

ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА АЦЕТИЛЦИСТЕИНА: ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ

О.А. Куликов*, кандидат медицинских наук,
В.П. Агеев, В.И. Инчина, доктор медицинских наук, профессор,
О.В. Минаева, кандидат медицинских наук, **Е.А. Репина**, кандидат медицинских наук
Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева;
Российская Федерация, 430005, Саранск, ул. Большевикская, д. 68

Для защиты легочной ткани от различных патогенных воздействий рекомендуется использовать липосомальную форму ацетилцистеина.
Цель исследования – создание липосомальной лекарственной формы ацетилцистеина (АЦЦ) и ее количественный анализ двумя методами.

Материал и методы. Липосомы получали методом обращения фаз из лецитина и холестерина. АЦЦ инкапсулировался методом пассивной загрузки. Для количественного определения содержания АЦЦ в липосомах использовалась спектрофотометрия. Размер липосомальных везикул определяли методом динамического светорассеяния при помощи наносайзера NANO-flex. Очистку липосомальной дисперсии от не включившегося в липосомы АЦЦ проводили методом диализа.

Результаты. С использованием готового препарата «Флуимуцил» получена липосомальная лекарственная форма АЦЦ. Произведено количественное определение эффективности инкапсуляции АЦЦ в липосомы двумя методами с использованием спектрофотометрии. Эффективность инкапсуляции составила $13,7325 \pm 0,392\%$.

Заключение. Выбран состав липосомальной лекарственной формы АЦЦ, при котором эффективность включения препарата в липосомы составила $13,7325 \pm 0,392\%$, а отношение включившегося АЦЦ к лецитину – 0,412.

Ключевые слова: липосомы, АЦЦ, концентрация, спектрофотометрия.

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

ВВЕДЕНИЕ

Для защиты легочной ткани от различных патогенных воздействий рекомендуется использовать липосомальную форму ацетилцистеина (АЦЦ), глутатион и другие тиолсодержащие антиоксиданты [1]. Малая эффективность антиоксидантов в различных исследованиях была обусловлена их неспособностью преодолевать клеточные барьеры [2]. Согласно результатам исследований последних лет, инкапсуляция антиоксидантов в липосомы повышает их терапевтический потенциал при лечении заболеваний легких [3–5]. При создании липосомальной формы АЦЦ для пульмонотропного действия предложены липосомы размером 100–200 нм с эффективностью включения АЦЦ в липосомы $13 \pm 4\%$ [6]. Можно предположить, что для увеличения времени нахождения липосом в капиллярном русле легких при парентеральном введении липосомы с АЦЦ должны иметь несколько большие размеры. При этом возникает вопрос, изменится ли эффективность включения АЦЦ в липосомы при изменении размерных характеристик липосомальных везикул.

Цель нашего исследования – создание липосомальной лекарственной формы АЦЦ и ее количественный анализ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Липосомальную форму АЦЦ получали на основе препарата «Флуимуцил (ацетилцистеин), раствор 100 мг/мл для инъекций и ингаляций». Липосомы получали методом обращения фаз из лецитина и холестерина. АЦЦ инкапсулировался методом пассивной загрузки. Количественное определение содержания АЦЦ в липосомах проводили на спектрофотометре UV-2600.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения липосомальной дисперсии с АЦЦ точную навеску лецитина (200 мг) и холестерина (2 мг) помещали в круглодонную колбу объемом 1 л. Затем добавляли хлороформ до полного растворения лецитина и холестерина. Органический растворитель упаривали под вакуумом при температуре 50°C постепенно, в течение 30 мин увеличивая количество оборотов с 50 до 210 об/мин. Высушивание проводили до образования липидной пленки и исчезновения запаха хлороформа. После чего ее гидратировали 6 мл препарата «Флуимуцил». Образовавшуюся дисперсию мультиламеллярных везикул измельчали с помощью экструдера LIPREX™ с использованием поликарбонатного фильтра с диаметром пор 400 нм. Прозекструированные липосомы собирали в приемную колбу, после чего процедуру повторяли 5 раз.

