

© Коллектив авторов, 2010

М. В. Карлина¹, О. Н. Пожарицкая¹, А. Н. Шиков¹, В. Г. Макаров¹,
С. Мирза², И. Мирошник², Р. Хилтунен²

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НАНОСИСТЕМ С БЕТУЛИНОМ ДЛЯ ИНГАЛЯЦИОННОГО ПРИМЕНЕНИЯ

¹ Санкт-Петербургский институт фармации, Санкт-Петербург, Россия;

² Университет Хельсинки, Хельсинки, Финляндия

Бетулин — тритерпеноид лупанового ряда, выделенный из коры березы, обладает широким спектром биологической активности. Однако низкая растворимость бетулина в воде ограничивает его биологическую доступность, а размер и форма частиц не позволяет использовать его для ингаляционной терапии. Основным недостатком ингаляционных препаратов — низкая биологическая доступность, которая обусловлена оседанием частиц препарата в ротовой полости. Целью настоящей работы стала биофармацевтическая оценка наносистем бетулина, подходящих для ингаляционного введения. Наносистемы охарактеризованы с помощью методов фотон-корреляционной спектроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии, рентгеновской порошковой дифракции; скорость высвобождения оценена с использованием теста “Растворение”. Изученные наносистемы бетулина обеспечивают быстрое высвобождение действующего вещества в тесте растворение, обладают оптимальными физико-химическими свойствами для ингаляционного введения и обеспечивают депозицию препарата в нижних отделах дыхательных путей.

Ключевые слова: бетулин, фотон-корреляционная спектроскопия, дифференциальная сканирующая калориметрия, рентгеновская порошковая дифракция.

Бетулин — тритерпеноид лупанового ряда, выделенный из коры березы, обладает широким спектром биологической активности. Он проявляет противовоспалительные, противовирусные, антибактериальные и другие свойства [1 – 3].

Однако низкая растворимость бетулина в воде ограничивает его биологическую доступность, а размер и форма частиц не позволяет использовать его для ингаляционной терапии.

В последние десятилетия возрос интерес к наносистемам для доставки лекарственных препаратов. Наносистемы позволяют улучшить биологическую доступность препаратов [4 – 7] и могут быть использованы в качестве систем доставки при различных путях введения, в том числе ингаляционном. Эффективность ингаляционной терапии зависит не только от действующего вещества, но и от правильно выбранной системы доставки. Основным недостатком ингаляционных препаратов — низкая биологическая доступность, которая обусловлена оседанием частиц препарата в ротовой полости. Использование наносистем с оптимальными свойствами позволит расширить ассортимент ингаляционных препаратов, увеличить биодоступность действующих веществ, а также эффективность доставки препаратов в различные отделы дыхательной системы и в ряде случаев снизить дозу вводимого препарата и количество побочных эффектов.

Целью настоящей работы стала биофармацевтическая оценка наносистем бетулина, подходящих для ингаляционного введения.

Экспериментальная часть

В работе использована субстанция бетулина, предоставленная ЗАО СНС-Фарма (Россия).

Наносистемы с содержанием 20 и 30 % бетулина получали методом замены растворителя. Для этого отдельно растворяли бетулин в спирте и лактозу в воде, смешивали оба раствора, отгоняли органический растворитель и лиофильно высушивали.

Определение размера частиц в наносистемах проводили методом фотон-корреляционной спектроскопии на приборе Malvern Zetasizer 3000HSA (Malvern instruments, Worcestershire, UK).

Термический анализ образцов проводили с использованием дифференциального сканирующего калориметра DSC822^o (Mettler Toledo, Columbus, США). Около 10 мг образца взвешивали в алюминиевом тигле и закрывали алюминиевой крышкой с отверстиями. Образцы нагревали со скоростью 10 °С/мин. Термограммы записывали и анализировали с помощью программного обеспечения STARe (Mettler Toledo).

