

УДК 544.77; 615.456

Метод генерации аэрозоля антибактериального лекарственного вещества цефазолина

А.А. Бажина^{1,2}, С.В. Валиулин^{1,2}, А.М. Бакланов¹, С.Н. Дубцов¹,
С.В. Аньков^{1,3}, М.Е. Плохотниченко¹, Т.Г. Толстикова^{1,3}, А.А. Онищук^{1,2*}

¹Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН
630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, 3

²Новосибирский государственный педагогический университет
630126, г. Новосибирск, ул. Вилюйская, 28

³Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 9

Поступила в редакцию 14.01.2020 г.

Представлен метод генерации аэрозоля лекарственного вещества цефазолина с частицами размером от 80 до 1400 нм. На примере ингаляционного введения аэрозоля лабораторным животным (мышам) показано, что такой способ доставки цефазолина близок по эффективности к внутривенному введению.

Ключевые слова: наночастицы, аэрозоль, ингаляционное введение, цефазолин, антибиотик; nanoparticles, aerosol, lung drug administration, cefazolin, antibiotic.

Введение

В настоящее время ингаляционная терапия применяется при лечении заболеваний верхних дыхательных путей, таких как астма, хроническая обструктивная болезнь легких, бронхит. Ингаляция аэрозольных частиц лекарственных веществ может быть использована для применения препаратов местного и системного действия [1, 2]. Преимуществом ингаляционной доставки над пероральной для препаратов системного действия является исключение потерь вещества в желудочно-кишечном тракте и при метаболизме, при первом прохождении через печень. Это позволяет использовать меньшие дозы вещества и, следовательно, снизить побочные эффекты. В отличие от инъекционного введения ингаляционная терапия — это неинвазивный метод, что избавляет пациента от неприятных ощущений и необходимости специального обслуживания медицинским персоналом в стационаре.

Однако для внедрения новых форм лекарственных препаратов необходимо проведение серии исследований, включающих разработку метода генерации аэрозоля с необходимым диапазоном разме-

ров частиц и стабильной концентрацией, а затем доклинических и клинических испытаний.

Настоящая работа посвящена разработке метода генерации аэрозоля антибактериального лекарственного средства цефазолина, применяемого обычно в инъекционной форме [3] при лечении ряда инфекционных заболеваний, в том числе — дыхательных путей. При пероральном применении цефазолин разрушается под действием кислой среды желудка. Использование аэрозольной формы этого вещества может позволить повысить эффективность его применения при воздействии на орган-мишень (легкие), а также вводить препарат неинвазивно, без специального медицинского обслуживания и неприятных ощущений у пациента. В работе показана работоспособность метода генерации аэрозоля цефазолина и возможность его ингаляционного применения.

Методика эксперимента

Схема экспериментальной установки для генерации аэрозоля цефазолина приведена на рис. 1. Основным блоком генератора аэрозоля является ячейка, в которой установлен пьезоэлемент для генерации ультразвуковых колебаний. В ячейку помещается цилиндрическая стеклянная кювета объемом 50 см³ с раствором цефазолина (объем раствора 15–20 см³). В верхней части кюветы расположены два стеклянных штуцера, через которые раствор цефазолина в дистиллированной воде наливается в кювету и извлекается из нее. Для передачи колебаний от пьезоэлемента кювете ячейка заполнена дистиллированной водой.

* Анастасия Александровна Бажина (sibinfonet@yandex.ru); Сергей Владимирович Валиулин (valiulin@kinetics.nsc.ru); Анатолий Максимович Бакланов (anatoli@kinetics.nsc.ru); Сергей Николаевич Дубцов (dubtsov@kinetics.nsc.ru); Сергей Владимирович Аньков (sergey.ankov42@gmail.com); Мария Евгеньевна Плохотниченко (mairy-jewel@yandex.ru); Татьяна Генриховна Толстикова (tgtolstik@nioch.nsc.ru); Андрей Александрович Онищук (onischuk@kinetics.nsc.ru).