Размер липосомальных везикул определяли методом динамического светорассеяния при помощи наносайзера NANO-flex. Для этого 1 мл раствора липосом помещали в пробирку Eppendorf и проводили анализ. Определение размеров проводилось автоматически, с помощью программы Microtrac Flex 11.0.0.2. Средний диаметр липосом составил 380 ± 30 нм.

Очистку липосомальной дисперсии от не включившегося в липосомы АЦЦ проводили методом диализа. В камеру для ультрафильтрации устанавливалась мембрана с диаметром пор 12–14 кДа, в нее помещали 5 мл раствора липосом и доводили объем до 30 мл. Камеру устанавливали на магнитную мешалку. В камере с помощью баллона с азотом создавали повышенное давление в 0,3 МПа. Диализ проводили в течение 24 ч при оборотах мешалки 60 об/мин, до образования в стакане густой очищенной дисперсии липосом объемом 4 мл, которую собирали и вновь доводили до объема 5 мл. Диализат объемом 26 мл, вышедший из стакана, собирали в колбу.

Количественное содержание АЦЦ в липосомальной дисперсии определяли спектрофотометрически в диапазоне волн от 350 до 650 нм. При взаимодействии АЦЦ с железом (III) и о-фенантролином образуется комплексное соединение, имеющее ярко-оранжевую окраску. Максимум поглощения данной системы находится в области 510 нм. Подготовку раствора к спектрофотометрированию проводили по 2 методикам.

Методика 1. 2 мл диализата помещали в мерную колбу объемом 25 мл и доводили до метки (раствор 1). 2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу объемом 50 мл, добавляли 1 мл раствора FeCl_3 и 10 мл раствора о-фенантролина, после чего доводили объем до 50 мл (раствор 2).

Методика 2. 5 мл очищенных липосом помещали в мерную колбу объемом 100 мл и доводили до метки деионизированной водой (раствор 3). Затем разведенную липосомальную дисперсию переливали в стакан объемом 250 мл, прибавляли 50 мл хлороформа и

перемешивали 15 мин. После чего отделяли воду от хлороформа с помощью делительной воронки. 10 мл полученного водного извлечения помещали в мерную колбу объемом 50 мл, добавляли 1 мл раствора FeCl_3 и 10 мл раствора о-фенантролина и доводили объем до 50 мл (раствор 4).

Далее при выполнении 1-й и 2-й методик проводили спектрофотометрирование в кювете с толщиной слоя 10 мм с использованием раствора сравнения. Раствор сравнения готовили следующим образом: в мерную колбу объемом 50 мл добавляли 1 мл раствора FeCl_3 и 10 мл раствора о-фенантролина и доводили объем до 50 мл водой.

Для приготовления раствора FeCl_3 точную навеску FeCl_3 (0,0684 г) растворяли в 20 мл воды ($C=3,42$ мг/мл). Раствор о-фенантролина получали, растворяя точную навеску о-фенантролина (0,66 г) в 150 мл воды, затем доводили объем до 200 мл 95% этанолом ($C=3,3$ мг/мл). Концентрацию АЦЦ определяли по графику (см. рисунок).

