

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ДВОЙНОГО ЭМУЛЬГИРОВАНИЯ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ МИКРОСФЕР НАЛТРЕКСОНА НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРА МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ

Е.А. Петрова, ведущий инженер, **С.А. Кедик**, заведующий кафедрой, **К.В. Алексеев**, профессор, **Е.В. Блынская**, старший научный сотрудник, **А.В. Панов***, директор по науке, **В.В. Суслов***, заместитель директора по производству, **Н.В. Тихонова**, старший научный сотрудник

кафедра Биомедицинских и фармацевтических технологий

МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия

**ЗАО «Институт фармацевтических технологий», Москва, 121353 Россия*

e-mail: elizaweta@mail.ru

Проведена оценка эффективности метода двойного эмульгирования при получении систем с модифицированным высвобождением лекарственного вещества. Изучено влияние параметров процесса на характеристики микросфер налтрексона на основе сополимера молочной и гликолевой кислот.

Ключевые слова: микросферы, сополимер молочной и гликолевой кислот, двойное эмульгирование, налтрексон.

Современное развитие исследовательских методов и технологий подготовило основу для создания систем, обладающих заданным профилем высвобождения лекарственного вещества (ЛВ), что обеспечивает его постоянную терапевтическую концентрацию в органах и тканях организма. Такие системы позволяют значительно снизить токсичность и другие побочные эффекты ЛВ.

Среди данных систем хорошо зарекомендовали себя микрокапсулированные лекарственные средства (микрокапсулы, микросферы, нанокapsулы), предназначенные для внутрисосудистого введения вблизи определенного органа или ткани – мишени. Инкапсулирование лекарственной субстанции в микро- и наночастицы изменяет фармакокинетические параметры системы в заданном направлении, что позволяет уменьшить влияние, а также снизить частоту проявления большинства негативных факторов [1].

На данный момент доля препаратов с улучшенной системой доставки на российском фармацевтическом рынке крайне незначительна. Разработка систем доставки, патентование и производство новых, оригинальных лекарственных средств направленного действия является актуальной задачей российской фармацевтической индустрии.

Основная проблема, с которой сталкиваются создатели микросфер, заключается в поиске подходящего для них материала. Он должен сохраняться в организме достаточно долго, но не вечно, и не вызывать сильного воспаления. С недавних пор специалисты обратили внимание на линейные полиэфирсы. Применение микросфер на основе сополимера молочной и гли-

колевой кислот (PLGA) как средств доставки лекарственных веществ возросло с расширением биотехнологического сектора [2].

Цель настоящей работы – оценить эффективность метода двойного эмульгирования при получении систем пролонгированного высвобождения на основе микросфер из PLGA на примере налтрексона гидрохлорида. Практический интерес представляет создание системы со сроком пролонгированного высвобождения налтрексона гидрохлорида около 28 дней.

Экспериментальная часть

В работе использовали: субстанцию налтрексона гидрохлорида (European Pharmacopoeia) производства фирмы Н.В. Органон (Нидерланды); сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA, 50:50) фирмы Evonik Industries (Германия); стабилизаторы устойчивости микросфер: метилцеллюлоза водорастворимая (МЦ) SM-100 фирмы Schin Etsu (Япония); поливиниловый спирт (ПВС ММ=40 000) фирмы Chang Chun Petrochemical Co. LTD (Тайвань); поливинилпирролидон среднемолекулярный медицинский 35 000±2000 (ПВП 35 000) фирмы ООО «АК Синтвита» (Россия), Lutrol F68 фирмы BASF (Германия); растворитель – хлористый метилен фирмы «Компонент-Реактив» (Россия).

Водный раствор гидрофильного ЛВ (налтрексона гидрохлорида) эмульгировали с органическим раствором полимера с образованием эмульсии типа «вода/масло». Эмульгирование проводили с помощью гомогенизатора. Первичную эмульсию затем приливали к внешней водной фазе, которая содержала стабилизаторы, и гомогенизировали с помощью ультразвуко-

вого диспергатора, гомогенизатора или лопастной мешалки.

Полученную эмульсию «вода/масло/вода» при включенной мешалке переливали в емкость с водой. Выдерживали реакционную смесь в течение 16–18 ч для дальнейшего удаления растворителя и затвердевания частиц.

Микросферы отделяли от водной фракции центрифугированием и несколько раз промывали водой. Полученный микрогранулят лиофилизировали.

