

УДК 66.065.7+544.351.4

МИКРОНИЗАЦИЯ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА МЕТОДОМ RESS

Е. Н. Антонов, Л. И. Кротова, Г. В. Мишаков*, В. К. Попов

Институт фотонных Технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва,
Россия

*mgennadii@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2019 г. Прошла рецензирование 9.10.2019 г.

Принята к публикации 9.10.2019 г.

Исследована микронизация антибактериального препарата левофлоксацина методом RESS с целью получения микрочастиц, обладающих высокой биологической доступностью. Для увеличения растворимости левофлоксацина в сверхкритическом диокside углерода был использован этанол в качестве сорасторовителя. Получены микрочастицы левофлоксацина сферической формы с характерными размерами менее 10 мкм.

Ключевые слова: сверхкритические флюидные технологии, RESS, микронизация, антибактериальные лекарственные препараты, левофлоксацин.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка и создание высокоэффективных антибактериальных лекарственных препаратов (АЛП) для лечения туберкулеза и смешанных инфекций, вызываемых как грамположительными, так и грамотрицательными микроорганизмами, являются одной из наиболее приоритетных и социально-значимых задач современной медицины и фармации.

Использование сверхкритических флюидных (СКФ) технологий открывает принципиально новые возможности создания таких препаратов [1]. Оно позволяет полностью исключить применение токсичных органических растворителей, а в ряде случаев многократно удешевляет и упрощает получение целевого продукта за счет уменьшения числа технологических стадий и способствует решению проблемы масштабирования производства [2, 3].

В настоящее время для лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза все активнее используют фторхинолоны, обладающие ярко выраженной активностью в отношении *Mycobacterium tuberculosis*.

Наиболее высокой антибактериальной активностью из антибиотиков группы фторхинолонов обладает левофлоксацин (ЛФ) — левовращающий изомер офлоксацина (брутто-формула $C_{18}H_{20}FN_3O_4$) — синтетический антибактериальный препарат широкого спектра действия. Подобно другим фторхинолонам, он обладает высокой активностью в отношении грамотрицательных, грамположительных (включая устойчивые к пенициллину штаммы *Streptococcus pneumoniae*) и «атипичных» возбудителей. ЛФ характеризуется хорошим профилем безопасности, высокой биодоступностью и тканевым распределением, что обеспечивает достижение высоких концентраций антибиотика в очаге инфекции [4, 5].

Антибактериальная активность ЛФ является концентрационно-зависимой [6], поэтому представляет интерес лекарственная форма, которая при введении в организ

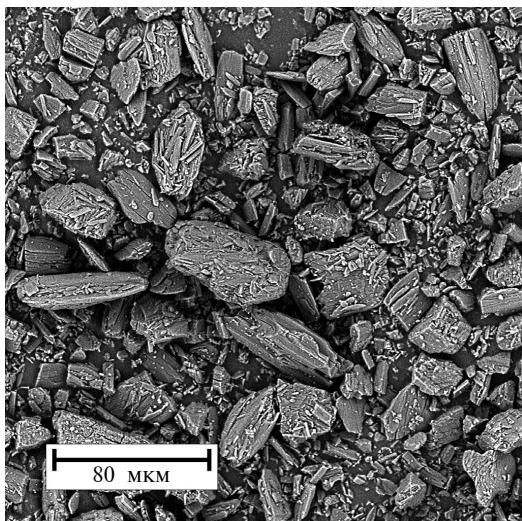


Рис. 1. СЭМ-изображение частиц левофлоксамина производства Sigma-Aldrich, США

в конце XX века были предложены новые подходы, связанные с использованием сверхкритического диоксида углерода (СК-СО₂) [7, 8] ($T_{kp} = 31^{\circ}\text{C}$, $P_{kp} = 7,3 \text{ МПа}$).

Сегодня известно и уже широко используются несколько родственных методов микронизации различных веществ с помощью СК-СО₂. Они различаются по роли, которую играет СО₂ в технологических процессах: растворитель, антирастворитель, растворенное вещество. Пожалуй, наиболее чистым из них и, следовательно, наиболее перспективным для производства лекарственных средств, является метод БРСР (быстрое расширение сверхкритического раствора), в англоязычной литературе — RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solution) [9—14]. Он используется для микронизации твердых веществ, растворимых в СК-СО₂.

