

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 615.46/47

РАЗРАБОТКА МИКРОРЕАКТОРНОГО МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ ЛАТЕКСНОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ

С.А. Кедик, заведующий кафедрой, **Е.А. Петрова**, ведущий инженер,
Е.С. Жаворонок, ведущий инженер, **А.В. Панов**, старший преподаватель,
В.В. Суслов, старший научный сотрудник

кафедра Биомедицинских и фармацевтических технологий
 МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571Россия
 e-mail: svvchem@yandex.ru

Разработан микрореакторный метод получения суспензий полимерных микросфер, предназначенных для использования в качестве носителей библигандов при создании диагностических тест-систем на основе реакции латексной агглютинации. Изучено влияние основных параметров процесса диспергирования (геометрии проточных микрореакторов, состава и соотношения скоростей подачи органической и водной фаз) на характеристики полимерных микросфер (средний размер и полидисперсность частиц) и выбраны оптимальные параметры.

Ключевые слова: полимерные микросферы, диагностические тест-системы, проточные микрореакторы, латексная агглютинация.

Введение

В настоящее время для проведения экспресс-анализов биологических жидкостей используют иммунодиагностические тест-системы, состоящие из функционализированных частиц монодисперсных суспензий с иммобилизованными на их поверхности библигандами [1]. В качестве носителей библигандов хорошо зарекомендовали себя полимерные микросферы со средним диаметром частиц от 1 до 5 мкм, узким распределением по размерам (РЧР), сохраняющие устойчивость и индивидуальность в растворах электролитов [2] и обладающие стабильностью при хранении.

Основным методом получения полимерных микросфер является гетерофазная полимеризация: эмульсионная, суспензионная, дисперсионная, осадительная, затравочная [3].

В последнее время широкое применение для получения лекарственных форм пролонгированного действия на основе полимерных микро-

сфер, содержащих лекарственные вещества, нашел «метод экстракции/испарения растворителя» (рис. 1), при котором полимерные микросферы получают путем диспергирования органических растворов полимеров в водных растворах ПАВ, с последующим удалением растворителя из частиц эмульсии. Особенно интересна его реализация для синтеза суспензий полимерных микросфер с использованием проточных микрореакторов – миниатюрных Т- или Y-образных узлов, а также узлов пересечения (рис. 2), в которых диспергирование раствора полимера происходит за счет потока другой фазы (водного раствора ПАВ) [3]. Такой прием позволяет синтезировать частицы заданного размера и активно используется для получения полимерных микросфер из биodeградируемых полимеров, содержащих различные лекарственные вещества (налтрексон, респеридон, октреотид, лейпрорелин, бусерелин и другие).

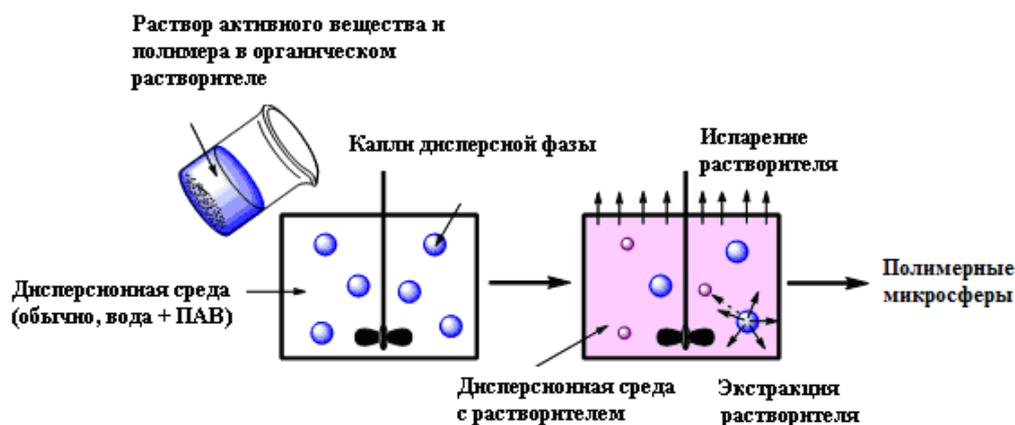


Рис. 1. Формирование микросфер путем эмульгирования органического раствора активного вещества и полимера в водной среде с последующей экстракцией/испарением растворителя.

