

МИКРОНИЗАЦИЯ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОГО АНТИСОЛЬВЕНТНОГО ОСАЖДЕНИЯ

¹Е. В. Кудряшова*, ¹И. М. Дейген, ¹К. В. Суховерков, ¹Л. Ю. Филатова,
¹Н. Л. Клячко, ^{1,2}А. М. Воробей, ²О. И. Покровский, ^{1,2}К. Б. Устинович,
^{1,2}О. О. Паренаго, ³Е. Н. Антонов, ³А. Г. Дунаев, ³Л. И. Кротова,
³В. К. Попов, ^{1,4}А. М. Егоров

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН, Москва, Россия

³Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Троицк (Москва), Россия

⁴Российская медицинская академия последипломного образования Министерства здравоохранения Российской Федерации (РМАПО), Москва, Россия

*Helena_Koudriachova@hotmail.com

Поступила в редакцию 28.10.2015 г.

Исследован процесс микронизации левофлоксацина (ЛФ) (антибактериального препарата группы фторхинолонов) методом сверхкритического антисольвентного осаждения (SAS). Показано, что в зависимости от типа растворителя, используемого для проведения микронизации методом SAS, образуются частицы ЛФ различного размера (от 1 до 10 микрон) и различной морфологии (от тонких пластин до вытянутых параллелепипедов). Исследования микронизированных субстанций ЛФ методами спектроскопии ИК-Фурье, комбинационного рассеяния и кругового дихроизма показали, что микронизация ЛФ не приводит к изменению его химической структуры или рацемизации. Микронизация ЛФ оказывает заметное влияние на скорость его растворения в модельных средах, причем ее величина зависит от типа растворителя, используемого для проведения микронизации. Так, при рН = 4 наибольшую скорость растворения демонстрируют препараты ЛФ, микронизированные с использованием хлоруглеводородов. Показано, что при рН = 7,5 скорость растворения всех микронизированных препаратов на 15–30 % выше по сравнению с исходным ЛФ, что может быть связано с изменением степени кристалличности/аморфности, а также морфологии формирующихся в процессе SAS микрочастиц.

Ключевые слова: левофлоксацин, СКФ микронизация, метод сверхкритического антисольвентного осаждения (SAS), ИК спектроскопия, КР спектроскопия, КД спектроскопия, растворимость.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений в создании новых лекарственных форм является использование принципов сверхкритических флюидных (СКФ) технологий [1–11]. Применение методов СКФ для микронизации и инкапсуляции лекарств в полимерные микрочастицы обеспечивает целый ряд неоспоримых преимуществ по сравнению с традиционными технологиями, используемыми в со-

временной фармации и биоинженерии. Уникальные свойства СКФ (регулируемая плотность, довольно высокая растворяющая способность, низкая вязкость, отсутствие поверхностного натяжения) позволяют получать частицы с заданным распределением по размерам, более точно и в широком диапазоне варьировать состав, морфологию, структуру, кристалличность/аморфность лекарственной субстанции, что крайне важно при создании лекарств с контролируруемыми биодоступностью и фармакокинетическими характеристиками.

Настоящая работа посвящена применению метода СКФ микронизации для разработки новых лекарственных форм левофлоксацина — высокоэффективного антибактериального препарата группы фторхинолонов с широкими показаниями к применению. В последние годы фторхинолоны все шире применяются для лечения туберкулеза [12]. Однако фторхинолоны, как и большинство антибиотиков, не лишены побочных эффектов, выраженность которых можно снизить уменьшением терапевтической дозы лекарства. Применение СКФ технологий для микронизации и инкапсулирования лекарственной субстанции в полимерные микрочастицы [1—7] открывает возможность разрабатывать новые лекарственные формы с пролонгированным действием и адресной доставкой, что может позволить снизить дозировку лекарственных препаратов, уменьшить токсичность, сократить сроки лечения.

Для инкапсуляции лекарственной субстанции в полимерные микрочастицы с использованием СКФ технологий первоначально необходимо исследовать влияние процесса микронизации на физико-химические свойства субстанции ЛФ, чему и посвящена настоящая работа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сверхкритическое антисольвентное осаждение левофлоксацина (SAS) проводили с использованием установки RESS/SAS «Waters Corp.» (рис. 1) [8, 9]. Микронизацию ЛФ проводили по следующей методике. Готовили растворы ЛФ в органическом растворителе при комнатной температуре. При необходимости использовали ультразвуковую баню. После запуска установки задавали рабочие параметры давления, температуры всех термостатируемых блоков и скорости потока СК-СО₂ и дожидались их выхода на заданные значения. Жидкостной насос 7 заполняли чистым растворителем и проводили распыление 10—20 мл чистого растворителя с рабочей скоростью в осадительный сосуд 8 с целью уравнивания состава флюида в сосуде. Сразу после этого входную линию насоса 7 перемещали в емкость 6 с раствором ЛФ и проводили его распыление/осаждение с той же объемной скоростью в сосуд 8. При распылении раствора в поток СК-СО₂ происходит мгновенное смешение органического растворителя и СО₂; полученная смесь обладает низкой растворяющей способностью по отношению к ЛФ, что приводит к резкому осаждению последнего во всем объеме. По израсходовании раствора целевого вещества дополнительно подавали в систему 20—25 мл чистого органического растворителя с целью промывки всех трубок и кранов, предшествующих распылительной форсунке. После этого выдерживали поток СК-СО₂ в осадительном сосуде еще в течение 20 минут с целью удаления из сосуда остатков органического растворителя во избежание его взаимодействия с осевшим порошком после сброса давления. Органический растворитель в ходе процесса распыления и промывки выносится сверхкритическим СО₂ из линии высокого давления, от которого затем отделяется в циклонном сепараторе 10. Затем останавливали поток СО₂ и с использованием автоматического регулятора давления 9 осуществляли плавный

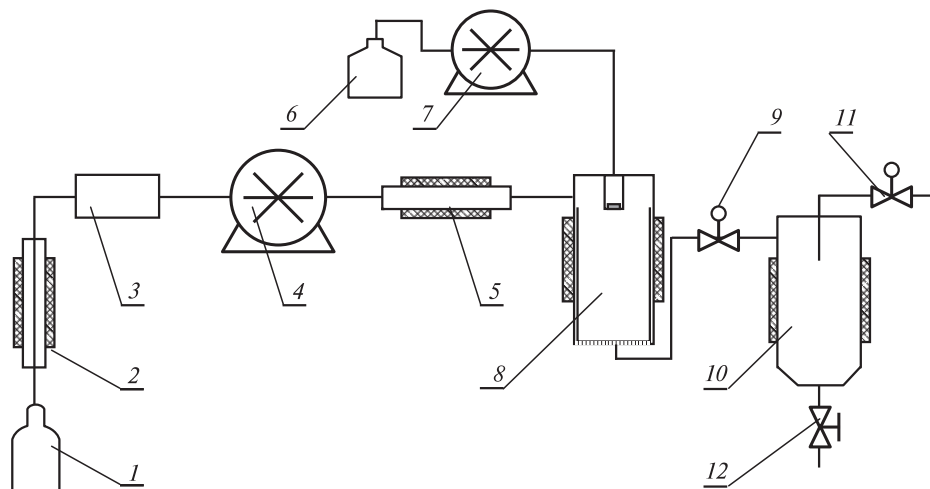


Рис. 1. Схема установки для проведения микронизации с помощью процесса SAS:

1 — источник CO_2 ; 2 — охлаждающий теплообменник; 3 — расходомер Кориолиса; 4 — насос CO_2 ; 5 — нагреватель; 6 — емкость с раствором лекарственной субстанции ЛФ; 7 — насос раствора; 8 — осадительный сосуд; 9 — автоматический регулятор давления; 10 — циклонный сепаратор; 11 — ручной регулятор давления; 12 — сливной кран

сброс давления. Полученный порошок извлекали из осадительного сосуда при помощи встроенной корзины. Во всех опытах скорость потока раствора поддерживали равной 1 мл/мин, скорость потока CO_2 составляла 50 г/мин (по данным массового расходомера), давление — 150 бар, температура — 40 °С, диаметр распылительной форсунки — 100 микрон. Использовались следующие растворители: хлороформ, дихлорметан, 1,2-дихлорэтан, метанол, ледяная уксусная кислота, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамид (ДМФА), этилацетат. Концентрация ЛФ во всех растворах органических растворителей, кроме метанола и этилацетата, была равной 25 мг/мл. Концентрация ЛФ в метаноле была 12,5 мг/мл, в этилацетате — 6,25 мг/мл из-за более низкой растворимости ЛФ в этих растворителях.

Сканирующая электронная микроскопия. Анализ исходного левофлоксацина и его микронизированных форм проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с помощью микроскопа LEO 1450 (Карл Цейс, Германия). Для этого исследуемые образцы помещались на проводящую (углеродную) клейкую ленту, на которую затем методом плазменного напыления наносилась тонкая (~0,05–0,1 мкм) пленка золота, обеспечивающая требуемую электропроводность их поверхности [3, 6, 7]. Анализ размеров микронизированных частиц проводили с использованием программного обеспечения IP3. Для этого вручную обрабатывали изображения частиц на нескольких СЭМ-фотографиях исследуемого образца. Для каждой частицы определяли максимальный диаметр. Далее из полученных таким образом данных находили среднее значение.

Спектроскопия кругового дихроизма (КД). КД-спектры ЛФ и его микронизированных форм регистрировали с помощью КД-спектрометра J-815 фирмы «Jasco» (Япония), оснащенного термостатируемой ячейкой. Измерения проводили в диапазоне длин волн 200–300 нм при температуре 25 °С в кварцевой кювете ($l = 1$ мм). Спектры получали 5-кратным сканированием с шагом 2 нм по методике, описанной в работе [13]. Измерение проводилось в водном растворе соляной кислоты (рН = 2) с концентрацией ЛФ 0,1–0,5 мг/мл.

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР). Для изучения спектров комбинационного рассеяния ЛФ использовался дисперсионный спектрометр комбинационного рассеяния Almega XR (производитель «Thermo Scientific») с конфокальным микроскопом [2]. Максимальное пространственное разрешение по поверхности образца могло составлять 1 мкм. Разрешение по глубине — до 2 мкм. Регистрируемые данные автоматически обрабатывались программой OMNIC. Регистрация спектров осуществлялась при длине волны возбуждающего лазера 532 нм. Мощность лазерного излучения выбиралась в диапазоне 16—100 % от максимальной мощности лазера, составлявшей 8 мВт. Мощность измерялась прибором Fildmaster («Coherent Inc.»). Длительность регистрации спектра, при которой достигалось необходимое соотношение сигнал/шум, составляла 10 минут.

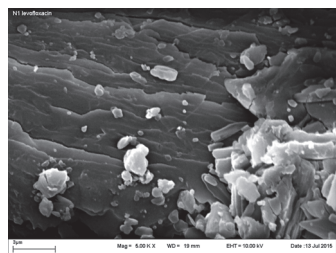
Инфракрасная (ИК) Фурье-спектроскопия. Спектры рассеяния порошка ЛФ, разбавленного порошком КВг в 4 раза (по весу), регистрировались на ИК-Фурье спектрометре Nicolet (Impact 410, США) с разрешением 4 см^{-1} за 64 скана и обрабатывались программой OMNIC [2].

ИК спектры ЛФ и его микронизированных форм в водных растворах (в 15 мМ фосфатном буферном растворе, pH = 7,5, либо в водном растворе соляной кислоты, pH = 4) регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Tensor 27 («Bruker», Германия), оснащенного термостатом Huber (США) при 22 °С [14].

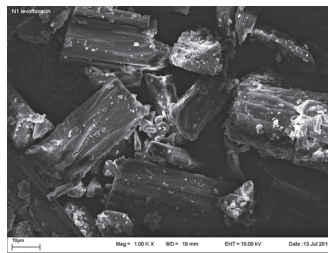
Определение растворимости ЛФ. 6—10 мг препарата суспендировали в 200—300 мкл натрий-фосфатного буферного раствора (15 мМ, pH = 7,5) либо водного раствора соляной кислоты (pH = 4) и инкубировали в шейкере при 37 °С и 200 об/мин. Через заданные промежутки времени отбирали аликвоты 25 мкл и центрифугировали их при 15000 об/мин в течение 15 мин. Затем отбирали пробу супернатанта, которую путем последовательных разведений разбавляли в 2000—3000 раз фосфатным буферным раствором либо водным раствором соляной кислоты. С помощью прибора Ultrospec 2100 («American Biosharm», США) регистрировали УФ спектр полученного раствора в диапазоне 260—330 нм при 25 °С. Содержание левофлоксацина в насыщенном растворе определяли по поглощению при длине волны 286 нм (pH = 7,5) либо 292 нм (pH = 4) с использованием соответствующих калибровочных зависимостей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