Содержание налтрексона гидрохлорида в микросферах определяли методом ВЭЖХ (Стайер, Россия). Для оценки распределения частиц полимерной суспензии по размерам использовали лазерный анализатор частиц Beckman Coulter LS 13320 (США). Остаточное содержание хлористого метилена определяли методом ГЖХ (Shimadzu, Япония). Изучение профиля высвобождения налтрексона гидрохлорида из микросфер проводили при 37°C в прецизионной термостатирующей бане LOIP LB-224 (Россия) в 0.1 н. фосфатном буфере (pH 7.35–7.45) с добавлением небольшого количества эмульгатора (0.018% «Tween 20» по объему); концентрацию налтрексона гидрохлорида, перешедшего в раствор, определяли спектрофотометрически при 281±2 нм.

Результаты и их обсуждение

В качестве объекта исследований при получении системы с модифицированным высвобождением использовали налтрексона гидрохлорид. Налтрексон – антагонист опиоидных рецепторов. Химическая структура молекулы налтрексона гидрохлорида представлена на рис. 1.

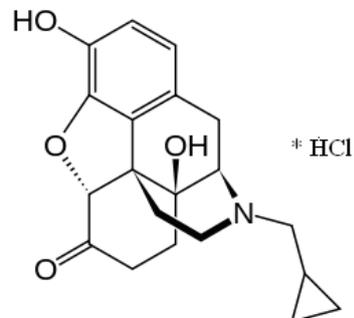


Рис. 1. Структурная формула налтрексона гидрохлорида.

Налтрексона гидрохлорид легко растворим в воде, малорастворим в 95% этиловом спирте, практически нерастворим в хлороформе и гексане, что обусловило выбор в качестве метода инкапсулирования метод двойного эмульгирования с диффузией органического растворителя в водную фазу [3]. Аппаратурная схема получения микросфер на основе PLGA представлена на рис. 2.

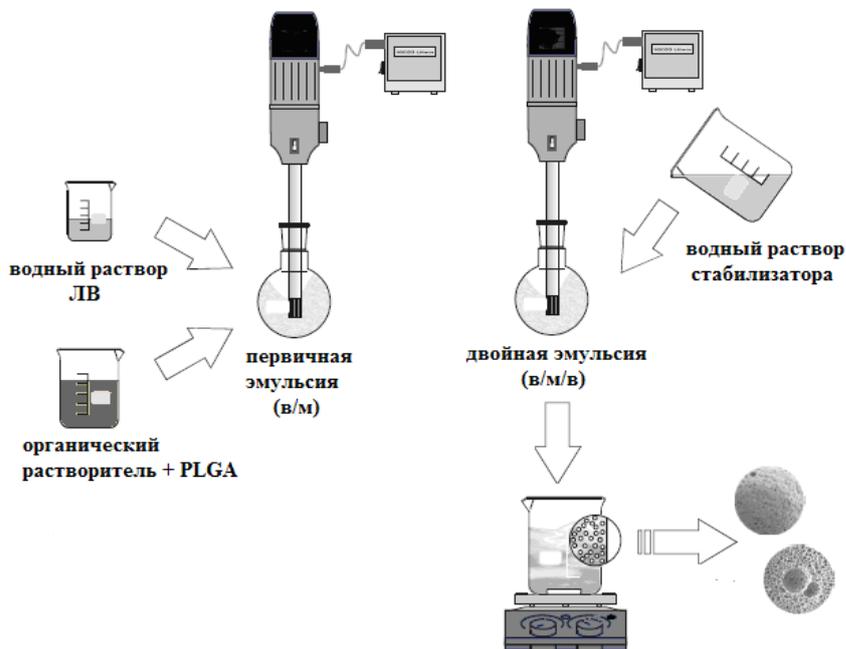


Рис. 2. Аппаратурная схема получения микросфер на основе PLGA методом двойного эмульгирования с диффузией органического растворителя в водную фазу.

Выбор растворителя играет решающую роль в процессе микрокапсулирования, поскольку большинство методов основано на использовании растворов полимеров как таковых, а также на явлении разделения фаз и образовании эмульсий. Важными характеристиками растворителя являются легучесть и температура кипения. В качестве раство-

рителя для получения микросфер налтрексона выбран хлористый метилен, так как он обладает высокой летучестью и низкой температурой кипения.

