

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ХИТОЗАНОВЫХ МИКРОСФЕР ПРИ РАЗРАБОТКЕ ЭНТЕРАЛЬНЫХ ФОРМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Устинова Т. М., Гусак Т. И., Венгерович Н. Г., Неешпапа А. Д.

*ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4,
e-mail: gniiivm_15@mil.ru*

Резюме.

Цель. Оптимизация метода получения носителя лекарственных средств на основе микросфер хитозана с учетом влияния технологических условий на формирование частиц методом эмульсии вода/масло с последующей сшивкой глутаровым альдегидом для повышения биодоступности пероральных лекарственных форм на примере модельной субстанции.

Материалы и методы. Распределение полученных микросфер хитозана по размеру исследовали с помощью лазерного дифракционного анализатора размера частиц Malvern Mastersizer 3000, их визуализацию проводили с использованием микроскопа Leica DM 2500 (Германия), Olimpus CX41 (YI), количественный анализ включения лекарственного средства (ЛС) в микросферы осуществляли с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа (ВЭЖХ) Agilent 1260 с квадрупольным-время пролетным масс-спектрометрическим детектором Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS с источником ионизации Dual ESI.

Результаты. В работе исследован ряд технологических параметров, которые оказывают влияние на формирование микросфер хитозана. Оптимальную морфологию и размер частиц при создании полимерной системы доставки для перорального введения достигали варьированием параметрами их получения, такими как количество сшивающего агента и эмульгатора, подбором скорости гомогенизации и временем отверждения.

Микросферы хитозана были получены методом эмульсионной сшивки с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента. Основное влияние на формирование плотных, гладких сферических частиц оказывало количество сшивающего агента и время выдержки (отверждения) частиц. Микрочастицы с такой структурой были получены при добавлении 5 мл глутарового альдегида, со скоростью гомогенизации эмульсии – 10000 об/мин и временем выдержки 120 минут.

Частицы характеризовались моодисперсным распределением и медианным размером 1150 [1145; 1165] мкм. Исследование эффективности включения осуществляли методом пассивной сорбции при соотношении 30, 50 и 70 % ЛС от массы полимера. В качестве модельного лекарственного средства использовали стрептомицин. Максимальную эффективность включения ЛС равную 22,6 [18,9; 25,5] достигали при использовании 50 % ЛС к массе использованного полимера.

Заключение. Подобраны оптимальные условия для формирования микросфер, содержащих максимальное включение стрептомицина, полученные эмульсионным способом вода/масло. Микрочастицы имели сферическую форму, обладали гладкой поверхностью с пористой структурой и медианным размером частиц от 1145,0 до 1165,0 мкм. Частицы были получены при следующих технологических параметрах эмульсионной сшивки с глутаровым альдегидом: объем сшивающего агента – 5 мл, скорость гомогенизации – 10000 об/мин, время отверждения 120 мин, соотношение ЛС/хитозан – 50 % от массы хитозана.

Ключевые слова. Микросферы; хитозан; сшивающий агент; глутаровый альдегид; эмульсия вода/масло.

Для корреспонденции: Устинова Татьяна Михайловна, gniiivm_15@mil.ru

OPTIMIZATION OF CHITOSAN MICROSPHERES OBTAINING METHOD IN ENTERAL MEDICATIONS DEVELOPMENT

Ustinova T.M., Gusak T.I., Vengerovich N.G., Neeshpapa A.D.

FSBI “The State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine” of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 195043, Russia, Saint Petersburg, Lesoparkovaya Street, Building 4, e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Abstract.

Purpose. Optimization of a chitosan microspheres-based drug carrier obtaining method in terms of the process conditions’ effect on particle formation by the water-in-oil emulsion method with subsequent glutaraldehyde cross-linking for increased bioavailability of oral pharmaceutical forms on a model substance.

Materials and method. Size distribution of the obtained chitosan microspheres was explored using a laser light scattering particle size analyzer Malvern Mastersizer 3000; their visualization was performed using a microscope Leica DM 2500 (German), Olympus CX41 (YI); quantitative analysis of microsphere-encapsulated drug was done using a high-performance liquid chromatograph Agilent 1260 with a quadrupole time of flight mass spectrometer Agilent 6530, Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, and an ionization source Dual ESI.

Results. The paper studied a set of process parameters influencing chitosan microspheres formation. The optimal morphology and particle size upon creation of a polymeric oral delivery system were achieved by variation of such parameters of their obtaining as the linking agent and emulsifier amounts, homogenization rate selectivity and hardening time. Chitosan microspheres were obtained by emulsion cross-linking technique using glutaraldehyde as a linking agent. The linking agent amount and hardening time exert the main influence on the formation of dense, smooth particles. Such microparticle structure was obtained by adding 5 mL of glutaraldehyde, at homogenization rate of 10000 rpm and hardening time of 120 min.

Particles were characterized by a monodisperse distribution, and median size of 1150 [1145; 1165] μm . Encapsulation efficiency was analyzed by passive sorption method with drug-to-polymer ratio of 30, 50 and 70% (w/w). Streptomycin was used as a model drug. The maximum encapsulation efficiency of 22.6 [18.9; 25.5] was achieved when using drug-to-polymer ratio of 50% (w/w).

Conclusion. The optimal conditions have been chosen for microspheres formation, when they contain the maximum streptomycin loading, and were obtained by the water-in-oil emulsion method. Microparticles had spherical shapes, smooth surfaces with a minor porosity, and a median size of 1145-1165 μm . Particles were obtained using the following process parameters of emulsion cross-linking with glutaraldehyde: linking agent amount – 5 mL, homogenization rate – 10000 rpm, hardening time – 120 min, and drug-to-polymer ratio – 50% (w/w).

Key words. Microspheres; chitosan; linking agent; glutaraldehyde; water-in-oil emulsion.

Введение.

Разработку эффективных энтеральных лекарственных форм следует считать одной из актуальных задач современной фармацевтической химии и технологии. На сегодняшний день потребность в применении лекарственных средств с высокой пероральной биодоступностью обусловлена возможностью самостоятельного использования вне медицинских организаций, что, несомненно, важно с экономической точки зрения.