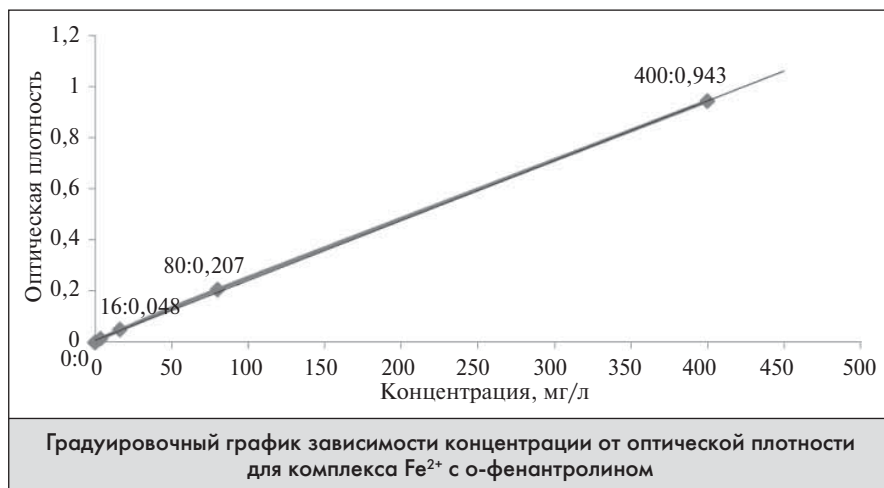
Аналитические пробы для построения градуировочного графика готовили следующим образом. Раствор АЦЦ: 1 мл препарата «Флуимуцил» (100 мг/мл) доводили до 50 мл водой ($C=2$ мг/мл). Пробирка 1 (раствор сравнения): раствор АЦЦ не добавляли; пробирка 2 – 0,08 мл раствора АЦЦ; пробирка 3 – 0,4 мл раствора АЦЦ; пробирка 4 – 2 мл раствора АЦЦ; пробирка 5 – 10 мл раствора АЦЦ. В каждую пробирку добавляли 1 мл раствора FeCl_3 , 10 мл раствора фенантролина и доводили объем до 50 мл водой. Так как фосфолипиды липосом способны восстанавливать Fe^{3+} до Fe^{2+} , то параллельно проводился контрольный опыт с пустыми липосомами (не содержащими АЦЦ).

Содержание АЦЦ определяли по формуле:

$$X1 = \frac{(C - C_k) \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot V_5}{V_2 \cdot V_4}$$

Для методики 1: $X1$ – количество АЦЦ в диализате, мг; V_1 – объем раствора 1 (0,025 л); V_2 – объем диализата, взятый для приготовления раствора 1 (0,002 л); V_3 – объем раствора 2 (0,05 л); V_4 – объем раствора 1, взятый для приготовления раствора 2 (0,002 л); V_5 – объем диализата (0,026 л); C – концентрация АЦЦ в растворе 2; C_k – результат контрольного опыта с пустыми липосомами.

Для методики 2: $X1$ – количество АЦЦ в объеме липосомальной дисперсии, мг; V_1 – объем раствора 3 (0,1 л); V_2 – объем очищенных липосом, взятый для приготовления раствора 3 (0,005 л); V_3 – объем раствора 4 (0,05 л); V_4 – объем раствора 3, взятый для



МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АЦЦ В ЛИПОСОМАХ

№	Метод 1				Метод 2			
	D	C, мг/л	D _к	C _к , мг/л	D	C, мг/л	D _к	C _к , мг/л
1	0,0973	66,138	0,0012	0,815	0,234	165,312	0,036	25,433
2	0,0979	66,546	0,0011	0,748	0,235	166,019	0,039	27,552
3	0,0977	66,410	0,0009	0,612	0,237	167,431	0,038	26,854
4	0,0978	66,478	0,001	0,680	0,238	168,138	0,038	26,853
5	0,0973	66,138	0,0011	0,748	0,241	170,257	0,036	25,432
M	0,0976	66,342	0,0011	0,7206	0,237	167,431	0,037	26,425
S		0,192		0,0772		1,935		0,950
ΔX _{ср} (мг)		0,239		0,096		2,405		1,180
ΣΔX _{ср} (мг)			0,335			3,585		
X ₁ (мг)			533,174±0,335			70,503±3,585		
X ₂ (мг)			66,826±0,335			70,503±3,585		
Сл (мг/мл)			13,365±0,067			14,1±0,717		

