

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ НАНОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДЕКСАМЕТАЗОНА В ГИПЕРОСМОЛЯРНОЙ ВОДНОЙ СРЕДЕ

О.А. Куликов

к.м.н. доцент, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва (г. Саранск)
E-mail: oleg-kulikov-84@mail.ru

Разработана новая липосомальная лекарственная форма дексаметазона в гипертоническом растворе хлорида натрия. Приведено описание химического синтеза, количественного анализа лекарственной формы, проанализирована кинетика высвобождения лекарственной субстанции из липосом *in vitro*.

Ключевые слова: липосомы, дексаметазон, спектрофотометрия.

Работа по созданию липосомальной формы дексаметазона описана в различных источниках [1]. При этом независимо от того, какая цель будет поставлена перед готовой лекарственной формой, изначальная методика получения препарата стандартная и включает в себя создание липидной пленки, гидратирование пленки и пропускание мультиламеллярных везикул через поликарбонатный фильтр [2]. Методика очистки липосомальной взвеси от свободного лекарственного вещества может представлять собой ультрафильтрацию (диализ) [3] или ультрацентрифугирование.

В настоящее время предложено создание липосом с дексаметазоном для местного или системного введения, а их синтез происходит в изотонической водной среде [4]. Поскольку липосомальная оболочка есть не что иное, как липидный бислой, при перемещении липосом, полученных в гипертонической среде в среду с меньшей тоничностью (изотоническую) будет происходить разрыв липосомальной оболочки и высвобождение дексаметазона. Похожий процесс происходит при гипотоническом гемолизе эритроцитов [5]. На сегодняшний день нет данных о сравнении кинетики высвобождения лекарственной субстанции дексаметазона из липосом, полученных различными методами или из липосом различных по составу, однако апробированные методики оценки этой кинетики, существуют [6].

Цель работы – получение и анализ новой липосомальной формы дексаметазона в гипертоническом растворе хлорида натрия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Химические субстанции и реактивы: препарат «дексаметазон» (раствор для инъекций 4 мг/мл,

«КРКА Ново место», Словения); лецитин (фосфатидилхолин) EPCS 10 8018-1/130 («Lipoid», Германия); холестерин («Avanti Polar Lipids, Inc.», США); хлороформ (трихлорметан) стабилизированный х.ч. («Химмед», Россия); вода очищенная деионизированная, ФС 42-2619-98; натрия гидроксид (ООО «Экономкэмикал», Россия); натрия хлорид (ООО «Экономкэмикал», Россия); раствор «Стерофундин» изотонический («B.Braun Melsungen», Германия).

Лабораторное оборудование: роторный испаритель («Heidolph Laborota eco», Германия); экструдер LIPEXTM («Northern Lipids Inc.», Канада); анализатор размеров наночастиц NANO-flex («Microtrac Inc.», США); спектрофотометр UV-2600 («Shimadzu Inc.», Япония); камера для ультрафильтрации модель 8200 («Amicon», США); диализный мешок MF-1210-76 с размером пор 12-14кДа (MFPI, США); магнитная мешалка с подогревом C-MAG HS 7, (IKA, Германия); зажим для диализного мешка MF-CB-10100 (MFPI, США).

Методика получения липосомальной дисперсии дексаметазона в 7,5% растворе NaCl. Липосомы получали методом пассивной загрузки. Точную навеску лецитина (300 мг) и холестерина (3 мг) растворяли в хлороформе. Органический растворитель упаривали на роторном испарителе до образования липидной плёнки. Липидную плёнку гидратировали 6,15 мл раствора дексаметазона, содержащим 75 мг/мл NaCl, при температуре 40 °С. Образовавшуюся дисперсию мультиламеллярных везикул измельчали с помощью экструдера с использованием поликарбонатного фильтра с диаметром пор 400 нм. Размер липосомальных везикул определяли методом динамического светорассеяния при помощи наносайзера NANO-flex и программы Microtrac Flex 11.0.0.2. (рис. 1).