К основным направлениям использования нано- и микроразмерных технологий относят высокую тропность к целевому органу-мишени, прогнозируемость скорости высвобождения активного начала, снижение колебаний концентрации ЛС в системе кровообращения, что в совокупности приводит к увеличению эффективности и снижению побочных эффектов. Природные полимеры, в частности полисахариды, используются в качестве систем доставки лекарственных препаратов различной природы, вакцин, ДНК содержащих

биотехнологических конструкций [1, 2]. Наночастицы на основе хитозана часто применяются в качестве матриц для систем контролируемого высвобождения и для направленной доставки к тканям-мишеням благодаря своей биосовместимости, биodeградации, адгезивным свойствам и возможности образования ковалентно-сшитого хитозана через аминокгруппы [3]. Наличие протонированных аминокгрупп в молекуле хитозана повышает его реакционную способность, в результате чего хитозан может легко подвергаться химическим модификациям, которые улучшают его химические и механические свойства для пероральной доставки веществ [4].

Доставка и высвобождение ЛС из частиц хитозана зависят от перекрестного связывания, морфологии, размера и плотности системы, а также от физико-химических свойств субстанции. При этом биоадгезивность и легкость связывания микрочастиц хитозана с отрицательно заряженными поверхностями (например, слизистые оболочки) реализуются благодаря процессу протонирования полимера в кислой среде до нейтрального раствора, при этом реакция зависит не только от pH, но и от степени деацетилирования [5]. К основным методам получения хитозановых микросфер относят ионотропное гелеобразование, коацервацию, сшивание с образованием ковалентной связи и распылительную сушку. Часто используемым способом получения микрочастиц также является приготовление эмульсий типа вода/масло, или Пикеринг, с последующим отверждением микрочастиц сшивающими агентами (глутаровый альдегид, триполифосфат, лимонная кислота и др.) [6, 7, 8].

Формирование микросфер или гидрогелей хитозана возможно благодаря его поликатионной природе и способности модифицировать поверхность за счет электростатических взаимодействий с помощью ионных сшивающих агентов (анионов или полианионов). К одному из условий образования ионной связи относят наличие в молекуле хитозана протонированных аминокгрупп и двух отрицательно заряженных групп в молекуле сшивающего агента [9, 10, 11, 12]. Однако, к недостаткам ионных сшивающих агентов относят высокую скорость образования

ионных связей. Получаемые гидрогели, как правило, имеют недостаточную механическую стабильность, с риском разрушения системы из-за высокого pH-чувствительного набухания [11].

Использование ковалентного сшивания приводит к образованию стабильной пространственной сетки полимера, по сравнению с использованием ионных сшивающих агентов [13]. Образование ковалентной связи происходит между аминными группами хитозана и молекулярными группами (как правило, альдегидами) сшивающего агента [14]. Пример реакции химического взаимодействия хитозана с глутаровым альдегидом представлен на рисунке 1 [15].

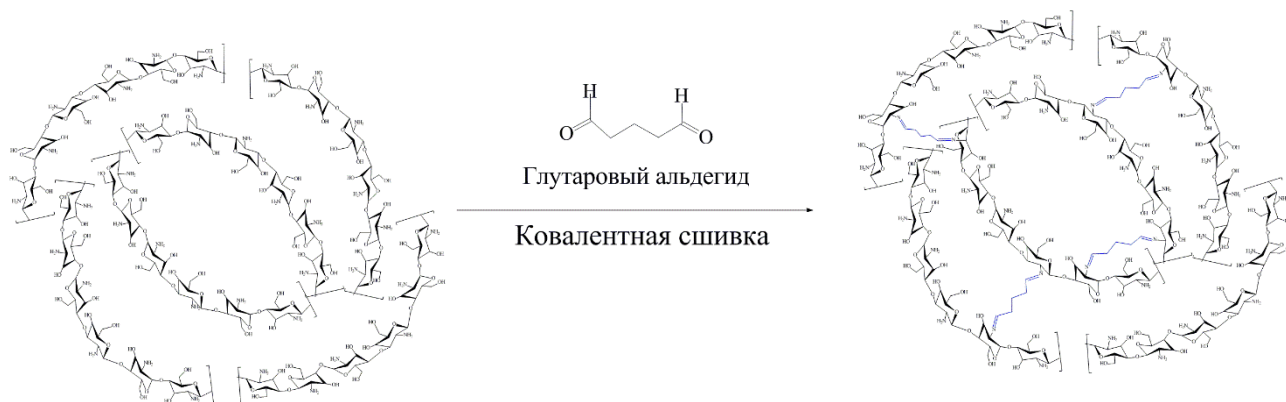


Рисунок 1. Реакция образования хитозана, химически сшитого с глутаровым альдегидом (по N. Islam et al.)

Основными параметрами, влияющими на физико-химические свойства микрочастиц полимера, являются концентрация хитозана, глутарового альдегида (или другого сшивающего агента) и уксусной кислоты, pH [16]. На качество полимерной сшивки оказывает влияние степень деацетилирования хитозана и количество сшивающего агента. Так гели с малой степенью деацетилирования обладают повышенным модулем упругости [17]. Образование оснований Шиффа в процессе сшивки хитозана с глутаровым альдегидом сопровождается изменением цвета, что обусловлено гелеобразованием или образованием поперечных связей с формированием трехмерной сетчатой структуры. Скорость образования частиц зависит от температуры, концентрации уксусной кислоты, добавленного электролита и от общей концентрации amino- и альдегидных групп. Плотность

сшивки напрямую зависит от концентрации глутарового альдегида [16]. При формировании микросфер хитозана методом эмульсионной сшивки в систему вносят поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые могут повлиять на высвобождение ЛС, на снижение агломерации микрочастиц за счет влияния на процесс поверхностной адсорбции. Чаще всего ПАВ (спаны, твины и их смеси) вводят на стадии приготовления исходной эмульсии [18, 19].

