

С. И. Воробьёв, А. А. Елапов, А. Р. Армасов

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПЕРФТОРУГЛЕРОДНЫХ НАНОЭМУЛЬСИЙ

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

В статье рассмотрена технология создания перфторуглеродных наноэмульсий медико-биологического назначения и их физико-химические и биологические свойства. При определённых технологических условиях получения биологически активных эмульсий на основе перфторуглеродов, эти наносистемы могут являться универсальными наноносителями. Перфторуглеродные наноэмульсии способны проникать и активно влиять на любые участки организма и отдельного органа, транспортировать на своей поверхности не только любой газ и органические соединения, но и механические частицы, маркеры, активные фармакологические элементы, действующие активные вещества и выполнять функции кровезамещающих составов с газотранспортной функцией.

Ключевые слова: перфторуглеродные наноэмульсии, наносистемы, гомогенизация, диспергационный способ получения наноэмульсий.

Используемые в настоящее время способы получения высокодисперсных наноэмульсий на основе перфторорганических соединений (ПФОС) медико-биологического применения включают либо диспергирование — гомогенизацию под высоким давлением, либо использование ультразвуковых колебаний.

С помощью ультразвука большой мощности с частотами 20 – 50 КГц можно получить достаточно высокодисперсные эмульсии, но под воздействием кавитационного давления, сопровождающегося сильным нагревом и кавитационным ударом, происходит частичное разрушение молекул ПФОС. В связи с этим отщепляется в эмульсии ион фтора в концентрациях, являющихся токсичными до 10^{-3} М. В результате образуются новые молекулярные и ионные компоненты.

Приготовление эмульсий диспергированием с помощью высокого давления оказалось лучшим способом. При этом были получены концентрированные высокодисперсные и достаточно стабильные эмульсии без токсических примесей [1]. Оптический контроль процесса диспергирования перфторуглеродов иногда осуществляется на мониторе, при этом эмульсии характеризуются кривой оптической плотности [2].

Наиболее распространёнными эмульгаторами при создании эмульсий как гомогенизационным, так и ультразвуковым способом являются поверхностно-активные вещества (ПАВ) — проксанолы 268 и 168, которые способны растворяться в одной из фаз эмульсии. Свойства эмульсий зависят во многом от поверхностного слоя, который образуют эмульгаторы во время получения эмульсий. Известно, что хорошее эмульгирующее действие обнаруживают те ПАВ, которые наряду со снижением межфазного натяжения способны создать структурно-механический барьер, обеспечивающий устойчивость капель ПФОС относительно коагуляции и коалесценции. Стабилизирующее действие проксанолов усиливается с увеличением длины полиоксиэтиленовой группы. Считается, чем меньше окси-

этиленовых групп в молекуле ПАВ, тем глубже эта молекула может погрузиться в масляную фазу. Если же молекула ПАВ глубоко погружена в масло, то снижается барьер, препятствующий сближению капель на такие расстояния, при которых они сольются. При больших длинах полиоксиэтиленовых групп на поверхности масляной капли может образоваться плотная структурная оболочка из переплетённых между собой гидрофильных цепей, обладающая определёнными структурно-реологическими свойствами.

Наиболее сильным фактором стабилизации, способным обеспечить практически неограниченную агрегатную устойчивость дисперсных систем, является структурно-механический барьер, рассмотренный впервые П. А. Ребиндером и сотрудниками в 1979 г. По мнению этого автора [3] структурно-механический барьер возникает при адсорбции ПАВ, которые могут быть и не сильно поверхностно-активными для данной границы раздела, но способны к образованию гелеобразного структурированного слоя на межфазной границе. Этот слой подобен трёхмерной структуре-гелю, который может возникать в растворах ряда веществ при достаточной их концентрации.