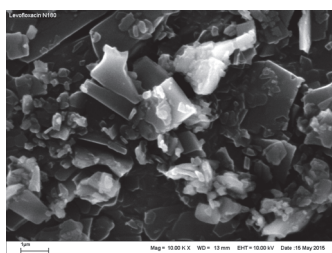
На рис. 2 приведены СЭМ-микрофотографии частиц ЛФ, микронизированного с использованием различных растворителей, в сравнении с исходным препаратом ЛФ. Частицы исходного ЛФ представляют собой фрагменты неправильной формы, так называемые «глыбы», часто удлинённые, в виде вытянутых параллелепипедов, со средним размером ~60 микрон (таблица 1). В зависимости от типа растворителя, используемого для проведения микронизации методом SAS, образуются частицы ЛФ различного размера — от 1 до 10 микрон. Отметим, что в качестве размера частиц в таблице 1 представлена длина микрочастиц в наиболее протяжённом направлении. Размер и морфология частиц ЛФ, микронизированного с использованием растворителей различного типа, приведены в таблице 1. Размер частиц всех обработанных порошков на порядок меньше, чем размер частиц исходного порошка. При этом размер частиц образцов 180 и 185 (микронизированных с использованием хлороформа и уксусной кислоты) является наименьшим, а образца 188 (микронизированного из ДМФА) — наибольшим среди представленных микронизированных образцов. Морфология микронизированных



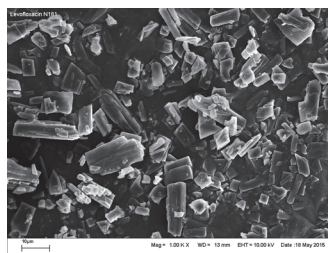
a



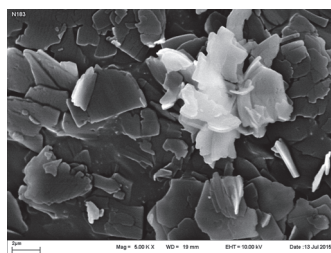
б



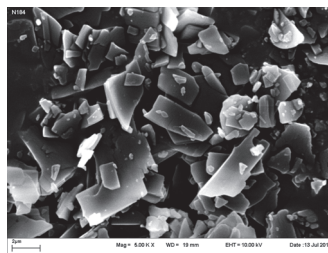
в



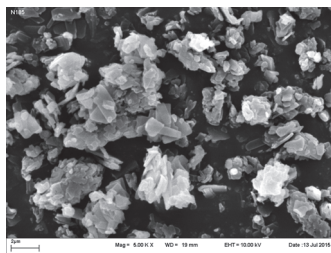
з



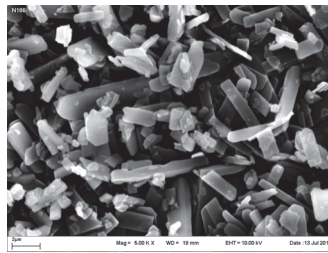
д



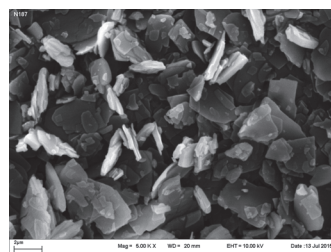
е



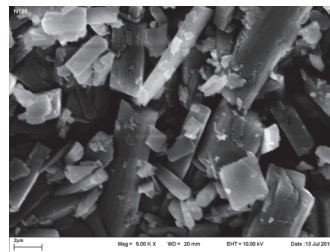
ж



з



и



к

Рис. 2. Микрофотографии образцов левофлоксацина:
a, б — исходный ЛФ; *в, з* — образцы 180—181; *д—к* — образцы 183—188

Таблица 1

Размер и морфология частиц ЛФ, микронизированного с использованием растворителей различного типа

Образец ЛФ	Растворитель	Состав раствора	Размер частиц, мкм (отн. погр., %)	Доверит. интервал, мкм	Морфология
Исходный	—	—	61,2 (8)	5,0	Анизотропные прямоугольники, глыбы
№ 180	Хлороформ	0,25 г/10 мл	1,4 (5)	0,1	Неправильные формы, близкие к параллелепипедам
№ 181	ДМСО	0,25 г/10 мл	6,6 ₅ * (10)	0,6 ₅	Вытянутые параллелепипеды
№ 183	Дихлорметан	0,25 г/10 мл	3,7 (4)	0,1 ₅	Тонкие пластины с неровными краями
№ 184	1,2-дихлорэтан	0,25 г/10 мл	2,9 (6)	0,2	Неправильные формы, близкие к параллелепипедам
№ 185	Лед. уксусная кислота	0,25 г/10 мл	1,6 ₅ (6)	0,1	Агрегированные частицы неправильной формы
№ 186	Метанол	0,25 г/20 мл	4,1 (6)	0,2 ₅	Вытянутые параллелепипеды
№ 187	Этилацетат	0,25 г/40 мл	1,6 (6)	0,1	Неправильные формы, близкие к параллелепипедам
№ 188	ДМФА	0,25 г/10 мл	8,8 (6)	0,5	Вытянутые параллелепипеды

* — обозначение неокругляемой пятерки после последней значащей цифры.

частиц также существенно зависит от типа растворителя и изменяется от тонких пластин (как в хлороформе и дихлорметане, образцы 180 и 183) до вытянутых параллелепипедов (как, например, в метаноле и ДМФА, образцы 186 и 188).

Анализ СЭМ-фотографий микронизированных форм ЛФ позволяет разделить использованные органические растворители на две условные группы по морфологии полученных микрочастиц. К первой группе относятся хлоруглеводороды — хлороформ, дихлорметан и 1,2-дихлорэтан. При их использовании получают частицы в форме тонких пластин, нередко с ажурными краями. Типичные примеры, соответствующие ЛФ, осажденному из хлороформа и дихлорметана методом SAS, представлены на рис. 2в и 2д. При осаждении из других растворителей (метанол, ДМСО, ДМФА) образуются преимущественно микрочастицы, имеющие форму параллелепипедов, вытянутых вдоль одной из осей. Типичная картина приведена на рис. 2к, где представлена микрофотография ЛФ, осажденного из ДМФА. Сходство в морфологии частиц внутри второй группы наблюдается, несмотря на значительную разницу в структурах и свойствах растворителей. В случае микронизации с использованием уксусной кислоты и этилацетата наблюдается смешанная картина. На СЭМ-фотографиях (уксусная кислота — рис. 2ж, образец 185;

этилацетат — рис. 2и, образец 187) видны как ажурные пластины, так и вытянутые параллелепипеды. На данный момент у нас нет четкого понимания механизма влияния типа органического растворителя на морфологию микрочастиц ЛФ, однако установление того факта, что растворители в SAS можно группировать по типам морфологий получаемых частиц, является примечательным и станет предметом более детального изучения в дальнейшей работе.