Отмечено, что сформированные микросферы хитозана с использованием глутарового альдегида с различными ЛС характеризовались схожими характеристиками. Так учитывая скорость эмульгирования, время выдержки, соотношение лекарственный препарат/полимер, количество альдегида и ПАВ микросферы хитозана обладали гладкой поверхностью, имели сферическую форму и узкое распределение частиц по размеру (средний диаметр частиц составлял 100 - 350 нм), но при этом отмечали образование агрегатов, что связывали с самоадгезией полимерных материалов и межчастичную сшивку, которая повышается с количеством сшивающего агента [20, 21]. Частицы хитозана, сформированные эмульсионной сшивкой позволяли снижать количество загружаемого ЛС с сохранением той же активности. Установлено, что с увеличением концентрации полимера, сшивающего агента, скорости и времени сшивки нагрузочная способность и эффективность захвата частицами хитозана снижается из-за неоднородного распределения сшивающего агента, что приводило к образованию частиц большого размера [22, 23, 24].

Цель исследования – оптимизировать метод получения носителя лекарственных средств на основе микросфер хитозана с учетом влияния технологических условий на формирование частиц методом эмульсии вода/масло с последующей сшивкой глутаровым альдегидом для повышения биодоступности пероральных лекарственных форм на примере модельной субстанции.

Материалы и методы. В работе использовали хитозан со средней молекулярной массой (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, США), ледяную уксусную

кислоту 99,8 % (НеваРеактив, Россия), поливиниловый спирт (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, New York), вазелиновое масло (Медхим, Россия, ГОСТ 3164-78), диэтиловый эфир (Экос-1, Россия), твин-80 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, США), глутаровый альдегид 25 % (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, США).

Образование эмульсии осуществляли с использованием гомогенизатора Heidolph SilentCrusher M (Heidolph, Германия), последующее перемешивание и отверждение частиц проводили на магнитной мешалке Biosan MSH-300 (Biosan SIA, Латвия). Очистку частиц выполняли с использованием центрифуги Eppendorf, Centrifuge-5804R (Германия), загруженные частицы подвергали сушке при комнатной температуре.

Получение микросфер хитозана проводили методом эмульсионной сшивки хитозана с глутаровым альдегидом при создании эмульсии вода/масло. Сформированные капли раствора хитозана (капли дисперсной фазы) в эмульсии подвергали процессу отверждения за счет образования ковалентной связи между аминными группами хитозана и молекулярными группами (альдегидными) сшивающего агента. В качестве сшивающего агента был использован 25 % раствор глутарового альдегида.

Распределение диспергированных частицы в воде по размерам измеряли с помощью лазерного дифракционного анализатора размера частиц Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Mastersizer Ltd., Великобритания). Оцениваемый показатель, характеризующий распределение частиц – Dv_{50} , который представляет собой эквивалентный диаметр сферы, описывающий частицу, меньше которого в образце находится 50 % частиц по объему.

Визуализацию сформированных частиц проводили с использованием микроскопа Leica DM 2500 (Германия), Olimpus CX41 (YI). Фоторегистрация осуществлялась при помощи цифровой фотокамеры Leica DFC 490 с базовым программным обеспечением Leica Image Manager и цифровой камеры Video Zawt Standart при увеличении $\times 1000$ и с помощью сканирующего электронного

микроскопа (СЭМ) KYKY - EM8000F STD FEG SEM. Для подготовки образца к исследованию на электронном микроскопе использовалась напыляющая вакуумная система Nano-Structured Coating Co. (модель: DSCR).

С целью оценки применения методики исследовали степень включения модельного ЛС. В качестве модельного ЛС применяли стрептомицин. Стрептомицин – антибиотик широкого спектра действия, в основном применяют в инъекционной форме, так как он плохо всасывается в желудочно-кишечном тракте и почти полностью выводится через кишечник. Максимально разовая доза стрептомицина составляет 1 г. Ведутся разработки пероральной формы стрептомицина, как и других аминогликозидов, с использованием микро- и наноразмерных систем доставки с включением $32,02 \pm 4,08$ % и сохранением необходимых концентраций в течение 4 дней [1].

Изучение эффективности включения лекарственного средства проводили сравнение трех соотношений ЛС/полимер (1:3,3 (30%), 1:2 (50%), 1:1,4 (70%)). Для количественной оценки эффективности включения модельного лекарственного средства готовили раствор загруженных частиц с концентрацией 10 мг/мл в метаноле. Суспензию частиц подвергали воздействию ультразвука (УЗ) в течение 5 минут. Для хроматографического исследования использовали анализ, очищенный от остатков частиц.

Идентификацию модельного лекарственного средства проводили с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа (ВЭЖХ) Agilent 1260 с квадрупольно-время пролетным масс-спектрометрическим детектором Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS с источником ионизации Dual ESI при следующих условиях: фаза А – 0,1 % TFA в H₂O, фаза Б – 10 мМ AcAm 15 % H₂O, 10 % ISP в ACN, градиентный режим (с 0 по 3 мин при 5 % фазы В, с 3 по 7 минуту фаза В увеличивается до 75 %, с 10 по 11 минуту фаза В уменьшается до 5 %), скорость потока 0,6 мл/мин; масс-детектирование проводили в полном ионном токе,

высоком разрешении при регистрации положительных ионов. Идентификацию аналита проводили по выделенному иону $m/z = 581,2656 \pm 0,01$.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Excel и Statistica 10. Критическое значение уровня статистической значимости принимали равным 0,05. Описательная статистика представлена медианой и межквартильным интервалом 25 и 75 перцентилем (Q25 и Q75) (Med [Q25; Q75]). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. При сравнении двух независимых групп и определении значимости использовали непараметрический метод несвязанных выборок U-критерий Манна – Уитни.

