAp) to the media of different pH values (5, 7.4, 10) were studied. Pentoxifylline (PTX), a model drug in the investigations, was distributed homogeneously in the bioceramic implants and released from the whole of their volume. Total porosity of the materials studied was in the range of 32-38%. The aim of the experiment was also to determine the mechanism of PTX release from the carriers using Korsenmeyer – Peppas model as well as to describe this process by Higuchi model. The results showed that the rate of PTX release grew as the proportion of hydroxyapatite powder in the materials increased. The drug release from α TCP-HAp tablets was the fastest into the medium of pH=5 and the slowest into that of pH=10. Using Korsenmeyer – Peppas model the mechanism of the drug release was determined. The values of diffusion exponent n (factor determining the mechanism of drug release) were equal to or higher than 1, which proved that PTX was released according to zero-order or super-zero order mechanism. Based on Higuchi model, the rate constants of the process were calculated. From practical point of view, constant rate of drug release over a long time is desired in the long-term therapy.

Keywords: bioceramic implants, drug carriers, mathematical models

[Engineering of Biomaterials, 76, (2008), 6-12]

Wprowadzenie

W ostatnich latach szczególne zainteresowanie w medycynie i farmacji zyskały biozgodne i bioaktywne fosforanowo-wapniowe materiały implantacyjne (CaPs) wytwarzane w oparciu o ceramikę hydroksyapatytową (HAp) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, whitlockitową (β TCP) – $\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ i α TCP – $\alpha\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Tworzywa te z uwagi na dużą kruchość wykorzystywane są jako materiały wypełniające ubytki tkanki kostnej w miejscach nie przenoszących znacznych obciążeń mechanicznych. Dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym i biologicznym bioceramika fosforanowo-wapniowa od kilku lat badana jest w aspekcie zastosowania jej w docelowych systemach dostarczających leki głównie do kości, tzw. skeletal drug delivery system. Stosowanie materiałów bioceramicznych, zawierających długotrwale uwalniającą się substancję leczniczą, może zapewniać przez dłuższy okres czasu terapeutyczne stężenie leku w miejscu założenia implantu. W konsekwencji prowadzi to do znacznie większej efektywności leczenia w porównaniu z doustnym, a nawet dożylnym podawaniem niektórych leków. Skuteczność terapeutyczna substancji leczniczych zależy nie tylko od ich działania farmakologicznego, ale także od odpowiedniego stężenia w pobliżu receptora, czyli w biofazie [3,4,6]. Stąd stężenie leku we krwi, a pośrednio i w miejscu działania, zależy w znacznym stopniu od sposobu jego dawkowania. Istnieje wiele możliwych dróg podania leku, a dobór właściwej jest ważnym elementem procesu leczenia chorego. Stosowanie biomateriałów jako nośników leków umożliwia kontrolę oraz stabilność uwalniania substancji leczniczej w organizmie. Opracowanie i zastosowanie modeli matematycznych pozwala natomiast na pełne scharakteryzowanie kinetyki uwalniania leku z danego implantu [7]. W ostatnich latach badania w tym zakresie dotyczą takich leków jak: antybiotyki, cytostatyki, niesteroidowe leki przeciwzapalne, hormony i białka. Ilość uwalnianego leku jest funkcją czasu, a szybkość tego procesu i w konsekwencji mechanizm uwalniania zależy od mikrostruktury i składu fazowego biomateriału oraz od właściwości fizykochemicznych substancji leczniczej. Istotną rolę pełni również sposób rozmieszczenia leku w implancie (układ homogeniczny lub heterogeniczny) [5,13-16]. Podstawowe znaczenie w doborze odpowiedniego modelu matematycznego do profilu uwalniania leku ma zarówno jego postać, jak również sposób inkorporowania w matrycę. Kinetykę procesu uwalniania substancji leczniczej z nośników ceramicznych, w których lek został rozmieszony homogenicznie można przedstawić za pomocą modelu Higuchiego, opisanego równaniem (1) [8-11]:

$$M_t = A M_0 \left[C_s \left(\frac{D_i \varepsilon}{\tau} \right) (2 C_d - C_s \varepsilon) t \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

zakładając, że:

$$K_H = A M_0 \left[C_s \left(\frac{D_i \varepsilon}{\tau} \right) (2 C_d - C_s \varepsilon) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

otrzymuje się równanie 3:

$$M_t = K_H t^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

gdzie:

- M_t - ilość uwolnionego leku po czasie t
- M_0 - początkowa ilość leku
- D_i - współczynnik dyfuzji leku
- A - powierzchnia całkowita kształtki (tabletki)
- C_s - rozpuszczalność leku
- C_d - stężenie leku w roztworze
- τ - krętość porów
- ε - porowatość
- t - czas
- K_H - stała Higuchiego

