

Микрочастицы альгината кальция, содержащие противотуберкулезные препараты

Бахытқызы И.* , Мұсабеков К.Б.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
*E-mail: inbakh@gmail.com

В данной работе представлены результаты исследования иммобилизации противотуберкулезных препаратов рифампицина и флуконазола в гидрогели альгината кальция. Изучена кинетика высвобождения рифампицина и флуконазола из набухших и высушенных микрочастиц альгината кальция. Выявлено, что скорость высвобождения препаратов из набухших микрочастиц выше, чем из высушенных. Также изучено высвобождение рифампицина из модифицированных адсорбционным слоем хитозан а альгинатных микрочастиц при различной толщине хитозанового покрытия. Установлено, что с повышением толщины оболочки выход препарата значительно снижается. При толщине хитозанового покрытия 25 мкм рифампицин диффундирует из микрочастиц практически на 95-100% за 600-720 минут. При использовании альгинатных частиц с покрытием толщиной 65 и 125 мкм за этот промежуток времени выделяется 60-70% препаратов, соответственно.

Ключевые слова: альгинат кальция; флуконазол; рифампицин; микрочастицы; иммобилизация.

Құрамында туберкулезге қарсы препараттар бар кальций альгинатының микробөлшектері

Бахытқызы И.* , Мұсабеков К.Б.

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы қ., Қазақстан
*E-mail: inbakh@gmail.com

Бұл жұмыста туберкулезге қарсы әсері бар дәрілер – рифампицин мен флуконазолды альгинат негізіндегі гидрогельдерге иммобилизациялаудың нәтижелері көрсетілген. Рифампицин мен флуконазолдың ісінген және кепкен кальций альгинат микробөлшектерінен босап шығу кинетикасы зерттелді. Препараттардың ісінген микробөлшектерден босап шығуы кепкен бөлшектерге қарағанда жоғары екендігі анықталды. Сонымен қатар, рифампициннің әр түрлі қалыңдықтағы хитозан адсорбционды қабатымен модифицирленген альгинат микробөлшектерінен босап шығуы зерттелді. Жабынды қабаттың қалыңдығы өскен сайын препараттың босап шығуы төмендейтіндігі анықталды. Хитозан жабындысының қалыңдығы 25 мкм болғанда, рифампициннің 95-100 пайызы микробөлшектерден 600-720 минут аралығында босап шығады. Жабынды қалыңдығы 65 және 125 мкм альгинат бөлшектерін қолданғанда осы уақыт аралығында сәйкесінше 60-70% препарат бөлінеді.

Түйін сөздер: кальций альгинаты; флуконазол; рифампицин; микробөлшектер; иммобилизация.

Calcium alginate microparticles containing anti-TB drugs

Bakhytkyzy I.* , Musabekov K.B.

Al-Farabi Kazakh National University,
Almaty, Kazakhstan
*E-mail: inbakh@gmail.com

This work presents the results of immobilization of anti-TB drugs rifampicin and fluconazole in alginate hydrogels. Release kinetics of rifampicin and fluconazole from swollen and dried calcium alginate microparticles were studied. It was revealed that the release of the drug from the swollen microparticles is higher than from the dried ones. The release of rifampicin from alginate microparticles coated with chitosan layer was studied. Slower drug release was observed for the thicker the layer of chitosan. At the chitosan coating thickness of 25 microns, 95-100% rifampicin release from the microparticles during 600-720 min was observed. When using coated alginate particles with a thickness of 65 and 125 microns, during this time interval, 60-70% of drug was released, respectively.

Keywords: calcium alginate; rifampicin; fluconazole; microparticle immobilization.