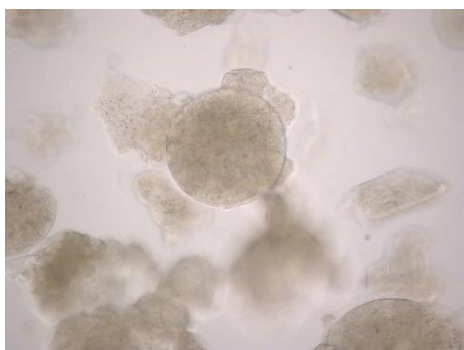
Получение хитозановых микрочастиц. Для формирования основы эмульсии 60 мл вазелинового масла и 40 мл диэтилового эфира помещали в 250-мл пластиковый стакан. К смеси добавляли 1 мл эмульгатора – твин-80, при перемешивании. К полученному раствору с помощью иглы ($0,7 \times 19$ мм) добавляли 3 мл раствора хитозана в концентрации 20 мг/мл (2 % мас/об), приготовленный растворением хитозана в 5 % уксусной кислоте. Процесс формирования частиц при комнатной температуре сопровождался гомогенизацией эмульсии при перемешивании с различными скоростями (7500, 10000 и 25000 об/мин). После полного добавления раствора хитозана в эмульсию гомогенизацию продолжали с той же скоростью в течение 5 минут. Далее скорость перемешивания снижали до 1100 об/мин и дважды добавляли 25 % глутаровый альдегид различного объема (0,25, 0,5 или 2,5 мл) при непрерывном перемешивании эмульсии вначале через 10 минут после добавления хитозана в эмульсию, затем через 30 минут. Время выдержки варьировали от 30 минут до 2 часов (временем выдержки считали время после окончания добавления сшивающего агента). Суспензию микросфер выдерживали в течение 1 часа, чтобы частицы осели под действием силы тяжести, после чего надосадочную жидкость сливали. Дальнейшую промывку частиц проводили методом центрифугирования с использованием диэтилового эфира (до

максимальной очистки частиц от вазелинового масла), далее частицы переносили в воронку с фильтром Шотта и поочередно несколько раз промывали небольшими количествами воды и диэтилового эфира, после смыва остатков вазелинового масла очистку продолжали только водой. Осушение микросфер осуществляли при 40 °С в течение суток.

Загрузку ЛС в частицы осуществляли методом пассивной сорбции при постоянном перемешивании в течение 48 часов. Для этого частицы погружали в раствор содержащий стрептомицин определенной концентрации (30, 50 или 70 % от массы полимера). Частицы отделяли от водной фазы и сушили при комнатной температуре.

Результаты и обсуждение. В основу разработки хитозановых микрочастиц был положен метод эмульсии вода/масло с последующей сшивкой глутаровым альдегидом по методике, предложенной Denkbas E. [25]. В процессе получения микросфер в исходной системе варьировали концентрацию ПАВ от 0 до 0,5 %, объем глутарового альдегида от 0,5 до 5 мл, скорость гомогенизации от 7500 до 25000 об/мин и время выдержки полученных частиц от 30 до 120 мин. Стрептомицин в микросферы включали методом пассивной сорбции, концентрация лекарственного средства в растворе соответствовала 30, 50 и 70 % от массы хитозана.

На первом этапе исследовали влияние поливинилового спирта на агломерацию полученных частиц при добавлении его в кислую среду хитозана на стадии образования эмульсии вода/масло. Было показано, что ПВС в качестве эмульгатора не оказывал значимого влияния на размер получаемых частиц и их агломерацию. Для каждого образца распределение по размеру имело бимодальное распределение и Dv_{50} составляло 495 [434;513] мкм для частиц с добавлением ПВС и 505 [492;544] мкм в случае отсутствия ПАВ в частицах. Сформированная поверхность и плотность сшивки микрочастиц при добавлении ПВС на стадии образования эмульсии вода/масло представлены на рисунке 2.



А



Б

Рисунок 2. Полученные микрочастицы хитозана при добавлении 0,5 % поливинилового спирта при формировании микрочастиц хитозана, где А – микрочастицы сформированы с добавлением 0,5 % поливинилового спирта; Б – микрочастицы сформированы без добавления поливинилового спирта

Согласно результатам, ПВС оказывал влияние на качество сшивки и формирование поверхности микрочастиц хитозана. Отмечали, что добавление эмульгатора снижало качество сшивки, что приводило к образованию в образцах множественного количества осколков полимера. В обоих случаях микрочастицы имели сферическую форму, рыхлую и пористую поверхность.

Известно, что степень перекрёстного связывания полимера и сшивающего агента влияют на пролонгированное действие у микрочастиц хитозана. Использование глутарового альдегида позволяло создавать плотно сформированные микросферы хитозана, способные обладать свойствами длительного высвобождения. В литературе известно, что при высокой степени сшивки частиц высвобождение до 60 % лекарственного средства происходило в течение 1 месяца [27]. Плотность сшивки также является основным параметром, влияющим на растворимость, механическую прочность, степень набухания и скорость высвобождения лекарственного средства.

Плотность сшивки и морфологию поверхности микрочастиц изучали при добавлении различного объема сшивающего агента. Было выявлено, что объем глутарового альдегида равный 0,5 мл и 1 мл способствовал образованию

сферических микрочастиц с пористой поверхностью, менее плотных по сравнению с частицами полученных при добавлении 5 мл сшивающего агента (рис. 3). В эксперименте с максимальным добавлением glutaraldehyde частицы имели сферическую форму и гладкую поверхность. Отмечали, что избыточное количество glutaraldehyde приводило к увеличению размера частиц. Медианный размер частиц составлял 1150 [1145;1165] мкм, что в 2 раза больше, чем образцы, сшитые 0,5 мл и 1 мл glutaraldehyde.

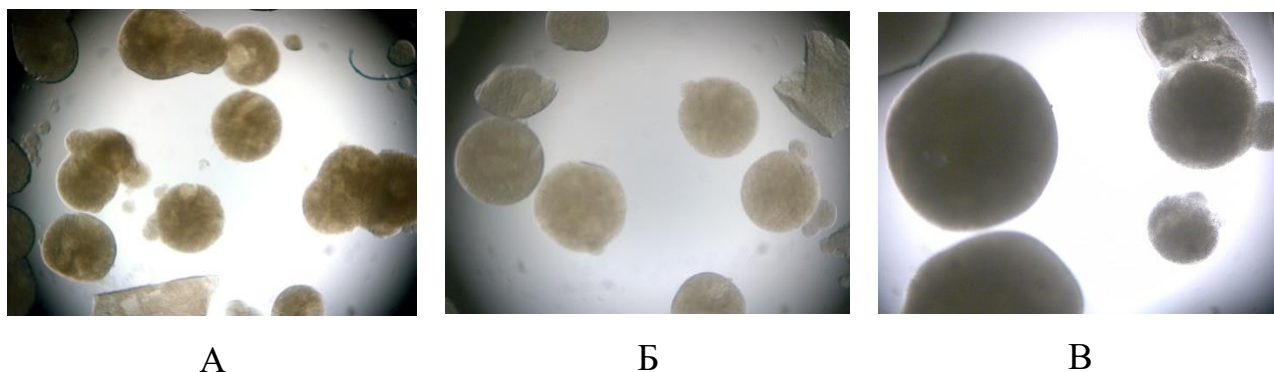


Рисунок 3. Микрочастицы хитозана, сшитые различным количеством glutaraldehyde, где А – 0,5 мл glutaraldehyde, Б – 1 мл glutaraldehyde, В – 5 мл glutaraldehyde