Высокую эффективность структурно-механического барьера [3] определяют следующие условия:

– наличие повышенной вязкости и механической прочности адсорбционных и межфазных слоев ПАВ – их способность сопротивляться деформации и разрушению с достаточной подвижностью, обеспечивающей залечивание случайно возникающих дефектов слоя;

– лиофильность наружной части межфазного или адсорбционного слоя, обеспечивающая «плавность» перехода от дисперсной фазы к дисперсной среде. Вязкость в таком диффузном слое должна постепенно нарастать от нормальной вязкости дисперсной среды до максимальных значений непосредственно вблизи дисперсной среды.

Важной чертой структурно-механического барьера по мнению [3], являются реологические свойства межфазных слоев, обуславливающих термодинамические (возникновение упругости) и гидродинамические (повышение вязкости) эффекты при стабилизации. Чтобы межфазный слой мог защищать частицы дисперсной фазы перфторуглеродов от коагуляции и коалесценции, он должен не разрушаться и не вытесняться из зоны контакта частиц под действием тех напряжений, которые возникают при соударении частиц, поэтому наряду с высокой структурной вязкостью адсорбционных слоев необходима подвижность молекул плёнки, то есть способность к быстрому затягиванию образующихся местных разрывов или к восстановлению целостности адсорбционного слоя.

Технология получения дисперсных систем — субмикронных эмульсий в опытно-промышленных масштабах осуществляется диспергационным способом на дезинтеграторах высокого давления. Этот способ позволяет получать наноэмульсии со средним размером дисперсной фазы от 30 до 100 нм (от 0,03 до 0,1 мкм), способные жестко стерилизоваться. Дезинтеграторы высокого давления типа “Донор-1” и “Донор-2”, разработанные совместно Институтом теоретической и экспериментальной биофизики и Экспериментальным заводом научного приборостроения Российской академии наук представляют собой устройства, в которых гомогенизация достигается пропусканием ПАВ и перфторуглеродов под большим давлением в диапазоне от 50 до 1500 атм через узкую гомогенизирующую микрощель с регулирующим зазором шириной от 25 до 500 мкм. Прохождение жидкости через малые отверстия из области высокого давления в область нормального давления приводит к разрыву жидкости на капли, т.е. эмульгирование вызывается градиентом давления — кавитацией и силами гидравлического трения. На таком принципе работы прибора можно получать 70–80 % эмульсии. Зарубежные аналоги таких приборов — гомогенизаторы высокого давления фирмы “Manton-Gaulin” (США), “Alfa-Laval” (Швеция) — уступают отечественным приборам “Донор-1” и “Донор-2” по распределению дисперсной фазы эмульсии.

Целью настоящей работы являлось определение режимов гомогенизации (диспергации) для создания стабильных и монодисперсных наноэмульсий в опытно-лабораторных условиях. Главным критерием выбора режима служил средний размер получаемых наноэмульсий и распределение частиц по диаметру.

Экспериментальная химическая часть

В работе использовались отечественные перфторсоединения: перфтордекалин, $C_{10}F_{18}$, молекулярная масса 462 Д, массовая доля *транс*-изомеров — 50–55 %, массовая доля *цис*-изомеров — 45–50 %, содержание основного вещества — 93 % (7 % перфторированные примеси) и перфторметилциклогексилпиперидин $C_{12}F_{23}N$, молекулярная масса 595, содержание основного вещества 97 % (3 % перфторированные

примеси). ПАВ проксанол-268 с формулой $HO-(C_2H_4O)_X-(C_3H_6O)_Y-(C_2H_4O)_Z-N$. Проксанол, неионогенный ПАВ, блок-сополимер окиси этилена и окиси пропилена, молекулярная масса 10000–13000 Д.