XRPD анализ проводили на тета-тета дифрактометре (D8 Advance, Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Германия) в симметричном рефлексном режиме с использованием CuK α радиации (1,54 Å) при 40 мА, 40 кВ и Göbel Mirror bent gradient многослойной оптики. Рас-

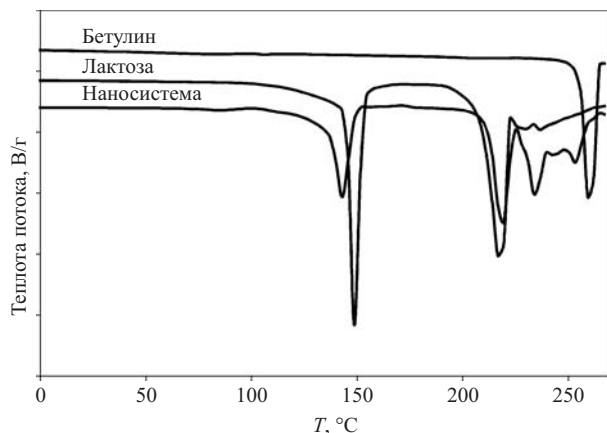


Рис. 1. Типичные термограммы субстанции бетулина, лактозы и наносистемы бетулина

сеивание интенсивности измеряли с помощью сцинтилляционного счетчика. Данные записывались в диапазоне $5 - 30^\circ 2\theta$ с шагом $0,05^\circ$ и временем измерения 1 с/шаг при стандартных условиях.

Насыпную массу наносистем определяли с помощью прибора для вибрационного уплотнения порошков 545 Р-АК-3 (Мариуполь).

Аэродинамический диаметр наносистем d_a рассчитывали по формуле:

$$d_a = \frac{dg}{\gamma} \sqrt{\rho/\rho_{\text{ref}}},$$

где dg — геометрический диаметр частиц, ρ — максимальная насыпная масса частиц, $\rho_{\text{ref}} = 1 \text{ г/см}^3$, γ — фактор формы (1 для сферических частиц).

Оценку скорости высвобождения *in vitro* проводили с использованием теста “Растворение” на приборе типа “вращающаяся мешалка” (Тип DT 600, Erweka, Германия) при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Скорость вращения 100 об/мин, среда растворения — двухфазная система вода — октанол 3:1, общий объем среды растворения 400 мл. Навеску испытуемого продукта (около 20 мг в пересчете на бетулин) помещали в твердую желатиновую капсулу. По истечению заданных промежутков времени (30, 45 мин и 1, 2 ч) отбирали пробы по 3 мл октанола, объем восполняли тем же растворителем.

Определение содержания бетулина в среде растворения проводили методом ВЭЖХ на хроматографе высокого давления фирмы “Beckman” с УФ детектором и колонкой Luna C 18 $4,5 \times 150$ мм (размер частиц сорбента 5 мкм) с предколонкой 20 мм, заполненной тем же сорбентом в режиме изократического элюирования 100% ацетонитрила, скорость потока элюента 1 мл/мин, дозируемый объем пробы 20 мкл. Обработку хроматограмм проводили при длине волны 202 нм. Расчет содержания бетулина проводили по методу внешнего стандарта.

Результаты и их обсуждение

Одним из главных параметров эффективности ингаляции является такая величина, как депозиция (т.е. отложение) препарата в дыхательных путях. Основ-

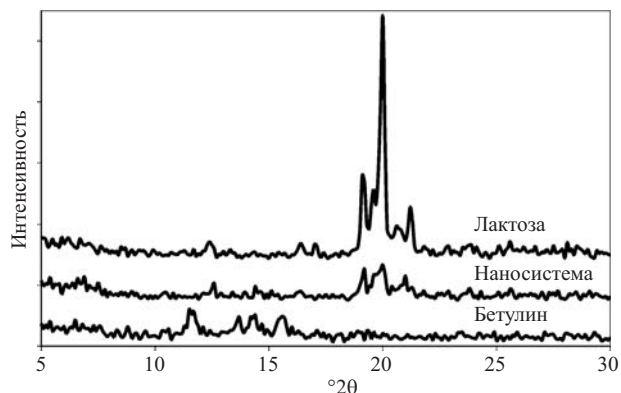


Рис. 2. Типичные дифрактограммы (XRPD) субстанции бетулина, лактозы и наносистемы с бетулином

ным фактором, определяющим депозицию частиц в дыхательных путях, является размер частиц препарата (средний аэродинамический размер частиц). Частицы размером 100 – 400 мкм полностью оседают в носовой и ротовой полостях, 100 – 25 мкм — в ротоглотке, гортани, 25 – 5 мкм — в гортани, трахее и крупных бронхах, 5 – 2 мкм — в нижних дыхательных путях, на стенках альвеол и бронхиол, 2 – 0,5 мкм — в альвеолах. Частицы размером менее 0,5 – 0,3 мкм свободно циркулируют в дыхательных путях и не оседают на слизистых оболочках. Кроме того, частицы порошка для ингаляции должны быть стабильны и, желательнее, иметь насыпную массу менее $0,4 \text{ г/см}^3$ [8].