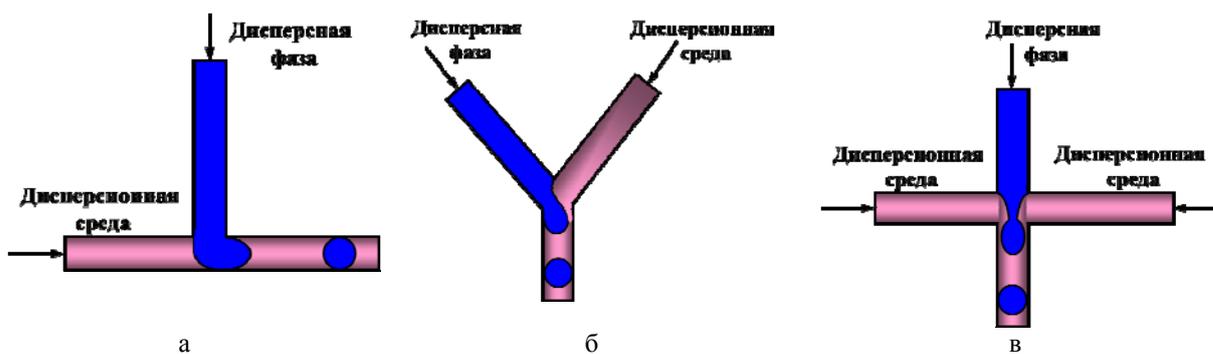


Рис. 2. Типы проточных микрореакторов:
(а) Т-образный; (б) Y-образный; (в) узел пересечения.

Целью настоящей работы является разработка метода получения полимерных микросфер, потенциально пригодных для создания диагностических тест-систем, путем микрореакторного диспергирования. В задачи исследования входило также определение влияния состава органической и водной фаз, скоростей их подачи и оптимальной геометрии микрореактора на распределение полимерных микросфер по размерам для нахождения оптимальных условий получения полимерных микросфер, предназначенных для использования в тест-системах на основе реакции латексной агглютинации.

Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования использовали сополимер метилметакрилата с бутилметакрилатом ($M_w = 75$ кДа, 85 мол.% звеньев метилметакрилата) производства Sigma-Aldrich (США), поливиниловый спирт ($M_w = 40$ кДа) производства Chang Chun Petrochemical Co. (Вьетнам) и растворитель – хлористый метилен

(х.ч.) компании «Компонент-Реактив» (Россия). Хлористый метилен характеризуется высокой летучестью, низкой температурой кипения и является хорошим растворителем для выбранных сополимеров. В качестве растворителя для поливинилового спирта использовали дистиллированную воду.

В качестве органической фазы использовали растворы сополимера метилметакрилата с бутилметакрилатом в хлористом метиле (2, 3, 4 или 5% мас.), а в качестве водной фазы – растворы поливинилового спирта (0.5, 1.0, 2.0 или 3.0% мас.).

Получение полимерных микросфер проводили с использованием комплекта оборудования eduFlowsys (Wingflow, Швейцария) (рис. 3), снабженного Т-образными микрочипами двух видов. Микрочипы представляют собой Т-образные узлы, выполненные в матрице из боросиликатного стекла. Рабочая часть микрочипов содержит каналы с поперечным сечением 400 мкм и