УДК 541.64.02;678

<http://dx.doi.org/10.15328/cb562>

Микрочастицы альгината кальция, содержащие противотуберкулезные препараты

Бахыткызы И.* , Мусабеков К.Б.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

*E-mail: inbakh@gmail.com

1. Введение

Альгинат является естественным, биосовместимым и биоразлагаемым анионным неразветвленным полисахаридом, который извлекается из бурых водорослей [1,2]. Альгинаты широко используются в пищевой и фармацевтической промышленности в качестве матрицы для доставки лекарственных препаратов [3,4], высокомолекулярных веществ [5] и живых клеток. Альгинат также обладает рядом ценных фармацевтических функций, в частности, он образует сетчатую полимерную структуру с двухвалентными катионами, которая может быть использована для иммобилизации препаратов [3]. Такие микросферы можно парентерально вводить в организм, где они, постепенно разрушаясь, выделяют физиологически активное вещество. Использование микрочастиц позволяет также значительно снизить токсичность лекарственных веществ и экономно их расходовать. Полимерные микрочастицы способствуют проникновению лекарственного вещества через клеточную мембрану, а также стимулируют их поглощение макрофагами. Прямая доставка лекарственных препаратов в зону поражения организма является эффективным методом, позволяющим избежать лекарственную резистентность, и существенно ослабить побочные эффекты.

Специфика лечения туберкулеза – комплексная терапия (лечение одновременно несколькими противотуберкулезными препаратами), длительность лечения, необходимость назначения многократных приемов больших доз медикаментов и возникновение

из-за этого токсико-аллергических осложнений [6] – выдвигает актуальную задачу создания противотуберкулезных препаратов пролонгированного действия. Такие препараты можно получить, включая в полимеры-носители, в частности, в микросферы, биосовместимые и биоразлагаемые природные полимеры известных противотуберкулезных препаратов. Это позволяет целенаправленно изменять физико-химические и медико-биологические свойства препаратов [7,8].

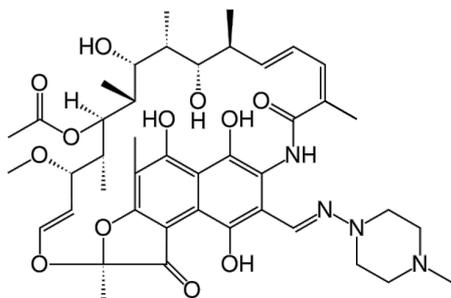
Одним из эффективных противотуберкулезных препаратов, широко используемых при лечении туберкулеза в составе комбинированной терапии, является рифампицин, представляющий собой 3-[[[4-Метил-1-пиперазинил) имино]метил] рифамицин [9].

Несмотря на значительный ассортимент и возможность выбора антимикотических препаратов, вопросы терапии туберкулеза не теряют актуальности и требуют для своего решения внедрения новых, более эффективных фармакологических субстанций, а также создания на их основе лекарственных препаратов. Среди групп современных синтетических антимикотических средств, используемых в терапии туберкулеза, доминируют триазольные соединения [10]. Из них особое место принадлежит флуконазолу, высокая биодоступность, актуальность и возможность применения которого подтверждена в эксперименте и клинической практике. Однако, наряду со многими положительными качествами, флуконазол обладает кратковременным лечебным действием, что вызывает необходимость его частого введения [10].

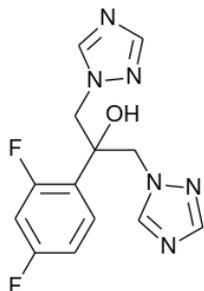
Недостаточная растворимость препаратов флуконазола приводит к сильному отклонению значений максимальной концентрации в плазме, возникающей во время изучения биодоступности, которое, в свою очередь, является причиной несогласованности результатов изучения. Следовательно, существует необходимость в лекарственных препаратах, содержащих флуконазол, которые обеспечивают стабильное высвобождение его *invitro*, а также быстрое и стабильное всасывание *invivo* [11]. В связи с этим, в данной работе были проведены исследования по созданию полимерных терапевтических систем на основе микрочастиц альгината кальция с пролонгированным высвобождением флуконазола и рифампицина.

2. Эксперимент

В работе использован противотуберкулезный препарат *рифампицин* (Rifampicinum) 5,6,9,17,19,21-гексагидрокси-23-метокси-2,4,12,16,18,20,22-гептаметил-8-(N-(4-метил-1-пиперазинил)формимидоил)-2,7-(эпоксипентадека(1,11,13)триэнимино)нафто(2,1-b)фуран-1,11(2H)-дион 21 ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$), $M_m = 822,96$, производства «Beiging Second pharmaceutical Factory», China. Кристаллический порошок кирпично-красного цвета, практически нерастворим в воде и малорастворим в спирте. Растворимости в воде и физиологическом растворе при температуре 25 °С 1300 мг/л и ~600 мг/л, соответственно.