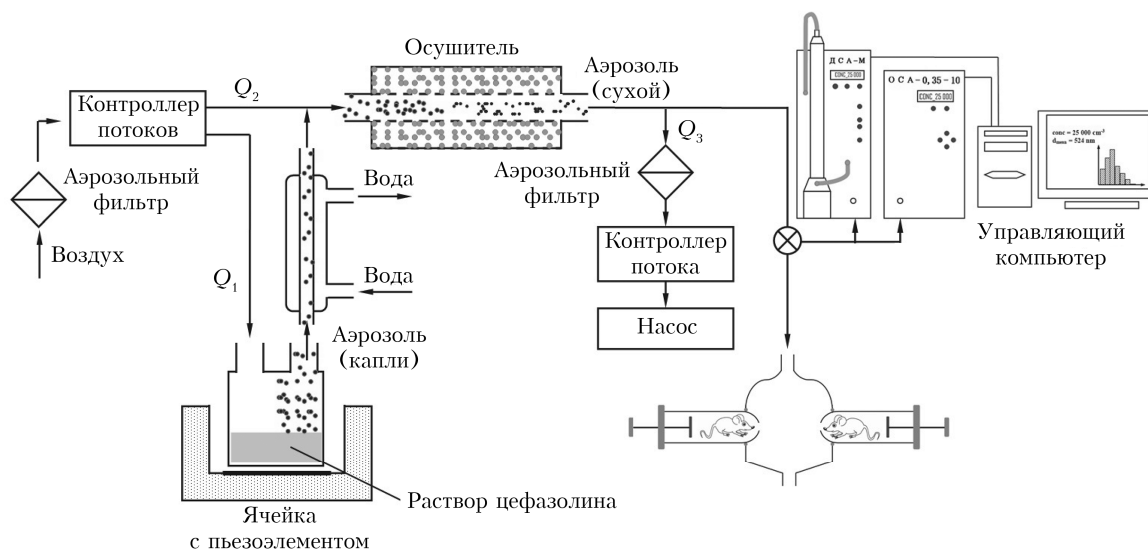


Рис. 1. Схема экспериментальной установки

За счет колебаний в кювете образуется аэрозоль, представляющий собой жидкие капли раствора. Через один из штуцеров предварительно фильтрованный воздух с объемной скоростью 0,6 л/мин (Q_1) поступает в кювету. Поток воздуха Q_1 захватывает образующийся аэрозоль и пары воды и выходит из кюветы через второй штуцер. Далее этот поток поступает в обратный холодильник, охлаждаемый водой ($\sim 15^\circ\text{C}$). Пары воды, которые захватил поток воздуха из кюветы, конденсируются на стенках холодильника и стекают обратно. На выходе из холодильника воздух (Q_1), содержащий аэрозоль, смешивается с потоком фильтрованного воздуха с объемной скоростью 1,8 л/мин (Q_2). Образующийся поток ($Q_1 + Q_2$) поступает в осушитель, где происходит испарение воды, и на выходе из него поток воздуха содержит твердые частицы исследуемого вещества (сухой аэрозоль).

Осушитель представляет собой металлическую цилиндрическую трубу (длина 50 см, диаметр 8 см), заполненную силикагелем, с каналом диаметром 1 см по оси трубы, отделенным от силикагеля металлической сеткой. Такая конструкция предотвращает потерю аэрозоля за счет его фильтрации при движении через силикагель.

Размер образующегося аэрозоля регулируется концентрацией раствора цефазолина, помещаемого в кювету.

Концентрацию и распределение по размерам образующихся аэрозольных частиц на выходе из генератора измеряли с помощью диффузионного спектрометра аэрозоля ДСА-М [4, 5] и оптического спектрометра аэрозоля ОСА. Для понижения концентрации аэрозольных частиц до измеряемого приборами диапазона использовали динамический аэрозольный разбавитель. Принцип действия разбавителя заключается в смешении аэрозоля с потоком фильтрованного воздуха, степень разбавления определяется соотношением смешиваемых потоков (аэрозольного и чистого воздуха). Такой способ

разбавления позволяет избежать искажения спектра частиц.

ДСА-М позволяет измерять общую концентрацию частиц до $5 \cdot 10^5 \text{ см}^{-3}$ и распределение по размерам в диапазоне 3–1100 нм. Принцип действия прибора основан на восстановлении распределения по размерам из известной зависимости подвижности частиц от их размера [5]. ОСА способен измерять концентрацию частиц до $10^5 \cdot \text{см}^{-3}$ и распределение по размерам в диапазоне 0,35–10 мкм. Принцип действия прибора основан на регистрации амплитуды рассеянного света от частицы, пролетающей через освещаемый источником света объем [6].

Массовую концентрацию образующегося аэрозоля определяли гравиметрическим методом. Для этого на выходе из генератора в течение заданного времени осуществлялся отбор аэрозольных частиц на стекловолокнистые фильтры Whatman GF/A (25 мм) с объемной скоростью 1 л/мин (Q_3 , рис. 1).

Доставку генерируемого аэрозоля цефазолина лабораторным животным проводили в ингаляционной камере nose-only (рис. 2). Такая камера оснащена шестью радиально расположенными портами, куда вставляются специальные стеклянные объемы. Внутри них животное располагается таким образом, чтобы только нос находился в области движения потока аэрозоля. В ходе эксперимента свобода перемещения животных ограничена.

