

## МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЕ МИДАЗОЛАМА КАК СПОСОБ МОДИФИКАЦИИ ЕГО ФАРМАКОКИНЕТИКИ

**М.А. Юдин**

д.м.н., доцент, нач. отдела, Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины (ГНИИИ ВМ МО РФ) (Санкт-Петербург)

**С.В. Чепур**

д.м.н., профессор, начальник ГНИИИ ВМ МО РФ (Санкт-Петербург)

**О.И. Алёшина**

мл. науч. сотрудник, ГНИИИ ВМ МО РФ (Санкт-Петербург)

**А.Ф. Быкова**

к.б.н., ст. науч. сотрудник, ГНИИИ ВМ МО РФ (Санкт-Петербург)

E-mail: [anna-kurpyakova@rambler.ru](mailto:anna-kurpyakova@rambler.ru)

**И.М. Иванов**

к.м.н., зам. начальника отдела, ГНИИИ ВМ МО РФ (Санкт-Петербург)

**Цель работы:** Выбор наиболее оптимального метода получения микрокапсулированной формы мидазолама, обеспечивающего улучшение кинетики его высвобождения из микрочастиц. **Материалы и методы:** Для создания микрокапсулированной формы мидазолама применяли методы эмульгирования, двойного эмульгирования, нанопреципитации и распылительной сушки. Эффективность включения и распределение мидазолама между матрицей и поверхностью частиц оценивали с помощью метода ВЭЖХ. **Результаты:** Показано, что применение метода распылительной сушки обеспечивает максимум включения мидазолама в полимерные матрицы для образцов на основе альгината (более 44%) и полилактид-ко-гликолида (более 60%). Кинетика высвобождения мидазолама *in vitro* характеризуется пологой кривой для образцов на основе альгината натрия по сравнению с образцами на основе полилактид-ко-гликолида. **Выводы:** Наиболее оптимальные параметры включения и высвобождения мидазолама достигаются при использовании полимерных матриц на основе PLGA и альгината. Это позволяет рассматривать образцы на их основе в качестве перспективных средств для повышения противосудорожного эффекта при лечении токсического судорожного синдрома.

**Ключевые слова:** мидазолам, микрокапсулирование, фармакокинетика, пролонгированная форма.

**Для цитирования:** Юдин М.А., Чепур С.В., Алёшина О.И., Быкова А.Ф., Иванов И.М. Микрокапсулирование мидазолама как способ модификации его фармакокинетики. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(8):27–32. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-08-05>

Эффективность терапии токсического судорожного синдрома во многом зависит от особенностей кинетики токсиканта и противосудорожного средства, определяющей возможность их конкуренции на протяжении периода острых клинических проявлений. В этой связи повышается актуальность создания пролонгированных форм базисных антиконвульсантов из числа барбитуратов и бензодиазепинов. К числу бензодиазепинов, зарегистрированных в Российской Федерации для терапии судорожного синдрома, относятся диазепам (сибазон) и мидазолам, обладающий большей эффективностью.

Эффективность противосудорожных средств, в том числе мидазолама, во многом зависит от скорости их накопления в плазме крови и центральной нервной системе (ЦНС), а также длительности поддержания их терапевтической концентрации в головном мозге. Быстрое уменьшение мидазолама

в ЦНС и плазме крови ниже 40 нг/мл приводит к рецидивам судорог, которые крайне сложно купируются при его повторном введении и могут привести к гибели пострадавшего [1]. Несмотря на способность проникать через гематоэнцефалический барьер, фармакологическое действие мидазолама характеризуется малой продолжительностью: T<sub>1/2</sub>, α-фаза – 15 мин, β-фаза – 2,5 ч (обычно от 1 до 5 ч) [2].

Повышение эффективности мидазолама за счет более длительного поддержания его стабильной терапевтической концентрации в плазме крови может быть достигнуто при его включении в состав полимерных матриц с использованием технологии нано- и микрокапсулирования. Благодаря возможности варьировать размеры, структуру и физико-химические свойства микрокапсул, их применяют в качестве систем доставки с контролируемым высвобождением активного начала

для обеспечения более длительного действия препаратов [3]. В качестве перспективных носителей для мидазолама могут рассматриваться полилактид-ко-гликолид (PLGA) [4], альгинат натрия [5], поливиниловый спирт (ПВС), карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) [6].