В проведенных исследованиях было показано, что на формирование частиц и их размер оказала скорость гомогенизации полимерной эмульсии (рис. 4). Отмечали, что получаемые частицы характеризовались бимодальным и тримодальным распределением, связанным с наличием в образцах осколков полимера и несформированных частиц. При скоростях гомогенизации эмульсии 7500 и 25000 об/мин средний диаметр составил 149 [144;150] мкм и 288 [271;301] мкм. В этих случаях микрочастицы имели сферическую структуру, осколки неправильной формы полимера и конгломераты частиц. При скорости гомогенизации 10000 об/мин средний размер образованных частиц был больше в 2-4 раза по сравнению с вышеперечисленными. Отмечали так же, что сформированные частицы имели сферическую форму с неровной поверхностью, так же присутствовало незначительное количество несформированных частиц.

Согласно результатам эксперимента, оптимальная скорость гомогенизации для формирования частиц необходимой формы, размера и морфологии составила 10000 об/мин. Скорость меньше или больше оптимальной приводила к образованию систем с несформированными остатками хитозана и большим количеством осколочных фрагментов.

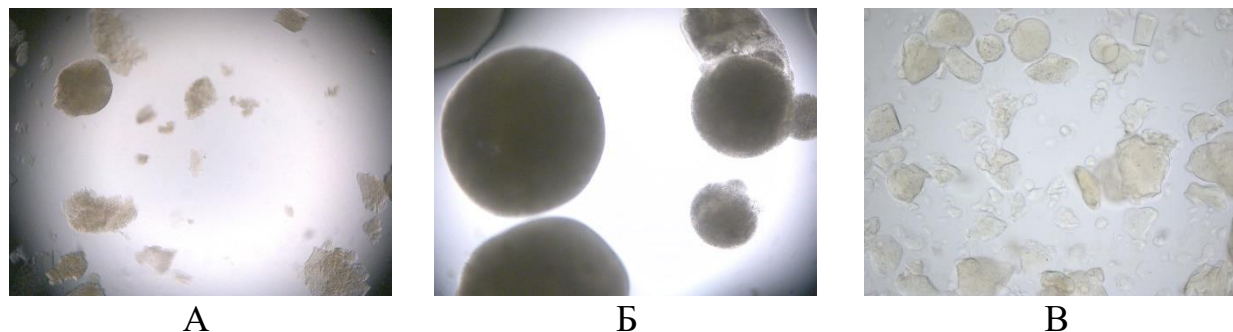


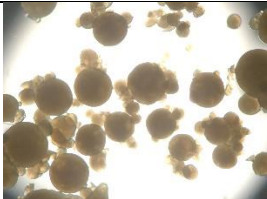
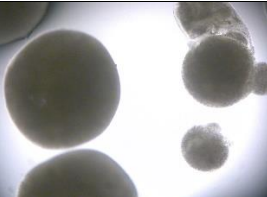
Рисунок 4. Микрочастицы хитозана, сформированные при различных скоростях гомогенации, где А – микрочастицы, сформированные при 7500 об/мин; Б – микрочастицы, сформированные при 10000 об/мин, В – микрочастицы сформированные при 25000 об/мин

Изучение необходимого времени отверждения осуществляли на сформированных микрочастицах при следующих условиях эксперимента: скорость гомогенизации эмульсии – 10000 об/мин, объем добавляемого 25 % водного глутарового альдегида составлял 5 мл, варьирование временем выдержки составляло от 30 до 120 мин. Было показано, что время отверждения (выдержки) оказывало влияние на формирование поверхности микрочастиц и их размер (табл. 1). С увеличением времени выдержки отмечали динамику к увеличению размера микрочастиц с монодисперсным распределением. Также было показано, что при минимальном времени выдержки происходила конгломерация более мелких частиц к крупным, а с увеличением времени выдержки образование мелких микрочастиц было минимальным. Во всех экспериментах в основном преобладала сферическая форма с небольшой шероховатостью и образованными внутренними порами. Для системы, обладающей пролонгированным свойствами, оптимальным

временем отверждения составляет 120 минут. При визуализации сформированных частиц и при анализе распределения частиц по размерам была выявлена следующая морфология и размеры: частицы сферической формы, плотно сшитые, шероховатые, с пористой структурой, медианный размер частиц варьировал от 1145,0 до 1165,0 мкм.

Таблица 1.

Влияние времени отверждения на формирование микросфер хитозана и их распределение по размеру, n=4, Med [Q25; Q75]

Время выдержки, мин	Фотографии	Распределение по размеру частиц, мкм	
30		D _v 10	171 [165,8; 76,0]
		D _v 50	433 [424,5;440,5]
		D _v 90	1140[1137,8;1143,5]
60		D _v 10	166 [160,8; 68,5]
		D _v 50	433 [430,5;436,5]
		D _v 90	876 [873,0; 879,0]
90		D _v 10	274 [267,8; 76,8]
		D _v 50	767 [764,5; 72,3]
		D _v 90	1510 [1503,8; 517,5]
120		D _v 10	694 [685; 696]
		D _v 50	1150 [1145;1165]
		D _v 90	2070 [2061;2077]

С помощью сканирующей электронной микроскопии была изучена поверхность частиц с оптимальными параметрами синтеза (объем сшивающего агента – 5 мл, скорость гомогенизации – 10000 об/мин, время отверждения –

120 мин). На рисунке 5 представлена частица, полученная из хитозана, размером около 1000 мкм, сферической формы. Сканирующий электронный микроскоп позволил увидеть складчатую (рис. 5А) и пористую (рис. 5Б) структуру частицы, что может говорить о постепенной медленной сшивке хитозана глутаровым альдегидом, что позволяет сделать вывод о возможности пролонгированного высвобождения лекарственного средства из такой частицы.

