

УДК 615.458:615.072

Г. И. БОРЩЕВСКИЙ¹, И. Б. ЯНЧУК¹, Т. Г. ЯРНЫХ²¹ ПАО «Фармак», г. Киев² Национальный фармацевтический университет

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Представлены результаты определения аналитических методов, которые являются специфическими для изучения физико-химических свойств липосом. К этим методам относятся тонкослойная хроматография, динамическое рассеяние света, электронная микроскопия, определение индекса окисления липидов и перекисного числа. Так, методы ТСХ, определение индекса окисления липидов и перекисного числа позволяют количественно определить содержание примесей при производстве и процессе хранения препаратов. Методы ДРС и ТЭМ позволяют визуализировать процесс получения липосомальных препаратов и судить о физических процессах, происходящих при образовании липосом.

Ключевые слова: липосомальные препараты; физико-химические свойства; аналитические методы

ВВЕДЕНИЕ

Получение и экспериментальное исследование липосом является одним из приоритетных направлений нанобиотехнологии. Существующие в настоящее время фармацевтические контейнеры (липосомы, мицеллы, наноэмульсии, полимерные наночастицы, дендримеры, вирусы и вирусоподобные частицы, полиэлектролитные комплексы и другие типы) демонстрируют широкое разнообразие полезных свойств: долгосрочную циркуляцию в кровотоке, что приводит к их накоплению в патологических областях; специфическую доставку, которая возможна благодаря различным лигандам на поверхности частиц; повышенную склонность к проникновению в клетку; способность к высвобождению содержимого под действием определенных физиологических условий [4].

Известно, что липосомальные мембраны из фосфолипидов склонны к гидролизу вследствие сложной связи. Следствием гидролиза фосфолипидов является реорганизация липидов с ламелярной структурой в мицелярную. При этом образуются лизофосфатидилхолин и жирные кислоты, что приводит к увеличению проницаемости мембраны. Альтернативный вариант деградации фосфолипидов – перекисная окислительная деградация ненасыщенных ацильных цепей, что также приводит к увеличению проницаемости бислоя [4, 5].

При получении липосом необходимо контролировать состав бислоя и их размер [1]. При создании липосомальных препаратов используются субстанции LIPOID S 100 и LIPOID E 80. Основным отличием

этих субстанций является количественное содержание фосфатидилхолина – около 93 % для S 100 и около 85 % для E 80. Различие в количественном составе полученных липосомальных препаратов определяет способность к проникновению клеточных мембран и, соответственно, изменяет фармакинетику препарата.

Нами было проведено изучение состава липидов, которые использовались для получения липосомальных препаратов, а также липидного состава полученных липосом [2].

Целью данной работы является исследование химической стабильности (фосфолипидный состав и перекисное число) и изучение структуры и размера липосом, полученных из липоидов различной природы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Липосомы получали методом высокого давления с помощью гомогенизатора высокого давления (микрофлюидайзера). Фосфолипидный состав липосом проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) согласно методике ГФУ Украины 2001 г. первое издание. Физические и физико-химические методы 2.2.27 тонкослойной хроматографии [3]. Определение перекисного числа в исследовательских субстанциях Lipoid S 100 серия 790629-10 и Lipoid E80 с. 510330-2133440-01 проводили по методике ГФУ Украины 2001 г. первое издание. Методы количественного определения 2.5.5 Перекисное число [3]. Размер липосом определялся с помощью метода динамического рассеяния света (ДРС) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

© Борщевский Г. И., Янчук И. Б., Ярных Т. Г., 2015

В работе использовали приборы и материалы: аналитические весы Sartorius BP 221S, pH-метр Mettler Toledo MP220, прибор для определения размера по методу динамического рассеяния света «Zetasizer Nano ZSP», электронный микроскоп ПЭМ-125, пипетки автоматические одноканальные переменного объема Nichiryo Nichipet EX Plus от 100 µl до 1000 µl, бюретку для титрования Simax на 10 мл, пробирки биологические, конические колбы, стеклянную посуду.

