

З. К. Мухидинов¹, Г. Ф. Касымова¹, С. Р. Усманова¹, К. Б. Мурзагулова²,
М. Е. Ким², А. В. Янович²

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОКАПСУЛ НА ОСНОВЕ ЯБЛОЧНОГО ПЕКТИНА И β -ЛАКТОГЛОБУЛИНА, СОДЕРЖАЩИХ РИФАМПИЦИН

¹ Институт химии Академии наук Республики Таджикистан, Душанбе, Таджикистан;

² ТОО Фармацевтическая компания "Ромат", Павлодар, Казахстан

Разработан двухстадийный способ приготовления микрокапсул на основе комплексообразования высокометилированного (НМ) и низкометилированного (ЛМ) яблочного пектина с концентратом β -лактоглобулина молочной сыворотки в системе эмульсии масло — вода. Показано, что отличие в способности пектиновой цепочки образовывать эффективный вторичный слой на протеиновых молекулах вокруг масляной капли зависит от молекулярной массы и структуры пектина. Полученные в результате исследований эмульсионные системы с НМ и ЛМ пектинами и различным соотношением пектин — протеин способны формировать микрокапсулы, отличающиеся размером частиц, степенью захвата рифампицина, и могут быть использованы как потенциальные носители лекарственных веществ.

Ключевые слова: микрокапсулы на основе высоко- и низкометилированного яблочного пектина, способ приготовления.

Традиционный путь введения лекарственных веществ (ЛВ) не позволяет управлять временем поступления ЛВ в биофазу и его высвобождением, что неблагоприятно сказывается на выборе терапевтической дозы препарата. Главная цель создания систем доставки ЛВ с контролируемым высвобождением (СДЛКВ) заключается в поддержании постоянной концентрации ЛВ в крови. СДЛКВ действующих веществ позволят достичь быстрого лечебного эффекта, уменьшить курсовую дозу и передозировку лекарств, ослабить частоту проявлений побочных эффектов, что создает удобство пациентам [1]. Широкое распространение получила новая технология доставки ЛВ на основе несущих частиц, таких как микросферы, наночастицы, липосферы, эмульсии, которые являются модуляторами высвобождения адсорбированного ЛВ [2].

Рифампицин (Rif) является одним из основных лекарственных средств при лечении туберкулеза (ТБ). Как известно, цикл лечения больных ТБ обычно длится от 3 до 12 мес, что часто приводит к нарушению режима приема лекарства и другим побочным эффектам. Поэтому разработка систем доставки с непрерывным высвобождением лекарства, которые будут способствовать улучшению терапевтической эффективности и удобству больных туберкулезом, особенно актуальна.

Целью данного исследования является разработка способа получения микрокапсул на основе комплексообразования высокометилированного (НМ) и низкометилированного (ЛМ) яблочного пектина с концентратом β -лактоглобулина (β -LgC) в эмульсионной системе масло в воде (м/в) с инкапсулированным Rif. Водно-масляная эмульсия, состоящая из мельчайших липидных капель, является термодинамически неустойчивой системой. Устойчивость эмульсии можно повысить при помощи двухстадийной процедуры: первичной эмульсии, которая образуется при использовании ионогенных эмульгаторов, и вторичной, кото-

рая образуется при добавлении противоположно заряженного полимера. Полученные липидные капли при этом покрываются заряженной мембраной в зависимости от pH среды, обеспечивающей эмульсионную устойчивость [3, 4]. В настоящем исследовании использовали катион-активный эмульгатор — β -LgC, который, адсорбируясь на поверхности липидных капель в процессе гомогенизации, образует первичную эмульсию. При добавлении анионного эмульгатора — пектина — образуется вторичная эмульсия. Таким образом, формируется многослойная мембрана, улучшающая стойкость эмульсии.