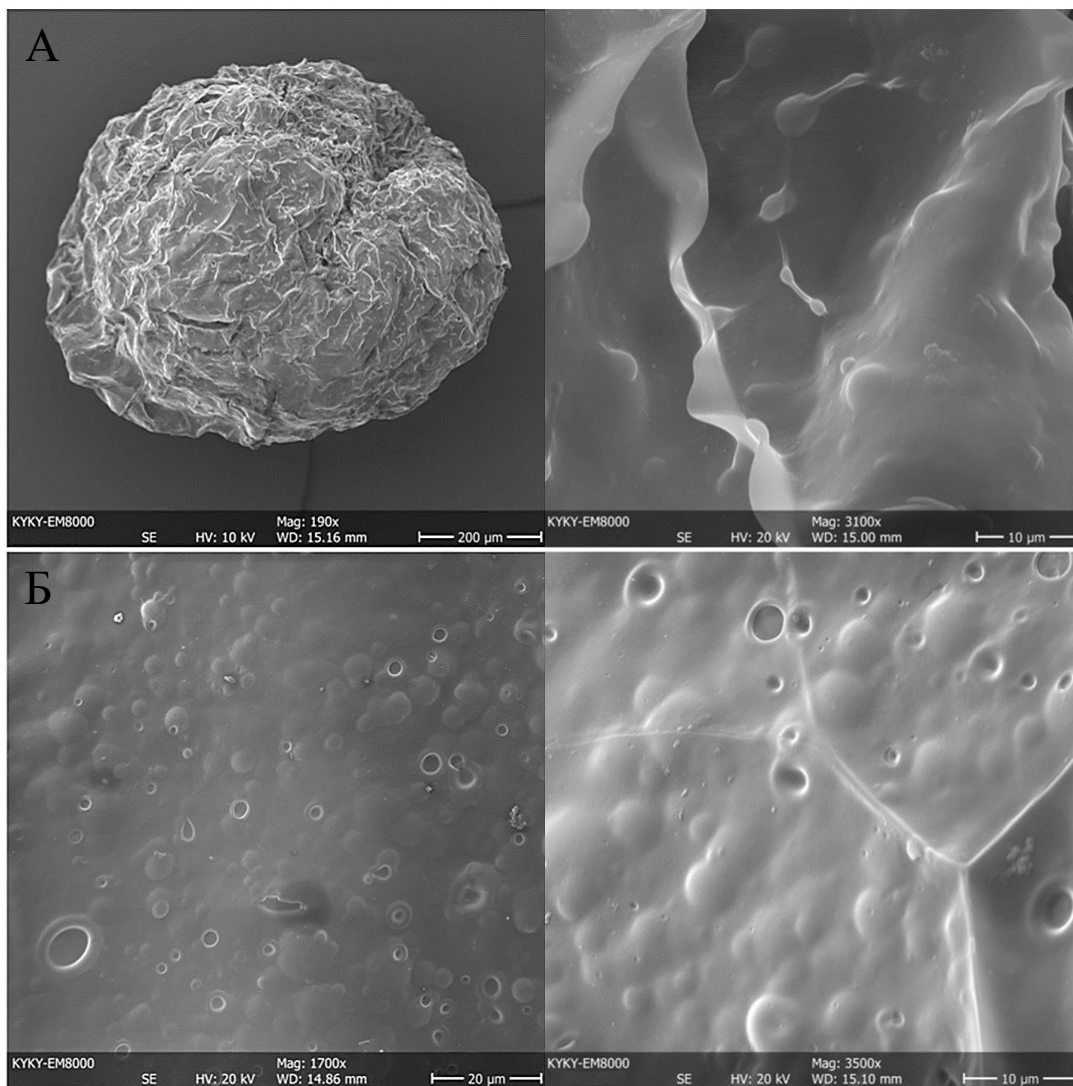


Рисунок 5. СЭМ – фотография частицы хитозана, сшитой глутаровым альдегидом. А – складчатая поверхность хитозановой частицы, Б – поры на поверхности хитозановой частицы

На завершающем этапе работы проводили исследование влияния соотношения ЛС/полимер на эффективность загрузки стрептомицина. Полученные

данные при пассивной загрузке представлены в таблице 2. Показано, что при соотношении 30 % ЛС к массе полимера эффективность загрузки составляла 13,9 [13,4; 14,3] %. При увеличении количества стрептомицина до 50 %, исследуемый показатель увеличивался в 1,5 раза и составлял 22,6 [18,9; 25,5] %. При максимальном соотношении ЛС/хитозан статистически значимого увеличения эффективности включения не регистрировали. Соответственно, максимальную эффективность включения микросфер хитозана, полученных эмульсионным способом, достигали при соотношении ЛС/полимер 1:2.

Таблица 2.

Эффективность загрузки (%) стрептомицина при различном соотношении ЛС/хитозан, n=4, Med[Q25;Q75]

Соотношение ЛС/полимер	Эффективность загрузки, %	Эффективность захвата микросферами, %
1:3,3 (30%)	13,9 [13,4; 14,3]	62 [57,2;65]
1:2 (50%)	22,6 [18,9; 25,5]*	64 [57;69]
1:1,4 (70%)	19,7 [17,4; 21,8]	67 [63;69]
Примечание: * - значение статистически значимо, при $p < 0,05$. Эффективность загрузки – соотношение массы ЛС в частице к массе частицы Эффективность захвата микросферами – соотношение массы ЛС в частице к общей массе ЛС		

Заключение. Благодаря наличию первичных аминогрупп и, соответственно, своим катионным свойствам, хитозан является одним из полисахаридов пригодных для доставки ЛС. В данной работе было исследовано влияние технологических параметров на получение микросфер хитозана для перорального введения. В результате были определены оптимальные условия получения микрочастиц хитозана. Сферические частицы с пористой структурой, медианным размером частиц от 1145,0 до 1165,0 мкм и эффективностью загрузки ЛС 22,6 % были получены при следующих условиях эмульсионной сшивки глутаровым альдегидом:

объем сшивающего агента – 5 мл, скорость гомогенизации – 10000 об/мин, время отверждения – 120 мин, соотношение ЛС/хитозан – 50 % от массы хитозана. Также отмечали, что наноразмер частиц эмульсионным способом получения достигнут не был, в связи с образованием крупных капель и агломератов на стадии формирования эмульсии. Использование оптимизированной методики в разработке и модификации ЛС для перорального введения обеспечит возможность наработки микросфер с характеристиками удовлетворительными для проведения исследования их эффективности на модели *in vivo*.