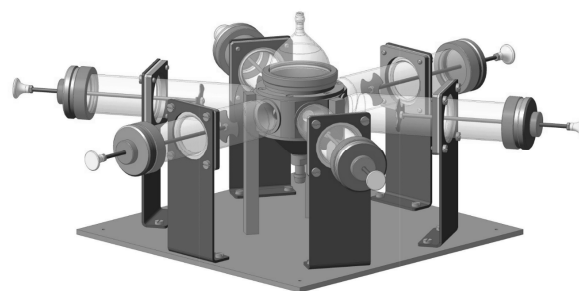


Рис. 2. Внешний вид ингаляционной камеры nose-only

Сразу после ингаляции кровь забирали методом декапитации и центрифугировали на 3000 об/мин в течение 15 мин с последующим отбором сыворотки крови. Концентрацию цефазолина в сыворотке крови определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе «Милихром А-02». За основу были взяты методики анализа цефазолина, предложенные в [7–9]. Хроматографирование проводили на колонке с обращенно-фазовым сорбентом ProtonSil C18 методом градиентного элюирования: элюент А — фосфатный буфер (рН = 3), элюент Б — ацетонитрил. Начальная концентрация элюента Б = 3%, градиент: 0–600 мкл — 3%, 600–1800 мкл — 30%, 1800–2500 мкл — 100%. Скорость элюирования — 150 мкл/мин, температура термостата колонки — 40 °С. Детектирование осуществлялось на длинах волн 268 и 300 нм.

Результаты и обсуждение

На рис. 3 приведены измеренные на выходе из осушителя зависимости среднего диаметра частиц и массовой концентрации частиц сухого аэрозоля от концентрации раствора цефазолина, заливаемого в кювету. Концентрация аэрозоля практически не зависела от концентрации вещества в растворе и составляла $(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ см}^{-3}$. Это обусловлено тем, что, независимо от концентрации раствора, под действием ультразвуковых колебаний (при постоянной частоте) генерировалось примерно одинаковое количество жидких капель, содержащих растворенное вещество. В то же время увеличение среднего размера (рис. 3, а) и средней массовой концентрации частиц (рис. 3, б) при повышении концентрации раствора обусловлено возрастанием содержания растворенного вещества в первичных каплях, что и формирует сухой аэрозоль при высыхании этих капель.

Представляет интерес сравнение количества цефазолина в сыворотке крови после традиционного для этого вещества внутривенного введения и после ингаляционной доставки в виде аэрозоля. Для этого мышам внутривенно вводили цефазолин в дозе 5 мг/кг, близкой к терапевтической дозе для человека. Кровь забирали через 3 мин после введения вещества. Анализ содержания цефазолина в сыворотке крови осуществляли тем же методом, что и после ингаляционного введения (см. разд. Методика эксперимента). В результате анализа в сыворотке крови концентрация цефазолина составила $18 \pm 4 \text{ мкг/мл}$.

Общую доставляемую при ингаляции дозу можно определить, используя выражение [10]:

$$\text{Dose} = \frac{C \varepsilon v_m t}{BW}, \quad (1)$$

где C — массовая концентрация частиц; $v_m = 595 \times (BW)^{0,75}$ — минутный объем дыхания мыши [11]; BW — вес мыши (кг); t — время ингаляции;

$$\varepsilon = 0,760 \exp \left(-\frac{1}{2} \left(\frac{\ln(d/4,5)}{2,20} \right)^2 \right) + 0,490 \exp \left(-\frac{1}{2} \left(\frac{\ln(d/2000)}{0,90} \right)^2 \right)$$

— доля частиц данного размера d (нм) оседающих в дыхательных путях мыши [10].

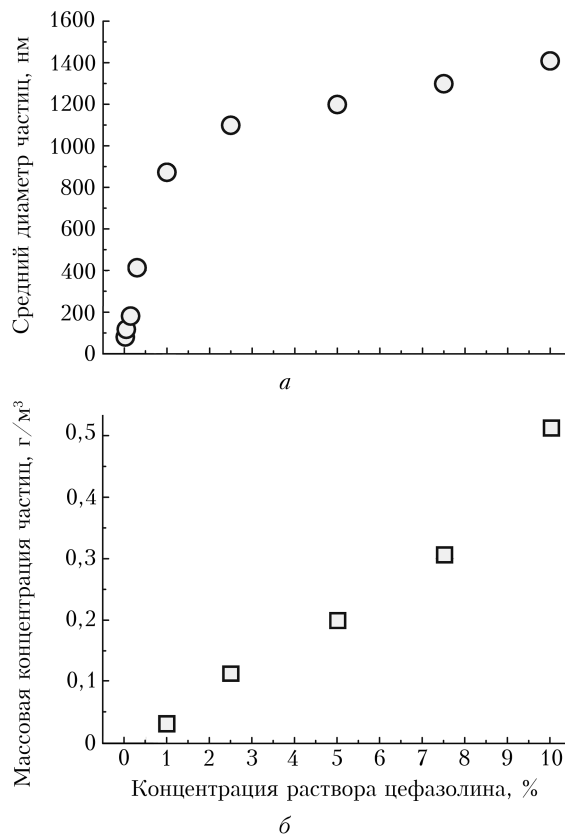


Рис. 3. Зависимости от концентрации раствора цефазолина: а — среднего диаметра частиц, б — массовой концентрации частиц, измеренные на выходе из осушителя