Экспериментальная часть

В работе использовали НМ и ЛМ яблочные пектины APF 100-7-2 и APM 120-5-2 (Файзобадский и Муминобадский районы Таджикистана), полученные методом быстрой экстракции [5] и охарактеризованные по содержанию галактуроновой кислоты (ГК) — 67,2 и 68 % и степени этерификации (СЭ) карбоксильных групп, равных 82,5 и 52 %, молекулярная масса (Мм) — 157 и 130 КД для НМ и ЛМ пектина соответственно.

Концентрат β -LgC выделяли из молочной сыворотки по методике, описанной в работе [6]. В качестве модельного лекарства использовали коммерческие образцы субстанции рифампицина, производства LUONE NANJIECUN PHARMACEUTICAL GROUP PHARMACY CO, LTD (Китай).

Получение микрокапсул проводили в 2 стадии по следующей методике: сначала готовили эмульсию масла в водном растворе 0,3 % β -LgC с добавлением 0,5 % спиртового раствора ЛВ при перемешивании на цифровом гомогенизаторе IKA T-25 (ULTRA TURRAX, США) при скорости вращения 12000 об/мин в течение 15 мин и температуре 60 °С (первичная эмульсия). Затем в полученную эмульсию,

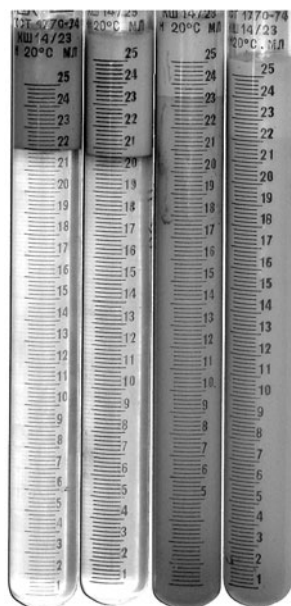


Рис. 1. Микрокапсулы с различным соотношением β -LgC/HM в системе масло/вода: слева направо Lg/HMA105; Lg/HMA65, Lg/HMA33, Lg/HMA5.

не прекращая перемешивания при той же скорости, медленно добавлялся 0,2 % раствор пектина. Перемешивание продолжалось еще 10 мин при низкой скорости. Таким способом были получены микрокапсулы, отличающиеся исходным весовым соотношением пектина и β -LgC.

После охлаждения до комнатной температуры эмульсии многократно промывались дистиллированной водой для удаления несвязанного ЛВ, количество которого контролировали спектрофотометрически при длине волны 334 нм.

В табл. 1 представлено соотношение исходных компонентов и характеристика микрокапсул на основе НМ- и LM- яблочного пектина.

Из данных табл. 1 следует, что объемы полученных эмульсий при всех соотношениях белок — пектин отличаются. За счет быстрого расслоения наблюдается

Таблица 1
Характеристика микрокапсул на основе НМ- и LM-яблочного пектина (А)

Шифр микрокапсул	Исходное соотношение β -Lg/пектин, г/г	Объем эмульсии через 1 день, мл	Степень связывания Rif, %
Lg/HMA105*	12,00	5,00	38,80
Lg/HMA65	7,50	8,00	47,74
Lg/HMA33	3,75	20,00	46,43
Lg/HMA5	0,55	22,00	42,35
Lg/LMA87	12,00	9,60	63,01
Lg/LMA54	7,50	8,00	56,55
Lg/LMA27	3,75	10,20	58,79
Lg/LMA5	0,75	15,40	57,28
Lg/LMA1	0,20	20,00	63,15

* Цифры указывают на молярное соотношение лактоглобулина к пектину.

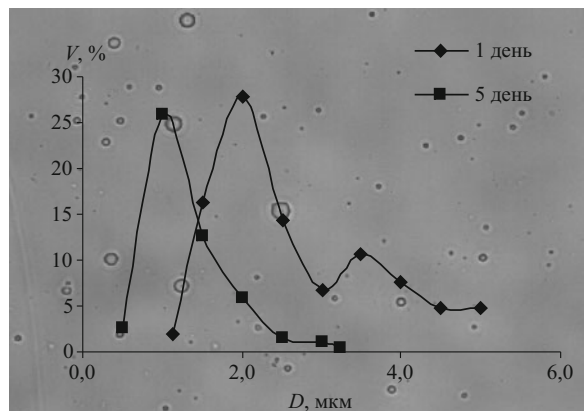


Рис. 2. Микроскопический снимок 1 капли эмульсии и профиль распределения частиц в системе β -Lg/HM65 — яблочный пектин в день приготовления и через 5 дней.