Для реализации метода RESS в камере высокого давления сначала создают раствор микронизуемого вещества в СК-СО₂, который затем через нагреваемое сопло распыляют в камеру низкого давления. Расширяющийся при этом диоксид углерода теряет свою растворяющую способность, вследствие чего молекулы ранее растворенного вещества объединяются в кластеры и микрочастицы, размер которых зависит от конкретных условий проведения процесса. Полученные таким методом микрочастицы уже не содержат растворителя (СО₂) и не требуют дальнейшей очистки.

Настоящая работа посвящена исследованию процесса микронизации левофлоксамина методом RESS с целью получения микрочастиц этой фармацевтической субстанции с характерными размерами менее 10 мкм и минимальной шириной распределения частиц по размерам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования по СКФ-микронизации ЛФ (Sigma-Aldrich, США) проводились на модернизированной установке RESS-100 производства компании Thar Technologies Inc. (www.thartech.com) (рис. 2).

Измерения растворимости ЛФ в чистом СК-СО₂ методом ИК-Фурье спектроскопии показали, что его растворимость даже при достаточно высоких темпера-

турсах, долгое время поддерживала бы в нем необходимую концентрацию действующего вещества. Такая форма может включать биорезорбируемую полимерную матрицу-депо (микрочастицу), импрегнированную ЛФ. Для импрегнации и последующего усвоения препарата организмом, размер частиц ЛФ не должен превышать величины порядка 10 мкм. Однако частицы исходных фармацевтических субстанций ЛФ, как правило, имеют широкий разброс размеров — от нескольких до ста микрометров (рис. 1).

В качестве альтернативы традиционным методам диспергирования материалов (дробление/измельчение, сублимация, перекристаллизация из растворителя, вымораживание и т.д.)

туре и давлении (60°C и 20,0 МПа) не превышает 10^{-5} мол. %. Однако добавление к СК- CO_2 небольших количеств органических (например, метанол или этанол) и неорганических (вода) сорасторовителей может в значительной степени увеличить его растворяющую способность [15]. В качестве сорасторителя нами был выбран этанол.

В предварительных экспериментах в камеру высокого давления (объем 100 мл) заливали порцию 1–2 мл раствора ЛФ в этаноле с концентрацией 10 мг/мл. После напуска диоксида углерода (20–28 МПа, 60°C) и перемешивания состава (на максимальной скорости магнитной мешалки в течение одной минуты), производилось распыление СКФ-раствора в камеру расширения объемом 2 л, заполненную горячим воздухом (60°C) при атмосферном давлении.

Порцию заливаемого раствора ступенчато (с шагом в 5 мл) увеличивали. Частицы, полученные после каждого распыления, исследовали на сканирующем электронном микроскопе. Увеличение объема заливаемого раствора до 10 мл потребовало изменения камеры расширения, которая была заменена на конический раструб высотой 80 см. Снизу раструб закрывали двумя слоями плотной ткани для улавливания микронизированных частиц. Распыление происходило в поток горячего воздуха (60 – 70°C) для полного удаления сорасторителя.

Необходимость изменений была вызвана тем, что, длина струи раствора из сопла (около 50 см) существенно превышала длину стандартной камеры расширения (20 см), что приводило к налипанию частиц на поверхность камеры. Налипшие слои частично дробились, давая крупные агломераты рекристаллизованного ЛФ. Для лучшего распыления раствора диаметр сопла был уменьшен с 500 до 350 мкм.

Микрофотографии полученных продуктов получали с использованием сканирующего электронного микроскопа Phenom ProX (Phenom, Нидерланды) при ускоряющем напряжении 10 кВ. Образцы без дополнительного металлического напыления закрепляли на рабочем столике микроскопа при помощи токопроводящей углеродной ленты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На фотографиях, полученных методом сканирующей электронной микроскопии, видно, что микронизированные частицы ЛФ, полученные методом RESS в присутствии малых количеств сорасторителя и в отсутствие сорасторителя, выглядят одинаково, как на фото для RESS раствора ЛФ в этаноле порциями 1–2 мл (рис. 3). По-видимому, это объясняется тем, что при таких условиях эксперимента спирт из раствора быстро испаряется, смешиваясь с большим объемом CO_2 , а оставшийся на дне осадок измельчается аналогично тому, как это происходит при RESS без сорасторителя.