Introduction

In recent years, biocompatible and bioactive calcium phosphate implant materials (CaPs) based on hydroxyapatite (HAp) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, whitlockite (β TCP) – $\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and α TCP – $\alpha\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ have received particular interest in medicine and pharmacy. Due to their brittleness, these materials are used as fillers of bone tissue losses in the sites not carrying high mechanical loads. Since CaP ceramics exhibit advantageous physico-chemical and biological properties, for several years they have been studied in view of their uses as skeletal drug delivery systems. Application of bioceramic materials from which a sustained drug release occurs, can provide its therapeutic level in the site of implantation for a long time. This results in significantly higher efficiency of the treatment with respect to those in which medical preparations are administered orally or even intravenously. Therapeutic effect of a drug depends not only on its pharmacological action but also on its appropriate concentration in the environment of the receptor, i. e. in the so-called biophase [3,4,6]. Drug levels in the blood and in the target site are influenced to a high degree by the way of its administration. There are numerous ways possible and the choice of the optimum one is an important factor in the treatment process. Use of biomaterials as carriers makes it possible to control and stabilize medicament release into the organism. On the other hand, development and application of mathematical models allows to fully characterize the kinetics of drug release from a given implant [7]. In recent years, investigations in this area are focused on such drugs, as: antibiotics, cytostatics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, hormones and proteins. The amount of the drug released is a function of time, whereas the rate as well as the mechanism of this process depend on the microstructure and phase composition of the biomaterial and on physico-chemical properties of the active substance. The method of drug loading within an implant (homogeneous or heterogeneous system) plays also an important role [5,13-16]. In the selection of the appropriate mathematical model for a given drug release profile, form of the medicament as well as the way of its incorporation in the matrix are the most significant factors which should be taken into account. Kinetics of the drug release from ceramic carriers with homogeneous drug distribution can be described using Higuchi model by equation (1) [8-11]:

$$M_t = A M_0 \left[C_s \left(\frac{D_i \varepsilon}{\tau} \right) (2 C_d - C_s \varepsilon) t \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

Assuming that:

$$K_H = A M_0 \left[C_s \left(\frac{D_i \varepsilon}{\tau} \right) (2 C_d - C_s \varepsilon) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

equation (3) is obtained:

$$M_t = K_H t^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

where:

- M_t - amount of the drug released after time t
- M_0 - initial drug amount
- D_i - drug diffusion coefficient
- A - total area of the formulation (tablet)
- C_s - drug solubility
- C_d - drug concentration in the solution
- τ - tortuosity of pores
- ε - porosity
- t - time
- K_H - Higuchi constant

Jak wynika z powyższego równania ilość uwolnionej substancji jest funkcją pierwiastka kwadratowego z czasu. Zgodnie z modelem Higuchiego proces dyfuzji leku przez pory jest czynnikiem kontrolującym uwalnianie leku z biomateriału. Szybkość procesu uwalniania leku w tego typu układzie w początkowym okresie jest wysoka, następnie maleje i pozostaje stała przez pewien okres czasu.

Mechanizm uwalniania leku z implantu może być także opisany równaniem zaproponowanym przez Korsenmeyera i Peppasa, które dla układu homogenicznego przyjmuje postać (4) [1,2,7]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (4)$$

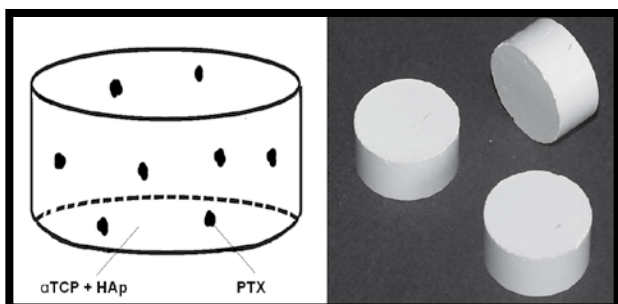
gdzie:

- M_t - ilość uwolnionego leku po czasie t
- M_∞ - początkowa ilość leku
- K - stała szybkości
- t - czas
- n - wykładnik dyfuzyjny

Równanie to jest słuszne przy założeniu, że analiza kinetyki procesu obejmuje czas, w którym uwolnione zostało 60% substancji. Wartość wykładnika n może być stosowana do scharakteryzowania zarówno penetracji rozpuszczalnika przez pory biomateriału jak i uwalniania leku. Peppas zaproponował, że dla $n = 0.5$ kinetyka uwalniania leku zachodzi zgodnie z kinetyką dyfuzji wg Ficka (Fickian diffusion), a dla $0.5 < n < 1$ ma charakter anomalny (anomalous transport) i jest różny od dyfuzji Ficka. Dla wartości $n = 1$ stanowi szczególny przypadek, w którym mechanizm transportu uwalniania zmierza do zerowego rzędu i określony został w piśmiennictwie jako przypadek II (case II transport), natomiast dla $n > 1$ określany jest jako super zerowego rzędu (super case II transport) [12].