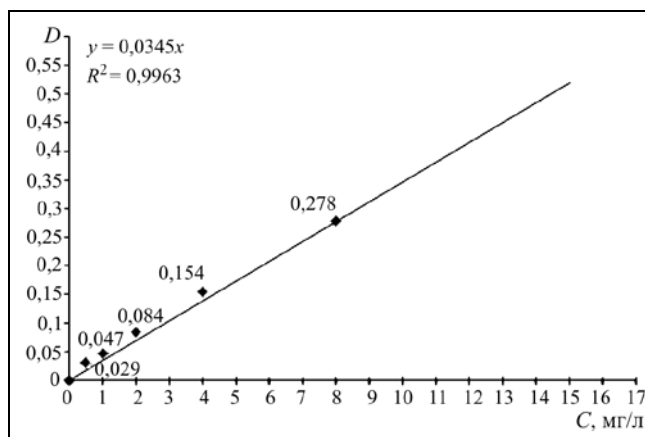


Рис. 1. График зависимости оптической плотности от концентрации дексаметазона в растворе

Очистка липосомальной дисперсии от не включившегося в липосомы дексаметазона проводилась путем ультрафильтрации в течение 24 ч в атмосфере азота под давлением 0,3 МПа. Перед фильтрацией объем липосомальной взвеси в диализной камере доводили до 50 мл при помощи 7,5%-ного раствора NaCl. После очистки густую дисперсию липосом доводили до объема 5 мл 7,5%-ным раствором NaCl. Диализат, вышедший из стакана, использовали для количественного определения методом спектрофотометрии. Концентрацию дексаметазона в диализате находили по градуировочному графику (рис. 1). Оптическую плотность диализата измеряли при $\lambda = 241$ нм (максимум поглощения дексаметазона в 0,1 М NaOH) (таблица).

Для построения графика зависимости оптической плотности от концентрации использовали образцы раствора дексаметазона с различной концентрацией (со стандартным содержанием NaCl 75 мг/мл в 0,1 М NaOH). Количество дексаметазона в диализате рассчитывали по формуле:

$$X = (C \times V1 \times V2) / (V3 \times 100),$$

где C – концентрация дексаметазона в анализируемом растворе, мг/л; V1 – объем диализата, 45 мл; V2 – объем раствора для приготовления аналитической пробы, 50 мл; V3 – объем диализата, взятый для анализа, 1 мл; X – количество дексаметазона в диализате, мг.

Методика оценки кинетики высвобождения дексаметазона из липосом *in vitro*. Дизайн исследования готовился таким образом, чтобы приблизить опыт к реальным условиям высвобождения дексаметазона из липосом в изотонической среде крови при внутривенном введении. В опыте

липосомы с дексаметазоном находились в изотонической биорелевантной среде для высвобождения (раствор «Стерофундин ISO»). Объем среды составил 250 мл, а липосом – 13,9 мл. Данное соотношение объемов обусловлено возможным объемом циркулирующей крови лабораторного животного и тем, что при исследовании *in vivo* безопасным считается внутривенное введение гиперосмолярного 7,5%-ного раствора NaCl в количестве не более 4 мл/кг. Выбор в качестве биорелевантной среды плазмозамещающего раствора «Стерофундин ISO», основывался на том, что он напоминает плазму крови по ионному составу и осмолярности.

Опыт проводили по следующей методике. В диализный мешок длиной 50 мм поместили вышеуказанный объем липосомальной взвеси и раствор «Стерофундин ISO» до полного заполнения мешка. Мешок герметично зафиксировали зажимами и поместили в мерный стакан вместимостью 500 мл. Стакан заполнили до метки 250 мл раствором «Стерофундин ISO» и установили на магнитную мешалку. Исследование проводили при температуре раствора 35,5 °C и частоте вращения мешалки 120 об/мин. Через определенные промежутки времени измеряли концентрацию дексаметазона во внешнем растворе. Для этого извлекали из внешнего раствора 1 мл, помещали в колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки 7,5%-ным раствором NaCl с 0,1 М NaOH и проводили спектрофотометрию. В качестве раствора сравнения использовали 7,5%-ный раствор NaCl с 0,1 М NaOH.

