УДК 615.45:616-03:54.084

Ю. І. Губін, Л. В. Євсєєва, С. Ю. Повстенко, О. І. Палійчук*

Національний фармацевтичний університет

**ТОВ «Новації»*

РОЗРОБКА ТА СТАНДАРТИЗАЦІЯ МЕТОДУ ОТРИМАННЯ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ ГІТОКСИГЕНІНУ

Розроблена методика отримання ліпосомальної форми карденоліду гітоксигеніну, проведені дослідження впливу модифікаторів поверхні на розмір частинок та стабільність ліпосомальної системи. Встановлені мікрометричні параметри ліпосомальної форми гітоксигеніну та визначені оптимальні умови її отримання. Проведена стандартизація 3-х дослідних серій за показником розмір частинок з використанням методу лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС).

Ключові слова: карденоліди; гітоксигенін; ліпосоми; фізико-хімічні параметри; розмір частинок; лазерна кореляційна спектроскопія

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Зменшення токсичності, збільшення біодоступності та ефективності біологічної молекули можна досягти як за рахунок її хімічної модифікації, так і за рахунок створення транспортних систем доставки молекули в організмі [6].

Застосування нанокон'югатів ліпідів, полімерних наночастинок дає широкі можливості для створення нових лікарських засобів на основі добре вивчених активних субстанцій. Використання ліпосомальних систем, як регуляторів і модифікаторів біофармацевтичних властивостей фармацевтичних субстанцій, дозволяє значно збільшити ефективність та знизити токсичність цих речовин.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Поява досліджень у сфері нанорозмірних частинок пов'язана з концепцією використання малорозмірних систем для доставки ліків. Це сферичні мікро — і наночастинки: ліпосоми, міцели, дендримери та ін., що були відкриті у 1985 році Гарі Крото і Річардом Смеллі в експериментах з лазерним випаровуванням графіту.

Застосування систем направленого транспорту дає можливість підвищити специфічну спрямованість терапії та знизити її побічні ефекти. Цілеспрямоване перенесення токсичних речовин у тканини забезпечує їх максимальну терапевтичну ефективність та мінімізацію пошкодження здорових клітин.

Підвищення біодоступності, зниження токсичності та збільшення ефективності активних речовин може бути досягнуто шляхом вибору для БАР ліпосомальних лікарських форм. Це потребує розробки удосконалених технологій направленої інкапсуляції лікарських речовин у ліпосомальні форми.

ВИДІЛЕННЯ НЕ ВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Гітоксигенін — добре відомий карденолід наперстянки, що не використовується в медичній практиці в парентеральній формі через його практичну нерозчинність у воді. Розроблена нами ліпосомальна форма гітоксигеніну розчинна у воді і має перспективу як ін'єкційна форма. Разом з тим зниження токсичності карденолідів у ліпосомальній формі дозволяє розглядати їх не тільки як кардіотонічні, але і як протипухлинні препарати [3, 5, 8].

Розробка ліпосомальних лікарських форм, як і лікарських форм з використанням інших супрамолекулярних комплексів, потребує нових підходів при визначенні показників якості. Одним з головних параметрів якості, що підлягає стандартизації, є розмір частинок.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою цієї роботи стала розробка і стандартизація методу отримання ліпосомальної форми гітоксигеніну, а також дослідження впливу мо-

© Ю. І. Губін, Л. В. Євсєєва, С. Ю. Повстенко, О. І. Палійчук, 2011

дифікаторів поверхні на розмір частинок, стабільність ліпосомальної системи, встановлення мікрометричних параметрів ліпосомальної форми гітоксигеніну та визначення оптимальних умов її отримання.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Як конструкційний матеріал для створення ліпосомальної форми гітоксигеніну використовували лецитин Lipoid-100 з показниками якості (табл. 1), які було визначено згідно з USP 32 NF27 [8].

Таблиця 1

ПОКАЗНИКИ ЯКОСТІ ЛЕЦИТИНУ LIPOID-100

Параметр	Значення параметра	Результат аналізу
Розчинність	Розчинний у хлороформі та ефірі, практично не розчинний в ацетоні та воді	Відповідає
Ідентифікація	Кольорова реакція з ваніліном	Відповідає
Кислотне число	Не більше 20	15 %
Загальний фосфор	Не менше 3,5 %	3,55 %
Не розчинні в гексані	Не більше 0,3 %	0,2 %
Не розчинні в ацетоні	Не менше 50 %	97,7 %
Важкі метали	Не більше 20 ppm	Не більше 20 ppm
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 7,0 %	2,03 %

Гітоксигенін було виділено з наперстянки шерстистої [1]. Вміст основної речовини — 98 %. Мультиламелярні ліпосоми з гітоксигеніном були приготовлені методом гідратації тонкої плівки. Розмір частинок визначали методом лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС) на приладі Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобританія) на базі ТОВ «НОВАЦІЇ». Цей метод дозволяє визначити коефіцієнт дифузії дисперсних частинок у рідині шляхом аналізу характерного часу флуктуацій інтенсивності розсіяного світла. Далі з коефіцієнта дифузії за рівнянням Ейнштейна обчислюється діаметр частинок.