Цель исследования – выбор наиболее оптимальных носителей для микрокапсулирования мидазолама, обеспечивающих модификацию его фармакокинетики, направленную на увеличение продолжительности фармакологического действия.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для микрокапсулирования мидазолама использовали полимеры: PLGA (85:15), 190–240 кДа, эфирная группа (далее – PLGA 1); PLGA (75:25), 76–115 кДа, эфирная группа (далее – PLGA 2); PLGA (75:25), 66–107 кДа, свободная группа (далее – PLGA 3); PLGA (85:15), 50–75 кДа, эфирная группа (далее – PLGA 4); PLGA 5 – PLGA (50:50), 38–54 кДа, кислотная группа (далее – PLGA 5); PLGA (65:35), 24–38 кДа, кислотная группа (далее – PLGA 6); PLGA (50:50), 24–38 кДа, кислотная группа (далее – PLGA 7); PLGA (50:50), 24–38 кДа, кислотная группа (далее – PLGA 8); PLGA (50:50), 7–17 кДа, эфирная группа (далее – PLGA 9); PLGA (75:25), 4–15 кДа, кислотная группа (далее – PLGA 10), альгинат натрия (вязкость 5,0–40 сП); ПВС (молярная масса 27 кДа); КМЦ (вязкость 1500–3000 сП). Все реактивы фирмы «Sigma Aldrich» (США). Также применяли очищенную воду, полученную из питьевой воды методом ионного обмена (ФС.2.2.0020.15 вода очищенная).

Микрокапсулированные формы мидазолама получали при использовании следующих методов:

**1. Метод эмульгирования.** Водную (250 мг ПВС в 25 мл воды очищенной) и органическую (10 мг мидазолама, 190 мг PLGA в 6,76 мл хлористого метилена) фазу эмульгировали при 15000 об/мин в течение 1 мин. Полученную эмульсию перемешивали в течение 15 ч при 325 об/мин. Осадок фильтровали и промывали.

**2. Метод двойного эмульгирования.** Первую водную (10 мг мидазолама в 3,945 мл воды очищенной) и органическую (190 мг PLGA в 6,76 мл хлористого метилена) фазы эмульгировали 1 мин при 15000 об/мин, после чего приливали вторую водную (250 мг ПВС в 25 мл воды очищенной) фазу и эмульгировали 1 мин при

9000 об/мин. Полученную эмульсию перемешивали 15 ч при 325 об/мин. Осадок фильтровали и промывали.

**3. Метод нанопреципитации.** Органический раствор (5 мг мидазолама, 45 мг PLGA в 2 мл ацетона) по каплям добавляли к водному раствору (50 мг Pluronic F-68 в 10 мл воды очищенной), а полученную суспензию перемешивали 4 ч при 325 об/мин. Осадок фильтровали и промывали.

**4. Метод распылительной сушки (Nano Spray Dryer B-90, Buchi, Швейцария).** Смесь мидазолама и полимера (альгинат, ПВС) в разных соотношениях (1:1, 1:3, 1:9, 1:19) растворяли в очищенной воде, затем высушивали при 120 °С и скорости потока 110 л/мин. Для микрокапсулирования с PLGA рабочие растворы готовили в смеси хлористый метилен : метанол (3:1) и высушивали в среде азота при 35 °С, давлении 1 бар, содержания кислорода 1% и скорости потока 110 л/мин. Высушенные частицы собирали специальным скребком.

Эффективность включения и распределение мидазолама между матрицей и поверхностью частиц оценивали методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1100 Infinity («Agilent», США) с использованием колонки RESTEK Ultra PFPP, длиной 150 мм и диаметром 2,1 мм. В качестве подвижной фазы применяли 0,1%  $\text{HCOONH}_4$ , температура термостата колонки – 45 °С, детектирование УФ – при 210 нм. Эффективность включения (ЭВ) в процентах рассчитывали по формуле:

$$\text{ЭВ} = \frac{C_{\text{п}}}{C_{\text{т}}} \cdot 100\%,$$

где  $C_{\text{п}}$  и  $C_{\text{т}}$  – концентрация практическая и теоретическая соответственно, мг/мл.