Также проводили два контрольных опыта. В первом опыте использовали раствор дексаметазона 4 мг/мл с концентрацией NaCl 75 мг/мл объемом 10,6 мл, во втором опыте использовали липосомы с дексаметазоном, изготовленные по аналогичной методике, но с использованием изотонического (0,9%-ного) раствора NaCl объемом 13,9 мл. Изотонические липосомы имели одинаковую с опытными концентрацию дексаметазона на единицу объема взвеси, а во всех трех опытах внутри диализного мешка находилось одинаковое количество дексаметазона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Средний диаметр липосом составил 320 ± 50 нм (рис. 2).

Результаты количественного определения содержания дексаметазона в липосомах. Измерение оптической плотности диализата проводили при $\lambda = 241$ нм (максимум поглощения

дексаметазона в 0,1 М NaOH). Полученные данные оптической плотности диализата и концентрации дексаметазона представлены в таблице.

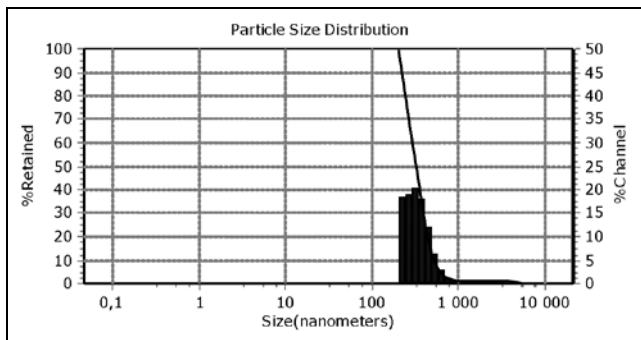


Рис. 2. Размеры полученных липосом (показатели наносайзера)

Таблица. Метрологические характеристики опыта количественного определения содержания дексаметазона в диализате после очистки липосом

Номер опыта	<i>D</i>	<i>C</i> , мг/л
1	0,1178	2,2715
2	0,1194	2,3024
3	0,1156	2,2291
4	0,1171	2,2580
5	0,1181	2,2773
Среднее	0,1176	2,2676
Среднее квадратическое отклонение (<i>S</i>)		0,0269
$\Delta X_{\text{ср}}$		0,03331

Примечание: *D* – оптическая плотность диализата; *C* – концентрация дексаметазона в диализате; $\Delta X_{\text{ср}}$ – доверительный интервал.

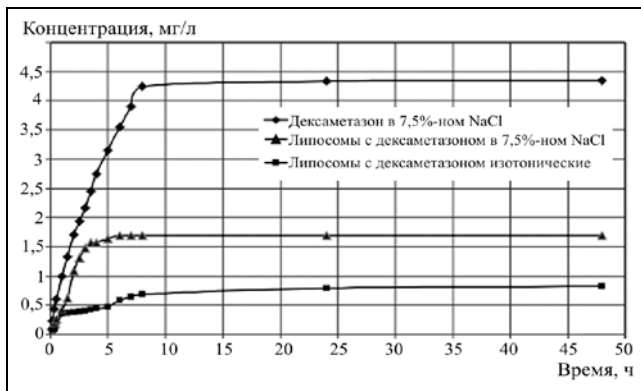


Рис. 3. Нарастание концентрации дексаметазона в биорелевантной среде с течением времени

Таким образом, количество дексаметазона в диализате (*X*) составило 5,1021 мг±0,075 мг. Количество дексаметазона оставшееся в липосомах:

$$X_{\text{л}} = X_0 - X = 20 \text{ мг} - 5,1021 \text{ мг} \pm 0,075 \text{ мг} = 14,8979 \text{ мг} \pm 0,075 \text{ мг},$$

где *X*₀ – количество дексаметазона, использованного для приготовления липосом.

