

УДК 616-092:620.3.

## РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ НАНОСЕРЕБРА

*Губин Ю. И., Шутеева Т. А.*

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

E-mail: [x123@ua.fm](mailto:x123@ua.fm)

**Аннотация.** Разработана методика получения липосомальной формы наносеребра, проведены исследования влияния модификаторов поверхности на размер частиц и стабильность липосомальной системы. Установлены микрометрические параметры липосомальной формы наносеребра и определены оптимальные условия ее получения. Проведена стандартизация 3-х экспериментальных серий по показателю размера частиц с использованием метода лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС).

**Ключевые слова.** Липосомы, наночастицы, липосомальное серебро, наносеребро, стабильность наночастиц.

### **Постановка проблемы.**

Увеличение биодоступности и эффективности биологически активного вещества возможно достичь как за счет его химической модификации, так и за счет создания транспортных систем доставки молекул в организме [1]

Применение наноконъюгатов липидов и наночастиц металлов дает широкие возможности для создания новых лекарственных средств на основе хорошо изученных активных субстанций. Использование липосомальных систем, как регуляторов и модификаторов биофармацевтических свойств фармацевтических субстанций, позволяет значительно увеличить эффективность и снизить токсичность этих веществ.

### **Анализ последних исследований и публикаций.**

Появление исследований в области наноразмерных частиц связано с концепцией использования малоразмерных систем для доставки лекарств. Это сферические микро и наночастицы: липосомы, мицеллы, дендромеры и другие, которые были открыты в 1985 году Гарри Крото и Ричардом Смелли при экспериментировании с лазерным испарением графита.

Применение систем направленного транспорта дает возможность повысить специфическую направленность терапии и снизить ее побочные эффекты. Целевое перенесение токсичных веществ в ткани обеспечивает их максимальную терапевтическую эффективность и минимизацию повреждения здоровых клеток.

Повышение биодоступности, снижения токсичности и увеличения эффективности активных веществ может быть достигнуто путем выбора для биологически активных веществ (БАВ) липосомальных лекарственных форм. Это требует разработки усовершенствованных технологий направленной инкапсуляции лекарственных веществ в липосомальные формы.

### **Выделение не решенных ранее частиц общей проблемы**

Серебро трудно использовать в металлическом виде в виду его практической нерастворимости в воде. Разработанная нами липосомальная форма наносеребра растворима в воде и имеет перспективу как инъекционная форма. Вместе с тем серебро в липосомальной форме позволяет рассматривать его не только как средство для наружного использования, но и как инъекционные и аэрозольные препараты.

Разработка липосомальных лекарственных форм, как и лекарственных форм с использованием других супрамолекулярных комплексов, требуют новых подходов при определении показателей качества. Одним из главных параметров качества, которое подлежит стандартизации, есть размер частиц.

**Формулировка целей.**

Целью этой работы стала разработка и стандартизация метода получения липосомальной формы наносеребра, а также исследование влияния модификаторов поверхности на размер частиц, стабильность липосомальной системы, установления микрометрических параметров липосомальной формы наносеребра и определения оптимальных условий ее получения.

**Изложение основного материала исследования.**

В качестве материала для создания липосомальной формы наносеребра использовали лецитин Lipoid - 100 с показателями качества, которые приведены в таблице 1, эти показатели качества соответствуют требованиям USP 42–NF 37 [2].

Таблица 1 - Показатели качества лецитина Lipoid - 100

№ п/п	Параметр	Значение параметра	Результат анализа
	Растворимость	растворим в хлороформе и эфире, практически не растворим в ацетоне и воде	отвечает
	Идентификация	цветная реакция с ванилином	отвечает
	Кислотное число	не больше 20	15 %
	Общий фосфор	не менее 3,5 %	3,55 %
	Вещества нерастворимые в гексане	не больше 0,3 %	0,2 %
	Вещества нерастворимые в ацетоне	не менее 50 %	97,7 %
	Тяжелые металлы	не больше 20 ppm	не больше 20 ppm
	Потеря в массе при высушивании	не больше 7,0 %	2,03 %

Серебро было получено в виде комплекса с ПВП методом лучевого выпаривания-конденсации. Содержимое основного вещества - 0,5 %.

Количественное содержание серебра в субстанции определяли методом предварительной минерализации серной кислотой, растворяли остаток в азотной кислоте, переносили в пробирку водой. Нейтрализовывали до pH 7,0 с помощью КОН.

Далее обрабатывали реактивом Несслера, доводили до метки водой (50 мл) и перемешивали.

Мультиламеллярные липосомы с наносеребром были приготовлены методом гидратации тонкой пленки. Размер частиц определяли методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Данный метод позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа характерного времени флуктуаций интенсивности рассеянного света. Дальше, из коэффициента диффузии по уравнению Эйнштейна рассчитывается диаметр частиц.

1 стадия. Получение липидной пленки. Смесь липидов растворяли в органическом растворителе (хлороформе или метаноле) в круглодонной колбе на 500 мл, к раствору добавляли комплекс наносеребра из ПВП (5% относительно количества фосфолипида). Растворитель удаляли на роторном испарителе при 25°- 30°C и остаточному давлению 20 мм рт. ст. так, чтобы получить тонкую пленку липидов на стенке колбы (возможно добавление стеклянных шариков для увеличения площади поверхности). Дальше колба выдерживалась еще 1-2 часа под вакуумом ради удаления окончательного растворителя.