Materiały i metody

Do wytworzenia tabletek jako nośników leków wykorzystano: ortofosforan (V) wapnia (α TCP) – $\alpha\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ oraz hydroksyapatyt (HAp) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Wyjściowe proszki otrzymano metodą moką w Katedrze Technologii Ceramiki i Materiałów Ogniotrwałych WIMiC Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Skład fazowy proszków określono za pomocą analizy rentgenowskiej przeprowadzonej przy użyciu dyfraktometru rentgenowskiego X'Pert Pro firmy Philips. Tabletki (RYS. 1) składające się z 1 g mieszaniny α TCP i HAp (TABELA 1), 50 mg PTX oraz 0.6 ml 3% roztworu Na_2HPO_4 wykonano w tabletkarce uderzeniowej Erweka z siłą kompresji 35 kN. Pole czynnej powierzchni uwalniania leku w tabletkach wynosiło 4.55 cm^2 . Porowatość całkowita badanych próbek wynosiła od 32 do 38%. Otrzymane w ten sposób tabletki stanowiły układ homogeniczny (lek równomiernie rozproszony w całej masie tabletki uwalniał się z dowolnego jej miejsca).



RYS. 1. Ceramiczne nośniki leku α TCP–HAp.
FIG. 1. Ceramic α TCP–HAp drug carriers.

From the above equation it follows that the amount of the drug released is a function of square root of time. According to Higuchi model, drug release from the biomaterial is controlled by its diffusion through the pores of the carrier. The rate of the release process in such system is high in the initial period, then it decreases and remains constant for some time.

Mechanism of drug release from the implant can be also described using the equation proposed by Korsenmeyer and Peppas, which for the homogeneous system is given by expression (4) [1,2,7]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (4)$$

where:

- M_t - amount of the drug released after time t
- M_∞ - initial drug amount
- K - rate constant
- t - time
- n - diffusion exponent

This equation is valid when the kinetics of the process within the time period during which 60% of the active substance has been released is considered. Value of exponent n can be used to characterize both, solvent penetration through the pores of the biomaterial and drug release. According to Peppas, for $n = 0.5$ kinetics of drug release follows that of Fickian diffusion, whereas for $0.5 < n < 1$ the anomalous transport, different from Fickian diffusion, is operating. The value of $n = 1$ is a special case in which the transport mechanism approaches the zero order, in the literature often referred to as case II transport, whereas for $n > 1$ it is frequently denoted as super case II transport [12].

Materials and methods

Calcium orthophosphate (V) (α TCP) – $\alpha\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and hydroxyapatite (HAp) – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ were used to obtain tablets of drug carriers. The starting powders were prepared by the wet method in the Department of Department of Ceramics and Refractory Materials of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH-University of Science and Technology in Krakow. The phase compositions of the powders were determined by X-ray diffractometry using a X'Pert Pro Philips diffractometer. Tablets (FIG. 1) containing 1 g of α TCP - HAp mixture (TABLE 1), 50 mg of PTX and 0.6 ml of 3% Na_2HPO_4 solution were fabricated using excentric press EK-0 Erweka at the compression strength of 35 kN. Active surface area of drug release from the tablets was equal to 4.55 cm^2 . Total porosity of the samples studied was in the range of 32-38%. The carriers thus obtained constituted a homogeneous system (the drug uniformly distributed in the whole volume of the tablet was released from the whole of their volume).

TABELA 1. / TABLE 1.

Symbol tabletki Pellet symbol	Skład Composition	Porowatość całkowita Total porosity [%]	Gęstość pozorna Apparent density [g/cm^3]
T 1	98% mas. α TCP + 2% mas. HAp 98 wt.% α TCP + 2 wt.% HAp	37.62	1.58
T 2	94% mas. α TCP + 6% mas. HAp 94 wt.% α TCP + 6 wt.% HAp	38.02	1.55
T 3	90% mas. α TCP + 10% mas. HAp 90 wt.% α TCP + 10 wt.% HAp	32.27	1.72

Pentoksyfyllina (PTX) – lek z grupy syntetycznych pochodnych metyloksantyn jest białym, krystalicznym, bezwonnym proszkiem o charakterze słabej zasady i stosunkowo słabych właściwościach lipofilnych. PTX bardzo dobrze rozpuszcza się w wodzie i w etanolu, a w środowisku o pH 7.4 jest nieznacznie zjonizowana. Jednym z najnowszych zastosowań PTX jest stosowanie jej w chorobach kości takich jak osteoporoza oraz choroba Sudecka.