Реактивы: калия йодид Merck B938043640, хлороформ Merck 1.02445, кислота уксусная Merck 1.00063, натрия тиосульфат Fluka 17876, крахмал Fluka 85642, ртути (II) йодид Merck A 263220236, натрия карбонат Sigma 223484.

После приготовления реактивов для установления титра поступали следующим образом: до 10 мл 0,033 М раствора калия бромата добавляли 40 мл воды Р, 10 мл раствора калия йодида Р 5 мл кислоты соляной Р1 и титровали приготовленным раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл раствора крахмала Р, который добавляли в конце титрования.

Приготовленный 0,1 М раствор натрия тиосульфата перед определением перекисного числа разводили в 10 раз.

Методика определения перекисного числа. Около 5,00 г (точная навеска) опытных образцов помещали в коническую колбу с притертой стеклянной пробкой вместимостью 250 мл, добавляли 30 мл смеси: хлороформ Р – кислота уксусная ледяная Р (2 : 3). Колбу интенсивно встряхивали до полного растворения. Добавляли 0,5 мл насыщенного раствора калия йодида Р, интенсивно перемешивали в течение 1 мин и добавляли 30 мл воды Р.

Полученный раствор титровали 0,01 М раствором натрия тиосульфата, медленно добавляя титрант при непрерывном перемешивании почти до полного исчезновения желтой окраски. Затем добавили 5 мл раствора крахмала Р и продолжали титровать, интенсивно перемешивая до светло-желтого цвета.

Параллельно проводили контрольный опыт. Объем 0,01 М раствора натрия тиосульфата, израсходованный на титрование в контрольном опыте, не превышал 0,1 мл.

Перекисное число рассчитывали по формуле:

$$I_p = \frac{(n_1 - n_2) \cdot 10}{m}, \quad (1)$$

где: n_1 – объем 0,01 М раствора натрия тиосульфата, израсходованный на титрование испытуемой вещества, мл; n_2 – объем 0,01 М раствора натрия тиосульфата, израсходованный на титрование в контрольном опыте, мл; m – масса навески вещества, г.

Методика определения размера липосом методом динамического рассеяния света. Размер определялся с помощью прибора Zetasizer Nano ZSP. Раствор препарата (1 : 20) объемом 1 мл помещал-

ся в кювету и облучался гелий-неоновым лазером с длиной излучения 633 нм. Прибор регистрирует динамику затухания рассеянного света раствором препарата. Для обработки экспериментальных данных используется метод фотонной корреляционной спектроскопии – метод кумулятивного анализа.

Методика определения размера липосом с помощью электронной микроскопии. Для предотвращения разрушения липосом под действием электронного луча микроскопа они были осаждены из раствора на специальную подложку и охлаждены жидким азотом. После этого был сделан скол, который исследовался с помощью электронного просвечивающего микроскопа. Для предотвращения разогрева замороженного скола липосомального препарата использовалось невысокое ускоряющее напряжение микроскопа 80 кэВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании методом тонкослойной хроматографии дифосфатидилглицерина и фосфатидилхолина (при сравнении со стандартными образцами липидов: фосфатидилхолин (R_f 0,31 ± 0,03), дифосфатидилглицерин (R_f 0,81 ± 0,02), фосфатидилэтаноламин (R_f 0,56 ± 0,03), лизофосфатидилхолин (R_f 0,14 ± 0,02), сфингомиелин (R_f 0,19 ± 0,02), фосфатидилсерин (R_f 0,24 ± 0,02)) были идентифицированы липиды и определены их качественный и количественный состав: фосфатидилхолин: основное вещество – 95-97,4 % (R_f 0,3 ± 0,03), фосфатидилэтаноламин – 0,6-1,0 % (R_f 0,58 ± 0,03), лизофосфатидилхолин – 1,2-1,5 % (R_f 0,12 ± 0,03), сфингомиелин – 1,2-1,43 % (R_f 0,18 ± 0,02); дифосфатидилглицерин: основное вещество 92,0-94,3 % (R_f 0,78 ± 0,02), фосфатидилхолин 2,7-4,0 % (R_f 0,3 ± 0,02), сфингомиелин (R_f 0,18 ± 0,02) и фосфатидилсерин (R_f 0,24 ± 0,02), суммарное количество которых составляло 2,2-3,0 % [6].