Для оценки распределения мидазолама между поверхностью и матрицей к 50 мг образцов добавляли 5 мл метанола (для водорастворимых полимеров) или ацетонитрила (для PLGA). Микросферы отделяли от раствора центрифугированием при 12700 об/мин. Содержание мидазолама ( $C_{\text{м}}$ ) в матрице рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{м}} = C_{\text{о}} - C_{\text{п}},$$

где  $C_{\text{о}}$  и  $C_{\text{п}}$  – содержание мидазолама в микросферах и на поверхности соответственно, мкг/мг.

Анализ распределения частиц по размерам выполняли на анализаторе Mastersizer Malvern 3000 с диспергатором Aero S при следующих

условиях: тип – несферические, длительность – 10 с, ослабление 0,01–15%, давление – 1 бар, скорость воздуха – 51%.

Оценку высвобождения мидазолама из микро-сфер проводили в инкубаторе при 37 °С при постоянном перемешивании: к навеске образца 20 мг добавляли 10 мл фосфатного буфера (рН 7,4), в установленные сроки из образцов отбирали аликвоты (500 мкл), доводили объем до 1 мл и центрифугировали при 12700 об/мин. После этого образцы анализировали методом ВЭЖХ [7–11].

Статистический анализ выполняли с помощью пакета Statistica 10. Критическое значение уровня статистической значимости принимали равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе разработки способа получения микрокапсул получено 112 микрокапсулированных образцов мидазолама. Применение методов нанопреципитирования, двойного эмульгирования и эмульгирования сопровождалось низким включением мидазолама (в среднем 1,6±0,8, 2,5±1,1 и 4,7±2,3%

соответственно) и большим размером частиц: 348±53, 189±39 и 185±42 мкм соответственно. Дальнейшее исследование этих образцов не проводили. Характеристики образцов, полученных с применением метода распылительной сушки, представлены в таблице.

Для образцов с соотношением мидазолам : PLGA 1:1 (образцы №№ 1–10) была характерна небольшая эффективность включения – в среднем 11±4,5%. С увеличением доли PLGA эффективность включения возрастала. Так, при соотношении 1:3 (образцы №№ 11–20) показатель увеличился до 17,4±6,0%, при соотношении 1:9 (образцы №№ 21–30) – до 40,3±13,1%, а при соотношении 1:19 – до 76,0±16,0%. При этом образец № 30 характеризовался наибольшей эффективностью включения (61,2±12,3%) при максимальном содержании мидазолама в матрице полимера – 54,8±8,0%. В образцах (№№ 1–20, 31–40) с соотношениями мидазолам : PLGA 1:1, 1:3 и 1:19 препарат адсорбировался на поверхности полимера, при этом образец № 40 обладал минимальным размером частиц (4,0±2,0 мкм).

**Таблица. Состав и характеристики образцов микрокапсулированного мидазолама ( $M \pm m$ )**

Полимер (соотношение мидазолама и полимера)	Показатель				
	№ образца	Включение, %	На поверхности, %	В матрице, %	Размер частиц, мкм
1	2	3	4	5	6
PLGA (соотношение 1:1)	1	5,4±2,3	100±0	0	33,4±19,5
	2	8,2±3,6	100±0	0	30,6±15,9
	3	4,6±1,9	100±0	0	32,2±16,8
	4	7,8±2,8	100±0	0	34,5±14,3
	5	13,3±4,2	94,8±4,3	5,3±4,3	15,2±3,6
	6	17,5±5,8	86,9±6,4	13,1±6,4	10,7±4,2
	7	12,4±3,7	93,5±4,2	6,5±4,2	9,6±2,5
	8	11,0±3,4	90,5±5,6	9,5±5,6	7,5±3,2
	9	16,8±5,2	89,9±9,1	10,1±9,1	8,4±3,1
	10	13,4±2,6	89,4±10,3	10,6±10,3	6,3±1,2
PLGA (соотношение 1:3)	11	10,5±4,2	99,5±0,5	0,5±0,5	31,2±12,8
	12	12,7±4,9	91,3±6,8	8,8±6,8	30,3±11,5
	13	9,6±2,7	94,1±7,8	5,9±7,8	28,7±13,6
	14	13,8±3,5	96,8±3,5	3,2±3,5	33,2±14,7
	15	20,7±6,9	87,3±7,2	12,8±7,2	10,7±3,3
	16	19,6±7,4	85,4±8,3	14,6±8,3	9,1±2,8
	17	21,4±8,3	84,8±7,6	15,3±7,6	8,5±3,1
	18	14,5±5,5	82,6±5,4	17,4±5,4	8,7±3,1
	19	23,5±6,3	88,5±6,2	11,5±6,2	9,2±2,4
	20	27,6±9,9	84,6±10,7	15,4±10,7	7,2±3,2