Badane tabletki α TCP–HAp zawierające PTX umieszczano w kolbach okrągłodennych zawierających po 50 ml cieplego medium, które stanowiły roztwory buforu fosforanowego o pH 5 i 7.4 i buforu węglanowego o pH 10. Eksperyment przeprowadzono w temperaturze 37°C w termostатовanej łaźni wodnej z wytrząsaniem przy częstotliwości ruchów 60/min. W określonych odstępach czasu z kolbek pobierano po 3 ml roztworu, po czym ich zawartość uzupełniano buforem do stałej objętości 50 ml zapewniając w ten sposób warunki *sink*. Dla każdego typu tabletki wykonano po trzy oznaczenia. Stężenie PTX w badanych próbkach oznaczano metodą spektrofotometryczną (spektrofotometr Helios β UV-VIS, Unicam) z detekcją UV przy analitycznej długości fali 275 nm z wykorzystaniem sporządzonych wcześniej krzywych wzorcowych. W zakresie stężeń 1-30 μ g/ml wykazano w każdym przypadku liniowe zależności absorbancji w funkcji stężenia leku ($R^2 > 0.99$). W obliczeniach stosowano programy Microsoft Excel oraz WinNonlin (Pharsight Corp., Mountain View, CA).

Wyniki i dyskusja

Kinetykę procesu uwalniania badanego leku z danego rodzaju tabletki α TCP–HAp oceniano na podstawie ilości uwolnionej PTX w czasie do określonego medium. Na RYS. 2 i 3 przedstawiono zależności ilości uwolnionej PTX (wyrażonej w procentach) w czasie.

Jak wynika z RYS. 2 przebieg krzywych ilości uwolnionej PTX w czasie do buforu fosforanowego o pH 7,4 dla wszystkich trzech typów tabletek (T1, T2, T3) był podobny. Funkcje osiągnęły plateau po ok. 170 h trwania eksperymentu, a po czasie 216 h ze wszystkich badanych nośników uwolniło się 100% leku. W przypadku uwalniania PTX z tabletki T1 do medium o różnym pH (RYS. 3) obserwowano wyraźne różnice w profilu uwalniania leku. Funkcje osiągnęły plateau po ok. 120, 170 oraz 190 h, odpowiednio dla pH 5, 7.4 i 10.

Na RYSUNKACH 4 i 5 przedstawiono szybkość uwalniania PTX z badanych materiałów w funkcji czasu. Analizując RYS. 4 można zauważyć, że najwolniej lek uwalniał się z tabletki T1 o najniższej procentowej zawartości HAp, a najszybciej z tabletki T3, przy czym początkowo (przez ok. 50 h) szybkość uwalniania PTX z tabletki T3 była zdecydowanie większa w porównaniu do pozostałych. Maksymalne szybkości uwalniania leku wynosiły: 0.45, 0.55 i 0.75 mg/h, odpowiednio dla tabletek T1, T2 i T3, a po upływie ok. 180 h trwania eksperymentu wartości szybkości uwalniania PTX ze wszystkich nośników ustaliły się na stałym poziomie wynoszącym ok. 0.30 mg/h. Na kinetykę procesu uwalniania również miało wpływ środowisko do którego następowało uwalnianie leku. Szybkość uwalniania PTX była największa dla pH 5 (maksymalna szybkość 0.71 mg/h), a najmniejsza dla pH 10 (maksymalna szybkość 0.34 mg/h) (RYS. 5).

Analizę stężeń uwolnionego leku z badanych tabletek do odpowiedniego medium przeprowadzono zgodnie z modelem Higuchiego. Wyniki przedstawiono na RYSUNKACH 6 i 7 oraz w TABELI 2. Przebieg otrzymanych krzywych miał charakter sigmoidalny, przy czym w określonych przedziałach czasu był prostoliniowy.

Pentoxifylline (PTX) – a drug belonging to a group of synthetic methyloxantine derivatives, is a white, crystalline odourless powder showing weak basic and relatively weak lipophilic properties. PTX dissolves very well in water and ethanol; in the medium of pH = 7.4 it is slightly ionized. Its application in the treatment of bone diseases, such as osteoporosis or Sudeck disease is one of the most recent uses of this drug.

α TCP–HAp tablets studied, containing PTX were placed in round-bottomed flasks filled with 50 ml of the liquid medium (solutions of phosphate buffer of pH 5 and 7.4 or carbonate buffer of pH 10). The experiment was conducted at the temperature of 37°C in the thermostated water bath shaken at the frequency of 60 strokes per minute. In the given time intervals, 3 ml aliquots were withdrawn from the solutions which were then filled with the buffer solution to maintain the constant volume of 50 ml. In this way, the *sink* conditions were ensured. For each tablet, three determinations were performed. PTX concentration in the studied samples was analysed by spectrophotometric method (Helios β UV-VIS spectrophotometer, Unicam) at the analytical wavelength of 275 nm using previously determined calibration curve. Dependence of the absorbance on the drug concentration in the concentration range of 1-30 μ g/ml was linear ($R^2 > 0.99$). In the calculations, Microsoft Excel and WinNonlin (Pharsight Corp., Mountain View, CA) software packages were used.

