



УДК 615.014.22:543.421

## ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЛИПОСОМАЛЬНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНЫХ СРЕДСТВ

**Е.И. МОЛОХОВА**  
**Д.Е. ЛИПИН**  
**А.В. ИВАНОВ**

*Пермская государственная  
фармацевтическая академия*

*e-mail: profmol@nm.ru*

Исследовано 9 составов липосомальных композиций с целью выбора состава с наименьшим диаметром липосом. Многослойные липосомы получены способом гидратации тонкой липидной пленки. Гомогенизацию проводили с помощью ультразвука. Установлено, что к 30-й мин озвучивания, липосомы, ресуспендированные в фосфатном буферном растворе с pH=6,4, измельчаются до размеров 102 нм. Введение уплотнителей в состав бислоя липосом приводит к увеличению размеров везикул на 14-42%. В качестве альтернативного метода определения диаметра частиц нами предложено использовать метод фотоколориметрии. Показана корреляционная связь между диаметром липосом, измеренным на приборе «Zetasizer Nano ZS», и фотометрическим показателем дисперсности.

Ключевые слова: липосомы, размер частиц, фотометрический показатель дисперсности (ФПД).

**Введение.** Липосомы – коллоидные, везикулярные структуры, основой которых являются фосфолипидные бислои. Их диаметр может быть меньше 20 нм, но может достигать и нескольких мкм. Липосомы перспективны для применения в препаратах трансдермального действия, т. к. они обладают небольшими размерами, высокой тропностью к кератиноцитам, а также способностью увеличивать проникновение лекарств в глубокие слои кожи и инкапсулировать широкий круг веществ, как гидрофобного, так и гидрофильного характера [3, 4]. Важным показателем устойчивости данных систем является размер частиц. Известно, что с увеличением размера частиц седиментационная устойчивость гетерогенных систем снижается. Представляет интерес поиск инструментальных методов для определения данного показателя в липосомах.

**Цель** нашего исследования – разработать состав липосомальной композиции и выбрать показатели для стандартизации липосом.

**Материалы и методы.** В качестве структурообразующего компонента липосомальных структур использовали яичный лецитин («Биолек», г. Харьков), в роли уплотнителей – холестерол и β-ситостерин. Получение липосом проводили по следующей методике: раствор лецитина в смеси спирт этиловый–хлороформ в соотношении 1:9 выпаривали на роторном испарителе при температуре (44–46)°С до образования на внутренней стенке колбы тонкой липидной пленки. К содержимому прибавляли буферный раствор. Полученную липидную эмульсию перемешивали в течение одного часа. Образовавшиеся многослойные липосомы подвергали гомогенизации на установке «УЗВ-12» фирмы «Сапфир»: 7 циклов обработки липосомальной дисперсии ультразвуком по 5 минут с 15 минутными перерывами.

Диаметр фосфолипидных частиц определяли на приборе «Zetasizer Nano ZS» фирмы «Malvern» методом лазерного корреляционного светорассеяния под углом 170°. Для оценки диаметра липосом использовали фотометрический показатель дисперсности (ФПД), рекомендованный для определения размеров частиц в вакцинных препаратах [2]. Оптическую плотность суспензии фосфолипида измеряли на приборе КФК-2 при двух длинах волн: 400 и 540 нм.

Вычисление ФПД проводили по следующим формулам:

$$\text{ФПД} = \frac{1 - \frac{D_1}{D_2}}{K} \text{ где}$$

$K = \lg \frac{\lambda_2}{\lambda_1} = 0,1303$ ;  $\lambda_1$  – длина волны 400 нм;  $\lambda_2$  – длина волны 540 нм;  $D_1$  – оптическая плотность при 400 нм;  $D_2$  – оптическая плотность при 540 нм.

**Основные результаты.** В ходе исследования получены составы липосом, представленные в табл. 1. Во все составы введен яичный лецитин в количестве 100 мг, тонкая липидная пленка всех составов ресуспендировалась в 30 мл буферного раствора.



Таблица 1

## Состав и свойства липосом

№ состава	Холестерол, мг	$\beta$ -ситостерин, мг	pH буфера	Диаметр липосом к 30-й мин, нм
1	—	—	6,4	102,2
2	20	—	6,4	146,9
3	—	5	6,4	116,7
4	20	—	4,5	397,0
5	—	—	4,5	407,0
6	—	5	4,5	523,7
7	—	—	7,25	—*
8	20	—	7,25	305,5
9	—	5	7,25	181,6

Примечание: \* — диаметр превышает 5 мкм.