Спектральные характеристики микронизированных субстанций ЛФ в форме порошков исследовались методами спектроскопии комбинационного рассеяния и ИК-Фурье спектроскопии. Выбранный спектральный диапазон составлял 300—1800 см^{-1} . Спектральные полосы в области 300 см^{-1} , соответствующие валентным колебаниям С—Н связи различных молекулярных групп, как правило, недостаточно информативны ввиду сильного перекрытия полос от различных молекулярных групп. Большой селективности можно достичь при исследовании ИК спектров в области 400—1800 см^{-1} , в которой лежат полосы поглощения, обусловленные валентными колебаниями двойных связей С=С, С=О, валентными колебаниями «тяжелых» атомов — кислорода, азота, фтора и различными деформационными колебаниями.

ИК и КР спектры ЛФ в диапазоне 400—1800 см^{-1} представлены на рис. 3. Для большей информативности весь спектральный диапазон разбит на две области (рис. 3а и 3б), в каждой из которых сопоставлены спектры ИК (верхний) и КР (нижний).

Значительная часть полос в ИК и КР спектрах совпадает, но при этом их интенсивности кардинально отличаются вследствие различий в правилах отбора. Исключение составляет полоса в районе 1620 см^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$), которая является наиболее сильной как в ИК, так и в КР спектрах. Идентификация спектральных полос была проведена на основе литературных данных [15—16]. Поскольку молекула ЛФ весьма сложная, то в ее спектрах имеет место наложение полос, принадлежащих разным типам колебаний различных молекулярных групп. Для аналитических целей наибольший интерес представляют полосы: 540,77 см^{-1} — $\delta_{\text{C-C}}$ в [15] (Ar — бензольное кольцо); 1358,88 см^{-1} — $\delta_{\text{O-H}}$ в COOH [16] + δ_{CH} + δ_{CH_2} + δ_{CH_3} [17]; 1397,18 см^{-1} — $\delta_{\text{O-H}}$ в COOH [15, 16]; 1440,15 см^{-1} — $\delta_{\text{O-H}}$ в COOH димер [15] + δ_{CH} + δ_{CH_2} + δ_{CH_3} + δ_{CH_3} [17]; 1615,80 см^{-1} — $\nu_{\text{C=O}}$ [15, 16]; 1725,87 см^{-1} — $\nu_{\text{C=O}}$ в COOH [15, 16]. Указанные полосы являются наиболее сильными и слабо маскируются другими полосами.

Спектры КР левофлоксацина, кристаллизованного методом SAS из разных растворителей, представлены на рис. 4. Видно, что спектры КР всех микронизированных образцов ЛФ по положению и соотношению интенсивностей полос идентичны спектрам исходной субстанции, что указывает на сохранение химической структуры лекарственной субстанции.

Для более детального исследования возможного влияния микронизации ЛФ с использованием различных растворителей на химическую структуру лекарственной субстанции были исследованы ИК спектры образцов ЛФ в водных растворах (рис. 5). Так, в спектрах ЛФ в растворе (при $\text{pH} = 7,4$) помимо высокоинтенсивных полос 1730—1720 см^{-1} и 1622 см^{-1} (наблюдаемых также в ИК спектрах ЛФ в форме порошка), которые соответствуют валентным колебаниям С=О связи в карбоксильной и карбонильной группах, следует отметить полосу 1580 см^{-1} , которая соответствует валентным колебаниям связей депротонированной карбоксильной группы (COO^-), интенсивные полосы поглощения в области 1470—1450 см^{-1} (область колебаний С—С связей в ароматической структуре хинолона), полосу 1283—1270 см^{-1} (деформационные колебания связей в COOH группе, pH-зависи-

Микронизация левофлоксацина методом сверхкритического антисольвентного осаждения

мая полоса), полосу 1100 см^{-1} , которая соответствует колебаниям связи C—O—C , полосы в области $1053\text{—}1028\text{ см}^{-1}$ (соответствуют колебаниям связи C—F , характерным для всех фторхинолонов) и полосу 979 см^{-1} , соответствующую колебаниям связей C—N и C—H пиперазольного остова [14, 16, 17].

ИК спектр ЛФ, обработанного методом SAS с использованием хлороформа (образец 180), представлен на рис. 5 в сравнении со спектром исходного ЛФ. Из