Исходная субстанция бетулина имеет размер частиц около 50 мкм, что делает ее не пригодной для ингаляционного применения.

Уменьшение размера частиц ведет к увеличению процессов агрегации и агломерации, поэтому их необходимо стабилизировать, что достигается введением различных носителей в состав рецептуры. В качестве носителей для ингаляционных порошковых препаратов чаще всего используют сахара [9]. Для стабилизации полученных наночастиц бетулина и придания им необходимого размера и формы в качестве носителя в систему вводили лактозу и готовили составы с содержанием бетулина 20 и 30 %.

Полученные наносистемы и исходные субстанции бетулина и лактозы подвергали термическому анализу (рис. 1). На термограмме бетулина наблюдался 1 эндотермический пик при 262°C , соответствующий температуре плавления субстанции; на термограмме лактозы — 2 эндотермических пика при 150°C и 220°C . На термограммах наносистем наблюдали появление дополнительных пиков при 138°C , 145°C и 238°C . Пик при температуре 262°C отсутствует, что позволяет предположить образование надмолекулярных комплексов бетулина и лактозы. Гипотеза нашла свое подтверждение после анализа методом XRPD. Результаты представлены на рис. 2. В диапазоне $11,2 - 12,2^\circ 2\theta$ наблюдаются максимумы для бетулина, а в диапазоне $18,6 - 21,6^\circ 2\theta$ — для лактозы. В образце наносистемы нарушается кристаллическая структура бетулина, при этом происходит и изменение кристаллического состояния лактозы. Данные XRPD анализа показали, что бетулин в наносистеме находится в аморфном состоянии в виде надмолекулярного комплекса с лактозой.

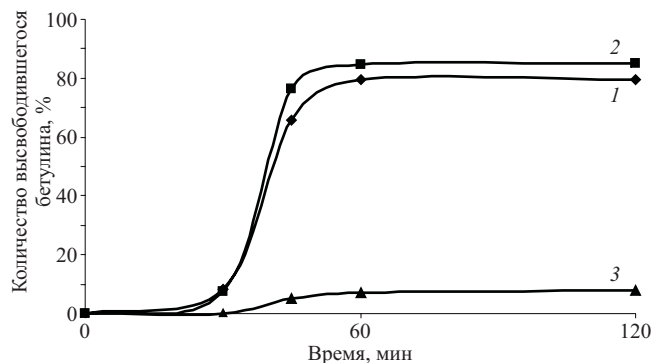


Рис. 3. Высвобождение бетулина из наносистем в двухфазную среду растворения: 1 — наносистема с содержанием бетулина 20 %; 2 — наносистема с содержанием бетулина 30 %; 3 — бетулин

Физико-химические характеристики полученных наносистем приведены в таблице.

Наносистемы бетулина сохраняют стабильность при комнатной температуре в течение 12 мес.

Далее для предварительной оценки биологической доступности при пероральном введении были изучены биофармацевтические свойства полученных наносистем бетулина *in vitro*. С учетом низкой растворимости исходной субстанции бетулина в качестве среды растворения была выбрана двухфазная среда вода — октанол [10]. Полученные результаты приведены на рис. 3.

Высвобождение бетулина из полученных наносистем протекает интенсивно, максимум высвобождения достигается к 1 ч эксперимента и составляет около 80 %. Константы скорости растворения, рассчитанные методом наименьших квадратов, составили:

наносистема с содержанием бетулина 20 % — 1,422 мин⁻¹,

наносистема с содержанием бетулина 30 % — 1,549 мин⁻¹,

бетулин (исходный) — 0,122 мин⁻¹.