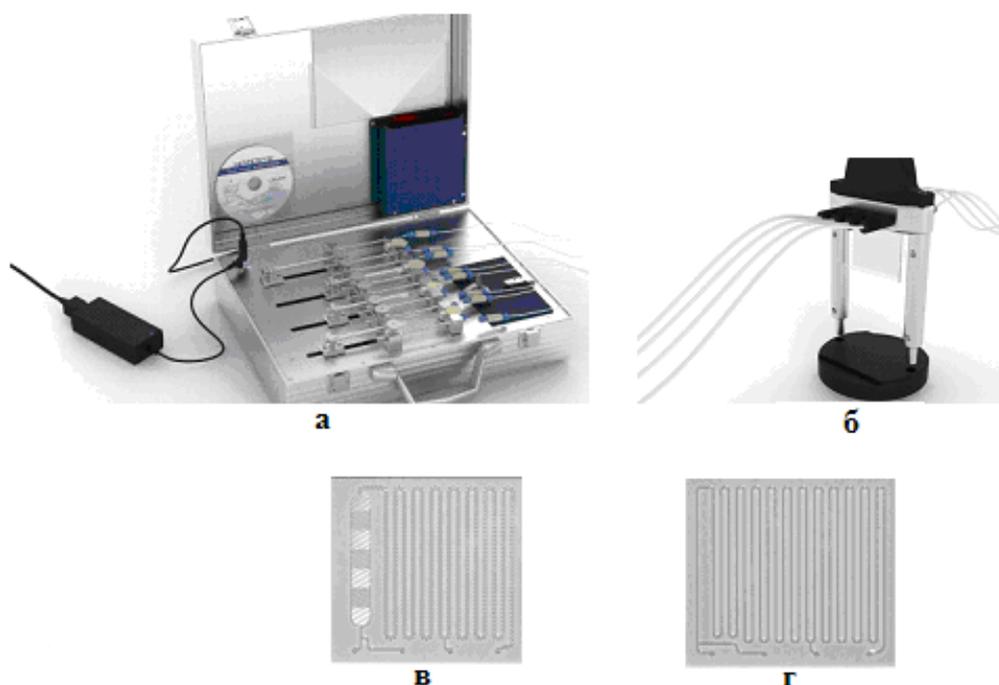


Рис. 3. Комплект оборудования eduFlowsys: (а) общий вид комплекта; (б) держатель микрочипа; (в) микрочип 1 типа; (г) микрочип 2 типа.

протяженностью 6.4×10^5 мкм (микрочип 1-го типа) или 4.2×10^5 мкм (микрочип 2-го типа). Микрочип 1-го типа, в отличие от микрочипа 2-го типа, снабжен статическим миксером и каналами с развитой поверхностью за счет многочисленных микроизгибов.

Принципиальная схема используемой микрореакторной системы представлена на рис. 4. Растворы сополимера (органическая фаза) и поливинилового спирта (водная фаза) посредством насосов 1 и 2 из емкостей 3 и 4 подают в проточный канал микрореактора 5. При этом поток раствора сополимера органической фазы в реакционном канале микрореактора проходит перпендикулярно потоку водной фазы (Т-образный узел). Диспергирование раствора полимера происходит в результате пересечения потоков органической и водной фаз. Образующийся

поток состоит из чередующихся участков водной и органической фаз и представляет собой высокодисперсную эмульсию. Его направляют в реактор 6, снабженный верхнеприводной лопастной мешалкой 7, рубашкой, подключенной к контуру криотермостата 8, и нижним сливом. Реактор на 1/3 объема предварительно заполнен раствором поливинилового спирта и охлажден до 4°C . Собранную в реакторе дисперсию полимера периодически (по мере заполнения реактора) переносят в стаканы и выдерживают при комнатной температуре до полного «созревания» частиц и образования суспензии полимерных микросфер. Полученную суспензию центрифугируют при 8000 об/мин в течение 5 мин, доводя количество полимерной суспензии до концентрации 5% (рис. 4).

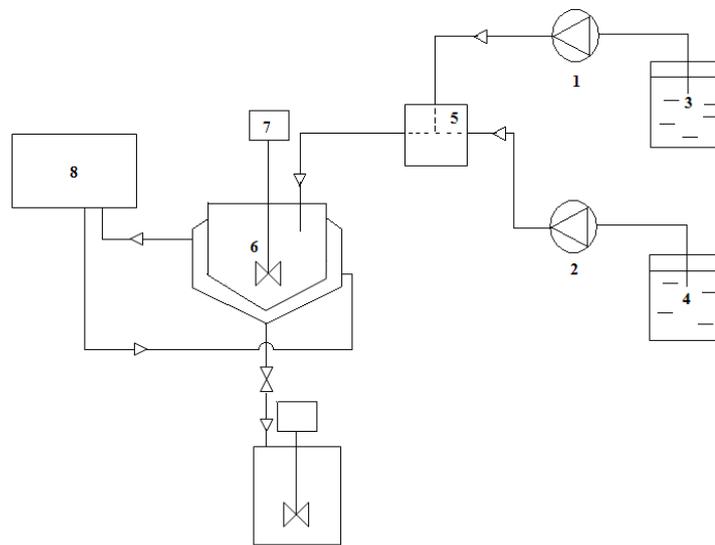


Рис. 4. Принципиальная схема микрореакторной установки:

1 и 2 – насосы; 3 и 4 – емкости с органической и водной фазой, соответственно; 5 – микрореактор; 6 – реактор; 7 – верхнеприводная лопастная мешалка; 8 – криотермостат.