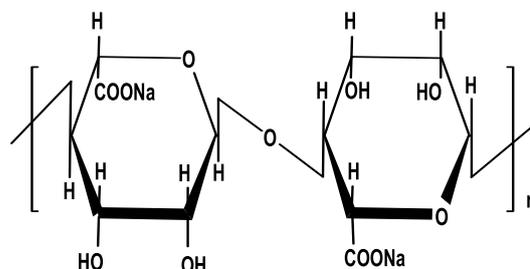


Флуконазол (Fluconazolium) 2,4-дифтор-(α),(α)-бис-(1H-1,2,4-тиазол-1-ил-метил) бензиловый спирт. Эта химическая структура соответствует эмпирической формуле $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ и молекулярному весу 306,3 г/моль.

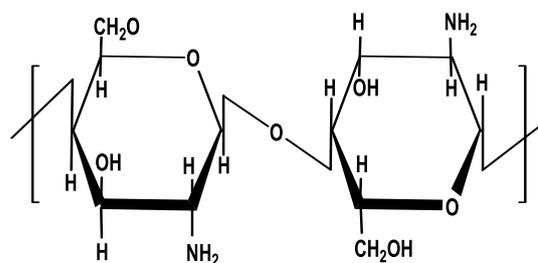


Флуконазол представляет собой белое кристаллическое вещество, растворимости в воде и физиологическом растворе при температуре 25 °С 550 мг/л и ~500 мг/л, соответственно.

Альгиновая кислота (Alginic Acid), в виде натриевой соли (Sodium salt from *Macrocysticpyrifer*), средней вязкости производства «Sigma» (США).



Хитозан (Chitosan, Practical Graga from Crab Shells) производства «Sigma» (США).



Синтез микрочастиц на основе альгината кальция, содержащих иммобилизованные биопрепараты. Микрочастицы на основе альгината кальция, содержащие иммобилизованные биопрепараты, были получены следующим образом. Смесь отфильтрованного раствора альгината натрия и противотуберкулезного препарата вводили каплевно через шприц в раствор хлорида кальция со скоростью 1,0 мл/мин. Затем полученные микрочастицы альгината кальция, содержащие иммобилизованный противотуберкулезный препарат, промывали раствором хлорида кальция в течение 5-10 мин и помещали для хранения в холодильник.

Синтез модифицированных альгинатных микрочастиц, содержащих хитозановое покрытие. Альгинатные микрочастицы, содержащие иммобилизованный препарат, помещали на 25-30 минут в раствор хитозана различной концентрации (0,75, 1,5 и 3,0 %) при постоянном перемешивании. Затем они отфильтровывались и отмывались небольшим количеством воды.

УФ-спектры водных растворов флуконазола и рифампицина записывались на спектрофотометре «UV-7504» (Shanghai Hansom Technology & Sales Limited, Shanghai, China) в кварцевой кювете толщиной 10 мм (рисунок 1,2). Концентрацию рифампицина