2 стадия. Гидратация тонкой липидной пленки. Тонкая липидная пленка на стенках

колбы была обработана 0,9 % раствором натрия хлорида [3]. Гидратации липидной пленки была проведена при температуре  $60 \pm 2^\circ\text{C}$ . При таких условиях липидная пленка более текуча, что позволяет получить мультиламелярные липосомы меньшего размера, которые более пригодные для дальнейшей обработки ультразвуком. Дисперсию выдерживали при комнатной температуре на протяжении 2-3 часов, чтобы позволить полностью набухнуть липидной пленке, получить везикулярную дисперсную систему и привести ее к равновесию. Далее раствор обрабатывали ультразвуком при температуре  $60^\circ\text{C}$  в течение 5 часов. При такой температуре мембраны мультислоевых липосом находятся в редко-кристаллическом состоянии, они упруги и мягки. Обработку ультразвуком проводили на ультразвуковой бане УЗВ-1.3 ТТА (мощность генератора 50 Вт, рабочая частота 35 кГц). Получили 0,25 % раствор мультиламелярных липосом в изотоническом растворе с концентрацией наносеребра 0,0125 %.

Далее раствор разделили на две части. Одну часть оставили для исследований (не стабилизированные липосомы), а в другой липосомы стабилизировали раствором ТВИН-80 в количестве 5 % от массы лецитина (0,025 г ТВИН-80 в 0,25 мл воды). После стабилизации раствор дополнительно обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин.

Определение микрометрических характеристик полученных липосомальных растворов проводили методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС).

Липосомальные системы, что получено, были исследованы на предмет размера частиц, распределения частиц по размеру по объему и численности, стойкость липосом относительно содержания включенного вещества. Мультиламелярные липосомы имели размер в диапазоне 20-500 нм.

Оценка пригодности системы для измерения методом ЛКС проводилась на приборе Zetasizer Nano ZS по трем показателям: средний диаметр или ( $Z$  - Average diameter), индекс полидисперсности (PdI) и значения корреляционной функции в момент времени  $t=0$  (Intercept). Эти величины являются коэффициентами в уравнении автокорреляционной функции. Вывод о пригодности системы измерения делается автоматически прибором на основе анализа значений указанных трех показателей.

Полученный образец липосом без стабилизатора характеризовался следующими показателями  $Z$  - average = 115,4 нм; PdI=0,35 и Intercept=0,96, которые свидетельствуют о пригодности образца для измерения. При применении метода обработки результата с высоким разрешением получили бимодальное распределение в диапазоне от 24 до 295 нм (по диаметру частиц). Кривая распределения не стабилизированных липосом по интенсивности автокорреляционной функции показывает присутствие двух размерных фракций липосом с диаметром частиц около 35 нм и 125 нм и шириной распределению 5 нм и 37 нм соответственно.

Представления результата измерения в виде распределения частиц не стабилизированных липосом по объему свидетельствуют о существенном преобладании фракции липосом с диаметром 35 нм по объему, судьба которой представляет 73 %. Соответственно объемная судьба фракции липосом с диаметром около 125 нм представляет 27 %.

Содержание липосомальной фракции с диаметром частиц около 35 нм при распределении по количеству составляет 99 %.

Полученные результаты распределения частиц не стабилизированных липосом по объему и количеству дают возможность допустить, что фракция с диаметром 125 нм является результатом агломерации липосом. Агломераты присутствующие в незначительном количестве, однако занимают достаточно существенную судьбу по объему.

Проверка пригодности образца липосом со стабилизатором для измерения вышеупомянутым методом дало позитивный результат (пригодность образца характеризуется показателями  $Z$  - average=43 нм; PdI=0,30 и Intercept=0,96).

При применении метода обработки результата с высоким разделением получили бимодальное распределение в диапазоне от 14 до 100 нм (по диаметру). Кривая распределения стабилизированных липосом по интенсивности автокорреляционной функции показывает присутствие двух размерных фракций с диаметром около 16 нм и 60 нм и шириной распределению 10 нм и 38 нм.

Представления результата измерения в виде распределения частиц стабилизированных липосом по объему свидетельствуют о существенном преобладании фракции липосом с диаметром около 15 нм по объему, судьба которой представляет 90 %. Соответственно объемная судьба фракции липосом с диаметром около 60 нм представляет 10 %.

Кривая распределения стабилизированных липосом по количеству частиц с фракцией липосом с диаметром около 16 нм при распределении по количества представляет 99 %.