четкая граница между водным слоем и эмульсией, достигая в дальнейшем стабильного объема. На следующий день объем эмульсии в системе с высоким соотношением β -LgC/HMA, равным 105, значительно снижается до 5 мл. В эмульсионной системе с НМ-пектином при низком соотношении β -Lg/HMA, равном 5, образуется стабильная эмульсия в объеме 22 мл, в то время как с LM-пектином при том же соотношении биополимеров объем эмульсии снижается до 15,4 мл. В данном случае НМ-пектин, благодаря своей гидрофобной природе, прочно связывается с белком на поверхности масляных частиц, образуя при этом отрицательно заряженные микрокапсулы, которые отделяются друг от друга. Несмотря на плотный объем эмульсии (кремообразование) системы Lg/LMA85 и Lg/LMA54 обладают большей способностью задерживать ЛВ (от 56,55 до 63,15 %), чем с НМ-пектином. Причем степень капсулирования (захвата) ЛВ не зависит от соотношения биополимеров.

Нами установлено, что различие в способности пектиновой цепочки образовывать эффективный вторичный слой на протеиновых молекулах вокруг масляной капли зависит от молекулярной массы и структуры пектинов [3, 4]. В условиях эксперимента при $pH > pI$ белка НМ пектин, имеющий отрицательно заряженные карбоксильные группы, преимущественно

Таблица 2
Параметры микрочастиц в системе Lg/HMA и Lg/LMA

Шифр микрокапсул	N, мл		d_{43} , мкм	
	1 день	5 день	1 день	5 день
Lg/HMA105	28012170	23343475	5,41	4,26
Lg/HMA65	23121156	21342606	5,46	2,16
Lg/HMA33	31791590	30013039	2,73	2,72
Lg/HMA5	22009562	20897968	5,59	2,21
Lg/LMA87	10 004346	17 785505	7,24	5,25
Lg/LMA54	9 337390	10 893622	9,57	9,56
Lg/LMA27	13 116809	10 004346	5,62	9,26
Lg/LMA5	16 673910	11 782897	4,97	7,33
Lg/LMA1	18 897098	18 230142	6,18	9,80

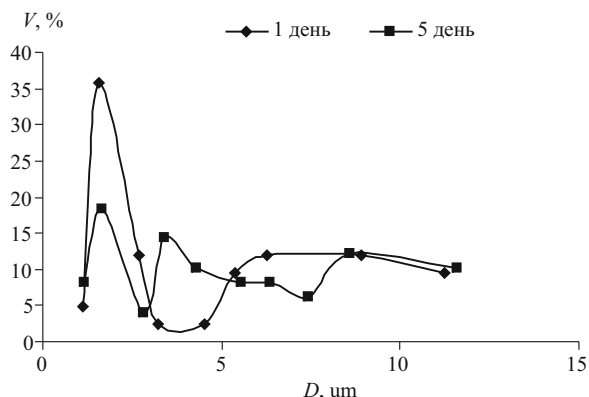


Рис. 3. Профиль распределения частиц в системе Lg/LMA 87 – яблочный пектин с различным соотношением (12,0; 7,5; 3,75 и 0,2) в день приготовления, через 5 дней.

покрывает положительно заряженную поверхность глобул β -LgC.

На рис. 1 приведены фотографии эмульсий с различным соотношением белок — пектин в системе масло — вода. Как видно, для микрокапсул β -Lg/HMA33 и β -Lg/HMA5 с более низким соотношением белок — пектин, по сравнению с микрокапсулами Lg/HMA105 Lg/HMA65, объемы эмульсий остаются также стабильными (20 – 22 мл) за счет отрицательного заряда на поверхности частиц. При дальнейшем наблюдении расслоение не наблюдается, а образуется стойкий, компактный крем с розовым оттенком. Однако, как видно из данных табл. 1, на количество адсорбированного ЛВ это заметного влияния не оказывает. Во всех 4 эмульсиях количество адсорбированного ЛВ составляет 38,8 – 47,7 %.