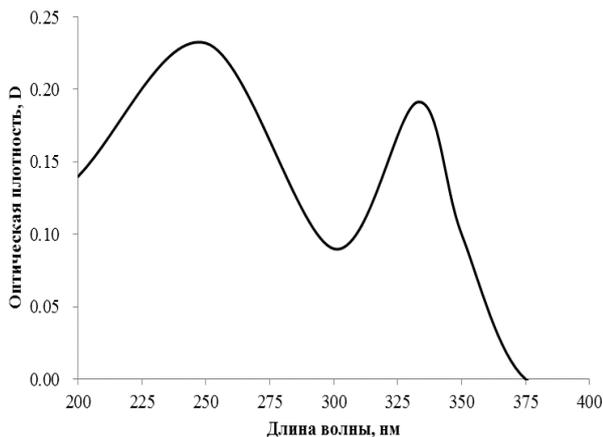


Рисунок 1 – УФ-спектр флуконазола

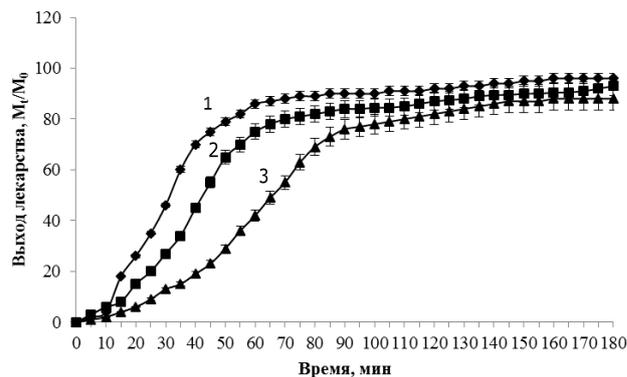


Рисунок 2 – УФ-спектр рифампицина

и флуконазола определяли по калибровочным графикам, построенным по максимумам поглощения, характерным для этих препаратов (рисунок 3).

Высвобождение противотуберкулезных препаратов из микрочастиц. Для определения кинетики высвобождения определенное количество альгинатных микрочастиц помещали в стакан с 50 мл физиологического раствора при комнатной температуре. Постоянную скорость перемешивания среды высвобождения (100 об/мин) обеспечивали с помощью магнитной мешалки. Через определенные промежутки времени 2 мл раствора отбирали для определения содержания лекарства с помощью УФ-спектроскопии. Эксперименты проводились трижды ($n = 3$).

Определение толщины поверхностного слоя микрочастиц. Толщину хитазанового покрытия на поверхности альгинатных микрочастиц определяли с помощью светового оптического микроскопа марки «Leica Eclipse TE 300 (Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Germany)». Для этого в раствор хитозана добавляли краситель конго красный при перемешивании в

течение 30 мин. Затем в раствор помещались ранее полученные альгинатные микрочастицы, содержащие иммобилизованный препарат. Образцы альгинатных сферогелей предварительно замораживались в жидком азоте и поперечно разрезались скальпелем непосредственно перед измерением. Средний диаметр сферических микрочастиц, измеренных для 5 образцов, составил $1,0 \pm 0,05$ мм.

3. Результаты и обсуждение

В настоящей работе исследовано влияние физического состояния альгинатных микрочастиц на процесс высвобождения из них рифампицина и в физиологический раствор в условиях *invitro*. Результаты опытов представлены на рисунках 4 и 5.

Установлено, что наибольшая скорость выхода рифампицина наблюдается для набухших образцов, которые были испытаны непосредственно после их получения. Так, выход 50% препарата из набухших микрочастиц наблюдается за 30-35 минут, тогда как такое

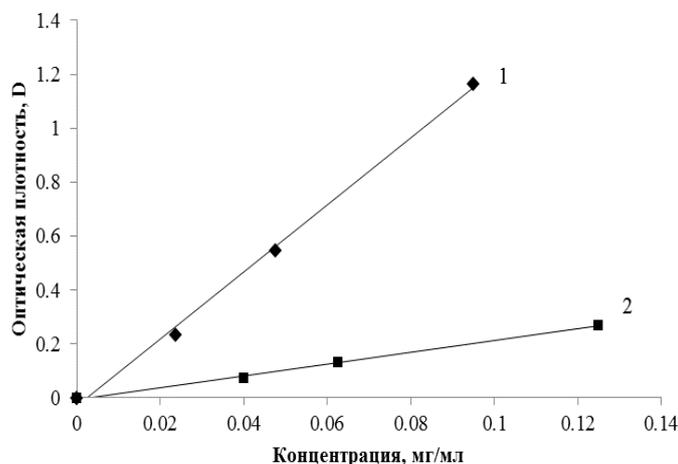


Рисунок 3 – Зависимость оптических плотностей препаратов от их концентрации: рифампицин (1), флуконазол (2)

