

ХИМИЯ

УДК 544.77+547.917

*В. И. КУЛИКОВСКАЯ, Д. И. ЕГОРОВ, академик В. Е. АГАБЕКОВ***ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА МИКРОЧАСТИЦ ПЕКТИНАТА КАЛЬЦИЯ,
СОДЕРЖАЩИХ МИРАМИСТИН***Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь
kulikouskaya@gmail.com; matt_l@mail.ru; agabekov@ichnm.basnet.by*

Получены микрочастицы пектината кальция с гидродинамическим диаметром 2–6 мкм методом распылительного высушивания. Разработана методика, позволяющая включать в них до 30 масс. % мирамистина. Показано, что в кислой среде (рН 2,0) включенный мирамистин полностью высвобождается через 2 ч. В физиологическом растворе через 48 ч релиз вещества составляет 2/3 от включенного количества. В щелочных средах через 2 сут. из микрочастиц пектината кальция высвобождается менее 5 % мирамистина.

Ключевые слова: микрочастицы, пектинат, мирамистин, эффективность включения, кинетика высвобождения.

*V. I. KULIKOUSKAYA, D. I. EGOROV, V. E. AGABEKOV***FABRICATION AND PROPERTIES OF MIRAMISTIN-CONTAINING CALCIUM PECTINATE
MICROPARTICLES***Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
kulikouskaya@gmail.com; matt_l@mail.ru; agabekov@ichnm.basnet.by*

Calcium pectinate microparticles with a hydrodynamic diameter of 2–6 μm were synthesized by the spray drying technique. The approach allowing one to entrap in them up to 30 wt. % of miramistin has been developed. It has been shown that all miramistin entrapped in microparticles fully releases in 2 hours in the acidic medium (pH 2.0). In the physiological solution, about 66 % of miramistin releases in 48 hours. In the alkali solution, less than 5 % of miramistin releases in 2 days.

Keywords: microparticles, pectinate, miramisti, entrapment efficiency, release kinetic.

Введение. В настоящее время разработка носителей для биологически активных веществ на основе полисахаридов, обеспечивающих пролонгированное высвобождение действующего вещества и/или его целевую доставку к органам и тканям, – одно из интенсивно развивающихся направлений в области создания новых лекарственных форм [1–3]. Преимуществом таких форм по сравнению с традиционными является повышение лечебного эффекта за счет уменьшения побочных действий препарата и периодичности его введения. Использование полисахаридов, в частности пектинов, для формирования носителей обусловлено их биосовместимостью, биодegradуемостью и нетоксичностью. Пектины также обладают собственной физиологической активностью, в том числе иммуномодулирующим действием [4], и широко используются в пищевой промышленности в качестве загустителей, желеобразующих агентов, стабилизаторов.

Среди многочисленных методов получения микрочастиц, основанных на испарении растворителя, технология распылительного высушивания (spray drying) широко используется в фармацевтической промышленности из-за ее несомненных достоинств, к которым относятся быстрота и легкость регулирования процесса, а также отсутствие необходимости дополнительной очистки и обработки получаемых микрочастиц [5; 6].

Перспективным антибактериальным веществом для лечения различных инфекций является мирамистин. Он оказывает гидрофобное влияние на цитоплазматические мембраны микроорганизмов, тем самым увеличивая проницаемость этих мембран и клеточных стенок и приводя к их разрушению. Активность препарата распространяется на все грамотрицательные и грамположительные, анаэробные и аэробные, аспорогенные и спорообразующие бактерии в виде микробных ассоциаций и монокультур, включая различные штаммы с устойчивостью к антибиотикам. В настоящее время мирамистин используется в виде 0,01 %-ного раствора для местного применения и гидрогелевых пластин с содержанием действующего вещества 0,05 масс. %. Создание его капсулированной формы является важной задачей для фармакологии.

Цель работы – получение микрочастиц пектината кальция, содержащих мирамистин, и изучение кинетики высвобождения из них действующего вещества в растворах, моделирующих физиологические среды человеческого организма.

Экспериментальная часть. Микрочастицы пектина получали методом распылительного высушивания. Водный раствор пектина (Herbstrait & Fox, АВ 901, степень этерификации 34–42 %) с концентрацией 7,5 мг/мл подвергался распылению на лабораторной установке Labultima LU 222 Advanced (диаметр сопла 0,7 мм). Условия получения пектиновых частиц: температура воздуха на входе в сушильную камеру 200 °С и на выходе из нее 70 °С, скорость подачи воздуха 100 м³/мин, а раствора 3 мл/мин. Полученные микросферы пектина диспергировали в этаноле и по каплям добавляли 0,1 М водный раствор CaCl₂, формируя микрочастицы пектината кальция (ПектСа МЧ).