Следует отметить, что образование стойких эмульсий — довольно сложный процесс, зависящий в первую очередь от природы взаимодействующих компонентов. В данном случае в начале происходит адсорбция белка на масляных каплях первичной эмульсии, а за счет электростатического взаимодействия между заряженными группами второго полимера (пектина) и коллоидными частицами образуется вторичная эмульсия. Степень адсорбции полимера на заряженной поверхности зависит от свойств полимера (длины цепи, гибкости, линейной плотности заряда, концентрации), свойств частицы (радиуса, суммарного заряда на поверхности, количества) и условий внешнего раствора (температуры, pH, типа и концентрации ионов) [7].

Пектиновые цепочки с их относительно устойчивой длиной могут связывать ряд протеиновых молекул адсорбированных на масляной поверхности. Пектин с высокой молекулярной массой может покрыть масляную каплю даже с менее адсорбированным протеином на монослой и формировать устойчивый вторичный слой. В данных условиях происходит взаимодействие между протеином и пектином на поверхности первичной эмульсии. При этом, кроме взаимодействия противоположно заряженных остатков на пектине и протеине, могут также вовлекаться и метилэтерифицированные остатки уроновой кислоты посредством гидро-

фобного взаимодействия с протеином. Неустойчивые эмульсии Lg/HMA105 и 65, а также Lg/LMA87 и 54, где доля пектина мала, образуются на вторичном слое, когда микрокапсулы в системе нейтральны или недостаточно покрыты. Из полученных данных следует, что образование эмульсионных капель зависит от способности пектиновой цепочки образовывать эффективный вторичный слой вокруг протеиновых глобул.

Второй проблемой, связанной с двухстадийным приготовлением эмульсии, использованной в данных исследованиях, является экстенсивная флокуляция капли, вызванная образованием полимерных мостиков между эмульсионными каплями. При определенных условиях окружающей среды (pH, ионной силе) эмульсии становятся неустойчивыми из-за быстрой нейтрализации заряда. По этой причине эксперименты проводились таким образом, чтобы избежать данных проблем — конструированием пектиновой цепочки в жесткую форму путем увеличения pH и ионной силы вторичной эмульсии.

Для характеристики устойчивости микрокапсулы суспендировали в воде на гомогенизаторе при 9000 об/мин. Количество микрочастиц и их размеры были определены на микроскопе Motic type 102 M (Motic Instrument INC, Canada) с помощью программы Motic Image Advanced 3.2.

На рис. 2 представлено микроскопическое изображение 1 капли эмульсии и профиль распределения частиц в системе Lg/HMA65 в день приготовления и через 5 дней. Рассчитанные параметры частиц (число частиц в 1 мл и их средне-объемный диаметр d_{43}) для микрочастиц Lg/HMA и Lg/LMA приведены в табл. 2. Высокое количество частиц (31 791 590) с меньшим диаметром (2,73 мкм) было обнаружено в системе Lg/HMA33. Увеличение фракции биополимеров в системе привело к уменьшению количества частиц и увеличению их диаметра.

На кривых дифференциального распределения частиц по размерам (рис. 2) в микрокапсулах Lg/HMA65 наблюдается некоторая аномалия: начальное бимодальное распределение частиц переходит в мономодальное, что несвойственно для формирования частиц с меньшим диаметром. Однако профиль распределения в случае микрокапсул Lg/HMA33 почти не менялся в течение исследуемого времени. На пятый день, возможно, формируются кинетически устойчивые вторичные эмульсии за счет нарушения флокуляции путем разрыва полимерных мостиков между эмульсионными каплями.