Индекс окисленности для фосфатидилхолина составлял не более 0,3, для дифосфатидилглицерина – не более 0,8. Таким образом, полученные данные подтвердили, что субстанции, которые использовались, есть высокоочищенными и минимально окисленными за двойными связями в жирных кислотах [2].

Исследование готовых липосомальных препаратов методом ТСХ позволило определить фосфолипидный состав препаратов. Учитывая то, что в процессе получения липосом может происходить окисление липидов и увеличение количества лизофосфатидилхолина, было проведено изучение этих параметров. Полученные результаты показали, что в составе липосом оказываются фосфатидилхолин, дифосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин. Количество лизофосфатидилхолина в различных образцах изменялась от 1,33 % до 1,61 % (от содержания фосфатидилхолина), что свидетельствует о стабильности фосфатидилхолина в процессе получения липосом.

Таблица 1

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ЧИСЛА В ОПЫТНЫХ ОБРАЗЦАХ
LIPOID S 100 СЕРИЯ 790629-10 И LIPOID E80 С. 510330-2133440-01**

Образец	Навеска, г	Объем 0,01 М натрия тиосульфата, мл	Найденное значение перекисного числа	Требования спецификации
Lipoid S 100	4,99	0,1	0	< 3
Lipoid S 100 II	5,02	0,1	0	
Lipoid E80	4,26	0,1	0	< 3
Lipoid E80 II	5,02	0,1	0	

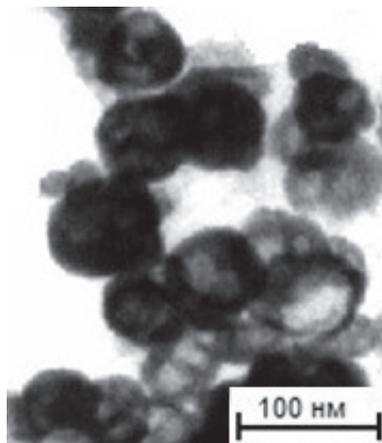


Рис. 1. Электронные фото липосом, полученные из Lipoid S 100.

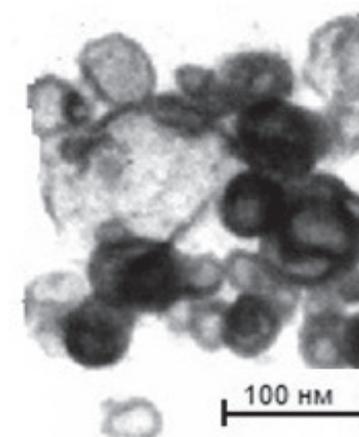


Рис. 2. Электронные фото липосом, полученные из Lipoid E 80.

Результаты определения перекисного числа приведены в табл. 1. Эти данные свидетельствуют о том, что перекисное число в опытных образцах не превышает значения, приведенные в сертификатах.

Индекс окисления липидов липосом при проведении технологического процесса не изменился по сравнению с исходной липидной смесью и составил 0,36 (Lipoid S 100) и 0,42 (Lipoid E80).

Структура и размеры полученных липосом были подтверждены с помощью методов ПЭМ и ДРС. На рис. 1 и 2 представлены электронные фото липосом, полученных с Lipoid S 100 серия 790629-10 и Lipoid E80. Видно, что липосомы имеют форму, близкую к сферической, средние размеры которых указаны в табл. 2. Темные контуры липосом вызваны наложением нескольких слоев липосом при формировании скола образца.

Учитывая сложную, длительную, дорогую и трудновоспроизводимую пробоподготовку образцов липосом для ПЭМ нами было проведено параллельное определение размера с помощью динамического рассеяния света. Метод ДРС является быстрым, дешевым, хорошо воспроизводимым. Результаты представлены в табл. 2.