Мирамистин включали в микрочастицы пектината кальция путем сорбции. Для этого 25 мг полисахаридных микрочастиц диспергировали в 1,5 мл водного раствора мирамистина, выдерживали 2 ч и центрифугировали (ИКА mini G, 6000 об/мин, 10 мин). В супернатанте спектрофотометрически (Solar CM 2203, Беларусь) определяли количество не включенного мирамистина по предварительно построенному калибровочному графику $A_{\lambda = 260 \text{ нм}} = f(C_{\text{мирамистина}})$ (рис. 1, кривая 1). При сорбции его концентрацию варьировали в диапазоне от 0,3 до 9,6 мг/мл.

Эффективность включения (ЭВ) и массовую долю (ω) мирамистина в микрочастицах рассчитывали по формулам

$$\text{ЭВ} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} 100 \%,$$

где m_1 – масса мирамистина в супернатанте, мг; m_0 – исходная масса мирамистина, мг;

$$\omega = \frac{m_0 - m_1}{m_{\text{ч}}} 100 \%,$$

где $m_{\text{ч}}$ – масса лиофильного порошка микрочастиц пектината кальция с мирамистином, мг.

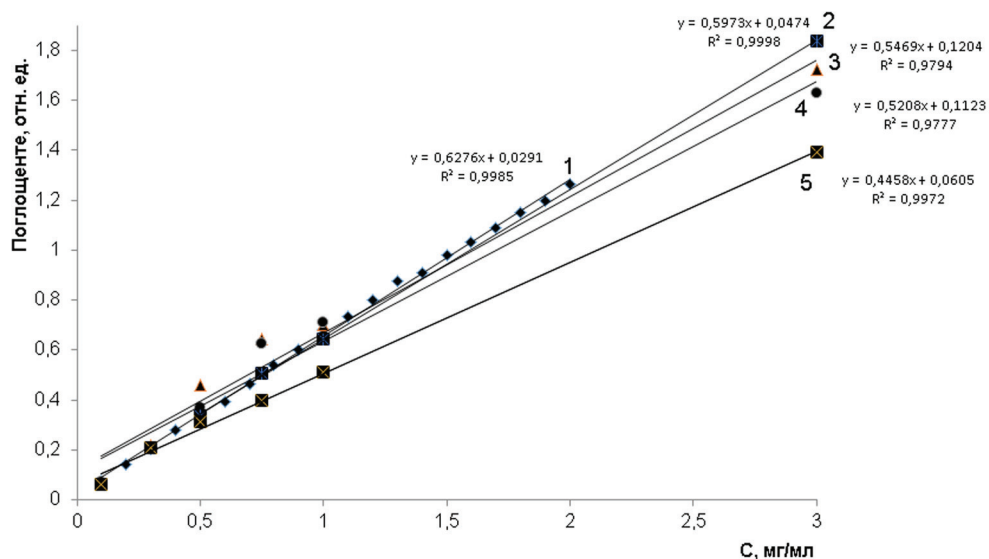


Рис. 1. Зависимость поглощения мирамистина при 260 нм от его концентрации в водном растворе (1), соляной кислоте (2), фосфатном буфере (3), гидроксиде натрия (4) и 0,9 %-ном хлориде натрия (5)

Закономерности высвобождения мирамистина из микрочастиц пектината кальция изучали в физиологическом растворе (0,9 % NaCl, pH 5,5, I = 0,16 моль/кг), фосфатном (PBS, pH 7,4, I = 0,17 моль/кг) буфере, а также в кислой (HCl, pH 2, I = 0,01 моль/кг) и щелочной (NaOH, pH 9, I = $1 \cdot 10^{-5}$ моль/кг) средах. К влажному осадку микрочастиц пектината кальция с мирамистином (65 мг в пересчете на сухое вещество) добавляли 10 мл модельного раствора, через определенные промежутки времени образцы центрифугировали (6000 об/мин, 10 мин), отбирали 5 мл супернатанта и добавляли 5 мл свежей среды. В супернатанте спектрофотометрически определяли количество высвободившегося мирамистина по соответствующему калибровочному графику (рис. 1, кривые 2–5).