1 стадія. Отримання ліпідної плівки. Суміш ліпідів розчиняли в органічному розчиннику (хлороформі або метанолі) у круглодоній колбі на 500 мл, до розчину додавали гітоксигенін (5% відносно кількості фосфоліпіду). Розчинник видаляли на роторному випарнику при 25-30°С і залишковому тиску 20 мм рт. ст. так, щоб отримати тонку плівку ліпідів на стінці колби (можливе додавання скляних кульок для збільшення площі поверхні). Далі колба витримувалась ще 1-2 години під вакуумом для видалення остаточного розчинника.

2 стадія. Гідратація тонкої ліпідної плівки. Тонка ліпідна плівка на стінках колби була оброблена 0,9 % розчином натрію хлориду [2]. Гідратація ліпідної плівки була проведена при температурі 60±2°С. За таких умов плівка більш плинна, що дозволяє отримати мультиламелярні ліпосоми меншого розміру, які більш придатні для подальшої обробки ультразвуком. Дисперсію витримували при кімнатній температурі впродовж 2-3 год., щоб дати повністю набухнути ліпідній плівці, отримати везикулярну дисперсну систему та привести її до рівноваги. Далі розчин обробляли ультразвуком при температурі 60°С на протязі 5 год. При такій температурі мембрани мультишарових ліпосом знаходяться в рідкокристалічному стані, вони пружні та м'які. Обробку ультразвуком проводили на ультразвуковій бані УЗВ-1.3 ТТА (потужність генератора 50 вт, робоча частота 35 кГц). Отримали 0,25 % розчин мультиламелярних ліпосом в ізотонічному розчині з концентрацією гітоксигеніну 0,0125 %.

Далі розчин розділили на дві частини. Одну частину залишили для досліджень (нестабілізовані ліпосоми), а в іншій ліпосоми стабілізували розчином ТВІН-80 у кількості 5 % від маси лецитину (0,025 г Твін-80 у 0,25 мл води). Після стабілізації розчин додатково обробляли ультразвуком на протязі 20 хв.

Визначення мікрометричних характеристик отриманих ліпосомальних розчинів проводили методом лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС).

Отримані ліпосомні системи було досліджено щодо розміру частинок, розподілу частинок за розміром по об'єму та кількості, стійкість ліпосом щодо утримання внесеної речовини. Мультиламелярні ліпосоми мали розмір у діапазоні 20-500 нм з розподілом, наведеним на рис. 1

Оцінка придатності системи для вимірювання методом ЛКС проводилась на приладі Zetasizer Nano ZS за трьома показниками: середній діаметр (Z-Average diameter), індекс полідисперсності (PdI) і значення кореляційної функції в момент часу t = 0 (Intercept). Ці величини є коефіцієнтами в рівнянні автокореляційної функції. Висновок про придатність системи вимірювання робиться автоматично приладом на основі аналізу значень цих трьох показників.

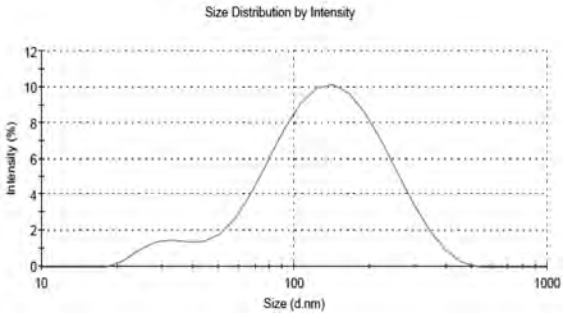

Рис. 1. *Розподіл нестабілізованих ліпосом за інтенсивністю сигналу*

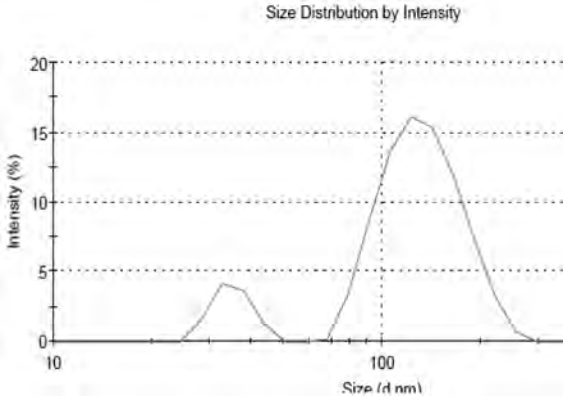

Рис. 2. *Розподіл нестабілізованих ліпосом за інтенсивністю автокореляційної функції*