Установлено, что введение субстанции бетулина в состав наносистемы позволяет значительно (в среднем в 6,6) увеличить его биодоступность *in vitro*, при этом скорость растворения возрастает в 12 раз по сравнению с исходной субстанцией.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что улучшение высвобождения бетулина из наносистемы

Физико-химические параметры бетулина и наносистем бетулина

Параметр	Бетулин	Наносистема с содержанием бетулина	
		20 %	30 %
Размер частиц бетулина, нм	50000 ± 120	176 ± 6	290 ± 8
Насыпная масса, г/см ³	0,332 ± 0,075	0,322 ± 0,031	0,199 ± 0,017
Средний аэродинамический диаметр, мкм	11,5 – 20,3	0,57 – 2,84	0,53 – 2,67
Форма частиц	пластинчатые кристаллы неправильной формы	сферическая	сферическая

происходит за счет наличия аморфного состояния бетулина, фиксированного взаимодействием с лактозой.

Таким образом, изученные наносистемы бетулина обеспечивают быстрое высвобождение действующего вещества в тесте растворения, обладают оптимальными физико-химическими свойствами для ингаляционного введения и обеспечивают депозицию препарата в нижних отделах дыхательных путей.

ЛИТЕРАТУРА

1. P. A. Keyel, M. Amjad, and M. R. Karim, *J. Minn. Acad. Sci.*, **3**, 26 (1999).
2. T. K. Sur, S. Pandit, D. Battacharya, *Phytother. Res.*, **16**(7), 669 – 671 (2002).
3. Патент России RU 2 262 349 C1 A61 K 35 / 78, A61 P 31 / 06 (2004).
4. O. N. Pozharitskaya, M. V. Karlina, A. N. Shikov, et al., *Phyto-medicine*, **16**(2/3), 244 – 251 (2009).
5. A. N. Shikov, O. N. Pozharitskaya, I. Miroshnyk, et al., *Int. J. Pharm.*, **377**(1 – 2), 148 – 152 (2009).
6. М. В. Карлина, О. Н. Пожарицкая, А. Н. Шиков, *Хим.-фарм. журн.*, **6**(43), 46 – 48 (2009).
7. А. Н. Шиков, О. Н. Пожарицкая, И. Мирошник и др., *Фармация*, **7**, 53 – 57 (2008).
8. M. V. Chougule, B. K. Padhi, K. A. Jinturkar, *Recent Patents on drug delivery & formulation*, **1**, 11 – 21 (2007).
9. A. H. Boer, P. P. Brun, H. G. Woude, et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **54**, 17 – 24 (2002).
10. М. В. Карлина, О. Н. Пожарицкая, В. М. Косман, *Вопр. биол. мед. и фарм. химии*, **9**(3), 42 – 46 (2006).

Поступила 18.02.10

BIOPHARMACEUTICAL STUDY OF NANOSYSTEMS CONTAINING BETULIN FOR INHALATION ADMINISTRATION

M. V. Karlina¹, O. N. Pozharitskaya¹, A. N. Shikov¹, V. G. Makarov¹, S. Mirza², I. Miroshnik², and R. Hiltunen²

¹ St. Petersburg Institute of Pharmacy, Piskarevsky Prosp. 47/33, St. Petersburg, 195067, Russia;

² Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Viikinkaari 5E, FI-00014 Helsinki, Finland

Betulin – a triterpenoid present in birch bark – possesses a broad spectrum of biological activity. Its bioavailability is limited by low solubility in water, while the form and size of particles are not suited for the administration via inhalation. One of the main drawbacks of inhalation preparations is low bioavailability because of the sedimentation of particles in the mouth. The present work was aimed at the biopharmaceutical study of nanosystems with betulin for administration via inhalation. Nanosystems were characterized by photon correlation spectroscopy, differential scanning calorimetry, and x-ray powder diffraction. In addition, their dissolution profile *in vitro* was obtained. It was established that the obtained nanosystems with betulin exhibit high bioavailability, have optimal physicochemical properties for inhalation administration, and ensure deposition of betulin in the lower part of the respiratory tract.

Key words: betulin, photon correlation spectroscopy, differential scanning calorimetry, x-ray powder diffraction