Интенсивнее всего измельчение везикул происходит во время первого цикла гомогенизации. Если до озвучивания средний диаметр липосом для всех составов составлял свыше 1,5 мкм, то уже к 5 мин размер частиц в составах липосом, ресуспендированных в фосфатном буфере, составил 200 нм. Размера частиц (1,5 мкм), приемлемого для определения на приборе «Zetasizer Nano ZS» для составов № 4–9, удалось достичь лишь к 30-ой минуте озвучивания, в составе № 7 липосомы после 7 циклов гомогенизации не уменьшили своих размеров ниже 5 мкм. Для этих составов не удалось отследить динамику уменьшения размеров везикул.

Из табл. 1 видно, что влияние уплотнителей на диаметр липосом зависит от pH среды. В составах с pH=6,4 добавление уплотнителей привело к увеличению диаметра липосом, в составах с pH=7,25, наоборот, к уменьшению. Липосомальные композиции в фосфатном буфере с pH=6,4 обладают наименьшим диаметром, поэтому для дальнейших исследований мы выбрали составы 1, 2 и 3.

Динамика изменения диаметра липосом составов № 1–3 в ходе озвучивания представлена на рис. 1. В составе № 2 диаметр липосом до начала озвучивания составлял 190 нм, в следующих 5 циклах липосомы составов № 1–3 постепенно измельчались, и к 30 мин диаметр липосом во всех составах достиг наименьшего значения. Последующее озвучивание приводит к небольшому увеличению диаметра.

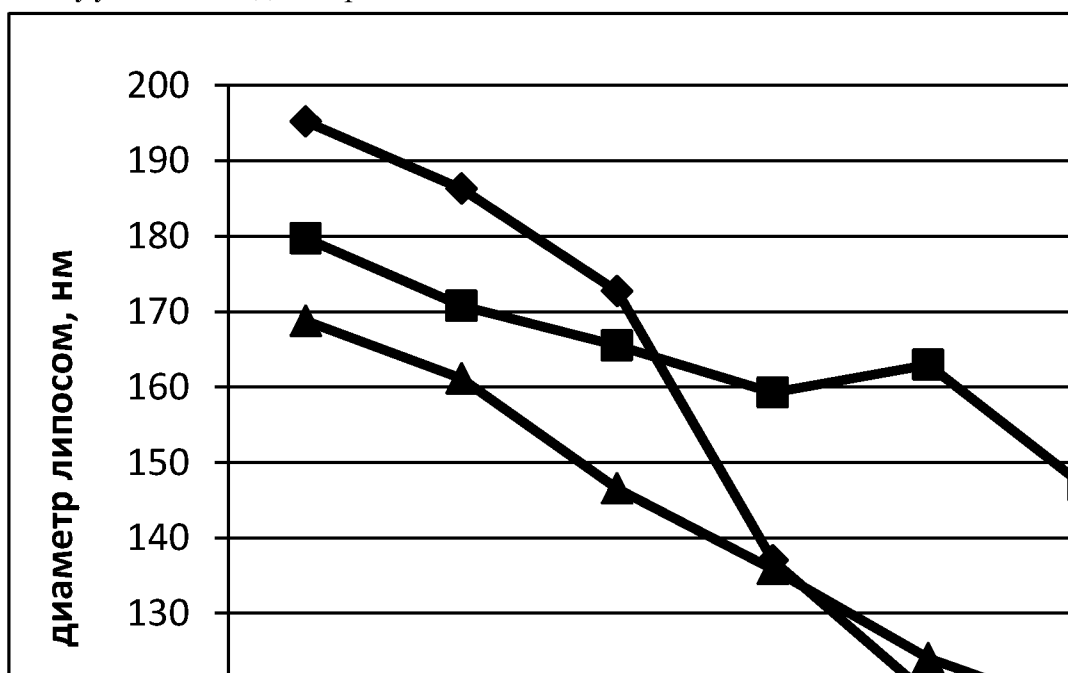


Рис. 1. Динамика диаметра липосом при их гомогенизации

Установлено, что по после 35 минут обработки ультразвуком дисперсии становились прозрачными, обладали хорошей смачивающей способностью, имели голубоватый оттенок, т. е. визуально отвечали критериям истинных липосомальных дисперсий [1].



Метрологические параметры составов 1–3 представлены в табл. 2.