Концентрация дексаметазона в очищенной липосомальной дисперсии:

$$C_{\text{л}} = X_{\text{л}} / V_{\text{л}} = 14,8979 \text{ мг} \pm 0,075 \text{ мг} / 5 \text{ мл} = 2,9795 \text{ мг/мл} \pm 0,015 \text{ мг/мл}.$$

Эффективность включения дексаметазона в липосомы:

$$14,8979 \text{ мг} \pm 0,075 \text{ мг} / 20 \text{ мг} \times 100\% = 74,4895\% \pm 0,375\%.$$

Соотношение дексаметазона и лецитина очищенных липосом:

$$2,9795 \text{ мг/мл} \times 6 \text{ мл} / 300 \text{ мг} = 0,05959.$$

Параллельно проводился контрольный опыт с «пустыми» липосомами, находящимися в гипертоническом растворе хлорида натрия. Липосомы без дексаметазона готовили по аналогичной методике, но для гитратирования липидной плёнки использовали 7,5%-ный NaCl, не содержащий дексаметазон.

Результаты оценки кинетики высвобождения дексаметазона из липосом *in vitro*. В результате проведённых опытов были получены графики, характеризующие скорость высвобождения дексаметазона из липосом (рис. 3).

ВЫВОДЫ

Особенностью разработанной и проанализированной липосомальной лекарственной формы дексаметазона явилось её получение в гипертонической водной среде. При попадании в изотонический раствор полученные липосомы высвобождают дексаметазон быстрее и в большей степени, чем изотонические. Данная особенность существенным образом способна повлиять на биодоступность и распределение липосомального препарата дексаметазона при исследовании *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matthias B., Franziska M.P., Klaudia T.W. Liposomal encapsulation of dexamethasone modulates cytotoxicity, inflammatory cytokine response, and migratory properties of primary human macrophages // *Nanomedicine*. 2014. № 10. P. 1209–1220.
2. Hegeman M.A., Cobelens P.M., Kamps J., et al. Liposome-encapsulated dexamethasone attenuates ventilator-induced lung inflammation // *British Journal of Pharmacology*. 2011. № 163. P. 1048–1058.

3. Куликов О.А., Агеев В.П., Инчина В.И. и др. Липосомальная лекарственная форма ацетилцистеина: получение и анализ // Фармация. 2016. Т. 65. № 4. С. 23–25.
4. Лепарская Н.Л., Сорокоумова Г.М., Сычева Ю.В. и др. Липосомы, содержащие дексаметазон: получение, характеристика и использование в офтальмологии // Вестник МИТХТ. 2011. Т. 6. № 2. С. 37–42.
5. Прокопенко Н.В. Сохранение структурно-функциональной целостности эритроцитов человека в средах различной то-
ничности // Вестник ХНАДУ. 2011. № 52. С. 174–177.
6. Мустафин Р.И., Ситенков А.Ю., Буховец А.В., Гарипова В.Р. Тест «Растворение» для особых лекарственных форм // Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли. М.: Перо. 2015. С. 169–184.

Поступила 1 апреля 2017 г.

PRODUCTION AND ANALYSIS OF THE NANOSOMAL DRUG FORM OF DEXAMETHASONE IN A HYPEROSMOLAR AQUEOUS MEDIUM

© O.A. Kulikov, 2017

O.A. Kulikov

Ph.D. (Med.), Associate Professor, National Research Ogaryov Mordovia State University (Saransk)

E-mail: oleg-kulikov-84@mail.ru

Objective. A new liposomal form of dexamethasone in a hyperosmolar solution of sodium chloride is obtaining and analysis.