Окончание таблицы

1	2	3	4	5	6
PLGA (соотношение 1:9)	21	26,4±11,2	86,1±7,4	13,9±7,4	27,8±18,6
	22	23,5±5,9	87,3±7,1	12,8±7,1	30,2±11,8
	23	31,8±12,7	82,1±9,8	17,9±9,8	31,3±12,5
	24	29,7±9,0	89,9±7,6	10,1±7,6	21,5±10,6
	25	50,3±18,5	54,3±13,3	45,8±13,3	12,2±3,8
	26	44,5±8,6	58,3±7,9	41,8±7,9	10,4±2,6
	27	49,6±11,3	60,3±10,8	39,8±10,8	11,1±2,5
	28	32,1±8,8	57,6±7,0	42,4±7,0	8,7±2,1
	29	54,0±19,6	62,1±12,4	37,9±12,4	7,5±3,1
	30	61,2±12,3	45,3±8,0	54,8±8,0	14,2±4,9
PLGA (соотношение 1:19)	31	66,5±9,0	100±0	0	15,7±8,6
	32	52,1±12,4	100±0	0	19,3±7,8
	33	59,3±18,7	100±0	0	14,9±3,3
	34	57,4±20,5	100±0	0	16,7±9,5
	35	83,2±27,2	93,0±8,1	7,0±8,1	7,4±2,6
	36	76,5±14,6	93,5±5,6	6,5±5,6	8,6±3,5
	37	87,1±31,8	97,8±2,1	2,3±2,1	5,8±2,5
	38	90,4±32,2	92,4±6,0	7,6±6,0	6,5±3,1
	39	89,8±24,6	89,8±6,8	10,3±6,8	10,0±4,8
	40	97,4±25,7	80,3±7,9	19,8±7,9	4,0±2,0
Альгинат	41	5,6±1,9	84,6±8,7	15,4±8,7	27,2±8,3
	42	27,4±10,2	67,3±11,3	32,8±11,3	20,5±6,5
	43	44,8±18,6	19,6±7,1	80,4±7,1	10,3±4,2
	44	48,4±12,1	13,8±6,0	86,3±6,0	12,5±5,9
ПВС	45	66,2±23,3	100±0	0	37,5±9,5
	46	76,5±17,2	100±0	0	44,6±10,3
	47	65,3±20,7	100±0	0	26,4±7,5
	48	74,2±33,4	100±0	0	29,7±6,2
КМЦ	49	56,1±15,2	100±0	0	45,3±7,6
	50	73,4±40,8	92,3±5,8	7,8±5,8	34,1±6,2
	51	54,9±16,6	100±0	0	37,2±5,3
	52	70,5±38,0	100±0	0	33,1±4,3

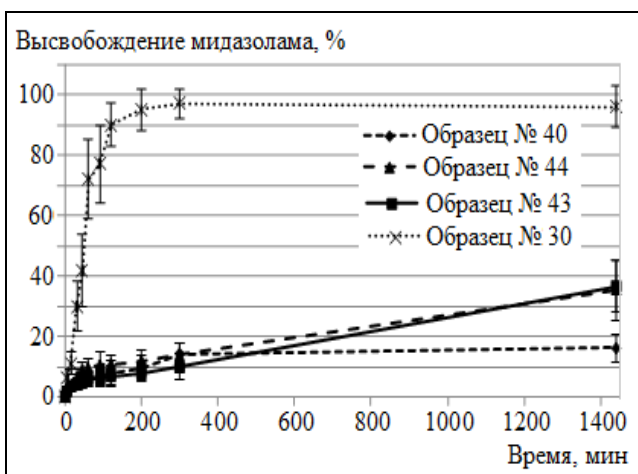


Рис. 1. Высвобождение мидазолама из образцов в различные сроки после добавления фосфатного буфера

Микрокапсулированные образцы мидазолама на основе КМЦ и ПВС (образцы №№ 45–52) отличались отсутствием или низким включением в матрицу полимера – меньше 8%. Образцы на основе альгината натрия с соотношением бензодиазепин : полимер 1:9 и 1:19 (образцы № 43 и 44) характеризовались высокой абсорбцией (в среднем – 83,4±4,2%) и включением препарата (в среднем – 46,6±2,5%). Полученные результаты позволили отобрать для дальнейших исследований образцы №№ 30, 40, 43 и 44.