Эмульсию получали с помощью дезинтегратора высокого давления типа “Донор-2” при различных давлениях гомогенизации. Эффективность гомогенизации определяли по величине среднего размера частиц эмульсии и её распределению. Средний размер частиц и распределение определяли с помощью электронной микроскопии и на фотоэлектроколориметре КФК-3, методом турбидиметрии, предназначенном для определения оптической плотности растворов.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что в группе I эмульсий, изготовленных при давлении (P) в 1 условную единицу в гомогенизационной камере дезинтегратора высокого давления, средний размер частиц эмульсии к концу контрольного времени составлял 430 нм (нанометров) или 0,43 мкм (микрона). Во II и III группах эмульсий при давлениях 2 и 3 усл. ед. средний размер составлял 310 и 100 нм соответственно. При этом отчетливо прослеживается, особенно в III группе, тенденция к уменьшению среднего размера частиц эмульсии по мере увеличения циклов прохождений эмульсий через камеру.

В следующих группах IV, V, VI, где давление при получении эмульсии соответственно составляло 4, 5, 6 усл. ед., наблюдался более равномерный выход на плато среднего размера частиц эмульсии, особенно в IV и V группах, который не изменялся по мере прохождения эмульсии через дезинтегратор. При этом средний размер частиц составлял в IV и V группах к концу контрольного времени 81 и 78 нм соответственно, что удовлетворяет медико-биологическим требованиям. В VI группе эмульсий, где давление в камере составляло 6 усл. ед., к 40 мин начался процесс укрупнения частиц от 74 до 85 нм.

Рассматривая VII, VIII группы получения экспериментальных эмульсий при давлении в дезинтеграционной камере 7 и 8 усл. ед., было обнаружено, что до 35 мин эмульгирования происходило уменьшение среднего размера частиц соответственно до 78 и 60 нм, после чего постепенно начинался процесс вторичного укрупнения. При этом средний размер к концу контрольного времени составлял в VII группе 96 нм, в VIII группе — 81 нм.

При увеличении давления в гомогенизационной камере дезинтегратора высокого давления до 9 и 10 усл. ед. в IX и X группах соответственно наблюдался быстрый процесс уменьшения среднего размера частиц эмульсии. Так, при 10 усл. ед. (X группа) к 10 мин эмульгирования размер составлял 71 нм, а при 9 усл. ед. в IX группе к 15 мин эмульгирования средний размер соответствовал 89 нм. Достаточно быстрый процесс уменьшения среднего размера частиц эмульсии в IX и X группах сменился таким же быстрым процессом

вторичного укрупнения частиц эмульсии. При этом средний размер частиц эмульсии к концу 30 и 35 мин составлял в IX группе 117 нм, в X группе — 127 нм. Дальнейший процесс эмульгирования при высоких давлениях в дезинтеграционной камере сопровождался резким увеличением температуры в камере, что затрудняло процесс многократного прохождения эмульсии через дезинтегратор. Таким образом, эмульгирование при низких давлениях в 4–5 усл. ед. позволило получить достаточно невысокий средний размер частиц эмульсии и поддерживать этот размер на определенном уровне при дальнейшем прохождении эмульсии через дезинтегратор.

Тем не менее встал вопрос об уменьшении среднего размера частиц эмульсий и поддержании данного размера в процессе эмульгации. Для этого было использовано комбинированное давление — 8 и 5 усл. ед. в гомогенизационной камере дезинтегратора высокого давления. Эмульгация перфторуглеродов при давлении 8 усл. ед. образует наиболее мелкие субмикронные частицы около 60 нм, но дальнейшее прохождение эмульсии через микрощель гомогенизационной камеры (для создания более монодисперсной смеси) сопровождается вторичным укрупнением среднего размера частиц. Как показали эксперименты, для преодоления вторичного укрупнения гомогенизацию необходимо проводить с помощью комбинированного давления (высокого/среднего), при котором процесс мелкодисперсного образования (на высоком давлении, 8 усл. ед.) необходимо прерывать до того момента, когда начинается процесс вторичного укрупнения субмикронных частиц, и продолжать гомогенизацию эмульсии уже на среднем давлении (5 усл. ед.), при котором не происходит крупнодисперсного образования. Комбинированное давление гомогенизации при получении перфторуглеродных эмульсий позволяет создавать эмульсии относительно монодисперсные, с узким распределением дисперсности, с субмикронным диамет-

ром частиц и без вторичного укрупнения в процессе диспергации.