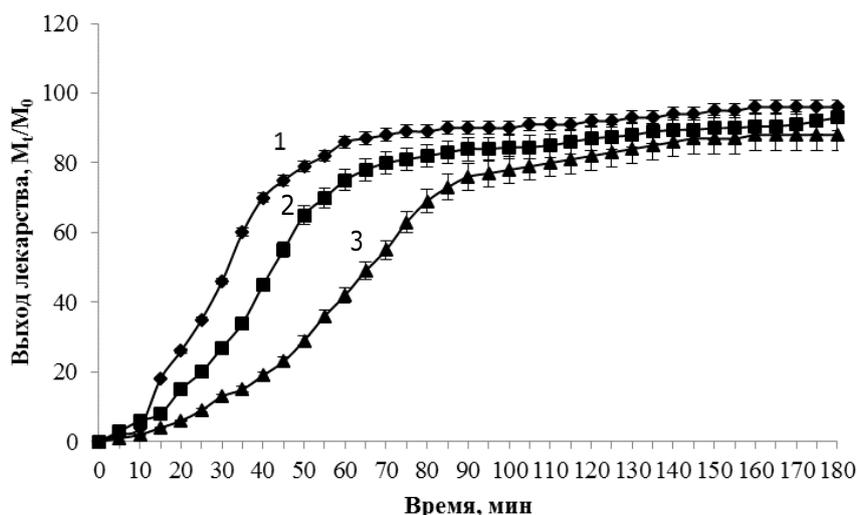


Рисунок 4 – Кинетика высвобождения рифампицина из набухших (1) и высушенных при 20°C (2), 50°C (3) альгинатных микрочастиц

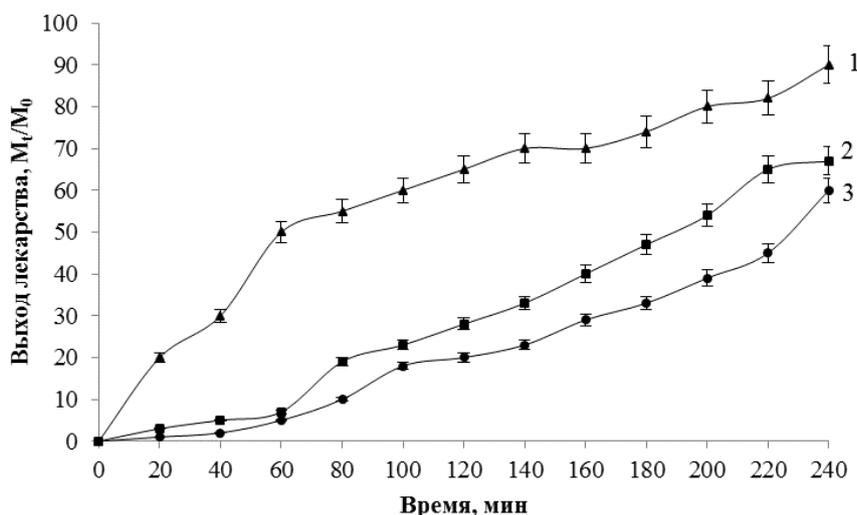


Рисунок 5 – Кинетика высвобождения флуконазола из набухших (1) и высушенных при 20°C (2), 50°C (3) альгинатных микрочастиц

же количество препарата из полностью высушенных при температурах 20°C и 50°C образцов происходит за 40 и 60 мин, соответственно. Высвобождение 95% рифампицина из набухших образцов происходит в течение 100-120 мин, а из высушенных образцов - в течение 160-200 мин.

Аналогичная закономерность обнаружена при изучении выхода флуконазола из набухших и высушенных образцов. Установлено, что наибольшая скорость выхода препарата наблюдается для набухших образцов. Полный выход препарата из набухших микрочастиц наблюдается за 180-240 мин, тогда как за это же время из высушенных образцов высвобождается около 60-65% иммобилизованного препарата.

Для усиления эффекта пролонгации противо-

туберкулезных препаратов на поверхность альгинатных микрочастиц, содержащих лекарственный препарат, были нанесены адсорбционные слои хитозана. Наличие поверхностного слоя хитозана позволило уменьшить скорость высвобождения препаратов из структуры альгинатного геля в физиологический раствор и обеспечить более длительный эффект пролонгации (рисунок 6) [12,13].