Для оценки размеров полученных полимерных микросфер и распределения частиц по размерам использовали лазерный анализатор частиц Beckman Coulter LS 13320 (США); измерения проводили по стандартной методике.

Результаты и их обсуждение

Для оптимизации параметров получения дисперсии полимерных микросфер методом микрореакторного диспергирования было проведено три серии экспериментов.

1. Влияние типа микрореактора, массового соотношения органической и водной фаз, скорости их дозирования на характеристики полимерных микросфер

Для исследования были использованы Т-образные микрореакторы двух типов. На основании предварительных экспериментов и литературных данных [2, 3], в качестве водной и органической фаз были выбраны 3% раствор сополимера в метилхлориде и 1% водный

раствор поливинилового спирта (ПВС).

Результаты исследований показали, что при проведении процесса в микрореакторе 1-го типа (рис. 3) формируются микросферы с бимодальным распределением частиц по размерам (рис. 5), тогда как при использовании микрореактора с менее развитой структурой (2-го типа) удалось получить полимерные микросферы с более узким распределением по размерам (рис. 6).

Полученные данные о размере микрочастиц и РЧР обобщены в табл. 1. Из нее видно, что микрореактор 2-го типа позволяет получать более однородные микрочастицы, при том, что средний размер частиц принципиально не изменяется. Вероятной причиной широкого распределения по размерам частиц полимерной суспензии, полученной в микрореакторе 1-го типа, может быть его весьма развитая внутренняя структура и наличие статического миксера, что приводит к турбулизации потоков и дополнительному диспергированию частиц дисперсии

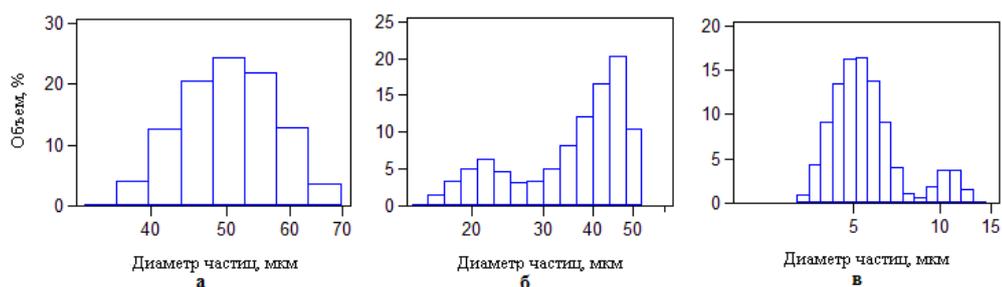


Рис. 5. Типичное распределение частиц по размерам в суспензиях, полученных с помощью микрореактора 1-го типа. Концентрация раствора сополимера в метиленхлориде 3%, концентрация водного раствора ПВС 1%. Соотношение расходов органической и водной фаз, мкл/с: (а) 1:5 (ПМ002); (б) 1:15 (ПМ006); (в) 10: 100 (ПМ013).