Размеры липосом, полученные с помощью электронной микроскопии, коррелируют с размерами липосом, полученных с помощью метода динамического рассеяния света. Размеры липосом, определенные методом ДРС, несколько больше (5-7 %) размеров

Таблица 2

СРЕДНИЙ РАЗМЕР ЛИПОСОМ

Название метода	Средний размер липосом, нм	
	Lipoid S 100	Lipoid E 80
Просвечивающая электронная микроскопия	42	43
Динамическое рассеяние света	44	44

липосом, определенных методом ПЭМ. Такое расхождение является типичным и объясняется тем, что при использовании ДРС измеряется гидродинамический радиус частицы, всегда является большим от реального. Размеры липосом, полученных из различного сырья, практически не отличаются.

ВЫВОДЫ

1. Определены аналитические методы, которые являются специфическими для изучения физико-химических свойств липосом. К этим методам относятся тонкослойная хроматография, динамическое рассеяние света, электронная микроскопия, определение индекса окисления липидов и перекисного числа.
2. Эти методы позволяют определить и оценить критические параметры технологии получения липосомальных препаратов.

3. Важным критерием стабильности липосомальных препаратов является образование примесей.
4. Методы ТСХ, определение индекса окисления липидов и перекисного числа позволяют количественно определить содержание примесей при производстве и процессе хранения препаратов.
5. Методы ДРС и ТЭМ позволяют визуализировать процесс получения липосомальных препаратов и судить о физических процессах, происходящих при образовании липосом.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ
ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ**

1. Борщевский Г. И. Стандартизация липосомальных лекарственных средств / Г. И. Борщевский, Е. К. Товмасын, Ю. М. Краснопольский, А. И. Гризодуб // Фармаком. – 2013. – № 2. – С. 5-11.
2. Борщевский Г. И. Физико-химическое обоснование способа получения многокомпонентного липосомального препарата / Г. И. Борщевский, Т. Г. Ярных // Вісник фармації. – 2013. – № 3 (75). – С. 5-7.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
4. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: бионанотехнология в фармации и медицине / Ю. М. Краснопольский, А. С. Дудниченко, В. И. Швец. – Х.: ИЦ НТУ «ХПИ». – 2011. – 227 с.
5. Лепарская Н. Л. Липосомы, содержащие дексаметазон: получение, характеристика и использование в офтальмологии / Н. Л. Лепарская, Г. М. Соркоумова, Ю. В. Сычова // Вестник МИТХТ. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 37-42.
6. Шахмаев А. Е. Исследование влияния технологических параметров на свойства липосомальных наночастиц / А. Е. Шахмаев, Д. С. Бида, И. В. Волчик, Ю. М. Краснопольский // Фармаком. – 2012. – № 1/2. – С. 82-87.

УДК 615.458:615.072**Г. І. Борщевський, І. Б. Янчук, Т. Г. Ярних****ВИВЧЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ**

Представлені результати визначення аналітичних методів, які є специфічними для вивчення фізико-хімічних властивостей ліпосом. До цих методів належать тонкошарова хроматографія, динамічне розсіювання світла, електронна мікроскопія, визначення індексу окиснення ліпідів і перекисного числа. Так, методи ТШХ, визначення індексу окиснення ліпідів і перекисного числа дозволяють кількісно визначити вміст домішок при виробництві і зберіганні препаратів. Методи ДРС і TEM дозволяють візуалізувати процес отримання ліпосомальних препаратів і судити про фізичні процеси, що відбуваються при утворенні ліпосом.

Ключові слова: ліпосомальні препарати; фізико-хімічні властивості; аналітичні методи

UDC 615.458:615.072**G. I. Borshchevskiy, I. B. Yanchuk, T. G. Yarnykh****THE STUDY OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF LIPOSOMAL DRUGS**

The article presents the results of determination of the analytic methods that are specific to the study of the physical and chemical properties of the liposome. These methods include thin-layer chromatography, dynamic light scattering, electron microscopy, determination of the index of lipid peroxidation and peroxide numbers. Thus, TLC methods, the definition of an index of lipid peroxidation and the peroxide number allows to quantify the content of impurities in the production process and at storage of drugs. DRS and TEM techniques allow visualizing the process of obtaining liposomal drugs and judge the physical processes occurring in the formation of liposomes.

Key words: liposomal drugs; physical and chemical properties; analytic methods

Адреса для листування:
м. Київ, вул. Фрунзе, 63.
ПАО «Фармак»

Надійшла до редакції 13.10.2015 р.