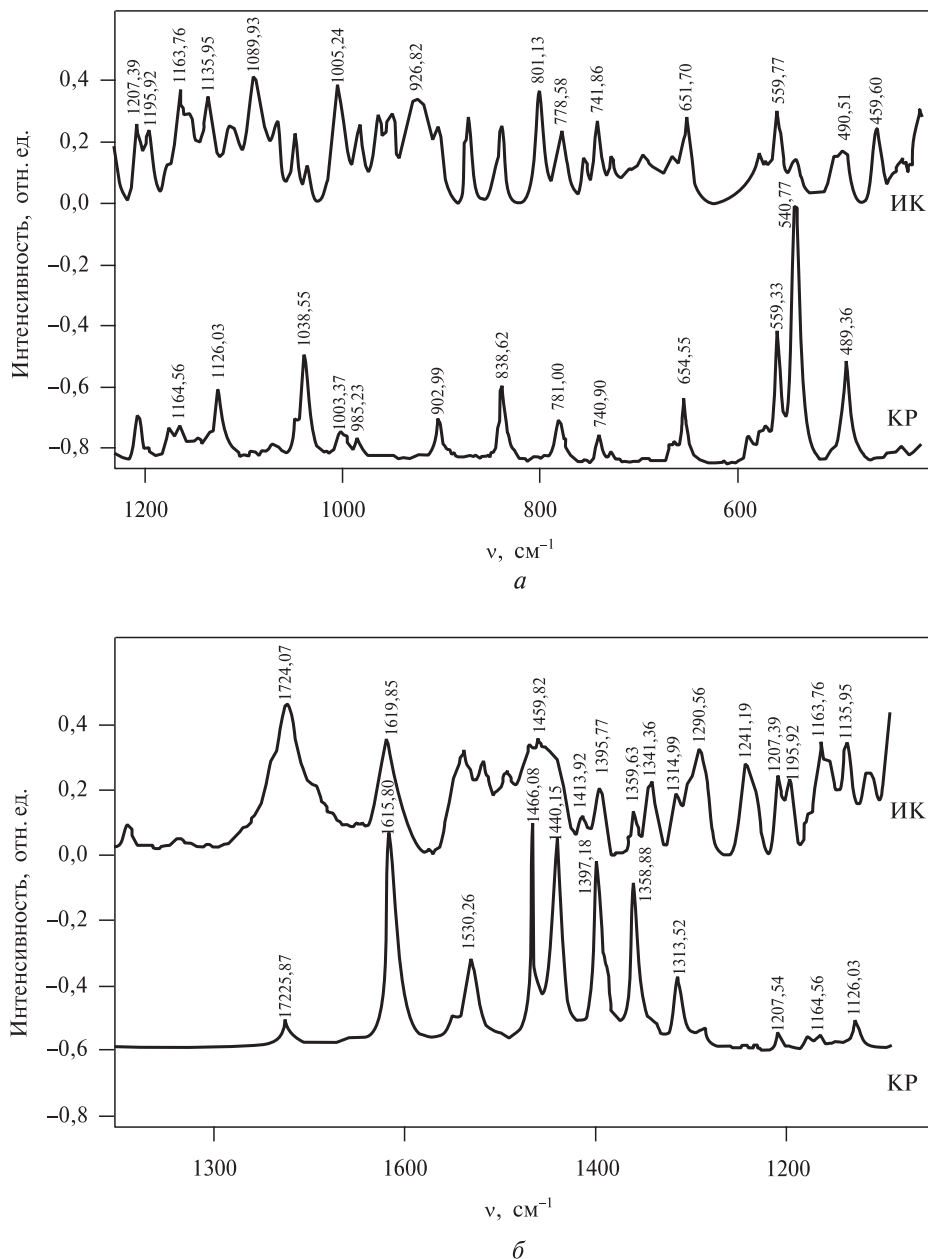


Рис. 3. ИК (верхний) и КР (нижний) спектры порошков ЛФ в диапазонах:
a — $400\text{—}1200\text{ см}^{-1}$; *б* — $1200\text{—}1800\text{ см}^{-1}$

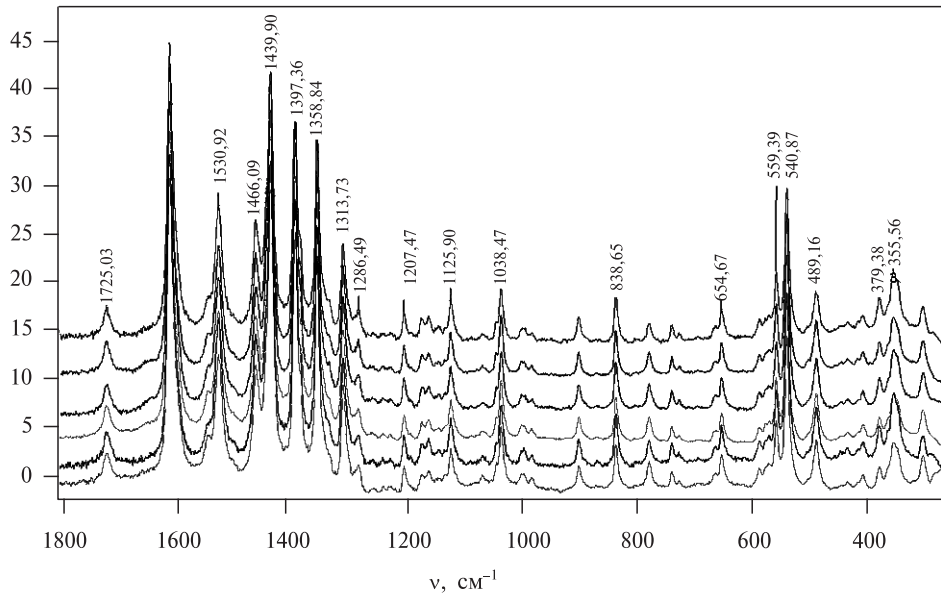


Рис. 4. КР спектры порошков ЛФ образцов 183–188 (снизу вверх), полученные при мощности лазерного излучения 16 %

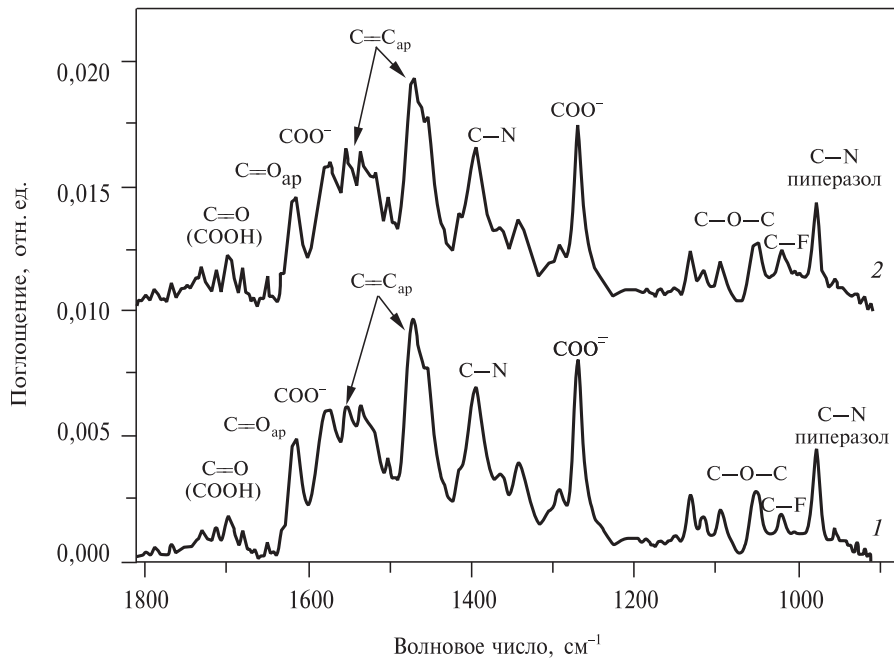


Рис. 5. ИК спектры ЛФ (1) и его микроиризированной фракции (образец 180) (2); условия эксперимента: 15 мМ фосфатный буферный раствор (pH = 7,5), концентрация ЛФ — 4 мг/мл

рис. 5 следует, что ИК спектры микронизированного и исходного образцов ЛФ в водном растворе идентичны, включая соотношение интенсивностей основных полос поглощения ЛФ, что свидетельствует о том, что обработка ЛФ СК-СО₂ с использованием различных типов растворителей не оказывает влияния на структуру молекулы.

Исследование влияния микронизации левофлоксацина на его оптические характеристики методом КД спектроскопии. ЛФ представляет собой левовращающий изомер офлоксацина, который отвечает за антибактериальную активность препарата [12], и рацемизация ЛФ будет приводить к снижению его терапевтических свойств. Поэтому необходимо установить, какое влияние будет оказывать процесс микронизации методом SAS на оптические характеристики препарата ЛФ. В качестве характеристики оптических свойств ЛФ в работе использовали удельный коэффициент эллиптичности образцов ЛФ, определяемый методом КД спектроскопии. На рис. 6. представлены КД спектры ЛФ в зависимости от концентрации лекарственной субстанции в сравнении с аналогичными спектрами микронизированного образца ЛФ, осажденного из хлороформа (образец 180).