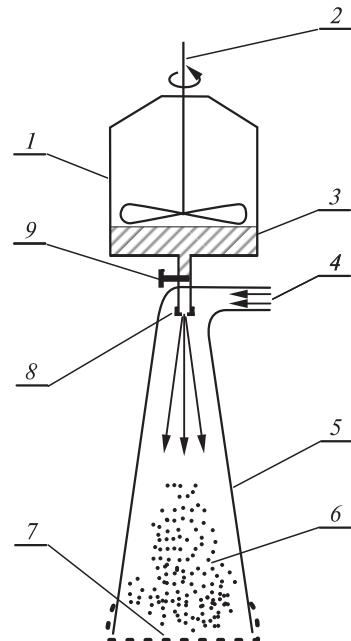


Рис. 2. Схема СКФ-микронизации на установке RESS-100:
1 — камера высокого давления,
2 — мешалка, 3 — раствор микронизируемого соединения в сорасторовителе, 4 — горячий воздух, 5 — раструб, 6 — частицы, 7 — фильтр для сбора частиц, 8 — сопло, 9 — пневмоклапан

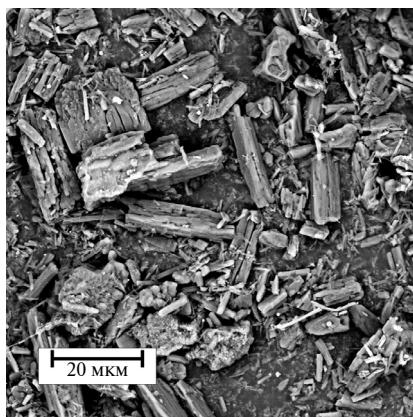


Рис. 3. Частицы, полученные RESS раствором левофлоксацина в этаноле порциями 1—2 мл

По мере увеличения объема заливаемого раствора доля сферических частиц в измельченном ЛФ также увеличивалась. При достижении объема заливаемого раствора до 15 мл на снимках практически перестали попадаться частицы исходного ЛФ. Для увеличения количества получаемых частиц и удобства их анализа объем распыляемого раствора был доведен до 50 мл.

На приведенных снимках видно, что частицы имеют форму правильных микросфер диаметром от нескольких десятых до единиц микрон (рис. 4).

Образуются как отдельные сферические частицы («rossыпи»), так и конгломераты слипшихся сферических частиц («губки») (рис. 5), что, по-видимому, зависит от условий распы-

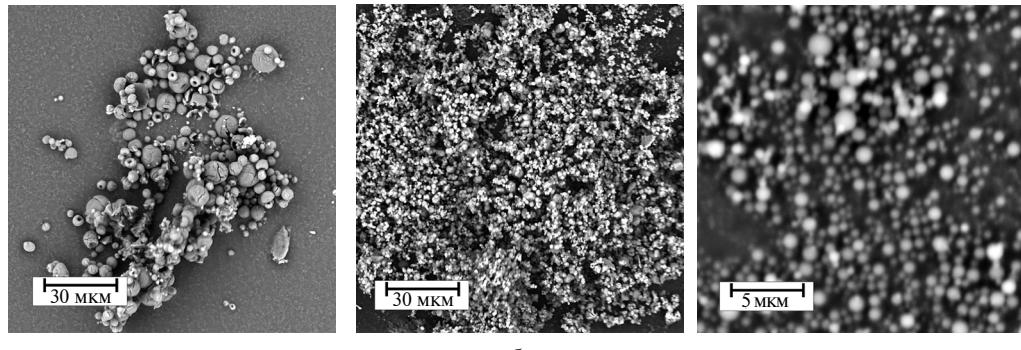


Рис. 4. Микросфера левофлоксацина, полученные с сорасторителем при 50 °C, заливка 50 мл:

а — концентрация 1,5 мг/мл, 15,0 МПа; б и в — концентрация 2 мг/мл, 20,0 МПа

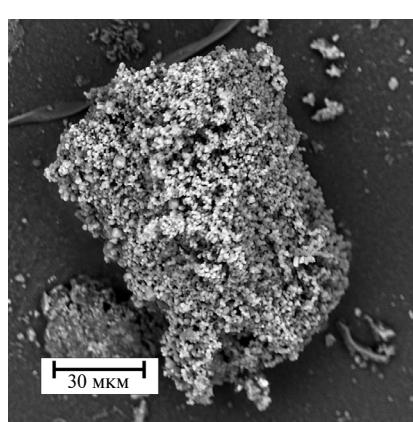


Рис. 5. Агломерат слипшихся частиц левофлоксацина субмикронного размера (концентрация 1,5 мг/мл, 57 МПа, 25 °C)

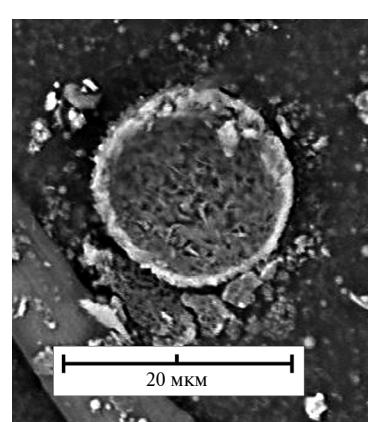


Рис. 6. «Расколотая» сфера, концентрация 2 мг/мл, 200 МПа, 50°C

Микронизация левофлоксацина методом RESS

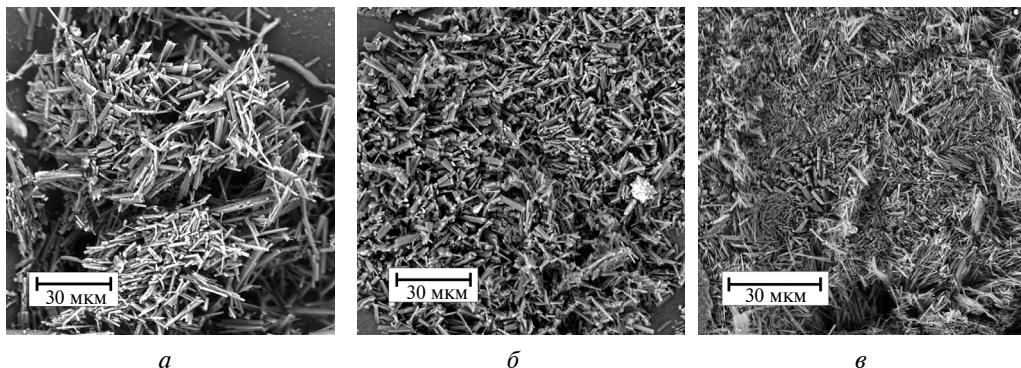


Рис. 7. Микронизированные частицы левофлоксацина в виде игольчатых кристаллов, концентрация 2 мг/мл, 50 °С:
а — 20,0 МПа, б и в — 16,0 МПа

ления (в том числе от того, в какой части факела распыления произошло выделение твердой фазы).

На снимке (рис. 6) видно, что сферы внутри полые, толщина стенки сферы диаметром 15 мкм составляет около 0,5 мкм. Такая структура частиц объясняется тем, что испарение растворителя происходит с поверхности сферической капли. Концентрация ЛФ в приповерхностном слое возрастает, пока не начинается образование твердой фазы, причем нарастание стенки происходит изнутри капли, откуда подводится раствор препарата. Очевидно, что толщина стенки зависит от первоначального размера капли и исходной концентрацией ЛФ в растворе.

Небольшая часть микронизированных частиц ЛФ имеет вид игольчатых кристалликов (рис. 7), которые, по-видимому, образуются из самых мелких капель раствора. Самые большие из них имеют длину около 10 мкм и толщину меньше микрона. В этом случае рост частиц, по-видимому, происходит путем зародышеобразования из газовой фазы.