Список литературы

1. Matalqah S.M., Aiedeh K., Mhaidat N.M. et al. Chitosan nanoparticles as a novel drug delivery system: a review article. *Current drug targets*.2020; 15(15): 1613-1624. <https://doi.org/10.2174/13894501216662000711172536>
2. Устинова Т.М., Венгерович Н.Г., Чалых С.Н., Гусак Т.И. Повышение биодоступности биотехнологических и иммунобиологических лекарственных препаратов с использованием микросфер хитозана (обзор литературы). *Медлайн.ру*. 2022; 23: 217-229.
3. Varshosaz J., Alinagari R. Effect of citric acid as cross-linking agent on insulin loaded chitosan microspheres. *Iranian Polymer Journal*.2005; 14(7): 647-656.
4. Shanqiti E.M., Alfooty K.O., Abdelaal M.Y. Synthesis of chitosan nanocomposites for controlled release applications. *International Journal of Biological Macromolecules*.2021; 168: 769-774. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.1345>
5. Abdelkader H., Hussain S.A., Abdullah N. et al. Review on micro-encapsulation with chitosan for pharmaceuticals applications. *MOJ Current Research & Reviews*.2018; 1(2). 77 - 84. <https://doi.org/10.15406/mojcurr.2018.01.000137>
6. Mwangi W.W., Preparation and Characterization of chitosan-stabilized oil-in-water linking emulsions for controlled delivery application. *Monash University*. Thesis., Malaysia, Sep. 2017. <https://doi.org/10.4225/03/59b9bb35e371>.

7. Frlani, F., Parisse, P. Sacco On the formation and stability of chitosan/hyaluronan-based complex coacervations. *Molecules*.2020; 25(5). 1-11. <https://doi.org/10.3390/molecules25051071>.
8. De la Paz N., Fernandez M., Lopez O. et al. Spray drying of chitosan acid salts: process development, scaling up and physicochemical material characterization. *Marine Drugs*.2021; 19(6). 1-16. <https://doi.org/10.3390/md19060329>
9. Sarwar A., Katas H., Zin N.M. Antibacterial effects of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: impact of particle size molecular weight. *Journal of nanoparticle research*.2014; 16(7). 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2517-9>.
10. Камская В.Е. Хитозан: структура, свойства и использование. Научное обозрение. *Биологические науки*. 2017; 6: 36-42.
11. Jozwiak T., Filipkowska U., Szymczyk P. et al. Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of Reactive Black 5 dye. *Reactive and Functional Polymers*.2017; 144: 58-74. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.03.007>
12. Касаткина М.А. Получение биологически активных пленочных материалов на основе хитозана, модифицированных полифосфатом. *Химико-фармацевтический журнал*.2016; 50(4): 32-39.
13. Berger J., Reist M., Mayer J.M. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutic and Biopharmaceutics*.2004; 57(1): 19-34. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(03)00161-9)
14. Hu H., Xin J.H., Hu H. et al. Glutaraldehyde-chitosan and poly (vinyl alcohol) blends, and fluorescence of their nano-silica composite films. *Carbohydrate Polymers*.2013; 91(1): 305-313. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.038>
15. Islam N., Dmour I., Taha M. Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. *Heliyon*.2019; 5: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01684>

16. Fen Y.W., Mat Yunus W.M., Moxsin M.M. et al. Optical properties of crosslinked chitosan thin film with glutaraldehyde using surface plasmon resonance technique. *American Journal of Engineering and Applied Sciences*.2011; 4(1): 61–65. <https://doi.org/10.3844/ajeassp.2011.61.65>
17. Ramachandran S., Nandhakumar S., Dhanaraju M. Formulation and characterization of glutaraldehyde cross-linked chitosan biodegradable microspheres loaded with famotidine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*.2011; 10(3): 310-316. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i3.13>
18. Faghmous N., Bouzid D., Boumaza M. et al. Optimization of chitosan-coated W/O/W multiple emulsion stabilized with span 80 and tween 80 using Box-Behnken design. *Journal of dispersion science and technology*.2020; 1-13. <https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1774387>
19. Langaroudi N.F., Kazemi N.M. Preparation and characterization of O/W nanoemulsion with Mint essential oil and Parsley aqueous extract and the presence effect of chitosan. *Nanomedicine Research Journal*.2019; 4(1): 48-55. <https://doi.org/10.22034/nmrj.2019.01.008>
20. Li B., Shan C.-L., Zhou Q. et al. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of cross-linked chitosan-glutaraldehyde. *Marine Drugs*.2013; 11(5): 1534-1552. <https://doi.org/10.3390/md11051534>
21. Banerjee T., Mitra S., Singh A.K. et al. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*.2002; 24(1-2): 93-105. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00267-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00267-3)
22. Grumezescu A.M., Andronesu E., Holban A.M. et al. Water dispersible cross-linked magnetic chitosan beads for increasing the antimicrobial efficiency of aminoglycoside antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*.2013; 454(1): 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.054>
23. Sethi A., Ahmad M., Huma T. et al. Pharmacokinetic variables of medium weight cross linked chitosan nanoparticles to enhance the bioavailability of 5-flourouracil

and reduce the acute oral toxicity. *Drug Delivery*.2021; 28(1): 1569-1584.
<https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1944398>

24. Nayak U.Y., Gopal S., Mutaik S. et al. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of Zidovudine. *Journal of Microencapsulation*.2009; 26(3): 214-222. <https://doi.org/10.1080/02652040802246325>

25. Pandey R., Khuller G.K. Nanoparticles-based oral drug delivery system for an injectable antibiotic – streptomycin. *Chemotherapy*.2007; 53: 437-441.
<https://doi.org/10.1159/000110009>

26. Denkbaz E.B., Seyyal M., Piskin E. 5-Fluorouracil loaded chitosan microspheres for chemoembolization. *Journal of Microencapsulation*.1998; 16(6): 741-749.
<https://doi.org/10.1080/026520499288681>

27. Jameela S. R., Jayakrishnan A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long-acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials*.1995; 16(10): 769-775. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)99639-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)99639-4)

References.