Из приведенных данных следует, что КД спектры при микронизации ЛФ практически не изменяются. Удельные значения эллиптичности для микронизированного и исходного образцов были определены с использованием калибровочной зависимости значения максимума эллиптичности при длине волны 224 нм от концентрации ЛФ (рис. 5, вставки; таблица 2).

Значения удельной эллиптичности для микронизированных препаратов ЛФ не меньше, а в ряде случаев несколько больше значений эллиптичности, найденных для исходного ЛФ (таблица 2). Этот результат свидетельствует об отсутствии рацемизации левофлоксацина в ходе микронизации методом SAS.

Исследование влияния микронизации на кинетику растворения левофлоксацина. При разработке лекарственных препаратов одной из наиболее важных характеристик лекарственной субстанции является растворимость в модельных средах. Влияние микронизации методом SAS на растворимость ЛФ было исследовано в средах с рН = 7,5 и рН = 4, моделирующих среду кишечника и желудка. Для этой цели на первом этапе нами был проведен подбор условий, позволяющих выявить различия между микронизированными препаратами ЛФ и исходным образцом лекарственной субстанции. Исследована зависимость скорости растворения от концентрации препарата в интервале от 0,1 мг/мл до 20 мг/мл для исходного и микронизированного ЛФ (на примере образца 180, микронизированного из хлороформа). Найдено, что при низких концентрациях (0,1—1,0 мг/мл) ЛФ достаточно быстро переходит в раствор: через 5 минут растворяется основная масса лекарственной субстанции, а через 15 минут практически вся доза лекарственного вещества переходит в раствор. Скорости растворения микронизированного и нативного ЛФ статистически значимо различаются только при концентрациях ЛФ 6 мг/мл и выше. Эти условия были применены далее для изучения влияния микронизации на кинетику растворения ЛФ.

Обнаружено, что проведение микронизации ЛФ методом SAS оказывает заметное влияние на скорость растворения левофлоксацина, и данный эффект зависит от растворителя, используемого для проведения микронизации. Кинетические кривые растворения для левофлоксацина и его микронизированных форм при рН = 7,5 и рН = 4 представлены на рис. 7а и б соответственно. Из представленных данных следует, что ЛФ и его микронизированные формы достаточно быстро переходят в

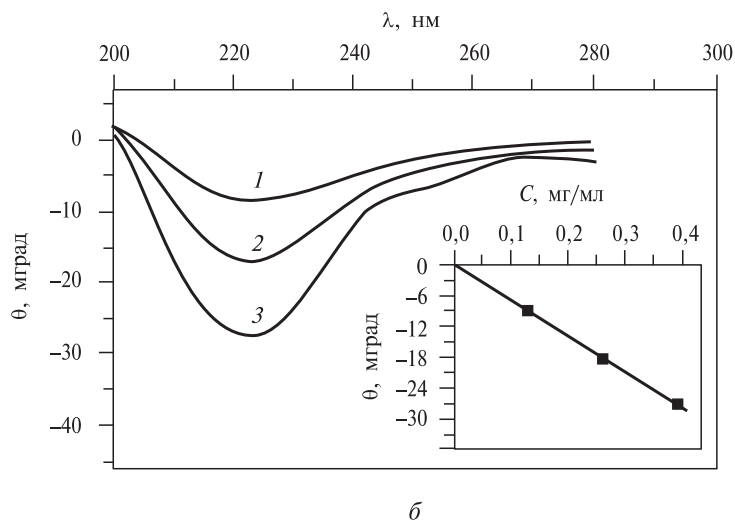
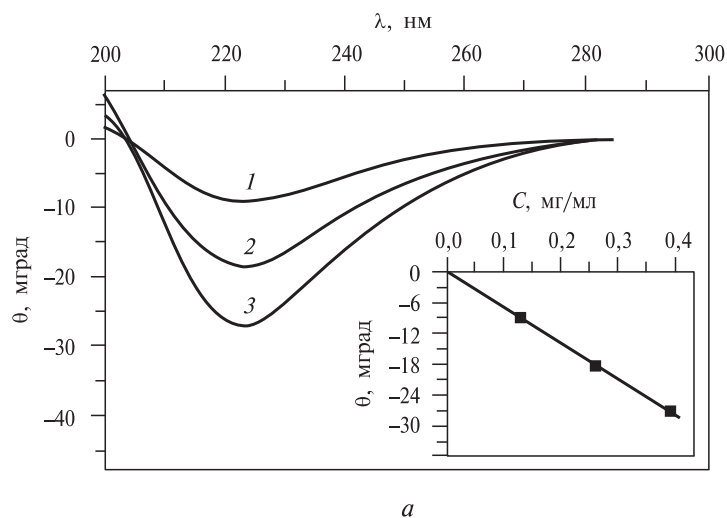


Рис. 6. КД спектры исходного ЛФ (а) и ЛФ, микронизированного из хлороформа (образец 180) (б) при концентрациях ЛФ 1 — 0,13 мг/мл, 2 — 0,26 мг/мл, 3 — 0,39 мг/мл; на вставках — калибровочные кривые, представленные в виде зависимости эллиптичности при 224 нм от концентрации ЛФ

Таблица 2

Удельные значения эллиптичности для исходного и микронизированных образцов ЛФ

Образец	$[\theta]_{224 \text{ нм}}$, мград/(мм·мг)
Исходный ЛФ	68,6 (±1)
ЛФ, микронизированный из хлороформа (180)	68,7 (±1)
ЛФ, микронизированный из ДМФА (188)	75,0 (±1)
ЛФ, микронизированный из метанола (180)	73,0 (±1)