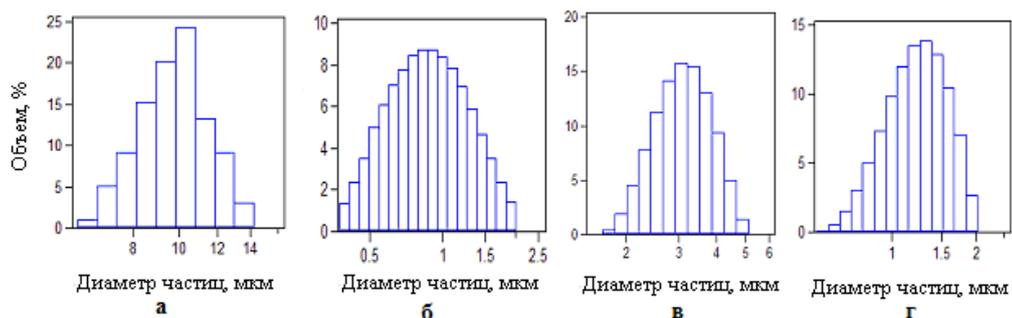


Рис. 6. Типичное распределение частиц по размерам в суспензиях, полученных с помощью микрореактора 2-го типа. Концентрация раствора сополимера в метиленхлориде 3%, концентрация водного раствора ПВС 1%. Соотношение расходов органической и водной фаз, мкл/с: (а) 5:100 (ПМ10); (б) 100:150 (ПМ36); (в) 25:150 (ПМ24); (г) 15:150 (ПМ27).

Таблица 1. Влияние соотношения расходов водной и органической фаз на средний размер и полидисперсность микросфер, полученных путем микрореакторного диспергирования

№ серии	Соотношение расходов [мкл/с] водной и органической фаз	Средний диаметр частиц, мкм	Полидисперсность частиц
<i>Микрореактор 1-го типа</i>			
ПМ002	1:5	50.2±3.0	1.17
ПМ006	1:15	d ₁ =21.7±1.0; d ₂ =45.6±3.0	1.41
ПМ008	1:30	d ₁ =12.4±1.0; d ₂ =34.6±3.0	2.34
ПМ009	3:30	d ₁ =10.3±1.0; d ₂ =26.7±3.0	1.24
ПМ013	10:100	d ₁ =5.4±0.8; d ₂ =10.3±1.0	2.80
<i>Микрореактор 2-го типа</i>			
ПМ01	1:5	52.0±3.0	1.09
ПМ04	1:15	44.8±3.0	1.11
ПМ07	1:30	38.0±3.0	1.04
ПМ09	3:30	35.5±3.0	1.07
ПМ11	3:50	29.0±2.0	1.15
ПМ15	10:30	14.0±2.0	1.11
ПМ19	10:50	11.5±2.0	1.07
ПМ31	10:100	5.6±0.8	1.06
ПМ10	50:100	9.3±0.8	1.30
ПМ36	10:150	0.98±0.1	2.35
ПМ27	15:150	1.3±0.5	1.50
ПМ24	25:150	3.1±0.5	1.40
ПМ21	30:150	5.4±0.5	1.20
ПМ16	50:150	6.7±0.5	1.35

полимера. Поэтому в дальнейших исследованиях был использован микрореактор 2-го типа, более пригодный для получения однородных микрочастиц.

Из данных табл.1 следует, что при одновременном увеличении расходов органической и водной фаз наблюдается уменьшение размера частиц. Минимальный размер частиц был получен в опыте ПМ36, однако полидисперсность микросфер при этих условиях высока. Увеличение скорости дозирования органической фазы при постоянной скорости дозирования водной фазы, т.е. увеличение содержания раствора полимера приводит к увеличению среднего размера микросфер, и РЧР становится более узким. Наиболее узкое РЧР было получено в серии ПМ24. Микросферы имеют достаточно узкое

РЧР, а средний диаметр частиц попадает в указанный выше интервал размеров частиц, пригодных для создания диагностических систем.

2. Влияние концентрации сополимера в хлористом метиле на характеристики полимерных микросфер

Не менее важным параметром, определяющим средний размер и полидисперсность микросфер, является концентрация сополимера в органической фазе. Исследования проводили при оптимальных постоянных скоростях дозирования реагентов (25:150 мкл/с) в микрореакторе 2-го типа. Типичные зависимости РЧР представлены на рис. 7, из которого видно, что для всех образцов сохраняется относительно узкое распределение по размерам.