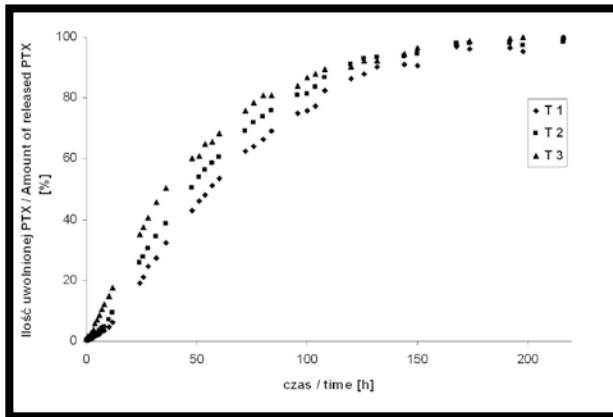
Results and discussion

Kinetics of the studied drug release process from a given type of the α TCP–HAp tablet was evaluated based on the amount of PTX released into a given medium as a function of time. In FIG. 2 and 3 dependences of the amounts of PTX released (in %) on time are shown.

As can be seen from the curves presented in FIG. 2, the amounts of PTX released into the buffer solution of pH=7.4 were similar for all three types of tablets (T1, T2, T3). Functions reached plateau after ca. 170 hours of the experiments and after 216 hours 100 % of the drug was released from all the carriers. In the case of PTX release from the T1 tablet into media of various pH (FIG. 3) distinct differences in the drug delivery profile were observed. Functions reached plateau after ca. 120, 170 and 190 hours for pH = 5, 7.4 and 10, respectively.

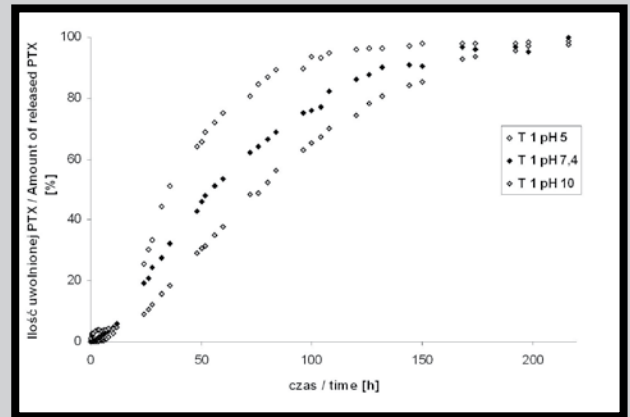
In FIGURES 4 and 5 the rate of PTX release from the materials studied is plotted as the function of time. When FIG. 4 is examined, it can be noticed that the slowest drug release was in the case of the T1 tablet, containing the smallest amount of HAp, and the fastest in the case of the T3 tablet. During the beginning of the experiment (for ca. 50 hours) the rate of PTX release from the T3 tablet was significantly higher than that observed for the other ones. Maximum rates of medicament release were the following: 0.45, 0.55 and 0.75 mg/h for the T1, T2 and T3 tablets, respectively. After ca. 180 hours of the experiments, values of PTX release from all the carriers stabilized at a constant level of ca. 0.30 mg/h. Kinetics of the process was also influenced by the medium into which the drug was released. The rate was the highest for pH = 5 (maximum rate of 0.71 mg/h), and the lowest for pH=10 (maximum rate of 0.34 mg/h) (FIG. 5).

Analysis of the concentrations of the drug released from the tablets into the investigated media was conducted using Higuchi model. Results are presented in FIGURES 6 and 7 as well as in TABLE 2. The curves showed sigmoid course, but within some time intervals linear functions were obtained.



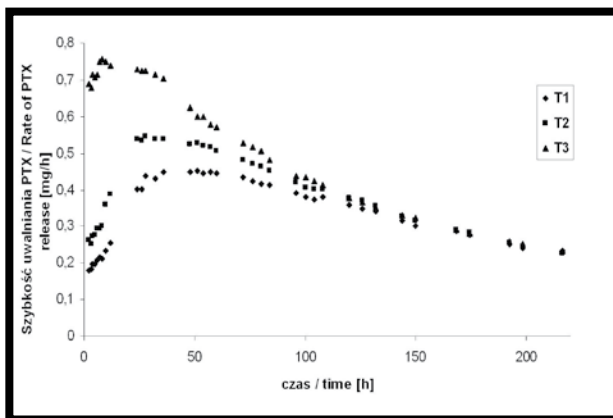
RYS. 2. Ilość uwolnionej PTX [%] w czasie z tabletek T1, T2, T3 do buforu o pH 7.4.

FIG. 2. Amount of released PTX [%] versus time from tablets T1, T2, T3 into the buffer solution of pH =7.4.