Гидродинамический диаметр и ζ -потенциал частиц измеряли на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Оптические микрофотографии пектинатных частиц получали на оптическом микроскопе Микро МБ (Planar, Беларусь) в камере Горяева. Размеры частиц и морфологию их поверхности также исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на микроскопе JEM-100 CX (Япония). Частицы адсорбировали на коллодиевую пленку, нанесенную на медную сеточку, и сушили при комнатной температуре.

Результаты и их обсуждение. Полимерные микрочастицы, получаемые методом распылительного высушивания, обладают теми же физико-химическими свойствами, что и исходное вещество. Следовательно, микрочастицы пектина, как и сам полисахарид, растворимы в воде и непригодны для использования в качестве контейнеров биологически активных веществ. С целью получения полисахаридных микросфер, нерастворимых в воде, микрочастицы пектина были дополнительно обработаны раствором хлорида кальция. Известно, что катионы кальция взаимодействуют с макромолекулами пектина с образованием координационных связей с двумя гидроксильными и электростатических с карбоксильными группами полисахарида, что приводит к формированию геля [7]. Синтезированные микрочастицы пектината кальция нерастворимы в воде и имеют сферическую форму (рис. 2, а). Гидродинамический диаметр частиц составляет ~2–6 мкм (рис. 2, в), а их размер в высушенном состоянии уменьшается до 1–2 мкм (рис. 2, б). Полученные микрочастицы заряжены отрицательно: значение их дзета-потенциала по абсолютной

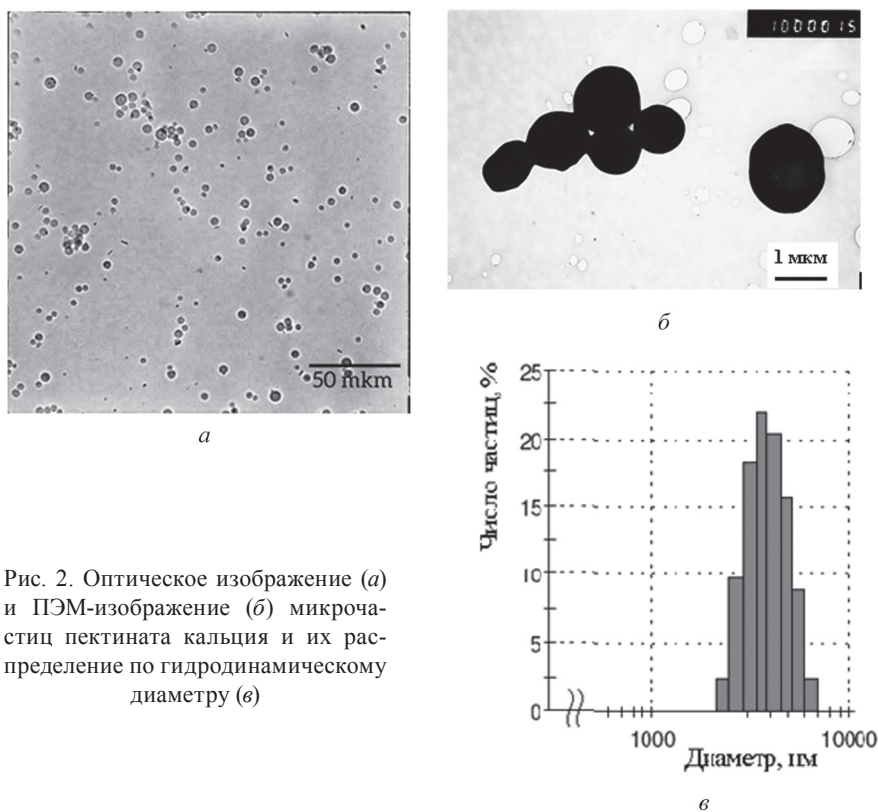


Рис. 2. Оптическое изображение (а) и ПЭМ-изображение (б) микрочастиц пектината кальция и их распределение по гидродинамическому диаметру (в)

величине составляет 7,7 мВ. Следовательно, они могут быть использованы для включения положительно заряженного мирамистина.