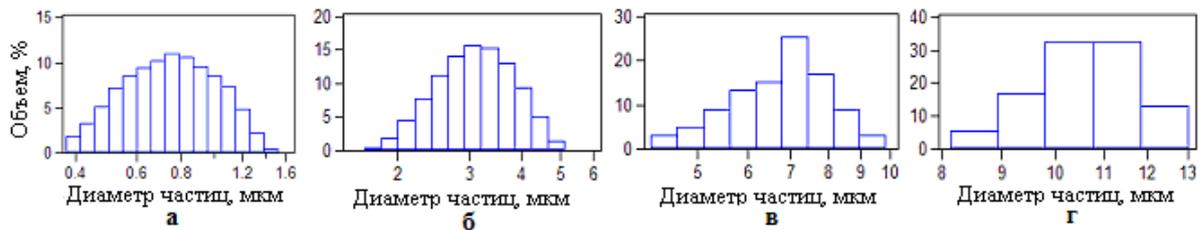


Рис. 7. Распределение частиц по размерам в суспензиях, полученных с помощью микрореактора 2-го типа. Соотношение скоростей расхода органической и водной фаз 25:150 мкл/с. Концентрация водного раствора ПВС 3%. Концентрация раствора сополимера в метиленхлориде, %: (а) 2 (ПМ24₁); (б) 3 (ПМ24₂); (в) 4 (ПМ24₃); (г) 5 (ПМ24₄).

Результаты исследований обобщены в табл. 2, из которой видно, что с увеличением концентрации сополимера средний диаметр микросфер возрастает, а полидисперсность, наоборот, уменьшается. При концентрации

сополимера в хлористом метиле, равной 3%, образуются полимерные микросферы, соответствующие по своим характеристикам частицам, потенциально пригодным для создания тест-систем.

Таблица 2. Влияние концентрации раствора сополимера в хлористом метиле на средний размер и полидисперсность микросфер, полученных с помощью микрореактора 2-го типа

№ серии	Концентрация сополимера, %	Средний диаметр частиц, мкм	Полидисперсность частиц
ПМ24 ₁	2	0.76±0.05	1.14
ПМ24 ₂	3	3.06±0.5	1.4
ПМ24 ₃	4	7.1±0.5	1.24
ПМ24 ₄	5	11.8±1.0	1.08

3. Влияние концентрации ПАВ в водной фазе на характеристики полимерных микросфер

Исследование влияния концентрации ПАВ (поливинилового спирта) в водной фазе на средний размер и полидисперсность микросфер проводили при постоянных скоростях дозирования реагентов (25:150 мкл/с) и оптимальной концентрации полимера в органической фазе 3% с помощью микрореактора 2-го типа. Типичные зависимости РЧР представлены на рис. 8, из которого видно, что для всех образцов также характерно узкое распределение полимерных микросфер по размерам.

Проведенные эксперименты свидетельствуют

о том, что с ростом концентрации поливинилового спирта наблюдается увеличение среднего размера частиц, а полидисперсность уменьшается (табл. 3). При концентрации поливинилового спирта в водной фазе, равной 1%, получаемые полимерные микросферы имеют узкое РЧР и средний диаметр частиц, соответствующий заданному ранее интервалу, поэтому эта концентрация была признана оптимальной.

Таким образом, путем изменения концентраций полимера в органической и поливинилового спирта в водной фазах возможно регулирование свойств полимерных микросфер.

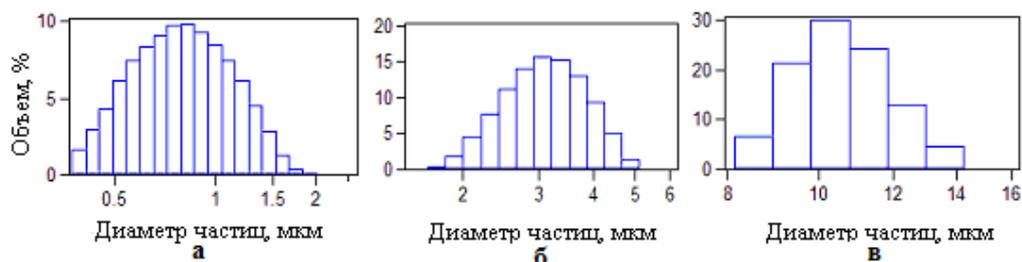


Рис. 8. Типичное распределение частиц по размерам в суспензиях, полученных с помощью микрореактора 2-го типа. Соотношение скоростей расхода органической и водной фаз 25:150 мкл/с; концентрация раствора сополимера 3%. Концентрация водного раствора ПВС, %: (а) 0.5 (ПМ24₆); (б) 1.0 (ПМ24₃); (в) 2.0 (ПМ24₇).