Таблица 2

**Фотометрические показатели дисперсности составов в ходе процесса гомогенизации липосом**

Гомогенизация, мин.	Состав № 1		Состав № 2		Состав № 3	
	ФПД	Метрологические характеристики	ФПД	Метрологические характеристики	ФПД	Метрологические характеристики
0	0,38	$S^2 = 0,023$ ; $S = 0,152$ ; $\Delta x = 0,42$ ; $\epsilon = 112,23\%$	1,45	$S^2 = 0,016$ ; $S = 0,127$ ; $\Delta x = 0,35$ ; $\epsilon = 24,33\%$	0,44	$S^2 = 0,034$ ; $S = 0,185$ ; $\Delta x = 0,52$ ; $\epsilon = 116,10\%$
5	0,77	$S^2 = 0,046$ ; $S = 0,214$ ; $\Delta x = 0,59$ ; $\epsilon = 77,64\%$	1,6	$S^2 = 0,001$ ; $S = 0,027$ ; $\Delta x = 0,07$ ; $\epsilon = 4,68\%$	1,39	$S^2 = 0,005$ ; $S = 0,072$ ; $\Delta x = 0,20$ ; $\epsilon = 14,37\%$
10	1,21	$S^2 = 0,008$ ; $S = 0,092$ ; $\Delta x = 0,25$ ; $\epsilon = 20,99\%$	1,64	$S^2 = 0,001$ ; $S = 0,028$ ; $\Delta x = 0,08$ ; $\epsilon = 4,70\%$	1,62	$S^2 = 0,022$ ; $S = 0,147$ ; $\Delta x = 0,41$ ; $\epsilon = 25,26\%$
15	1,63	$S^2 = 0,025$ ; $S = 0,157$ ; $\Delta x = 0,44$ ; $\epsilon = 26,79\%$	1,68	$S^2 = 0,001$ ; $S = 0,031$ ; $\Delta x = 0,09$ ; $\epsilon = 5,15\%$	1,64	$S^2 = 0,014$ ; $S = 0,119$ ; $\Delta x = 0,33$ ; $\epsilon = 20,13\%$
20	1,99	$S^2 = 0,023$ ; $S = 0,152$ ; $\Delta x = 0,42$ ; $\epsilon = 21,29\%$	1,75	$S^2 = 0,001$ ; $S = 0,029$ ; $\Delta x = 0,08$ ; $\epsilon = 4,61\%$	1,72	$S^2 = 0,150$ ; $S = 0,388$ ; $\Delta x = 1,08$ ; $\epsilon = 62,52\%$
25	2,22	$S^2 = 0,031$ ; $S = 0,177$ ; $\Delta x = 0,49$ ; $\epsilon = 22,12\%$	1,77	$S^2 = 0,001$ ; $S = 0,027$ ; $\Delta x = 0,08$ ; $\epsilon = 4,30\%$	1,93	$S^2 = 0,029$ ; $S = 0,169$ ; $\Delta x = 0,47$ ; $\epsilon = 24,27\%$
30	2,47	$S^2 = 0,007$ ; $S = 0,083$ ; $\Delta x = 0,23$ ; $\epsilon = 9,38\%$	1,97	$S^2 = 0,003$ ; $S = 0,058$ ; $\Delta x = 0,16$ ; $\epsilon = 8,17\%$	2,24	$S^2 = 0,013$ ; $S = 0,113$ ; $\Delta x = 0,31$ ; $\epsilon = 14,06\%$
35	2,54	$S^2 = 0,003$ ; $S = 0,053$ ; $\Delta x = 0,15$ ; $\epsilon = 5,76\%$	2,03	$S^2 = 0,0003$ ; $S = 0,016$ ; $\Delta x = 0,04$ ; $\epsilon = 2,19\%$	2,40	$S^2 = 0,012$ ; $S = 0,108$ ; $\Delta x = 0,30$ ; $\epsilon = 12,56\%$

На основе данных, представленных в табл. 2, можно сделать вывод о том, что с увеличением циклов гомогенизации уменьшается относительная погрешность измерения оптической плотности липосомальной суспензии. Так, до начала гомогенизации, когда диаметр липосом в составах 7 и 9 превышал 1 мкм, значение ФПД было в пределах 0,4, а относительная погрешность составляла более 100%. Однако, при измельчении липосомальных везикул до 200 нм и менее, относительная погрешность находилась в области 5% – систематической ошибки спектрофотометрического метода. Наиболее однородные результаты получены в составе 2.