При сорбции мирамистина в микрочастицы пектината кальция изменение концентрации его водного раствора от 0,3 до 0,8 мг/мл приводит к увеличению эффективности включения от 77,9 до 99,5 % (рис. 3). Дальнейшее повышение содержания мирамистина не влияет на ЭВ и для всего изученного концентрационного диапазона (0,8–9,6 мг/мл) составляет >97,0 % (рис. 3). Высокие значения ЭВ мирамистина обусловлены, вероятно, тем, что его включение в микрочастицы пектината кальция происходит не только механически, но и за счет электростатического взаимодействия отрицательно заряженных ПектСа МЧ и положительно заряженных молекул БАВ. При увеличении концентрации мирамистина в растворе от 0,3 до 9,6 мг/мл массовая доля включенного БАВ в пектинатных частицах возрастает от 1,6 до 29,6 % (рис. 3). Варьируя содержание мирамистина в растворе, можно получать ПектСа МЧ с заданным содержанием вещества до 30 масс. % (рис. 3). Следует отметить, что мирамистин прочно удерживается в полисахаридных контейнерах. Так, при хранении в дистиллированной воде суспензии микрочастиц пектината кальция с мирамистином через 48 ч высвобождение БАВ составило менее 1 % от включенного.

Закономерности высвобождения мирамистина из микрочастиц пектината кальция изучали в растворах, моделирующих физиологические среды человеческого организма. Микрочастицы пектината кальция представляют собой иотропные гели, которые являются обратимыми, так как их пространственная структурная сетка закреплена за счет переплетения молекул и ионных, водородных связей и гидрофобных взаимодействий, которые могут быть разрушены при изменении ионной силы и рН среды. Следовательно, высвобождение мирамистина из микрочастиц пектината кальция может протекать как за счет десорбции, так и в результате разрушения ПектСа МЧ.

В фосфатном буфере (рН 7,4) и растворе гидроксида натрия (рН 9,0) через 48 ч высвобождается менее 5 % от включенного мирамистина. Это может быть связано с тем, что мирамистин, будучи четвертичным аммониевым соединением, удерживается в отрицательно заряженных микрочастицах пектината кальция преимущественно за счет электростатических взаимодействий. В щелочных средах степень ионизации карбоксильных групп полисахарида увеличивается, что приводит к усилению взаимодействия между полимерной матрицей и мирамистином, в результате чего включенное вещество не высвобождается. В кислой среде (рН 2,0), напротив, степень ионизации СООН-групп пектина уменьшается, что приводит к ослаблению взаимодействия между полисахаридными микрочастицами и мирамистином, половина от включенного количества которого высвобождается из ПектСа МЧ через 0,5 ч, а уже через 2 ч кинетическая кривая запределивается и наблюдается полный релиз включенного вещества (рис. 4, кривая 1). В первые два часа ($t = 0-2$ ч) скорость высвобождения мирамистина нелинейна и относительно высока (так называемое взрывное высвобождение [8]), что позволяет сделать вывод о преимущественном вкладе диффузии в процесс релиза вещества из пектинатных микрочастиц. В физио-

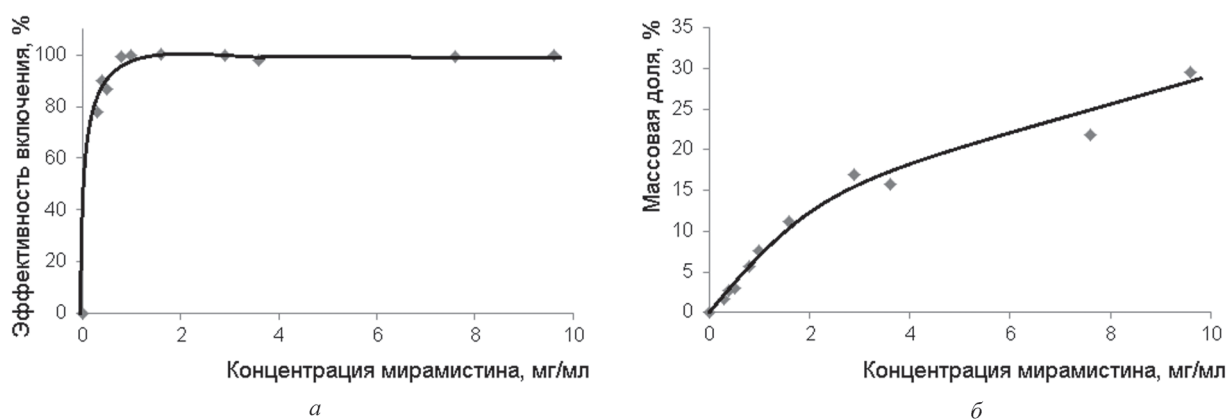


Рис. 3. Зависимость эффективности включения (а) и массовой доли мирамистина в микрочастицах пектината кальция (б) от его концентрации