Метод двойного эмульгирования с диффузией органического растворителя в водную фазу особенно подходит для микрокапсулирования водорастворимых и чувствительных соединений, таких

как белки, пептиды и другие макромолекулы. Эффективность метода оценивается по следующим показателям: степень включения налтрексона в микросферы на основе PLGA и профиль высвобождения действующего вещества.

В ходе работы изучали следующие факторы, влияющие на размер микросфер: концентрация сополимера; используемый стабилизатор и его концентрация; объем внешней и

внутренней фазы; тип и скорость механического воздействия на вторичную эмульсию.

Была исследована зависимость размера микросфер, полученных по представленной выше технологии, от концентрации сополимера (при соблюдении прочих условий постоянными) (табл. 1). С увеличением концентрации раствора сополимера увеличивается размер микросфер.

Таблица 1. Зависимость размера микросфер налтрексона гидрохлорида от концентрации сополимера

Концентрация сополимера, % (мас./об.)	10.7	13.2	16.6
Размер микросфер, мкм	22	30	50

Определена зависимость размера микросфер от используемого стабилизатора и его концентрации (табл. 2).

Таблица 2. Зависимость размера микросфер налтрексона гидрохлорида от используемого стабилизатора и его концентрации

Концентрация стабилизатора, %	Стабилизатор			
	ПВС	МЦ	ПВП	ПВС и МЦ
0.5	агломерация	агломерация	агломерация	80 мкм, агломерация
1	81 мкм, агломерация	агломерация	агломерация	75 мкм, агломерация
2	55 мкм, агломерация	41.9 мкм	84 мкм, агломерация	50 мкм

Как видно из табл. 2, при увеличении концентрации стабилизатора размер микросфер уменьшается из-за усиления стабилизации на границе раздела фаз.

При использовании ПВС и ПВП в качестве стабилизатора происходит формирование недостаточно стабильных частиц. Эту проблему

решает использование в качестве стабилизатора сочетания ПВС с гидроколлоидом (МЦ), в результате формируются устойчивые к агрегации частицы нужного размера.

Изучено влияние объема внешней и внутренней фаз на размер микросфер налтрексона гидрохлорида (табл. 3 и 4).

Таблица 3. Зависимость размера микросфер налтрексона гидрохлорида от объема внешней фазы

Объем внешней воды, % (мас. PLGA/об.)	10	11.5	15	21.4
Размер микросфер, мкм	10.5	22	36	42

Как видно из табл. 3, с увеличением объема внешней водной фазы (раствора стабилизатора частиц) уменьшается размер микросфер. Это можно объяснить тем, что размер капель вторичной эмульсии может уменьшаться из-за уменьшения частоты столкновений капель в увеличенном объеме внешней фазы вторичной эмульсии.

Таблица 4. Зависимость размера микросфер налтрексона гидрохлорида от объема внутренней фазы

Объем внутренней воды, мл	0.4	0.6	1
Размер частиц, мкм	35.5	25.4	15.3

С увеличением объема внутренней водной фазы (раствора налтрексона гидрохлорида)

уменьшается размер капель первичной эмульсии, что способствует уменьшению размера микросфер (табл. 4). При увеличении объема внутренней фазы увеличивается количество капелек воды в первичной эмульсии «вода/масло», сами капли (внутренней фазы – водный раствор налтрексона гидрохлорида) укрупняются, что способствует повышению хрупкости полимерных частиц при втором эмульгировании во внешней водной фазе и последующей диффузии растворителя.

Нами исследовано влияние типа и скорости механического воздействия на вторичную эмульсию. Условия получения первичной эмульсии постоянные: гомогенизатор со скоростью вращения 6500 об/мин, время воздействия на эмульсию – 1 мин (табл. 5).

Таблица 5. Зависимость размера микросфер налтрексона гидрохлорида от типа и скорости механического воздействия

Тип механического устройства	Гомогенизатор	Ультразвуковой диспергатор	Лопастная мешалка
Параметры: скорость вращения, об/мин; мощность, % время обработки, мин	6500 об/мин 1	60% 1	250 об/мин 1
Размер микросфер, мкм	6 и 30	3	50 и 150

Большой размер частиц можно получить, гомогенизируя вторичную эмульсию с помощью лопастной мешалки, а наименьший – с использованием ультразвукового диспергатора. Также от типа механического воздействия зависит вид распределения частиц по размерам. Применяя ультразвуковое диспергирование, получали частицы с унимодальным распределением частиц по размерам, а применяя гомогенизатор и лопастную мешалку – бимодальное распределение частиц (рис. 3).