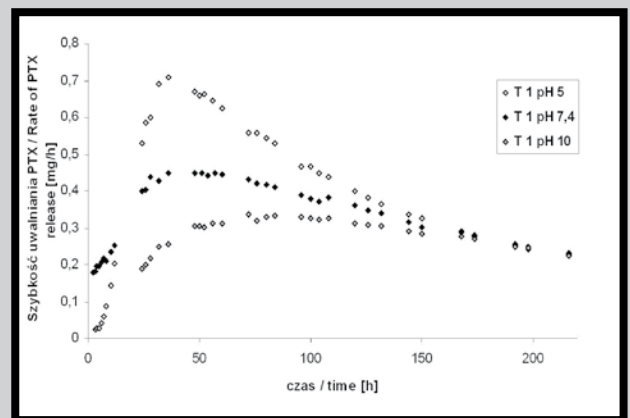
RYS. 3. Ilość uwolnionej PTX [%] w czasie z tabletki T1 do buforów o różnym pH (5, 7.4, 10).

FIG. 3. Amount of released PTX [%] versus time from the tablet T1 into the buffer solutions of various pH (5, 7.4, 10).



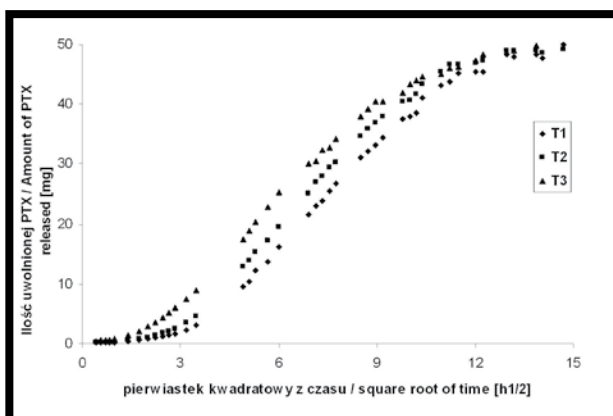
RYS. 4. Szybkość uwalniania PTX [mg/h] w czasie z tabletek T1, T2, T3 do buforu o pH 7.4.

FIG. 4. Rate of PTX release [mg/h] from T1, T2, T3 tablets into the buffer solution of pH = 7.4 as the function of time.



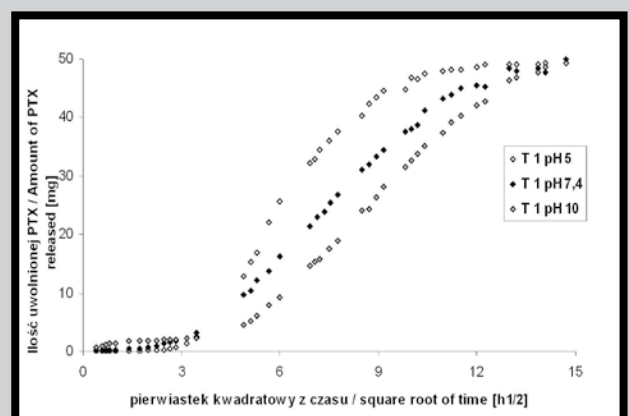
RYS. 5. Szybkość uwalniania PTX [mg/h] w czasie z tabletki T1 do buforów o różnym pH (5, 7.4, 10).

FIG. 5. Rate of PTX release [mg/h] from the T1 tablet into the buffer solution of various pH (5, 7.4, 10) as the function of time.



RYS. 6. Ilość uwolnionej PTX [mg] w funkcji pierwiastka kwadratowego z czasu z tabletek T1, T2, T3 do buforu o pH 7.4.

FIG. 6. Amount of PTX released [mg] from T1, T2, T3 tablets into the buffer solution of pH = 7.4 as the function of square root of time.



RYS. 7. Ilość uwolnionej PTX [mg] jako funkcja pierwiastka kwadratowego z czasu z tabletki T1 do buforów o różnym pH (5, 7.4, 10).

FIG. 7. Amount of PTX released [mg] from the T1 tablet into the buffer solution of various pH (5, 7.4, 10) as the function square root of time.

TABELA 2. Wartości stałej Higuchiego obliczone na podstawie równania (3)*.

TABLE 2. Values of Higuchi constant calculated based on equation (3)*.

Symbol tworzywa Symbol of the material	pH medium pH of the medium	Stała Higuchiego K_{H1} Higuchi constant K_{H1} [mg/h ^{1/2}]	R ² R ²
T1	5	8.6732	0.9864
T1	7.4	5.8390	0.9986
T1	10	5.6148	0.9980
T2	7.4	6.0003	0.9986
T3	7.4	6.2332	0.9926

* W obliczeniach stałej brano pod uwagę średnie dane uzyskane w przedziale czasu, w którym zależność pomiędzy ilością uwolnionego leku [mg], a pierwiastkiem kwadratowym z czasu była prostoliniowa.