Одно- и двухконтурные методы диспергационного способа получения эмульсий

Полученные ранее перфторуглеродные эмульсии в вышеперечисленных группах готовились одноконтурным методом диспергационного (гомогенизационного) способа, который можно представить в следующем виде. Из первой емкости гомогенизационной системы перфторуглерод капельно подавался во вторую ёмкость — рабочую, где находился эмульгатор проксанол-268, затем вся эта смесь подавалась в дезинтегратор (диспергатор) и из него обратно во вторую ёмкость. Этот цикл повторялся многократно (от 5 до 15 циклов).

Указанный одноконтурный метод получения субмикронной эмульсии не полностью удовлетворяет предъявляемым требованиям, так как не вся эмульсия, находящаяся во второй ёмкости, равномерно (определенное количество циклов) проходит через дезинтегратор, остаются так называемые “застойные зоны”, которые расположены по краям рабочей ёмкости системы, что, по-видимому, создаёт неоднородный по размеру состав эмульсии, остаются так называемые “хвосты” из крупных частиц размером 400–500 нм.

Известно, что острая токсичность быстро увеличивается, когда имеется фракция частиц размером более 400 нм. В настоящее время признано, что наиболее приемлемым размером являются частицы эмульсии со средним диаметром 50–80 нм. Указанные частицы примерно в 100 раз меньше, чем эритроцит (7–8 мкм), но их количество — 10^{16} намного превышает число эритроцитов, что обеспечивает большую, в несколько сотен раз, площадь поверхности газообмена по сравнению с клетками крови.

Двухконтурный метод осуществляется следующим образом: из первой ёмкости ПФОС капельно подается в рабочую ёмкость, где находится ПАВ, затем вся эта смесь подается в дезинтегратор, а из него уже в новую дополнительную ёмкость, из которой снова эмульсия поступает в дезинтегратор, а оттуда в рабочую ёмкость. Этот цикл повторяется многократно.

Весь процесс изготовления субмикронных эмульсий двухконтурным методом заключается в чередовании прохождения предэмульсии через контуры рабочей и дополнительной ёмкостей гомогенизационной системы. Этот способ позволяет избавиться от “застойных зон”, так как эмульсия, находящаяся в одной рабочей ёмкости, при смене контура полностью перекачивается в другую дополнительную ёмкость, что позволяет создавать более однородный по размеру состав, чем при одноконтурном методе.

Из таблицы видно, что при двухконтурном методе получения эмульсии распределение, полученное с помощью электронно-микроскопических исследований методом негативного контрастирования, более предпочтительное, чем при одноконтурном методе, так как меньше в процентном отношении частиц, находящихся в пределах от 100 до 250 нм, отсутствуют крупные

Средний размер частиц и распределение (электронная микроскопия) в зависимости от метода получения перфторуглеродной эмульсии

Диаметр частиц, нм	Одноконтурный метод, %	Двухконтурный метод, %
от 0,00 до 50,0	20,7	30,2
от 50,0 до 100	52,1	55,0
от 100 до 150	20,5	13,2
от 150 до 200	4,7	1,3
от 200 до 250	1,2	0,3
от 250 до 300	0,5	–
от 300 до 350	0,1	–
от 350 до 400	0,1	–
от 400 до 450	0,1	–
Средний диаметр частиц, нм	96	77
Количество циклов гомогенизации (при $P = 5,0$ усл. ед.)	10	10

фракции от 300 до 450 нм. Кроме этого, при одинаковом количестве циклов прохождения эмульсии в одно и двухконтурных методах через гомогенизационную камеру дезинтегратора в двухконтурном методе средний размер частиц эмульсии был меньше и предпочтительней, чем при одноконтурном методе.