В описанной выше модификации метод RESS во многом схож с методом распылительной сушки (Spray Drying). Однако использование СК-СО₂ в качестве распыляющего агента имеет ряд принципиальных преимуществ. Во-первых, это повышение растворяющей способности системы сорасторитель—распыляющий агент, что, в свою очередь, позволяет минимизировать количество растворителя, который часто требует специальной утилизации. Во-вторых, очевидно, что скорость высвобождения СК-СО₂ из раствора значительно выше, чем для просто растворенного в жидкости газа. Большая скорость высвобождения приводит к уменьшению размера капель и, соответственно, размеру частиц, а также уменьшает затраты на дополнительную осушку частиц от растворителя.

Таким образом, методом RESS с использованием этанола в качестве сорасторителя могут быть получены микрочастицы ЛФ сферической формы микронного размера. Они удовлетворяют требованиям, предъявляемым к фармацевтическим субстанциям, обладающим высокой биодоступностью, для формирования на их основе компонентов лекарственных форм пролонгированного действия.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения Государственного задания ФНИЦ «Кристаллография и

фотоника» РАН в части развития СКФ-методов микронизации биоактивных веществ и РФФИ (проект 18-29-06062 мк) в части формирования сферических частиц левофлоксацина микронных размеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kankala R.K., Zhang Yu.S., Wang S.-B., Lee C.-H., Chen Ai-Z. // Adv. Healthcare Mater. 2017. Vol. 6. P. 1700433.
 2. Залепугин Д. Ю., Тилькунова Н.А., Чернышова И.В., Поляков В.С. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2006. Т. 1. № 1. С. 27.
 3. Pasquali I., Bettini R. // Int. J. Pharm. 2008. Vol. 364. P. 176.
 4. Самойлова А.Г., Васильева И.А., Багдасарян Т.Р., Мусеева С.В. // Медицинское обозрение. 2013. № 19. С. 973.
 5. Синопальников А.И. // Клиническая медицина. 2016. Т. 94. С. 11.
 6. Nareddin A.M., Elkhatib W.F., Cunnion K.M., Zhanel G.G. // Drug Health Patient. Saf. 2001. Vol. 3. P. 59.
 7. Moribe K., Tozuka Y., Yamamoto K. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. Vol. 60. P. 32.
 8. Богородский С.Э., Кротова Л.И., Минаева С.А., Мишаков Г.В., Попов В.К., Басок Ю.Б., Севастьянов В.И. // Перспективные Материалы. 2013. №1. С. 23.
 9. Turk M., Hils P., Helfgen B., Schaber K., Martin H.-J., Wahl M.A. // J. Supercrit. Fluids. 2002. Vol. 22. No 1. P. 75.
 10. Reverchon E., Adami E. // J. Supercrit. Fluids. 2006. Vol. 37. No 1. P. 1.
 11. Hermsdorf D., Jauer S., Signorell R. // Molecular Physics. 2007. Vol. 105. No 8. P. 951.
 12. Гильмутдинов И.М., Сабирзянов А.Н., Гумеров Ф.М. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2008. Т. 3. № 1. С. 43.
 13. Gil'mutdinov I.M., Khairutdinov V.F., Kuznetsova I.V., Mukhamadiev A.A., Gabitov F.R., Gumerov F.M., Sabirzyanov A.N. // Russian Journal of Physical Chemistry B. December 2009. Vol. 3. Is. 8. P. 1145.
 14. Hezave A.Z., Aftab S., Esmaeilzadeh F. // J. Supercrit. Fluids. 2010. Vol. 55. No 1. P. 316.
 15. Fattahi A., Karimi-Sabet J., Keshavarz A., Golzary A., Rafiee-Tehrani M., Dorkoosh F.A. // J. Supercritical Fluids. Vol. 107. P. 469.
-

MICRONIZATION OF LEVOFLOXACIN USING RESS METHOD

E.N. Antonov, L.I. Krotova, G.V. Mishakov, V.K. Popov

Institute of Photonic Technology FNIC «Crystallography and Photonics» RAS, Moscow, Russia

Micronization of anti-bacterial drug levofloxacin (LF) by the RESS method for obtaining microparticles with high bioavailability was performed. Ethanol was used as a cosolvent to increase the solubility of LF in supercritical carbon dioxide. Spherical LF microparticles with characteristic sizes < 10 microns were obtained.

Key words: supercritical fluid technologies, RESS, micronization, antibacterial drugs, levofloxacin.