* In the calculations, the mean values obtained for the time interval in which the dependence of the amount of drug released and the square root of time was linear were taken into account.

W TABELI 2 zebrano wartości stałej Higuchiego charakteryzującej szybkość uwalniania leku oraz współczynniki korelacji prostych będących zależnościami pomiędzy ilością uwolnionej PTX, a pierwiastkiem kwadratowym z czasu (równanie 3).

Jak wynika z powyższej tabeli, biorąc pod uwagę tabletki o różnym składzie uwalniające do medium o pH fizjologicznym wynoszącym 7.4, lek najszybciej uwalniał się z tabletki T3 (pomimo jej niższej w stosunku do pozostałych porowatości), natomiast najwolniej z tabletki T1. Dla tabletek o tym samym składzie (T1), a uwalniających PTX do środowiska o różnym pH, uwalnianie zachodziło najszybciej przy pH 5 (najwyższa stała Higuchiego równa 8,6732 [mg/h^{1/2}]), a najwolniej do medium o pH 10 (stała Higuchiego na poziomie 5,6148 [mg/h^{1/2}]).

Celem określenia mechanizmu uwalniania badanego leku, korzystając z otrzymanych zależności ilości uwolnionej PTX od czasu, obliczono dla wszystkich badanych nośników parametry równania Korsenmeyera i Peppasa (równanie 4). Wyniki zebrano w TABELI 3.

Otrzymane wartości wykładnika dyfuzyjnego (n) charakteryzującego mechanizm penetracji rozpuszczalnika i uwalniania leku wykazały, że uwalnianie PTX z tabletek α TCP-HAP miało charakter określany jako super zerowego rzędu (super case II transport, $n > 1$) z wyjątkiem uwalniania leku z tabletki T3 do medium o pH 7.4. W tym ostatnim przypadku uwalnianie zachodziło zgodnie z mechanizmem zerowego rzędu (case II transport, $n = 1$).

Wnioski

1. W badaniach *in vitro* stwierdzono stosunkowo powolne uwalnianie zawartej w materiałach α TCP-HAP substancji leczniczej. Różnice w procentowej zawartości obu komponentów, tzn. α TCP i hydroksyapatytu w tabletkach wpływały na szybkość uwalniania zawartego w nich leku.

2. O profilu uwalniania PTX, a co z tym idzie o szybkości uwalniania leku w czasie z biomateriałów ceramicznych, decydowało także pH środowiska. Analizując kinetykę uwalniania PTX z badanych biomateriałów stwierdzono, że szybkość uwalniania leku była tym większa im mniejsza była zawartość HAP w tabletkach i im niższe było pH środowiska.

TABELA 3. Wartości parametrów opisujących mechanizm uwalniania PTX zgodnie z równaniem (4) Korsenmeyera i Peppasa.

TABLE 3. Values of parameters describing the mechanism of PTX release in equation (4) proposed by Korsenmeyer and Peppas.

Symbol tworzywa Symbol of the material	pH medium pH of the medium	n (SE)	K (SE) [h ⁻ⁿ]	Mechanizm uwalniania Release mechanism
T1	5	1.519 (0.09340)	0.01840 (0.00039)	super zerowego rzędu super case II transport
T1	7.4	1.356 (0.02239)	0.00229 (0.00016)	super zerowego rzędu super case II transport
T1	10	1.273 (0.04160)	0.00199 (0.00031)	super zerowego rzędu super case II transport
T2	7.4	1.218 (0.02408)	0.00458 (0.00032)	super zerowego rzędu super case II transport
T3	7.4	0.967 (0.01401)	0.01549 (0.00057)	zerowego rzędu case II transport

In TABLE 2 values of Higuchi constant which characterizes the rate of the drug release as well as coefficients of the straight lines obtained for the dependences between the amounts of PTX released and the square root of time (equation 3) are collected.

As can be concluded from the data in TABLE 2 when the tablets of various compositions releasing the drug into the medium of physiological pH equal to 7.4 are compared, PTX release was the fastest from the T3 tablet (in spite of its lower porosity with respect to the other ones) and the slowest from the T1 tablet. In the case of the tablets of the same composition (T1), but releasing the drug into the solutions of various pH, the fastest PTX release was observed at pH = 5 (the highest Higuchi constant equal to 8,6732 [mg/h^{1/2}]), and the slowest at pH = 10 (Higuchi constant at the level of 5,6148 [mg/h^{1/2}]).

In order to determine the mechanism of the studied drug release, parameters of the Korsenmeyer and Peppas equation (equation 4) for all the investigated carriers were calculated based on the obtained dependences of the amounts of PTX released on time.