Установлено, что с повышением толщины хитозановой оболочки выход препарата значительно снижается. Так, при толщине хитозанового покрытия 25 мкм рифампицин диффундирует из микрочастиц практически на 95-100% за 600-720 минут. При использовании альгинатных частиц с покрытием толщиной 65 и 125 мкм за этот промежуток времени выделяется, соответственно, 60-70% препаратов. Следует отме-

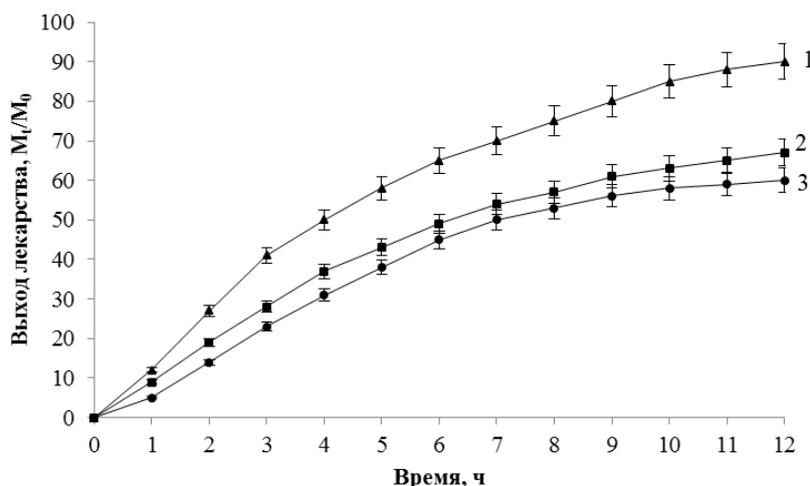


Рисунок 6 – Кинетика высвобождения рифампицина из модифицированных адсорбционным слоем хитозана альгинатных микрокапсул в физиологический раствор. Толщина хитозанового покрытия 25 мкм (1), 65 мкм (2), 125 мкм (3)

тить наличие незначительного индукционного периода продолжительностью 10-20 минут, при котором выход препаратов из модифицированных микрокапсул не наблюдается. По-видимому, этот промежуток времени необходим для набухания микрокапсулы и прохождения молекул лекарственных препаратов через слой хитозановой оболочки с последующей диффузией в объем раствора.

4. Заключение

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о перспективности использования микрокапсул геля альгината кальция для получения противотуберкулезных препаратов пролонгированного действия. Установлено, что наибольшая скорость выхода препаратов наблюдается для набухших образцов. Так, полный выход

рифампицина и флуконазола из набухших микрокапсул наблюдается за 120 и 180 минут соответственно, тогда как за это же время из высушенных образцов высвобождается 80% и 65% иммобилизованных препаратов. Модификация поверхности микрокапсул природным полисахаридом хитозаном способствует усилению эффекта пролонгации действия лекарственного препарата. Увеличение толщины хитозанового покрытия с 25 мкм до 125 мкм снижает выход рифампицина из микрокапсулы на 30%.

Благодарности

Работа выполнена в рамках магистерской диссертации Бахыткызы Инал при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Список литературы

- Li L., Wang L., Shao Y., Ni R., Zhang T., Mao S. Drug release characteristics from chitosan-alginate matrix tablets based on the theory of self-assembled film // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2013. – Vol.450. – P.197-207.
- Murtaza G., Waseem A., Hussain I. Alginate microparticles for biodelivery: A review // *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2011. – Vol.5. – P. 726-737.
- Инагамов С.Я., Мухамеджанова М.Ю., Мухамедов Г.И. Поликомплексные гели на основе натрийкарбоксиметилцеллюлозы – новые пролонгаторы // *Химия растительного сырья*. – 2011. – №2. – С.51-56.
- Fernández Farrés I., Douaire M., Norton I.T. Rheology and tribological properties of Ca-alginate fluid gels produced by diffusion-controlled method // *Food Hydrocolloid*. – 2013. – Vol.32. – P.115-122.
- Yang Y., Campanella O.H., Hamaker B.R., Zhang G., Gu Z. Rheological investigation of alginate chain interactions induced by concentrating calcium cations // *Food Hydrocolloid*. – 2013. – Vol.30. – P.26-32.
- Arbex M.A., Varella M.C.L., Siqueira H.R., Mello F.A.F. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations - part 2: second line drugs // *Jornal Brasileiro de Pneumologia [online]*. – 2010. – Vol.36. – P.641-656.
- Шомуратов Ш.А., Муродов Э.А., Тураев А.С. Синтез исследование комбинированного противотуберкулезного препарата на основе карбоксиметилцеллюлозы // *Химия растительного сырья*. – 2006. – №2. – С.25-28.