Сравнение результатов распределения частиц стабилизированных и не стабилизированных липосом по объему и количеству свидетельствует об уменьшении процессу агломерации при применении стабилизатора. Стабильность липосом на предмет содержания в них наносеребра изучалась в течение 5 суток при хранении при температуре 4-8°C. В основу методики определения невключенного вещества была положенная методика с использованием высокоэффективной гелевой проникающей хроматографии (ВЭГПХ). Липосомы, которые являются надмолекулярными структурами, выходят в неудерживаемом объеме, а невключенное вещество задерживается в порах геля, чем и достигается разделение. Концентрацию невключенного вещества ( $X_i$ ) вычисляли из полученных для испытанного раствора хроматограм с помощью калибровочного графика зависимости аналитического сигнала от концентрации.

Таблица 2. Концентрации невключенного активного вещества для липосомальных форм наносеребра, метрологические характеристики полученных результатов.

№	Образец/серия	$X_i$	s	RSD, %	$X_i$ , через 5 суток	s	RSD, %
Не стабилизированные липосомы							
1	№ 1	0,012	0,00016	1,33	0,015	0,00022	1,47
2	№ 2	0,011	0,00017	1,55	0,018	0,00018	1,00
3	№ 3	0,012	0,00025	2,08	0,018	0,00026	1,44
Стабилизированные липосомы							
4	№ 1	0,005	0,00010	2,01	0,005	0,00012	2,40
5	№ 2	0,004	0,00009	2,25	0,005	0,00015	3,00
6	№ 3	0,006	0,00014	2,33	0,008	0,00014	1,75

Примечания:  $X_i$  - значение концентрации невключенного активного вещества, мг/мл; s - дисперсия; RSD - относительное стандартное отклонение, %.

Стабильность липосомальной системы определяли как функцию концентрации невключенного активного вещества. Ее определение позволяет проводить оценку стабильности системы и действие стабилизаторов. Данные подтверждают ожидаемую тенденцию уменьшения размеру липосомальных частиц при добавлении модификатору (Твин 80) и большую стабильность такой системы [4]

#### Выводы

Разработана стандартизированная методика получения липосомальной формы наносеребра и определено влияние модификаторов на размер частиц и их стабильность. Определено уменьшение размеру липосом и увеличения стабильности липосомальной системы, которая

содержит наносеребро при условии добавки в систему 5 % Твина 80 относительно содержащего фосфолипидов.

Литература:

1. Evjena T.J. Sonosensitive dioleoylphosphatidylethanolamine-containing liposomes with prolonged blood circulation time of doxorubicin / T. J. Evjena, E. Hagtvets, E. A. Nilssena et. al. // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2011. – Vol. 43. – P. 99-108.
2. The United State Pharmacopoeia. 42 Ed. – The National Formulary 37; Suppl. 1. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2019. – P. 1266
3. Стадніченко А. В. Отримання ліпосомальних форм цитостатиків за технологією «хімічного градієнту» / А. В. Стадніченко, Ю. М. Краснопольський, Ю. І. Губін, С. М. Коваленко // Вісник фармації. – 2010. №2 (62). – С.6-9
4. Note for guidance on impurities testing: impurities in new drug substances. Technical Coordination. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. London, 2003. – 15 p.

Literature:

1. Evjena T.J. Sonosensitive dioleoylphosphatidylethanolamine-containing liposomes with prolonged blood circulation time of doxorubicin / T. J. Evjena, E. Hagtvets, E. A. Nilssena et. al. // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2011. – Vol. 43. – P. 99-108.
2. The United State Pharmacopoeia. 42 Ed. – The National Formulary 37; Suppl. 1. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2019. – P. 1266
3. Stadnichenko A. V. Otrimannya liposomal'nikh form tsitostatikiv za tekhnologiyu «khimichnogo gradientu» / A. V. Stadnichenko, Yu. M. Krasnopol's'kii, Yu. I. Gubin, S. M. Kovalenko // Visnik farmatsii. – 2010. №2 (62). – p. 6-9
4. Note for guidance on impurities testing: impurities in new drug substances. Technical Coordination. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. London, 2003. – 15 p.

**АНОТАЦІЯ.**

УДК 616-092:620.3.

**РОЗРОБКА ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ НАНОСРІБЛА**

*Губін Ю. І., Шитєєва Т. О.*

Розроблено методику отримання ліпосомальної форми наносрібла, проведені дослідження впливу модифікаторів поверхні на розмір часток і стабільність ліпосомальної системи. Встановлені мікрометричні параметри ліпосомальної форми наносрібла і визначені оптимальні умови її отримання. Проведена стандартизація 3-х експериментальних серій за показником розміру часток з використанням методу лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС).

Ключові слова. Ліпосоми, наночастки, ліпосомальне срібло, наносрібло, стабільність наночасток.

**RESUME.**

UDC 616-092:620.3.

**DESIGN AND STANDARDIZATION OF THE PROCESS OF MAKING LIPOSOMAL FORM OF NANOSILVER**

*Gubin I.I., Shiteeva T. O.*

Methodology of making of liposom form of nanosilver is worked out, conducted researches of influence of modifiers of surface on the size of parts and stability of the liposom system. Set micrometrical parameters of liposom form of nanosilver and certain optimal terms of her receipt. The conducted standardization of 3th experimental cerouss is on a size of parts attribute with the use of method of laser cross-correlation spectroscopy (CCS).

Keywords. Liposome, nanoparticle, liposomal silver, nanosilver, stability of nanoparticles.