Можно предположить, что получение субмикронных эмульсий при ступенчатом давлении от 8 до 5 усл. ед. при двухконтурном методе более предпочтительно, чем стандартным методом при постоянном давлении (5 усл. ед.). Экспериментальные данные подтверждают это предположение. Так, эмульсия, приготовленная с помощью разработанной схемы, имела следующее распределение по диаметру частиц. Наблюдается уменьшение по размеру так называемого “хвоста” эмульсии, при этом максимальный размер частиц составляет 250 нм по сравнению с максимальным размером частиц эмульсии (300 нм), полученной при постоянном давлении (5,0 усл. ед.) на двухконтурной системе.

Таким образом, можно заключить, что использование двухконтурного метода и ступенчатого давления гомогенизации при получении перфторуглеродных эмульсий диспергационным способом более предпочтительно по сравнению с одноконтурным методом.

Это позволяет создавать относительно монодисперсные эмульсии (более 85 % частиц находится в пределах наноразмерности до 100 нм) с узким распределением дисперсии с максимальным диаметром частиц не более 250 нм (0,1 %) и средним диаметром частиц не более 80 нм.

Одно- и двухкамерный метод диспергационного способа получения эмульсий

Наиболее часто встречающимся методом эмульгации перфторсоединений является диспергация или гомогенизация (дезинтеграция) в одной камере высокого давления гомогенизатора. При этом методе субмикронную эмульсию получают за счет многократного (многоциклового) прохождения (эмульгации) многокомпонентной смеси из нескольких или одного перфторуглерода через микрощель камеры высокого давления при давлении от 50 до 1500 атмосфер. Недостатком однокамерного метода гомогенизационного способа получения перфторуглеродных эмульсий является длительная эмульгация перфторуглеродов: 9 – 10 циклов прохождения эмульсии ПФОС через микрощель камеры высокого давления и невозможность получения концентрированных эмульсий (свыше 40 %).

Для создания метода получения концентрированных перфторуглеродных эмульсий и уменьшения времени получения эмульсий был разработан метод двухкамерного получения, за счет последовательного включения к основной рабочей камере гомогенизатора дополнительной (второй) аналогичной рабочей камеры гомогенизационного прибора и буферной ёмкости, выравнивающей давление между 2 камерами, работающими в различных режимах.

Согласно новой модели, перфторуглеродную эмульсию получают струйно-капельным пропусканием многокомпонентной смеси перфторуглеродов через основ-

ную и дополнительную (вторую) камеру гомогенизатора высокого давления, расположенных последовательно и буферную ёмкость между ними, выравнивающую давление.

Двухкамерный метод гомогенизационного способа осуществляется следующим образом. Для получения предэмульсии (микронных размеров) смесь перфторуглеродов поступает струйно-капельно из верхней ёмкости по трубопроводу в нижнюю ёмкость с эмульгатором проксанолом-268, и через трубопровод эмульсия поступает в основную рабочую камеру гомогенизатора при высоком “ударном” давлении в контуре гомогенизатора 350 – 1500 атм. Предэмульсия из основной рабочей камеры гомогенизатора под высоким “ударным” давлением 350 – 1500 атм. поступает через трубопровод в буферную ёмкость, из этой ёмкости через трубопровод эмульсия поступает в дополнительную (вторую) рабочую камеру гомогенизатора, из дополнительной камеры эмульсия поступает через трубопровод в основную ёмкость. Первый цикл получения предэмульсии замыкается: эмульсия вместо одной гомогенизационной обработки (“раздробления” до субмикронных размеров) в основной камере гомогенизатора получила дополнительную (вторую) равноценную обработку (“раздробление”) во второй рабочей камере высокого давления, что в 2 раза сокращает время приготовления субмикронной эмульсии. После второго цикла эмульгации, полностью аналогичного первому циклу, за исключением давления гомогенизации, которое, начиная со второго цикла, в дальнейшем не меняется и составляет в колеблющемся режиме от 20 до 800 атм, начинается цикл эмульгации, который полностью аналогичен третьему и т.д. до 4 – 5 циклов. В течение всего процесса получения эмульсии осуществляют охлаждение при t от +15 до +60 °С в ёмкостях и в самих контурах гомогенизатора, в связи с тем, что увеличение температуры эмульсии во время гомогенизации приводит к укрупнению частиц эмульсии, что не допустимо. После получения субмикронной перфторуглеродной эмульсии она поступает с помощью насоса в фильтрационную и стерилизационную систему, для фильтрации или стерилизации, с последующим заливом эмульсии в ёмкость с электролитным раствором для получения готовой лекарственной формы.