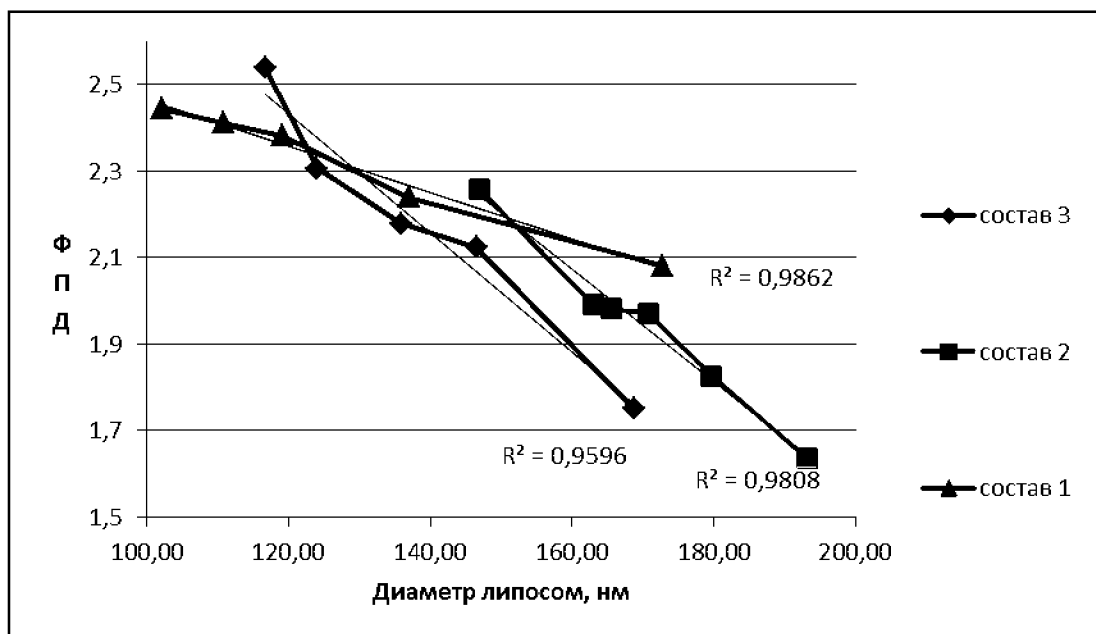




Рис. 2. Зависимость ФПД от диаметра липосом

Изучение связи между значением ФПД и диаметром липосом отражено на рис. 2. Линейность отмечается в интервале оптических плотностей от 0,05 до 1,2, когда диаметр липосом составляет от 100 до 200 нм. Более крупные липосомы не коррелируют со значениями ФПД.

Существующая обратно пропорциональная зависимость между диаметром липосом и ФПД объясняется тем, что при увеличении дисперсности системы возрастает количество частиц, а их размер уменьшается. Данная спектрофотометрическая методика может использоваться для стандартизации липосомальных композиций, т.к. обладает линейностью:  $R^2=0,9862$  для состава №1, 0,9808 – для состава № 2 и 0,9596 – для №3.

Таким образом, разработана технология липосомальной дисперсии с размером частиц порядка 100 нм. В результате проведенной работы, установлено, что гомогенизация липосомальных композиций не должна превышать 30 мин во избежание обратного слияния липосом. На диаметр липосом оказывает влияние природа буферного раствора. Введение уплотнителей в состав липосом увеличивает их диаметр на 14,2–43,7%. Наименьший диаметр (102 нм) отмечается в составе, который ресуспендировался в фосфатном буфере с pH=6,4. В качестве альтернативного метода определения размеров везикул предложено использовать ФПД. Диаметр липосом к концу гомогенизации коррелирует с ФПД суспензии, коэффициент корреляции для двух композиций составил свыше 0,98.

### Литература

1. Иванов, А. В. Липосомы как адьюванты комбинированных вакцин / А. В. Иванов, А. М. Николаева, И. В. Красильников // Пермский медицинский журнал. – 2012. – Т. 29, № 4. – С. 115–120.
2. Иванов, А. В. Разработка использование адьювантов на основе наночастиц в технологии вакцинных препаратов : автореф. на дис. канд. фармацевт. наук : 14.04.01 / А. В. Иванов. – Пермь, 2013. – 25 с.
3. Asili, J. preparation and characterization of liposomes containing methanol extract of aerial parts of *Platycladus orientalis* (L.) Franco / J. Asili [et al] // Avicenna journal of phytomedicine. – 2012. – Vol. 2, No 1. – P. 17–23.
4. Jithan, A. V. Development of topical diclofenac sodium liposomal gel for better anti-inflammatory activity / A. V. Jithan, M. Swathi // International journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology. – 2010. – Vol. 3, Issue 2. – P. 986–993.

## DEVELOPMENT AND EVALUATION OF LIPOSOMAL DELIVERY SYSTEMS FOR TRANSDERMAL PREPARATIONS

**E.I. MOLOKHOVA**  
**D.E. LIPIN**  
**A.V. IVANOV**

*Perm State Pharmaceutical Academy*

*e-mail: profmol@nm.ru*

Nine liposomal formulations were investigated in order to select the composition with the smallest diameter of the liposomes. Multilamellar liposomes were prepared via thin film hydration methodology. The homogenization was carried out by sonication. It was found that at 30th min of sonication liposomes resuspended in phosphate buffered saline (pH = 6,4) are crushed to 102 nm. Introduction of the compactors in liposome's bilayer leads to 14-42 % increase of vesicle's size. As an alternative method for determining the diameter of the particles, we proposed to use the method of photocolourimetry. The correlation between the diameter of the liposomes measured on the «Zetasizer Nano ZS» and photometric index dispersity was shown.

Key words: liposomes, particle size, photometric index dispersity (PID).