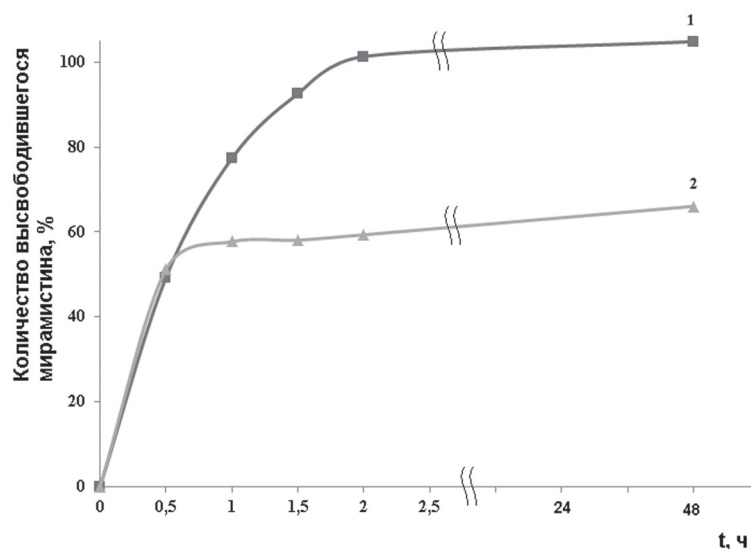


Рис. 4. Кинетические кривые высвобождения мирамистина из микрочастиц пектината кальция в растворах соляной кислоты (1) и 0,9 %-ного хлорида натрия (2)

логическом растворе половина от включенного мирамистина также высвобождается через 0,5 ч, однако после этого кинетическая кривая запределивается: через 1 ч количество высвободившегося мирамистина составляет 57 %, а через 48 ч – 66 % (рис. 4, кривая 2). Так как pH физиологического раствора, как и дистиллированной воды, равен 5,5, то закономерности высвобождения в нем мирамистина из микрочастиц пектината кальция обусловлены только изменением ионной силы среды. Наличие низкомолекулярного электролита (хлорида натрия) может приводить к экранированию зарядов микрочастиц пектината кальция и молекул мирамистина, что приводит к ослаблению их взаимодействия и высвобождению части включенного вещества.

Заключение. Получены микрочастицы пектината кальция, пригодные для включения водорастворимых биологически активных веществ. Разработана методика, позволяющая получать микрочастицы пектината кальция, содержащие до 30 масс. % мирамистина. Показано, что включенный мирамистин полностью высвобождается только в кислой среде. В физиологическом растворе через 48 ч релиз вещества составляет 2/3 от включенного количества. В щелочных средах мирамистин прочно удерживается в носителе: через 2 сут. из микрочастиц пектината кальция высвобождается менее 5 % от включенного вещества.

Список использованной литературы

1. Song, Y. B. α -Tocopherol-loaded Ca-pectinate microcapsules: optimization, *in vitro* release and bioavailability / Y. B. Song, J. S. Lee, H. G. Lee // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2009. – Vol. 73, N 2. – P. 394–398.
2. Sriamornsak, P. Application of pectin in oral drug delivery / P. Sriamornsak // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2011. – Vol. 8, N 8. – P. 1009–1023.
3. Ogaji, I. J. Advances in natural polymers as pharmaceutical excipients / I. J. Ogaji, E. I. Nep, J. D. Audu-Peter // *Pharm. Anal. Acta*. – 2011. – Vol. 3, N 1. – P. 146.
4. Потиевский, Э. Г. Медицинские аспекты применения пектина / Э. Г. Потиевский, А. И. Новиков. – М.: Мед. книга, 2002.
5. Получение полимерных микрочастиц с биологически активными веществами методом распылительной сушки (обзор литературы) / С. А. Кедик [и др.] // *Вестн. ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. – 2014. – № 2. – С. 28–32.
6. Vehring, R. Pharmaceutical particle engineering via spray drying / R. Vehring // *Pharm. Res*. – 2008. – Vol. 25, N 5. – P. 999–1022.
7. Thibault, J. F. Chain association of pectic molecules during calcium-induced gelation / J. F. Thibault, M. Rinaudo // *Biopolymers*. – 1986. – Vol. 25. – P. 455–468.
8. Григорьева, М. В. Полимерные системы с контролируемым высвобождением биологически активных соединений / М. В. Григорьева // *Биотехнология*. – 2011. – Т. 4, № 2. – С. 9–23.

Поступило в редакцию 20.04.2015