Примечание. D, D_к – оптическая плотность аналитической и контрольной проб; C, C_к – концентрация комплекса Fe²⁺ с о-фенантролином для аналитической и контрольной проб; M – среднее значение оптической плотности и концентрации раствора комплекса Fe²⁺ с о-фенантролином; S – среднее квадратичное отклонение; ΔX_{ср} – доверительный интервал; X₁ – количество АЦЦ в диализате для метода 1 и в липосомальной дисперсии для метода 2; X₂ – количество АЦЦ в 5 мл липосомальной дисперсии (X₂=600 мг – X₁ для метода 1; X₂=X₁ для метода 2); C_л – концентрация АЦЦ в липосомальной дисперсии.

приготовления раствора 4 (0,01 л); V₅ – объем липосомальной дисперсии (0,005 л); C – концентрация АЦЦ в растворе 4; C_к – результат контрольного опыта.

Результаты исследования представлены в таблице.

Целесообразно принимать во внимание среднее значение состава АЦЦ, полученное методами 1 и 2 (13,7325±0,392 мг/мл), так как они отличаются по принципу анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования был выбран состав липосомальной лекарственной формы АЦЦ, при котором эффективность включения препарата в липосомы составила 13,7325%±0,392%, а отношение включившегося АЦЦ к лецитину – 0,412.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mitsopoulos P., Suntries Z. E. Protective Effects of Liposomal N-Acetylcysteine against Paraquat-Induced Cytotoxicity and Gene Expression. *Journal of Toxicology*, 2011; 2011: 1–14.
2. Suntries Z. E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*, 2002; 180(1): 65–77.
3. Stone W.L., Smith M. Therapeutic Uses of Antioxidant Liposomes. *Molecular Biotechnology*, 2004; 27 (3): 217–30.
4. Hoesel L.M., Flierl M.A., Niederbichler A. D. Ability of antioxidant liposomes to prevent acute and progressive pulmonary injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008; 10(5): 973–81.
5. Bailey M.M., Berkland C.J. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. *Medicinal Research Reviews*, 2009; 29(1):196–212.
6. Mitsopoulos P., Omric A., Alipour M., Vermeulena N., Smithd M.G., Suntries Z.E. Effectiveness of liposomal-N-acetylcysteine against LPS-induced lung injuries in rodents. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008; 363 (1–2): 106–11.

Поступила 30 января 2016 г.

LIPOSOMAL ACETYLCYSTEINE FORMULATION: PREPARATION AND ANALYSIS

O.A. Kulikov, MD; V.P. Ageev; Professor V.I. Inchina, MD; O.V. Minaeva, MD; E.A. Repina, MD
N.P. Ogarev Mordovian State University; 68, Bolshevistskaya St., Saransk 43005, Russian Federation

SUMMARY

Background. Liposomal acetylcysteine is recommended for the protection of lung tissue from different pathogenic exposures.

Objective: to design a liposomal acetylcysteine (ACC) formulation and to carry out its quantitative analysis using two methods.

Material and methods. Liposomes were obtained by the lecithin-cholesterol phase inversion method. ACC was encapsulated by the passive loading technique. Spectrophotometry was used to measure the content of ACC in the liposomes. The size of liposomal vesicles was determined by dynamic light scattering by means of a NANO-flex nanosizer. A dialysis method was applied to purify liposomal dispersion from liposomal unencapsulated ACC.

Results. The finished drug Fluimucil was employed to prepare a liposomal ACC formulation. The efficiency of liposomal ACC encapsulation was quantified by two methods using spectrophotometry. The encapsulation efficiency was 13.7325±0.392%.

Conclusion. The liposomal ACC composition was chosen, in which the efficiency of liposomal ACC encapsulation was 13.7325±0.392% and the ratio of encapsulated ACC to lecithin was 0.412.

Key words: liposomes, acetylcysteine, concentration, spectrophotometry.