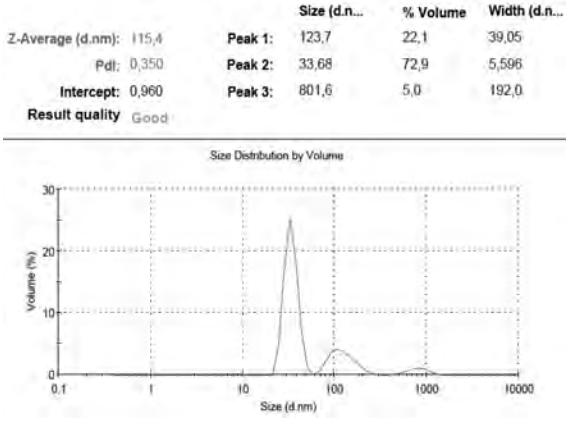

Рис. 3. *Розподіл нестабілізованих ліпосом за об'ємом частинок*

Отриманий зразок ліпосом без стабілізатора характеризувався такими показниками: Z-average = 115,4 нм; PdI = 0,35 та Intercept = 0,96, які свідчать про придатність зразка для вимірювання. При застосуванні методу обробки результату з високим розділенням отримали бімодальний розподіл у діапазоні від 24 до 295 нм (за діаметром частинок). На рис. 2 наведена крива розподілу нестабілізованих ліпосом за інтенсивністю автокореляційної функції. Спостерігається присутність двох розмірних фракцій ліпосом з діаметром частинок близько 35 нм і 125 нм та шириною розподілу 5 нм та 37 нм відповідно.

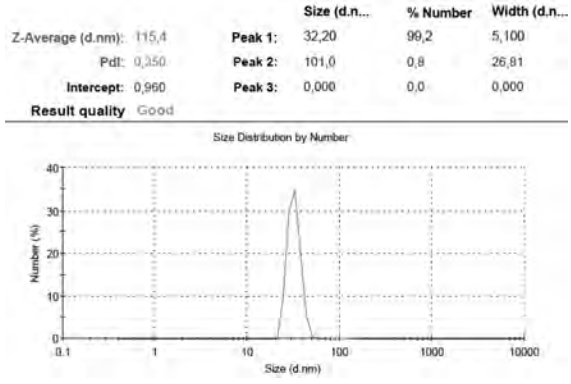

Рис. 4. *Розподіл нестабілізованих ліпосом за кількістю частинок*

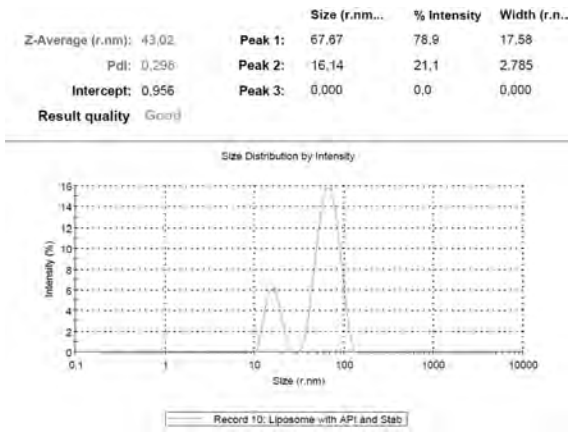

Рис. 5. *Розподіл стабілізованих ліпосом за інтенсивністю сигналу*

Результати вимірювання у вигляді розподілу частинок нестабілізованих ліпосом за об'ємом (рис. 3) свідчать про суттєве переважання фракції ліпосом з діаметром 35 нм за об'ємом, частка якої становить 73 %. Відповідно об'ємна частка фракції ліпосом з діаметром близько 125 нм становить 27 %.

На рис. 4 наведена крива розподілу нестабілізованих ліпосом за кількістю частинок. Частка фракції ліпосом з діаметром близько 35 нм при розподіленні за кількістю становить 99 %.