The obtained values of the diffusion exponent (n) which characterizes the mechanism of solvent penetration and drug release, showed that the PTX release from α TCP-HAP tablets followed the super case II transport ($n > 1$), with drug release from the T3 tablet into the medium of pH = 7.4 being the only exception. In this case, the release was in accordance with case II transport ($n = 1$).

Conclusions

1. *In vitro* experiments confirmed a relatively slow release of the therapeutic substance contained in the investigated α TCP-HAP tablets. Differences in the proportions of α TCP and HAP in the materials affected the rate of this process.

2. The release profile and, consequently, the rate of drug release from ceramic carriers were also influenced by the pH of the surrounding medium. When the kinetics of PTX release is analyzed, it should be noted that the rate of this process increases with the decrease in both, HAP content in the tablet and pH value of the medium.

3. Prawie w każdym przypadku uwalnianie leku zachodziło zgodnie z mechanizmem super zerowego rzędu (super case II transport).

4. Opracowanie nowej generacji wielofunkcyjnych bioceramicznych nośników leku, które z optymalną szybkością i na określonym poziomie terapeutycznym uwalniałyby dany lek, stwarza realną szansę uzyskania skuteczności i bezpieczeństwa leczenia różnych schorzeń kości.

Podziękowania

Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Projekt nr R 15 003 03.

3. Almost in all the investigated cases, the drug was released according to the super zero order mechanism (super case II transport).

4. Development of new generation of multifunctional bioceramic drug carriers which would release the active substances at the optimum rate ensuring their therapeutic level, would make a chance to achieve efficient and safe treatment of various bone diseases.

Acknowledgement

This work has been supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education. Project No R 15 003 03.

Piśmiennictwo

- [1] Brazel Ch.S., Peppas N.A.: Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers. *Polymer*. 1999, 40, 3383-3398.
- [2] Castro C., Sánchez E., Delgado A., Soriano I., Núñez P., Baro M., Perera A., Evora C.: Ciprofloxacin implants for bone infection. In vitro-in vivo characterization. *J Control Release*. 2003, 93, 341-354.
- [3] Goto T., Kojima T., Iijima T.: Resorption of synthetic Poros hydroxyapatite and replacement by newly formed bone. *J Orth Sci*, 2001, 6, 444-447.
- [4] Hirabayashi H., Fujisaki J.: Bone-specific drug delivery systems. *Clin Pharmacokinet*. 2003, 42 (15), 1319-1330.
- [5] Itokazu M., Kumazawa S., Wada E., Wenyi Y.: Sustained release of adriamycin from implanted hydroxyapatite blocks for the treatment of experimental osteogenic sarcoma in mice. *Cancer Lett*. 1996, 107, 11-18.
- [6] Jain A.K., Panchagnula R.: Review skeletal drug delivery systems. *Int J Pharm*. 2000, 206, 1-12.
- [7] Kim H., Fassihi R.: Application of a binary polymer system in drug release rate modulation. 1. Characterization of release mechanism. *J Pharm Sci*. 1997, 86 (3), 316-322.
- [8] Otsuka M., Nakahigashi Y., Matsuda Y., Fox J.L., Higuchi W.I.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement. 7. Effect of biological factors on indomethacin release from the cement loaded on bovine bone. *J Pharm Sci* 1994, 83 (11), 1569-1573.
- [9] Otsuka M., Matsuda Y., Fox J.L., Higuchi W.I.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement. 9: Effects of the mixing solution volume on anticancer drug release from homogenous drug-loaded cement. *J Pharm Sci*. 1995, 84 (6), 733-736.

References

- [10] Otsuka M., Matsuda Y., Kokubo T., Yoshihara S., Nakamura T., Yamamuro T.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting bioactive glass bone cement. III: the in vitro drug release from bone cement containing indomethacin and its physicochemical properties. *J Control Release*. 1994, 31, 111-119.
- [11] Otsuka M., Matsuda Y., Suwa Y., Fox J.L., Higuchi W.I.: A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement. 2. Physico-chemical properties and drug release rate of the cement-containing indomethacin. *J Pharm Sci*. 1994, 83 (5), 611-615.
- [12] Peppas N.A., Sahlin J.J.: A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int J Pharm*. 1989, 57, 169-172.
- [13] Raińska-Giezek T., Pawlik A.: Systemy nośnikowe do miejscowego dostarczania antybiotyków w zakażeniach kości. *Farmacja Polska*. 2002, 58 (5), 225-228.
- [14] Sánchez E., Baro M., Soriano I., Perera A., Evora C.: In vivo-in vitro study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants. *Eur J Pharm Biopharm*. 2001, 52, 151-158.
- [15] Shinto Y., Uchida A., Korkusuz F., Araki N., Ono K.: Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. *J Bone Joint Surg Am*. 1992; 74-B, 600-604.
- [16] Sivakumar M., Panduranga Rao K.: Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres. *Biomaterials*. 2002, 23, 3175-3181.