Таким образом, с увеличением силы механического воздействия на вторичную эмульсию уменьшается размер микросфер, а распределение частиц становится унимодальным.

Проведено исследование факторов, оказывающих влияние на эффективность инкапсуляции налтрексона гидрохлорида в микросферы на основании сополимера молочной и гликолевой кислот с соотношением мономерных звеньев 50:50.

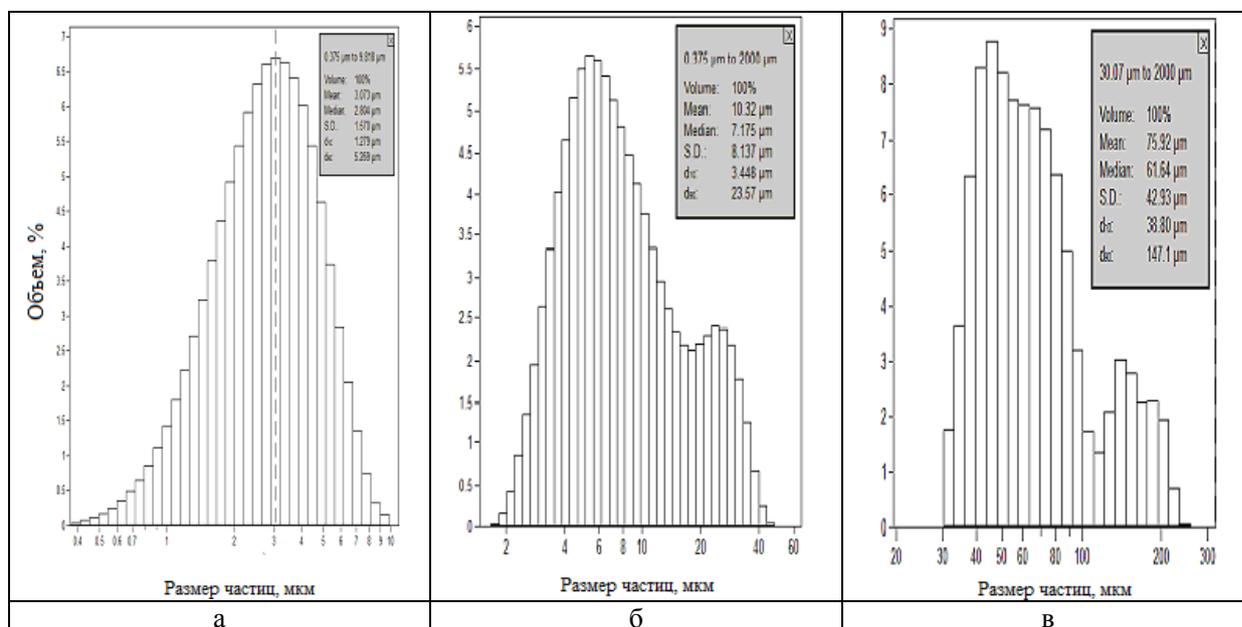


Рис. 3. Распределение частиц вторичной эмульсии по размерам: а – ультразвуковой диспергатор; б – гомогенизатор; в – лопастная мешалка.

Обнаружена зависимость эффективности инкапсуляции от стабильности первичной эмульсии

(табл. 6). Условия получения вторичной эмульсии постоянны (гомогенизатор, 6500 об/мин, 1 мин).

Таблица 6. Зависимость степени включения от состава первичной эмульсии

Вид и концентрация стабилизатора	1% ПВП	1% ПВС	1% Lutrol F68
Степень включения, %	15	23	8

Во время второй гомогенизации применяемая энергия разрушает первичную эмульсию так, что внутренняя водная фаза может смешиваться с внешней водной фазой, позволяя налтрексону выходить во внешнюю водную фазу. Это приводит к низкой степени включения, за исключением того, когда стабильность достаточно высокая, чтобы обеспечить энергетический барьер при перемешивании. Как видно из

результатов, представленных в табл. 7, поливиниловый спирт обеспечивает более высокую стабильность эмульсии.

Максимальной степени включения достигли при соотношении налтрексон:PLGA – 1:1. При дальнейшем увеличении концентрации налтрексона гидрохлорида по отношению к полимеру увеличение степени включения не происходит.