Materials. The drug "Dexamethasone"; Lecithin; Cholesterol; Chloroform; Purified deionized water; Sodium hydroxide; Solution "Sterofundin" isotonic; Sodium chloride.

Equipment. Rotary evaporator; Extruder; Nanoparticle size analyzer; Spectrophotometer; Chamber for ultrafiltration; Dialysis bag; Magnetic stirrer with heating; Dialysis bag clamp.

A method for obtaining liposomal dispersion of dexamethasone in 7.5% NaCl solution. Liposomes were obtained by reversing the phases from lecithin and cholesterol. Dexamethasone was encapsulated by passive loading. Lecithin and cholesterol were dissolved in chloroform. The organic solvent was evaporated in vacuo. The lipid film was hydrated with a hypertonic sodium chloride solution containing dexamethasone. The dispersion of multilamellar vesicles was ground with an extruder. The size of the liposomes was determined with the aid of Nanoparticle size analyzer. The average diameter of the liposomes was 320 ± 50 nm. Purification of liposomes from free dexamethasone was performed by dialysis. UV-spectrophotometry was used for the quantitative determination. Optical density of dialysate was determined at $\lambda = 241$ nm. The concentration of dexamethasone in the dialysate was found using a calibration schedule. The concentration of dexamethasone in the purified liposomal dispersion was 2.9795 mg / ml \pm 0.015 mg / ml; The effectiveness inclusion to the liposomes of the drug was $74.5\% \pm 0.4\%$; The ratio of dexamethasone and lecithin to liposomes after purification: 0.06.

The comparison of the kinetics of dexamethasone release from liposomes. In the experiment, the rate of dexamethasone release from liposomes and its accumulation in a biorelevant environ were compared. As a biorelevant environment the infusion saline "Sterofundin ISO" was taken. The experiment was carried out at a constant temperature of 35.5 ° C and a magnetic stirrer speed of 120 / min. The release rate was evaluated by sampling from the biorelevant environ at regular intervals. The concentration of dexamethasone in the samples was determined by spectrophotometry. The concentration-time curves showed that dexamethasone is released much more quickly from liposomes prepared in 7.5% NaCl solution.

Key words: liposomes, dexamethasone, spectrophotometry.

REFERENCES

1. Matthias B., Franziska M.P., Klaudia T.W. Liposomal encapsulation of dexamethasone modulates cytotoxicity, inflammatory cytokine response, and migratory properties of primary human macrophages // Nanomedicine. 2014. № 10. P. 1209–1220.
2. Hegeman M.A., Cobelens P.M., Kamps J., et al. Liposome-encapsulated dexamethasone attenuates ventilator-induced lung inflammation // British Journal of Pharmacology. 2011. № 163. P. 1048–1058.
3. Kulikov O.A., Ageev V.P., Inchina V.I. i dr. Liposomal'naja lekarstvennaja forma acetilcisteina: poluchenie i analiz // Pharmacy. 2016. V. 65. № 4. S. 23–25.
4. Leparskaja N.L., Sorokoumova G.M., Sycheva Ju.V. i dr. Liposomy, sodержashhie deksametazon: poluchenie, harakteristika i ispol'zovanie v oftal'mologii // Vestnik MITHT. 2011. T. 6. № 2. S. 37–42.
5. Prokopenko N.V. Sohranenie strukturno-funkcional'noj celostnosti jерitroцитов cheloveka v sredah razlichnoj tonichnosti // Vestnik HNADU. 2011. № 52. S. 174–177.
6. Mustafin R.I., Sitenkov A.Ju., Buhovec A.V., Garipova V.R. Test «Rastvorenie» dlja osobyh lekarstvennyh form // Test «Rastvorenie» v razrabotke i registracii lekarstvennyh sredstv. Nauchno-prakticheskoe rukovod'stvo dlja farmaceuticheskoy otrasli. M.: Pero. 2015. S. 169–184.