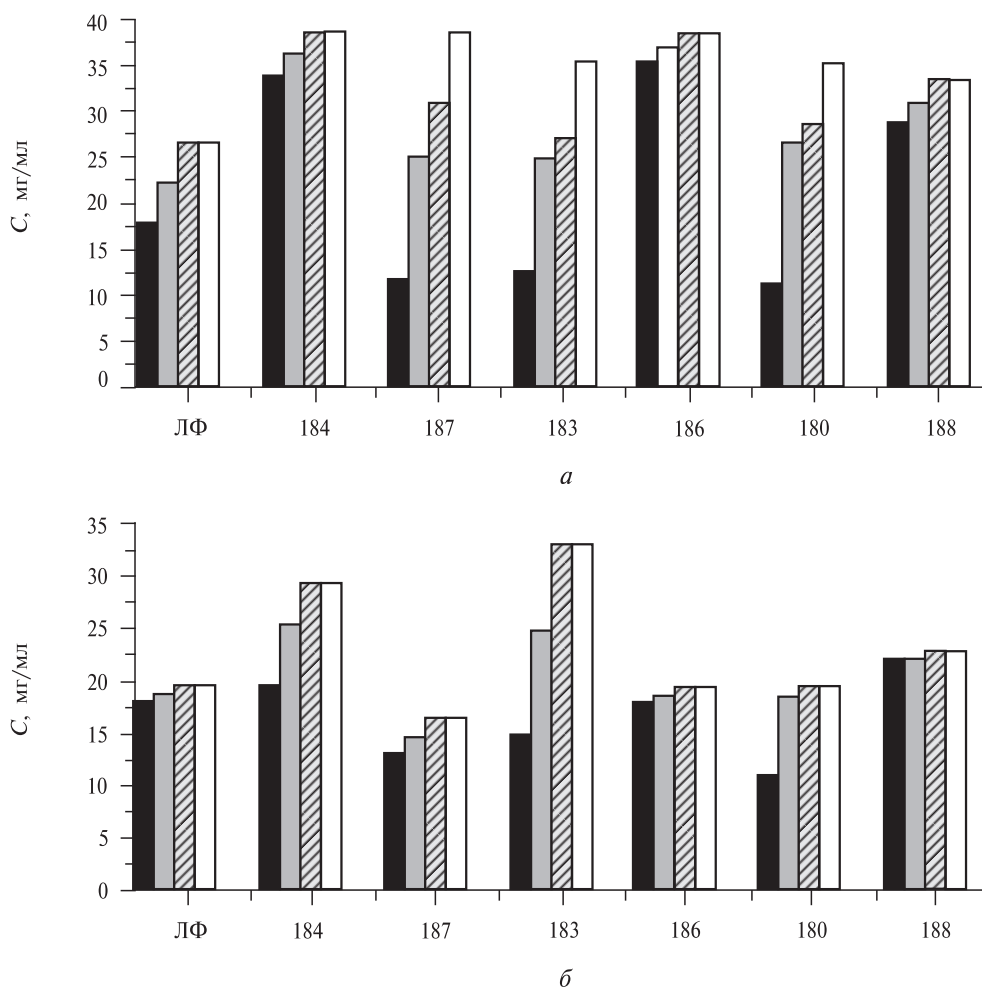


Рис. 7. Кинетика растворения ЛФ и его микронизированных образцов (180—188) при рН = 7,5 (а) и рН = 4 (б); столбики соответствуют временам растворения: черный — 10 мин, серый — 20 мин, серый в полоску — 30 мин, белый — 120 мин

раствор: уже через 10 минут высвобождается 20—30 % лекарственного вещества, а через 30 минут в растворенном состоянии находится большая часть препарата. Однако как при кислых, так и при слабощелочных значениях рН существуют различия в кинетике растворения для образцов ЛФ, микронизированных из разных растворителей.

В качестве критерия скорости растворения образцов ЛФ использовали количество препарата, растворившегося за 20 минут (см. таблицу 3), как наиболее показательную величину в плане наблюдаемых различий между образцами. Приведенные данные показывают, что при рН = 7,5 все микронизированные препараты растворяются быстрее, чем исходный ЛВ. При этом наибольшая скорость растворения наблюдается для образцов 180 и 186, микронизированных из хлороформа и метанола соответственно. При рН = 4 наблюдается несколько иная картина. Наибольшая скорость растворения наблюдается для образцов 180, 184 и 188, микронизированных из хлороформа, дихлорэтана и ДМФА, в то время как остальные

препараты растворяются примерно с той же скоростью, что и исходный ЛФ. Известно, что на растворимость лекарственных веществ влияют размер частиц лекарственной субстанции и ее кристаллическое состояние, которые в свою очередь задаются технологией получения лекарственной формы [18]. В нашем случае это, среди прочего, определяется типом органического растворителя, который использовался при проведении микронизации ЛФ методом SAS. Ожидалось, что наибольшей скоростью растворения будут обладать препараты с наименьшим размером частиц. Но в случае исследованных микронизированных препаратов ЛФ такой корреляции не наблюдается. Так, препарат 187 (микронизированный из этилацетата), который имеет наименьший размер частиц (1,6 мкм), растворяется с такой же скоростью, как и исходный ЛФ с размером частиц ~61 мкм (таблица 3). Препараты 186 и 188 (микронизированные из метанола и ДМФА), которые имеют размеры частиц 4 и 8,8 мкм соответственно, растворяются со скоростью, сравнимой с таковой для препаратов 180 и 184 (микронизированных из хлоруглеводородов), размер частиц которых находится в диапазоне 1—3 мкм.

Если сопоставить скорости растворения получаемых препаратов с типами растворителей, использованных для микронизации, можно заметить, что наиболее быстро растворяются (как в кислой, так и в слабощелочной среде) препараты 180 и 188. При этом препарат 180 был получен из хлороформа, относящегося к группе не смешивающихся с водой растворителей, характеризующихся низкой способностью выступать акцептором протона при образовании водородных связей [19—20], а другой высокорастворимый микронизированный образец (188) получен из ДМФА, относящегося к группе смешивающихся с водой полярных растворителей, способных к образованию водородных связей с водой [19—20].

В зависимости от типа растворителя может изменяться механизм кристаллизации лекарственной субстанции и, как следствие, морфология кристаллов микронизированных образцов, что также может оказывать влияние на растворимость ЛФ. Обсуждаемые выше наиболее растворимые образцы микронизированного ЛФ (180 и 188) в первом случае состоят из микрочастиц в форме тонких пластин (рис. 2в), а во втором случае — в форме анизотропных параллелепипедов (рис. 2к). Таким образом, корреляции между морфологией микронизированных частиц и растворимостью не наблюдается. По-видимому, ключевым фактором, влияющим

Таблица 3

Скорость растворения ЛФ и его микронизированных форм

Образец ЛФ	Растворитель	Размер частиц, мкм	Концентрация ЛФ, достигаемая за 20 мин	
			Среда с pH = 4,0	Среда с pH = 7,5
Исходный	—	61,2	18,7±1	22,4±1
№ 180	Хлороформ	1,4	25,4±1	36,4±1
№ 183	Дихлорметан	3,7	14,7±1	25,2±1
№ 184	1,2-дихлорэтан	2,9	24,8±1	25,1±1
№ 186	Метанол	4,1	18,7±1	37,1±1
№ 187	Этилацетат	1,6	18,7±1	26,6±1
№ 188	ДМФА	8,8	22,2±1	31,1±1