Аэрозоль для ингаляционного эксперимента был получен из 10% раствора цефазолина. Экспозиция аэрозоля животным проводилась в течение 12 мин. Сразу после ингаляции осуществлялся забор крови для анализа. Общая доставленная доза составила 4,3 мг/кг, в сыворотке крови мышей обнаружено $9 \pm 3 \text{ мкг/мл}$ вещества.

Сопоставляя данные внутривенного и аэрозольного введения, можно отметить, что ингаляционное введение по эффективности близко внутривенному.

Заключение

Разработан метод генерации аэрозоля цефазолина, позволяющий получать частицы в диапазоне размеров от 80 до 1400 нм с концентрацией $(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ см}^{-3}$. На примере ингаляционного введения лабораторным мышам показана возможность аэрозольной доставки цефазолина в организм.

Обнаружено, что после аэрозольного введения дозы 4,3 мг/кг в сыворотке крови мышей содержится 9 ± 3 мкг/мл цефазолина, а при внутривенном введении дозы 5 мг/кг — 18 ± 4 мкг/мл. Установлено, что ингаляционная доставка аэрозоля по эффективности близка внутривенному введению.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 19-73-10143).

1. Gaul R., Ramsey J.M., Heise A., Cryan S.-A., Greene C.M. Nanotechnology approaches to pulmonary drug delivery: Targeted delivery of small molecule and gene-based therapeutics to the lung // *Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications*. Oxford: Elsevier, 2018. P. 221–253.
2. *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology* / A.J. Hickey (ed). New York: Marcel Dekker Inc., 2004.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. Т. 2. М.: Новая Волна, 2001. 608 с.
4. Валиулин С.В., Бакланов А.М., Дубцов С.Н., Митроченко В.Г., Моисеенко П.П., Онищук А.А. Диффузный спектрометр аэрозоля для измерения распределения по размерам и концентрации нано- и субмикронных частиц // *Приборы и техника эксперимента*. 2019. № 1. С. 145–146.
5. Onischuk A.A., Valiulin S.V., Baklanov A.M., Moiseenko P.P., Mitrochenko V.G. Determination of the aerosol particle size distribution by means of the diffusion battery: Analytical inversion // *Aerosol Sci. Technol.* 2018. V. 52, N 8. P. 841–853.
6. Пауэрс П. Аэрозоли. Введение в теорию. М.: Мир, 1987. 278 с.
7. Kunicki K., Was J. Simple HPLC method for cefazolin determination in human serum — validation and stability testing // *J. Chromatogr. B.* 2012. V. 911, N 12. P. 133–139.
8. Palma E.C., Laureano J.V., de Araújo B.V., Meinhardt N.G., Stein A.T., Costa T.D. Fast and sensitive HPLC/UV method for cefazolin quantification in plasma and subcutaneous tissue microdialysate of humans and rodents applied to pharmacokinetic studies in obese individuals // *Biomed. Chromatogr.* 2018. V. 32. P. e4254 (1–11).
9. Hasan N., Sher N., Siddiqui F.A., Ahmad M., Shafi N., Sial A.A., Baig M.T. Novel HPLC method for quantitative determination of cefazolin sodium in pharmaceutical formulations // *Res. Rep. Med. Chem.* 2013. V. 2013, N 3. P. 21–28.
10. Valiulin S.V., Onischuk A.A., Baklanov A.M., Dubtsov S.N., An'kov S.V., Tolstikova T.G., Plokhhotnichenko M.E., Dultseva G.G., Mazunina P.S. Excipient-free isoniazid aerosol administration in mice: Evaporation-nucleation particle generation, pulmonary delivery and body distribution // *Int. J. Pharm.* 2019. V. 563. P. 101–109.
11. Arms A.D., Travis C.C. Reference Physiological Parameters in Pharmacokinetic Modeling. EPA Report no. EPA/600/6-88/004. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment, 1988. Available from NTIS Springfield, VA PB88-196019.

A.A. Bazhina, S.V. Valiulin, A.M. Baklanov, S.N. Dubtsov, S.V. An'kov, M.E. Plokhhotnichenko, T.G. Tolstikova, A.A. Onischuk. **Technique of aerosol generation of antibacterial medicine cefazolin.**

Technique for generation of cefazolin aerosol particles with the size from 80 to 1400 nm is described. Experiments with aerosol drug administration on laboratory animals (mice) showed the efficiency of this cefazolin delivery technique to be close to the efficiency of intravenous injection.