Для оценки скорости высвобождения мидазолама из микрокапсул образцы растворяли в фосфатном буфере и через различное время после растворения определяли содержание препарата (рис. 1).

Мидазолам из образца № 30 практически полностью ( $96,9 \pm 5,1\%$ ) высвобождался за 5 ч. Доля высвободившегося препарата из других образцов была существенно ниже и составила через 1 сутки для образца № 40 –  $16,1 \pm 4,6\%$ , № 43 –  $36,5 \pm 8,5\%$ , № 44 –  $35,2 \pm 10,1\%$ .

Учитывая отсутствие крайней точки полного высвобождения мидазолама, наблюдение за образцами №№ 40, 43 и 44 продолжали. Аликвоты для анализа отбирали через 32, 48, 56, 72, 168, 176, 192, 200, 216 ч после добавления физиологического раствора (рис. 2).

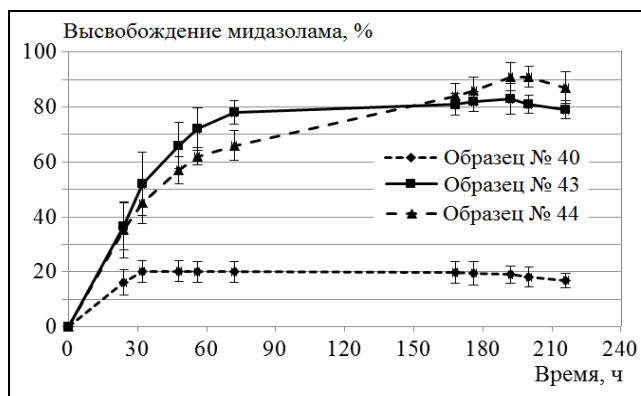


Рис. 2. Высвобождение мидазолама из образцов №№ 40, 43 и 44 в различные сроки после добавления фосфатного буфера

Доля высвободившегося из образца № 40 мидазолама составила  $20,2 \pm 4,0\%$  (в течение 32 ч с момента растворения образца). В последующие сроки уровень бензодиаземина не изменялся, что может быть обусловлено его ковалентным связыванием с полимерной матрицей в результате структурных изменений комплекса. В целом образцы №№ 43 и 44 имели схожий профиль высвобождения мидазолама. За 200 ч препарат высвобождался на  $91,0 \pm 3,9$  и  $83,1 \pm 3,4\%$ , соответственно для образцов № 44 и № 43.

## ВЫВОДЫ

1. Образцы микрокапсулированного мидазолама, полученные методом распылительной сушки, в которых в качестве полимера-носителя использовался полилактид-ко-гликолид (образцы №№ 30 и 40), характеризовались более быстрым профилем высвобождения, по сравнению с образцами на основе альгината (образцы №№ 43 и 44). Различия в кинетике высвобождения можно

объяснить различной природой полимеров и, как следствие, различной растворимостью в воде, а также размером частиц. В отличие от альгината, который набухает в воде и препятствует быстрому высвобождению мидазолама, полилактид-ко-гликолид разлагается быстрее в результате гидролиза эфирных связей. По всей видимости, разница в размерах частиц образцов № 40 ( $4 \pm 2,06$  мкм) и № 30 ( $14,2 \pm 4,93$  мкм) лежит в основе низкого уровня высвобождения бензодиаземина из образца № 40 ( $20,2 \pm 4,0\%$ ).