- 8 Ahmed M.M., El-Rasoul S.A., Auda S.H., Ibrahim M. Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium-sodium alginate microparticles // Saudi Pharmaceuticals Journal. – 2013. – Vol.21. – P.61-69.
- 9 Мишин В.Ю. Современная стратегия лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза легких // Лечащий врач. – 2000. – №3. – С.4-9.
- 10 Панкрушева Т.А., Автина Т.В., Покровский М.В., Медведева О.А. Исследования по разработке суппозиторий для лечения вагинального кандидоза // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2010. – №12-2. – С.40-46.
- 11 Consiglieri V.O., Mourao S., Sampaio M., Granizo P., Garcia P., Martinello V., Spricigo R., Gomes Ferras H. Improvement of fluconazole flowability and its effect on dissolution from tablets and capsules // Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2010. – Vol.46. – P.115-120.
- 12 Simonoska C.M., Glavas D.M., Goracinova K. Chitosan coated Ca-alginate micro particles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2008. – Vol.68. – Is.3. – P.565-578.
- 13 Mohammadi-Samani S., Miri R., Salmanpour M., Khalighian R., Sotoudeh S., Erfani N. Preparation and assessment of chitosan-coated superparamagnetic Fe(3)O(4) nanoparticles for controlled delivery of methotrexate // Research in Pharmaceutical Sciences. – 2013. – Vol.8, Is.1. – P.25-33.

References

- 1 Li L, Wang L, Shao Y, Ni R, Zhang T, Mao S (2013) Int J Pharm 450:197-207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.052>
- 2 Murtaza G, Waseem A, Hussain I (2011) Afr J Pharm Pharmacol 5:2726-2737. <http://dx.doi.org/10.5897/AJPP11.706>
- 3 Inagamov SY, Muhamedzhanova MY, Muhamedov GI (2011) Chemistry of Plant Raw Materials [Khimija Rastitel'nogo Syr'ja] 2:51-56. (In Russian)
- 4 Fernández Farrés I, Douaire M, Norton IT (2013) Food Hydrocolloid 32:115-122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.12.009>
- 5 Yang Y, Campanella OH, Hamaker BR, Zhang G, Gu Z (2013) Food Hydrocolloid 30:26-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.006>
- 6 Arbex MA, Varella MCL, Siqueira HR, Mello FAF (2010) J Bras Pneumol 36:641-656. <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37132010000500017>
- 7 Shomuratov SA, Murodov EA, Turaev AS (2006) Chemistry of Plant Raw Materials [Khimija Rastitel'nogo Syr'ja] 2:25-28. (In Russian)
- 8 Ahmed MM, El-Rasoul SA, Auda SH, Ibrahim M (2013) Saudi Pharmaceuticals Journal 21:61-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.08.004>
- 9 Mishin VY (2000) Attending Doctor [Lechashhij Vrach] 3:4-9. (In Russian)
- 10 Panrusheva TA, Avtina TV, Pokrovskiy MV, Medvedeva OA (2010) Scientific Bulletin of BelSU. Medicine. Pharmacy Series [Nauchnyie Vedomosti Belgu. Seriya: Meditsina. Farmatsiya] 12-2:40-46. (In Russian)
- 11 Consiglieri VO, Mourao S, Sampaio M, Granizo P, Garcia P, Martinello V, Spricigo R, Gomes Ferras H (2010) Brazilian J Pharm Sci 46:115-120. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502010000100013>
- 12 Simonoska CM, Glavas DM, Goracinova K (2008) Eur J Pharm Biopharm 68:565-578. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.06.007>
- 13 Mohammadi-Samani S, Miri R, Salmanpour M, Khalighian R, Sotoudeh S, Erfani N (2013) Res Pharm Sci 8:25-33.