Таблица 7. Зависимость степени включения от количества вводимого налтрексона гидрохлорида

Соотношение налтрексон : PLGA	1:2	1:1.5	1:1.2	1:1	1:0.75
Степень включения, %	16	7	9	23	10

На основании проведенных экспериментов предложена рецептура микросфер на основе сополимера полилактида-ко-гликолида (50:50),

с размером частиц 30–50 мкм и степенью включения налтрексона до 25% (табл. 8).

Таблица 8. Рецептура получения микросфер на основе сополимера лактида и гликолида (50:50), содержащих налтрексон

Название вещества	Ед. измерения	Количество
Налтрексона гидрохлорид	г	1.5
PLGA (50:50)	г	1.5
Хлористый метилен	мл	9.4
Поливиниловый спирт	г	0.15
Метилцеллюлоза	г	0.14
Вода дистиллированная (внешняя и внутренняя фазы)	мл	8

На скорость гидролиза PLGA влияет соотношение индивидуальных мономерных компонентов (лактид и гликоид) в цепи сополимера. Полимеры PLGA, содержащие молочную и гликолевую кислоты в соотношении 50:50, гидролизуются значительно быстрее, чем сополимеры с большим содержанием молочной кислоты [4].

Остаточное содержание хлористого метилена в образцах по данным ГЖХ составило 0.25–0.5%, что соответствует требованиям ГФ XII, т. 1 по показателю «Остаточный органический растворитель» [5].

Изучение профиля высвобождения налтрексона гидрохлорида из микросфер показало, что уже в 1-й день в среду растворения перешло более 80% налтрексона гидрохлорида, что не соответствует требованиям, предъявляемым к пролонгированным препаратам.

Кроме того, проведенные эксперименты позволяют сделать вывод, что метод двойного эмульгирования малоприменим для получения систем с модифицированным высвобождением налтрексона гидрохлорида: степень включения налтрексона в микросферы на основе PLGA в наработанных сериях не превышала 25%.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Соснов А.В., Иванов Р.В., Балакин К.В., Шоболов Д.Л., Федотов Ю.А., Калмыков Ю.М. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц // Качественная клиническая практика. 2008. № 2. С. 4–12.
2. Park J.H., Ye M., Park K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs // *Molecules*. 2005. № 10. С. 146–161.
3. Алексеев К.В., Кедик С.А., Блынская Е.В., Лазарева Е.Е., Уваров Н.А., Алексеев В.К., Тихонова Н.В. Фармацевтическая технология. Твердые лекарственные формы: учебное пособие. М.: Изд-во ЗАО «Институт фармацевтических технологий», 2011. С. 408–425.
4. Алексеев К.В., Грицкова И.А., Кедик С.А. Полимеры для фармацевтической технологии: учебное пособие. М.: Изд-во ЗАО «Институт фармацевтических технологий», 2011. С. 468–497.
5. Государственная фармакопея XII издания. Т. 1. М.: Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2007. С. 115–118.

ESTIMATION OF EFFICIENCY OF DOUBLE EMULSIFICATION METHOD FOR THE PREPARATION OF NALTREXONE MICROSPHERES BASED ON POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) COPOLYMER

E.A. Petrova[@], S.A. Kedik, K.V. Alekseev, E.V. Blynskaya, A.V. Panov*, V.V. Suslov*, N.V. Tikhonova

M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technology, Moscow, 119571 Russia

** Institute of Pharmaceutical Technologies, Moscow, 121353, Russia*

@Corresponding author e-mail: elizaweta__@mail.ru

Administration of drug delivery systems allows reaching therapeutic efficiency in comparison with traditional dosage forms. Microspheres are used quite often as drug delivery systems in pharmaceutical technology. There are a polymeric carrier and a drug substance in microspheres. Incorporation of a drug substance in a polymeric matrix (carrier) extends the drug release duration by half a year. There are several methods for obtaining microspheres. Depending on the physical and chemical properties drug substances incorporate either by the double emulsification methods or by the single emulsification methods. Naltrexone hydrochloride is a water-soluble drug substance. It has antagonistic activity with respect to opioid receptors. Naltrexone incorporates into microspheres in the form of a water/oil/water type emulsion. In this work the factors that influence the size of microspheres and incorporation efficiency of Naltrexone were studied: the concentration of poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer (PLGA); the type of the stabilizer and its concentration; the volume of an external and internal phase; the type and speed of mechanical influence on a secondary emulsion. The method of double emulsification for drug delivery systems with modified release showed low efficiency: the efficiency of Naltrexone incorporation into microspheres didn't exceed 25%.

Key words: *microspheres, poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer, double emulsification method, Naltrexone.*