2. Высокая эффективность включения мидазолама в состав полимерных матриц на основе PLGA и альгината и значительная доля высвобождения препарата позволяет рассматривать образцы №№ 30, 43 и 44 в качестве наиболее перспективных средств, предназначенных для поддержания стабильной терапевтической концентрации исследованного бензодиаземина и обеспечения его длительного противосудорожного эффекта при лечении токсического судорожного синдрома.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Jellinger K.A. The human nervous system structure and function // *European Journal of Neurology*. 2009; 45 (7): 136–136.
2. Rongen V. A., Vaughns J.D., Moorthy G.S. et al. Population pharmacokinetics of midazolam and its metabolites in overweight and obese adolescents // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2015; 80 (5): 1185–1196.
3. Singh R., Lillard J.W. Nanoparticle-based targeted drug delivery // *Experimental and Molecular Pathology*. 2009; 86 (3): 215–223.
4. Sharma D., Gabrani R., Sharma S.K. et al. Development of midazolam loaded poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) nanoparticles for treatment of status epilepticus // *Advanced Science Letters*. 2014; 20 (7): 1526–1532.
5. Daemi H., Barikani M. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles // *Scientia Iranica*. 2012; 19 (6): 2023–2028.
6. Venkata B.V., Maulick C. Emil J. Sonal M. Preparation and characterization of nanoparticles of carboxymethyl cellulose acetate butyrate containing acyclovir // *Applied Nanoscience*. 2016; 6 (2): 197–208.
7. Sarfaraz M.D., Hiremath D, Chowdary K.P.R. Formulation and characterization of rifampicin microcapsules // *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010; 72 (1): 101–105.
8. Sagiri S.S., Pal K., Basak P. et al. Encapsulation of sorbitan ester-based organogels in alginate microparticles // *AAPS PharmSciTech*. 2014; 15 (15): 1197–1208.
9. Attia M.I., Eldehna W.M., Afifi S.A. et al. New hydrazonoindolin-2-ones: synthesis, exploration of the possible antiproliferative mechanism of action and

- encapsulation into PLGA microspheres // PloS One. 2017; 12(7): 1–24.
10. Do A.V., Geary S.M., Seol D. et al. Combining ultrasound and intratumoral administration of doxorubicin-loaded microspheres to enhance tumor cell killing // Int. J. Pharm. 2018; 539 (1-2): 139–146.
11. Jaswir I., Noviendri D., Taher M. et al. Optimization and formulation of fucoxanthin-loaded microsphere (F-LM) using response surface methodology (RSM) and analysis of its fucoxanthin release profile // Molecules. 2019; 24 (5): 947–963.

Поступила после доработки 15 мая 2019 г.

## MIDAZOLAM MICROENCAPSULATION AS A METHOD OF MODIFYING ITS PHARMACOKINETICS

© Authors, 2019

### M.A. Judin

Dr.Sc. (Med.), Associate Professor, Head of Department, Federal State Budgetary Institution State Scientific-Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation (St. Petersburg)

### S.V. Chepur

Dr.Sc. (Med.), Professor, Head of Federal State Budgetary Institution State Scientific-Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation (St. Petersburg)

### O.I. Aleshina

Junior Research Scientist, Federal State Budgetary Institution State Scientific-Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation (St. Petersburg)

### A.F. Bykova

Ph.D. (Biol.), Senior Research Scientist, Federal State Budgetary Institution State Scientific-Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation (St. Petersburg)  
E-mail: anna-kurpyakova@rambler.ru

### I.M. Ivanov

Ph.D. (Med.), Deputy Head of Department, Federal State Budgetary Institution State Scientific-Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation (St. Petersburg)

**Purpose of the study.** The selection of the most optimal method for obtaining the microencapsulated form of midazolam, which improves the kinetics of its release from microparticles.

**Materials and methods.** Methods of emulsification, double emulsification, nanoprecipitation and spray drying were used to create a microencapsulated form of midazolam. The efficiency of incorporation and distribution of midazolam between the matrix and the surface of the particles was evaluated using the HPLC methods.

**Results.** It's shown that the application of the spray drying method provides the maximum inclusion of midazolam in polymer matrices for samples based on alginate (more than 44 %) and polylactide-co-glicolide (more than 60 %). The in vitro release kinetics of midazolam is characterized by a gentle curve for sodium alginate-based samples compared to polylactide-co-glicolide samples.

**Findings.** The most optimal midazolam incorporation and release parameters are achieved using PLGA- and alginate-based polymeric matrices. This allows us to consider samples based on them as promising means to increase the anticonvulsant effect in the treatment of toxic convulsive syndrome.

**Key words:** *midazolam, microencapsulation, pharmacokinetic, prolonged form.*

**For citation:** Judin M.A., Chepur S.V., Aleshina O.I., Bykova A.F., Ivanov I.M. Midazolam microencapsulation as a method of modifying its pharmacokinetics. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(8):27–32. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-08-05>