Разработанный двухкамерный метод получения перфторуглеродных эмульсий позволяет в 2 раза укоротить время получения концентрированных до 70 – 80 % перфторуглеродных эмульсий (концентрацией ПФОС в 2 раза выше, чем при однокамерном методе). При этом получают относительно монодисперсные эмульсии (более 85 % частиц находится в пределах наноразмерности до 100 нм) с узким распределением дисперсии, с максимальным диаметром частиц не более 250 нм (0,1 %) и средним диаметром частиц не более 80 нм, предназначенных для медико-биологических целей.

Совместное использование двухкамерного и двухконтурного методов диспергационного (гомогенизаци-

онного) способа получения эмульсии ПФОС может успешно применяться не только в лабораторных условиях, но и в опытно-промышленном производстве для получения промышленных партий высокодисперсных перфторуглеродных наноэмульсий и других сред. Эмульсии перфторуглеродов, изготовленные по модифицированной технологии диспергации, имеют незначительную реакционную активность, что связано с технологией создания монодисперсных наноэмульсий. Именно наноэмульсии в процессе эффективной гомогенизации приобретают агрегатную устойчивость дисперсной фазы за счёт плотной проксанольной оболочки на поверхности масляной капли ПФОС, которая (оболочка) состоит из переплетённых между собой гидрофильных цепей — структурно-механического барьера, обладающего определенными структурно-ре-

ологическими свойствами. Вероятнее всего, полностью избавиться от реактогенности проксанольно-фторуглеродных и фосфолипидно-фторуглеродных эмульсий не удастся, её можно только минимизировать до определенного уровня, не ограничивающего применение перфторуглеродных препаратов в клинике.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. И. Воробьёв, Л. Н. Старовойтова, Р. Я. Сенина и др., *Физико-химические и клинические исследования перфторорганических соединений*, Пушино (1994), сс. 24 – 33.
2. В. В. Капцов, Н. А. Шипунова, *Физиологическая активность фторсодержащих соединений*, Пушино (1995), сс. 54 – 65.
3. П. А. Ребиндер, *Избранные труды. Физико-химическая механика*, Наука, Москва (1979), сс. 312.

Поступила 15.11.09

CREATION OF NEW PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BASED ON PERFLUOROCARBON NANOEMULSIONS

S. I. Vorob'ev, A. A. Elapov, and A. R. Armasov

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia

Technology and some physicochemical and biomedical characteristics of perfluorocarbon (PFC) nanoemulsions are considered. Synthesis of biologically active emulsions from perfluorocarbons under appropriate technological conditions provides emulsions with universal properties. These emulsions contain nanoparticles that can absorb, penetrate, and affect any systems of organism and parts of organs, and carry various substances on their surface, such as gases, organic compounds, solid particles, markers, pharmaceuticals, and active substances. PFC emulsions can perform as blood-plasma-substituting solutions with gas transport function, as solutions for correction of the blood volume, oncotic and osmotic pressure, and as solutions for correcting pH and other physiological parameters.

Key words: Perfluorocarbon nanoemulsions, nanosystems, homogenization, obtaining emulsions by dispersion