1. Matalqah S.M., Aiedeh K., Mhaidat N.M. et al. Chitosan nanoparticles as a novel drug delivery system: a review article. *Current drug targets*.2020; 15(15): 1613-1624.
<https://doi.org/10.2174/13894501216662000711172536>.

2. Ustinova T.M., Vengerovich N.G., Chalykh S.N., Gusak T.I. Increasing the bioavailability of biotechnology-derived Pharmaceuticals and immunobiologicals using chitosan Microspheres (literature review). *Medline.ru*. 2022; 23: 217-229. (In Russian).

3. Varshosaz J., Alinagari R. Effect of citric acid as cross-linking agent on insulin loaded chitosan microspheres. *Iranian Polymer Journal*.2005; 14(7): 647-656.

4. Shanqiti E.M., Alfooty K.O., Abdelaal M.Y. Synthesis of chitosan nanocomposites for controlled release applications. *International Journal of Biological Macromolecules*.2021; 168: 769-774. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.1345>.

5. Abdelkader H., Hussain S.A., Abdullah N. et al. Review on micro-encapsulation with chitosan for pharmaceuticals applications. *MOJ Current Research & Reviews*.2018; 1(2). 77 - 84. <https://doi.org/10.15406/mojcurr.2018.01.000137>.
6. Mwangi W.W., Preparation and Characterization of chitosan-stabilized oil-in-water linking emulsions for controlled delivery application. *Monash University*. Thesis., Malaysia, Sep. 2017. <https://doi.org/10.4225/03/59b9bb35e371>.
7. Frlani, F., Parisse, P. Sacco On the formation and stability of chitosan/hyaluronan-based complex coacervations. *Molecules*.2020; 25(5). 1-11. <https://doi.org/10.3390/molecules25051071>.
8. De la Paz N., Fernandez M., Lopez O. et al. Spray drying of chitosan acid salts: process development, scaling up and physicochemical material characterization. *Marine Drugs*.2021; 19(6). 1-16. <https://doi.org/10.3390/md19060329>.
9. Sarwar A., Katas H., Zin N.M. Antibacterial effects of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles: impact of particle size molecular weight. *Journal of nanoparticle research*.2014; 16(7). 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2517-9>.
10. Kamskaya V.E. Chitosan: structure, properties and using. *Biological sciences*. 2017; 6: 36-42. (In Russian).
11. Jozwiak T., Filipkowska U., Szymczyk P. et al. Effect of ionic and covalent crosslinking agents on properties of chitosan beads and sorption effectiveness of Reactive Black 5 dye. *Reactive and Functional Polymers*.2017; 144: 58-74. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.03.007>.
12. Kasatkina M.A., Budantseva N.A., Kildeeva N.R. Production of biologically active chitosan-based film materials modified with polyphosphate. *Himiko-Farmatsevticheskij zhurnal*.2016; 50(4): 32-39. (In Russian).
13. Berger J., Reist M., Mayer J.M. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutic and Biopharmaceutics*.2004; 57(1): 19-34. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(03)00161-9).

14. Hu H., Xin J.H., Hu H. et al. Glutaraldehyde-chitosan and poly (vinyl alcohol) blends, and fluorescence of their nano-silica composite films. *Carbohydrate Polymers*.2013; 91(1): 305-313. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.038>.
15. Islam N., Dmour I., Taha M. Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. *Heliyon*.2019; 5: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01684>.
16. Fen Y.W., Mat Yunus W.M., Moxsin M.M. et al. Optical properties of crosslinked chitosan thin film with glutaraldehyde using surface plasmon resonance technique. *American Journal of Engineering and Applied Sciences*.2011; 4(1): 61–65. <https://doi.org/10.3844/ajeassp.2011.61.65>.
17. Ramachandran S., Nandhakumar S., Dhanaraju M. Formulation and characterization of glutaraldehyde cross-linked chitosan biodegradable microspheres loaded with famotidine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*.2011; 10(3): 310-316. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i3.13>.
18. Faghmous N., Bouzid D., Boumaza M. et al. Optimization of chitosan-coated W/O/W multiple emulsion stabilized with span 80 and tween 80 using Box-Behnken design. *Journal of dispersion science and technology*.2020; 1-13. <https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1774387>.
19. Langaroudi N.F., Kazemi N.M. Preparation and characterization of O/W nanoemulsion with Mint essential oil and Parsley aqueous extract and the presence effect of chitosan. *Nanomedicine Research Journal*.2019; 4(1): 48-55. <https://doi.org/10.22034/nmrj.2019.01.008>.
20. Li B., Shan C.-L., Zhou Q. et al. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of cross-linked chitosan-glutaraldehyde. *Marine Drugs*.2013; 11(5): 1534-1552. <https://doi.org/10.3390/md11051534>.
21. Banerjee T., Mitra S., Singh A.K. et al. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*.2002; 24(1-2): 93-105. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00267-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00267-3).

22. Grumezescu A.M., Andronesu E., Holban A.M. et al. Water dispersible cross-linked magnetic chitosan beads for increasing the antimicrobial efficiency of aminoglycoside antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*.2013; 454(1): 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.054>.

23. Sethi A., Ahmad M., Huma T. et al. Pharmacokinetic variables of medium weight cross-linked chitosan nanoparticles to enhance the bioavailability of 5-flourouracil and reduce the acute oral toxicity. *Drug Delivery*.2021; 28(1): 1569-1584. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1944398>.

24. Nayak U.Y., Gopal S., Mutaik S. et al. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of Zidovudine. *Journal of Microencapsulation*.2009; 26(3): 214-222. <https://doi.org/10.1080/02652040802246325>.

25. Pandey R., Khuller G.K. Nanoparticles-based oral drug delivery system for an injectable antibiotic – streptomycin. *Chemotherapy*.2007; 53: 437-441. <https://doi.org/10.1159/000110009>.

26. Denkbaz E.B., Seyyal M., Piskin E. 5-Fluorouracil loaded chitosan microspheres for chemoembolization. *Journal of Microencapsulation*.1998; 16(6): 741-749. <https://doi.org/10.1080/026520499288681>.

27. Jameela S. R., Jayakrishnan A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long-acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle. *Biomaterials*.1995; 16(10): 769-775. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)99639-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)99639-4).