Таблица 3. Влияние концентрации раствора поливинилового спирта в водной фазе на средний размер и полидисперсность микросфер, полученных с помощью микрореактора 2-го типа

№ серии	Концентрация поливинилового спирта,	Средний диаметр частиц, мкм	Полидисперсность частиц
ПМ24 ₆	0.5	0.83±0.05	1.99
ПМ24 ₃	1.0	3.06±0.5	1.40
ПМ24 ₇	2.0	10.5±1.0	1.14
ПМ24 ₈	3.0	Несферические частицы	–

Выводы

Проведенные исследования позволили разработать метод для получения полимерных микросфер разного диаметра с относительно узким распределением частиц по размеру. Характеристики полученных микросфер позволяют рассматривать их как потенциально пригодные в качестве носителей биологандов в тест-системах, работающих по принципу латексной агглютинации. Определены оптимальные параметры микрореакторного процесса (микрореакторный узел без турбулизирующих участков, соотношение скоростей подачи орга-

нической и водной фаз, концентрация раствора сополимера метилметакрилата и бутилакрилата в метилхлориде, концентрация водного раствора поливинилового спирта). Разработанный метод позволяет получать микросферы со стабильными характеристиками.

Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (ГК № 14.512.11.0019 от 11.03.2013 г., шифр темы 2013-1.2-14-512-0007).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Солодухина Н.М. Анализ опиатов, барбитуратов и каннабиоидов методом латексной агглютинации с использованием функциональных полимерных микросфер : дис. ... канд. хим. наук. – М., 2012. 114 с.
2. Артыкова З.Б., Грицкова И.А., Гусев С.А., Басырева Л.Ю., Социлин В.А., Штильман М.И., Горячая А.В., Хейнман Г.П., Кедик С.А., Прокопов Н.И. Получение диагностических тест-систем на основе полимерных микросфер в присутствии поливинилпирролидона, модифицированного аминокислотой // Вестник МИТХТ. 2010. Т. 5. № 3. С. 82–87.
3. Ahmad H., Oli M.W.U., Ali A.M.I., Miah M.A.J. Preparation of sub-micron to micron-sized di-functional polymer particles and their characterization// Malaysian Polymer J. 2010. V. 5. № 2. P. 181–192.
4. Петрова Е.А., Кедик С.А., Алексеев К.В., Блынская Е.В., Панов А.В., Суслов В.В., Тихонова Н.В. Оценка эффективности метода двойного эмульгирования при получении микросфер налтрексона на основе сополимера молочной и гликолевой кислот // Вестник МИТХТ. 2013. Т. 8. № 2. С. 58–63.
5. Ekanem E.E., Shiu Y.Y., Tauanov Z., Sharma L., Shahmohamedi H., Henry J.V., Das D., Vladisavljević G.T. Development of novel drug formulation using microfluidic device / Technology Forum 2012 «Formulating with particles». – Loughborough University, April 4–5, 2012.
6. Martín-Banderas B.L., Rodríguez-Gil A., Cebolla A., Chávez S., Berdún-Álvarez T., Fernandez G.J.M., Flores-Mosquera M., Gañán-Calvo A.M. Towards high-throughput production of uniformly encoded microparticles// Advanced Material. 2006. V. 18. P. 559–564.

DEVELOPMENT OF MICROREACTOR METHOD FOR POLYMERIC MICROSPHERES PRODUCTION USED IN TEST SYSTEMS BASED ON LATEX AGGLUTINATION REACTION

S.A. Kedik, E.A. Petrova, E.S. Zhavoronok, A.V. Panov, V.V. Suslov[@]

M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies, Moscow, 119571 Russia

[@]Corresponding author e-mail: svvchem@yandex.ru

Some steps were taken to elaborate a method for the preparation of polymeric microspheres using flow microreactors by emulsifying the solution of methacrylic acid esters copolymer in an aqueous PVA solution followed by extraction and evaporation of the solvent. The effect of process parameters on the characteristics of polymeric microspheres with a predetermined set of properties (mean size, polydispersity) potentially suitable for use as carriers in bioligands for diagnostic test systems was investigated. The dependence of the average particle size on the microreactor type, concentration of copolymer solution in methylene chloride and polyvinyl alcohol in water and the ratio of flow rates of organic and aqueous phases was stated, and the optimal process conditions were selected.

Key words: *polymeric microspheres, diagnostic test systems, flow microreactors, latex agglutination.*