По сравнению с эмульсионными системами Lg/HMA, Lg/LMA системы отличались несколько меньшим количеством частиц и средним диаметром. Высокое количество частиц (18 897098) со средним диаметром 6,18 мкм было обнаружено только в системе при молярном соотношении Lg/LMA равном 1, где доминирует доля пектина в системе. Как видно из дифференциальных кривых распределения частиц в системе Lg/LMA87 (рис. 3), увеличение фракции LM-пектина в изученных системах приводит к замет-

ному увеличению количества частиц и уменьшению их диаметра (от 7,24 до 5,25 мкм). На пятый день профиль распределения частиц изменился: с уменьшением доли пектина наблюдается бимодальное распределение частиц, которое возможно за счет образования мостиков между частицами. С увеличением фракции пектина в системе преимущественно формируются стабильные частицы.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что НМ-пектин с β -LgC при соответствующих условиях способен образовывать полимерную матрицу вокруг масляных микрочастиц и эффективно захватывать ЛВ. С возрастанием доли пектина в системе возрастает количество частиц в полученных эмульсиях. При оптимальном соотношении β -LgC/LM — яблочный пектин наблюдается стабильная эмульсия с наименьшими размерами частиц и повышенным внедрением ЛВ. Исследование пектинов, отличающихся по структуре, указывает на альтернативный выбор при создании СДЛКВ. Использование НМ-пектина позволяет получать стабильные эмульсии микрокапсул с наименьшими размерами, а LM-пектин в системе способствует эффективному захвату Rif.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан способ приготовления микрокапсул

на основе НМ- и LM-яблочного пектина с β -LgC молочной сыворотки в различных соотношениях в системе эмульсии м/в. Полученные устойчивые эмульсионные системы, способные эффективно захватывать ЛВ, могут быть использованы в фармацевтической промышленности при создании носителей лекарств с управляемым высвобождением.

Поступила 20.04.10

ЛИТЕРАТУРА

1. R. S. Langer, *Nature*, **392**, 5 – 10 (1998).
2. L. William, N-Hong Li and J. R. Benson, *Drug Del. Technol.*, **5**(2), 48 – 55 (2005).
3. Z. K. Muhidinov, Z. B. Sharifova, S. R. Usmanova, et al., *Abstrs. EPNOE (2009) "Polysaccharides as a Sources of Advanced Materials"*, Turku, Finland (2009), p. 47.
4. З. Б. Шарифова, С. Р. Усманова, З. К. Мухидинов и др., *Известия АН РТ*, **2**(135), 72 – 78 (2009).
5. З. К. Мухидинов, М. Л. Фишман, Горшкова и др., *Хим. ж. Казахстана (спец. выпуск)*, **21**, 60 – 65 (2008).
6. З. К. Мухидинов, А. С. Джонмуродов, Х. И. Тешаев и др., *Здравоохранение Таджикистана*, № 3, 44 – 49 (2009).
7. R. A. Ganzevles, in: *Food Colloids: Self-Assembly and Material Science*, E. Dickinson and M. E. Leser (eds.), Roy. Soc. Chem., Cambridge (2007), p. 195.

Поступила 20.04.10

PRODUCTION TECHNOLOGY OF RIFAMPICIN-CONTAINING MICROCAPSULES BASED ON APPLE PECTIN COMPLEXES WITH β -LACTOGLOBULIN

Z. K. Mukhidinov¹, G. F. Kasymova¹, S. R. Usmanova¹, K. B. Murzagulova², M. E. Kim², and A. V. Yanovich²

¹ Institute of Chemical Sciences, Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan;

² Romat Pharmaceutical Company, Pavlodar, Kazakhstan

A two-stage technology of rifampicin-containing microcapsules based on high- and low-methylated apple pectin complexes with milk serum β -lactoglobulin has been developed using an oil–water emulsion system. It is established that the ability of pectin chains to form an effective secondary layer on protein molecules surrounding oil drops depends on the molecular weight and structure of pectin. The obtained emulsion systems with two pectins and various pectin/protein ratios are capable of forming microcapsules with various dimensions and different rifampicin content. The proposed microcapsules can be used as potential drug carriers.

Key words: Microcapsules, technology, high- and low-methylated apple pectin, β -lactoglobulin