Отримані результати розподілу частинок нестабілізованих ліпосом за об'ємом і кількістю дають можливість припустити, що фракція з діаметром 125 нм є результатом агломерації ліпосом. Агломерати присутні в незначній кількості, проте займають досить суттєву частку за об'ємом.

Перевірка придатності зразка ліпосом зі стабілізатором для вимірювання вищезгаданим методом дала позитивний результат (придат-

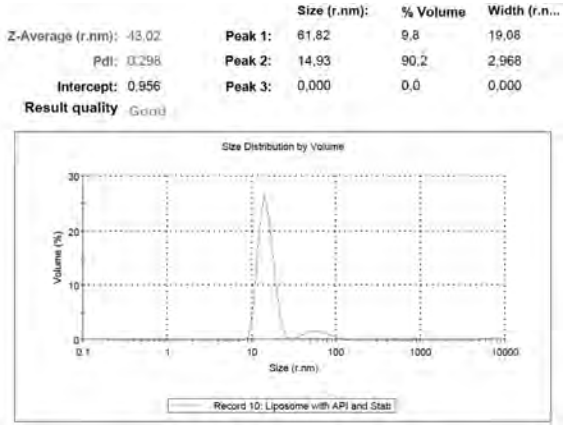

Рис. 6. *Розподіл стабілізованих ліпосом за об'ємом частинок*

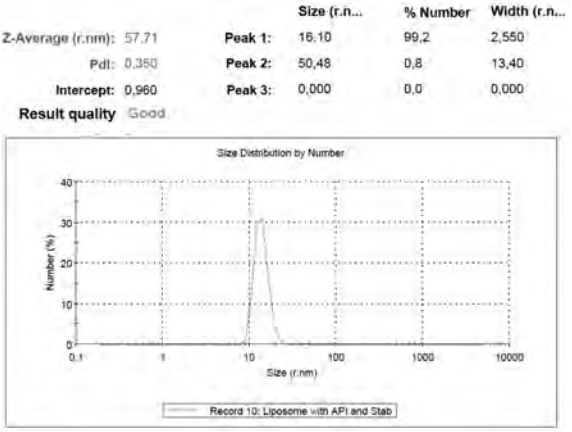

Рис. 7. *Розподіл стабілізованих ліпосом за кількістю частинок*

ність зразка характеризується показниками: Z-average = 43 нм, PdI = 0,30 та Intercept = 0,96).

При застосуванні методу обробки результату з високим розділенням отримали бімодальний розподіл у діапазоні від 14 до 100 нм (за діаметром). На рис. 5 наведена крива розподілу стабілізованих ліпосом за інтенсивністю автокореляційної функції. Спостерігається присутність двох розмірних фракцій з діаметром близько 16 нм і 60 нм та шириною розподілу 10 нм та 38 нм.

Результат вимірювання у вигляді розподілу частинок стабілізованих ліпосом за об'ємом (рис. 6) свідчить про суттєве переважання фракції ліпосом з діаметром близько 15 нм за об'ємом, частка якої становить 90 %. Відповідно об'ємна частка фракції ліпосом з діаметром близько 60 нм становить 10 %.

На рис. 7 наведена крива розподілу стабілізованих ліпосом за кількістю частинок. Частка фракції ліпосом з діаметром близько 16 нм при розподіленні за кількістю становить 99 %.

Порівняння результатів розподілу частинок стабілізованих і нестабілізованих ліпосом за об'ємом і кількістю свідчить про зменшення процесу агломерації при застосуванні стабілізатора. Стабільність ліпосом щодо утримання в них гітоксигеніну вивчалася при зберіганні протягом 5 діб при температурі 4–8°С. В основу методики визначення невнесеної речовини була покладена методика з використанням високоефективної гель-проникної хроматографії (ВЕГПХ). Ліпосоми, що є надмолекулярними структурами, виходять в неутримуваному об'ємі, а не внесена речовина утримується в порах гелю, чим і досягається розділення. Концентрацію не внесеної речовини (Xi) обчислювали з отриманих для випробовуваного розчину хроматограм за допомогою калібрувального графіка залежності аналітичного сигналу від концентрації.