на растворимость, является кристалличность/аморфность образцов — свойства, которые зависят от типа используемого растворителя для проведения микронизации методом SAS. Данный вопрос будет являться предметом дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследован процесс формирования микрочастиц левофлоксацина различных размеров (от 1 до 10 микрон) и морфологии (от тонких пластин до вытянутых параллелепипедов) методом SAS с использованием различных растворителей. Методами КР, ИК-Фурье и КД спектроскопии показано, что химическая структура и оптические характеристики лекарственной субстанции ЛФ сохраняются при проведении микронизации. Показано, что микронизация ЛФ оказывает заметное влияние на скорость его растворения в средах с $\text{pH} = 7,5$ и $\text{pH} = 4$, моделирующих среду кишечника и желудка. Эта скорость зависит от типа растворителя, используемого в процессе SAS, но не коррелирует с размером получаемых микрочастиц. Полученные в работе результаты показали, что при выявлении физико-химических закономерностей влияния органического растворителя, используемого при микронизации лекарственной субстанции методом SAS, необходимо учитывать растворимость ЛФ в различных органических растворителях и характер взаимодействия растворителей с лекарственной субстанцией, а также взаимодействие $\text{СК}-\text{CO}_2$ как с растворителем, так и с самой лекарственной субстанцией. Таким образом, микронизация ЛФ методом SAS представляет собой многофакторный процесс, анализ которого требует дополнительных исследований. Обнаруженные в работе закономерности формирования микрочастиц ЛФ методом SAS планируется в дальнейшем использовать для разработки новых лекарственных форм левофлоксацина пролонгированного действия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 15-13-00063.

Авторы выражают благодарность академику РАН, профессору В.В. Лунину за плодотворные обсуждения и научную поддержку данного проекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баграташвили В.Н., Богородский С.Э., Коновалов А.Н., Кубышкин А.П., Новицкий А.А., Попов В.К., Уптон К., Хоудл С.М. СКФ-ТП. 2007. Т. 2. № 1. С. 53.
2. Антонов Е.Н., Богородский С.Э., Фельдман Б.М., Марквичева Е.А., Руми Л.Д., Попов В.К. СКФ-ТП. 2008. Т. 3. № 1. С. 34.
3. Баграташвили В.Н., Егоров А.М., Кротова Л.И., Миронов А.В., Панченко В.Я., Паренаго О.О., Попов В.К., Ревельский И.А., Тимашев П.С., Цытина С.И. СКФ-ТП. 2011. Т. 6. № 4. С. 88.
4. Слуцкий В.Г., Баграташвили В.Н., Кротова Л.И., Мишаков Г.В., Попов В.К., Цыганов С.А. СКФ-ТП. 2012. Т. 7. № 4. С. 88.
5. Кротова Л.И., Миронов А.В., Попов В.К. СКФ-ТП. 2013. Т. 8. № 1. С. 36.
6. Богородский С.Э., Кротова Л.И., Минаева С.А., Попов В.К. СКФ-ТП. 2014. Т. 9. № 2. С. 64.
7. Баграташвили В.Н., Богородский С.Э., Егоров А.М., Кротова Л.И., Попов В.К., Севастьянов В.И. СКФ-ТП. 2015. Т. 10. № 3. С. 26.
8. Воробей А.М., Устинович К.Б., Покровский О.И., Паренаго О.О., Лунин В.В. СКФ-ТП. 2014. Т. 9. № 4. С. 3.

9. Воробей А.М., Покровский О.И., Устинович К.Б., Кротова Л.И., Паренаго О.О., Лунин В.В. СКФ-ТП. 2015. Т. 10. № 2. С. 51.
 10. Padrela L., Rodrigues M., Velaga S.P. et al. Eur. J. Pharm. Sci. 2009. Vol. 38. No. 1. P. 9.
 11. Патент WO 2005/105293 A1 (2005).
 12. Яковлев В.П. Лечащий врач. 2001. № 2. <http://www.lvrach.ru/2001/02/4528577/>
 13. Kudryashova E.V., Sukhoverkov K.V. Analytical & Bioanalytical Chemistry. 2016. В печати.
 14. Дейген И.М., Егоров А.М., Кудряшова Е.В. Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 387.
 15. Sahoo S., Chakraborti C.K., Mishra S.C., Nanda U.N., Naik S. J. of Pharm. Res. 2011. Vol. 4. No. 4. P. 1129.
 16. Дорофеев В.Л. Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. № 12. С. 45.
 17. Bin C., Shao Zh. Chin. J. Pharm. Anal. 2011. Vol. 31. No. 9. P. 1715.
 18. Дорофеев В.Л., Титов И.В., Кочин И.Ю., Арзамасцев А.П. Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. № 5. С. 35.
 19. Abraham M.H., Ibrahim A., Zissimos A.M. J. Chromatogr. A. 2004. Vol. 1037. P. 29.
 20. Mintz C. Predicting chemical and biochemical properties using the Abraham general solvation model. PhD Thesis. University of North Texas, 2009. 361 p.
-
-

MICRONIZATION OF LEVOFLOXACIN BY SUPERCRITICAL ANTISOLVENT PRECIPITATION

¹E.V. Kudryashova, ¹I.M. Deygen, ¹K.V. Sukhoverkov, ¹L.Yu. Filatova, ¹N.L. Klyahcko, ^{1,2}A.M. Vorobei, ²O.I. Pokrovskiy, ^{1,2}K.B. Ustinovich, ^{1,2}O.O. Parenago, ³E.N. Antonov, ³A.G. Dunaev, ³L.I. Krotova, ³V.K. Popov, ^{1,4}A.M. Egorov

¹*Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russia*

²*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of RAS, Moscow, Russia*

³*Institute of Laser and Information Technologies of RAS, Troitsk (Moscow), Russia*

⁴*Russian Medical Academy of Postgraduate Education of the Ministry of Health of the Russian Federation (RMAPE), Moscow, Russia*

Micronization of levofloxacin (LF) — antibacterial drug of fluoroquinolons group — using Supercritical Antisolvent Precipitation method (SAS) is studied. Depending on the type of solvent used in the SAS process, particles of different size (1-10 microns) and morphology (from thin plates to elongated parallelepipeds) can be obtained. Characterization of micronized LF forms by FTIR, Raman and circular dichroism spectroscopies showed that micronization doesn't cause any changes in chemical structure of LF or its racemization. Micronization has a significant effect on the rate of LF dissolution in model media, which depends on the type of the solvent used in the SAS process. At pH = 4, the LF samples micronized using chlorohydrocarbons exhibit the highest dissolution rate. At pH = 7.5 the dissolution rate of micronized LF samples is 15-30 % higher compared to the original one, that can be associated with the degree of crystallinity / amorphousness, as well as with the morphology of microparticles formed during the SAS micronization.

Key words: levofloxacin, SCF-micronization, supercritical antisolvent precipitation (SAS), FTIR and Raman spectroscopy, CD spectroscopy, solubility.