Таблиця 2

КОНЦЕНТРАЦІЇ НЕ ВНЕСЕНОЇ АКТИВНОЇ РЕЧОВИНИ ДЛЯ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ФОРМ ГІТОКСИГЕНІНУ, МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зразок / серія	Xi	s	RSD, %	Xi, через 5 діб	s	RSD, %
Нестабілізовані ліпосоми						
№ 1	0,012	0,00016	1,33	0,015	0,00022	1,47
№ 2	0,011	0,00017	1,55	0,018	0,00018	1,00
№ 3	0,012	0,00025	2,08	0,018	0,00026	1,44
Стабілізовані ліпосоми						
№ 1 стабілізовані	0,005	0,00010	2,01	0,005	0,00012	2,40
№ 2 стабілізовані	0,004	0,00009	2,25	0,005	0,00015	3,00
№ 3 стабілізовані	0,006	0,00014	2,33	0,008	0,00014	1,75

Примітка. Xi — значення концентрації не внесеної активної речовини, мг/мл; s — дисперсія; RSD — відносне стандартне відхилення, %.

Стабільність ліпосомальної системи визначали як функцію концентрації не внесеної активної речовини. ЇЇ визначення дозволяє проводити оцінку стабільності системи і дію стабілізаторів. Дані підтверджують очікувану тенденцію зменшення розміру ліпосомальних частинок при додаванні модифікатора (Твін-80) та більшу стабільність такої системи [4].

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

Розроблено стандартизовану методику отримання ліпосомальної форми гітоксигеніну та визначено вплив модифікаторів на розмір частинок та їх стабільність. Визначено зменшення розміру ліпосом та збільшення стабільності ліпосомальної системи, що містить гітоксигенін, за умови додавання до системи 5 % модифікатора (Твін-80) відносно вмісту фосфоліпідів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. А.с. 1363559 СССР, А61к 31/705. Способ очистки дигитоксина от гитоксина / И. Ю. Губин, И. Ф. Макаревич, С. Н. Нурахов и др. (СССР). — Заявка № 3932924; заявл. 22.07.1985; опубл. «Бюллетень изобретений», № 48, 1987. — С. 49.
2. Отримання ліпосомальних форм цитостатиків за технологією «хімічного градієнта» / А. В. Стадніченко, Ю. М. Краснопольський, Ю. І. Губін, С. М. Коваленко // Вісник фармації. — 2010. — № 2 (62). — С. 6–9.
3. Bailly C. Ready for a comeback of natural products in oncology / C. Bailly // Biochemical Pharmacology. — 2009. — Vol. 77. — P. 1447–1457.
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.
5. Preparation, therapeutic efficacy and intratumoral localization of targeted daunorubicin liposomes conjugating folate-PEG-CHEMS / S. Xionga, Bo Yub, Jun Wuc et al. // Biomedicine & Pharmacotherapy. — 2011. — Vol. 65. — P. 2–8.
6. Sonosensitive dioleoylphosphatidylethanolamine-containing liposomes with prolonged blood circulation time of doxorubicin / T. J. Evjena, E. Hagtvetc, E. A. Nilssena et al. // European Journal of Pharmaceutical Sciences. — 2011. — Vol. 43. — P. 99–108.
7. The United State Pharmacopoeia. 32 Ed. — The National Formulary 27; Suppl. l. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2009. — P. 1266.
8. Wermuth C. G. Preparation of Water-Soluble Compounds by Covalent Attachment of Solubilizing Moieties / C. G. Wermuth // The Practice of Medicinal Chemistry. — 2008. — Vol. 3 — P. 767–785.

УДК 615.45:616-03:54.084

РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ГИТОКСИГЕНИНА

Ю. И. Губин, Л. В. Евсеева, С. Ю. Повстенко, О. И. Палийчук

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

Ключевые слова: карденолиды; гитоксигенин, липосомы; физико-химические параметры; размер частиц; лазерная корреляционная спектроскопия

UDC 615.45:616-03:54.084

ELABORATING AND STANDARDIZATION THE METHOD OF PREPARATION THE GITOXIGENIN LIPOSOMAL MEDICINAL FORM

Yu. I. Gubin, L. V. Evseeva, S. Yu. Povstenko, O. I. Paliichuk

Elaborated the method of preparation liposomal medicinal form of cardenolide gitoxigenin. It was studied the influence of the surface modifiers on size and stability of liposomal system. There also ware determined the optimal micrometric parameters of Gitoxigenin liposomal form and the optimal process of its preparation. Three experimental lots of the medication were standardized by method of laser correlation spectroscopy (LCS).

Key words: cardenolides; gitoxigenin; liposome; physical and chemical parameters; particle size; laser correlation spectroscopy

Адреса для листування:
61001, м. Харків , пл. Повстання, 17,
Кафедра якості, стандартизації та сертифікації ліків ІПКСФ НФаУ
Тел. (057) 731-92-76

Надійшла до редакції:
27.04.2011 р.