

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОДИСПЕРСИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЭКСТРАКТА БЕРЕСТЫ, ДЛЯ СОЛЮБИЛИЗАЦИИ ПЛОХО РАСТВОРИМЫХ В ВОДЕ ВЕЩЕСТВ

В.В. Красильникова, аспирант, Н.И. Пахарькова, студент,

**В.И. Попенко, ведущий научный сотрудник, А.П. Каплун, профессор
кафедра Биотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова*

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН*

e-mail: wwkras@mail.ru

П

редложен способ солюбилизации плохо растворимых субстанций с помощью нанодисперсий, полученных из тритерпеноидов бересты. Определены оптимальные соотношения субстанция/носитель для метилфеофорбида А, доксорубицина, силибинина и силимарина.

Ключевые слова: солюбилизация, нанодисперсия, тритерпеноиды бересты, метилфеофорбид А, доксорубицин, силимарин, силибинин

Многие лекарственные вещества мало-растворимы в воде (доксорубицин, гидрофобные фотосенсибилизаторы, флавоноиды и др.), что затрудняет их использование. Для солюбилизации плохо растворимых веществ используют несколько способов: комплексообразование с амфифильным полимером [1, 2], ассоциацию вещества с наночастицами (липосомы [3], жировые эмульсии [4], полимерные [5], керамические [6], твердые липидные наночастицы [7] и др.), циклодекстрины [7], получение смешанных мицелл с полимерными ПАВ [9], получение нанодисперсий (дисперсий нанокристаллов) [10].

Приготовление нанодисперсий считается одним из наиболее дешевых и технически

простых способов улучшения биодоступности плохо растворимых веществ, к тому же нанокристаллы – физически довольно устойчивая форма лекарства [11]. Кроме того, получение нанодисперсий является практически единственным способом, позволяющим добиться высокого соотношения вещество/носитель (в некоторых случаях оно составляет 1).

Ранее в нашей лаборатории был разработан простой способ получения стабильных нанодисперсий из БЭС (бересты экстракт сухой, представляющий собой смесь тритерпеноидов лупанового ряда: бетулина, лупеола, кофеата бетулина), размер частиц которых составляет 70–150 нм (рис. 1).

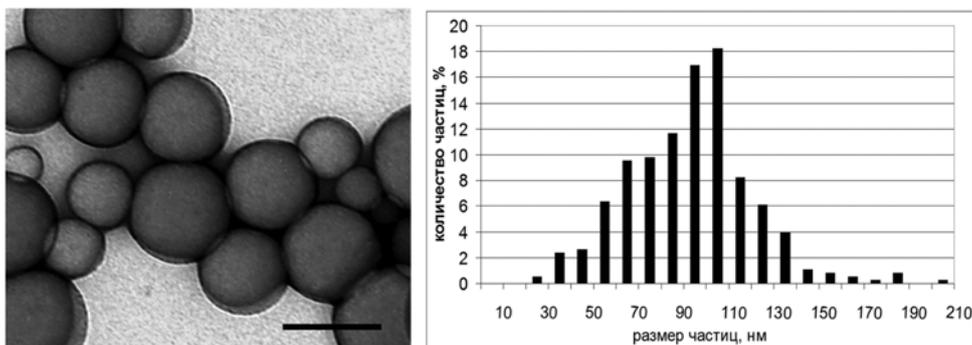


Рис. 1. Электронная микрофотография дисперсии БЭС и гистограмма распределения размеров частиц дисперсии.

Поверхностно-активные вещества довольно токсичны, в то время как дисперсии БЭС не содержат токсичных веществ. Так как БЭС представляет собой смесь гидрофобных веществ, такие дисперсии могут быть использованы для солюбилизации плохо растворимых веществ. Целью данной работы было определение максимальной и оптимальной эффективности включения несколь-

ких плохо растворимых лекарственных субстанций. Для этого исследовали зависимость размера частиц от доли включенного вещества и однородность морфологии частиц полученных дисперсий. За оптимальную эффективность принимали эффективность включения, при которой морфология частиц в полученной дисперсии относительно однородна и отсутствуют частицы несферической

формы, кристаллы.

В качестве модельных веществ были выбраны а) метилфеофорбид А (МФФА) – вещество, используемое в фотодинамической терапии опухолей; б) доксорубин (ДР) – противоопухолевый препарат; в) силимарин (СЛМ) – гепатопротекторная субстанция; г) основной компонент СЛМ – силибинин (СБ).

а) Метилфеофорбид А – гидрофобный фотосенсибилизатор, при включении которого в липосомы максимальное соотношение

вещество/носитель составило 0.013. Получали нанодисперсии с соотношением МФФА/БЭС (по массе) 0.1, 0.2 и 0.4. Из электронных микрофотографий дисперсий видно, что при соотношениях МФФА/БЭС, равных 0.1 и 0.2, дисперсия морфологически однородна (рис. 2А, Б), в то время как в случае соотношения МФФА/БЭС, равного 0.4, в дисперсии образуются помимо сферических частиц также кристаллы, по форме напоминающие «доски» (рис. 2В).

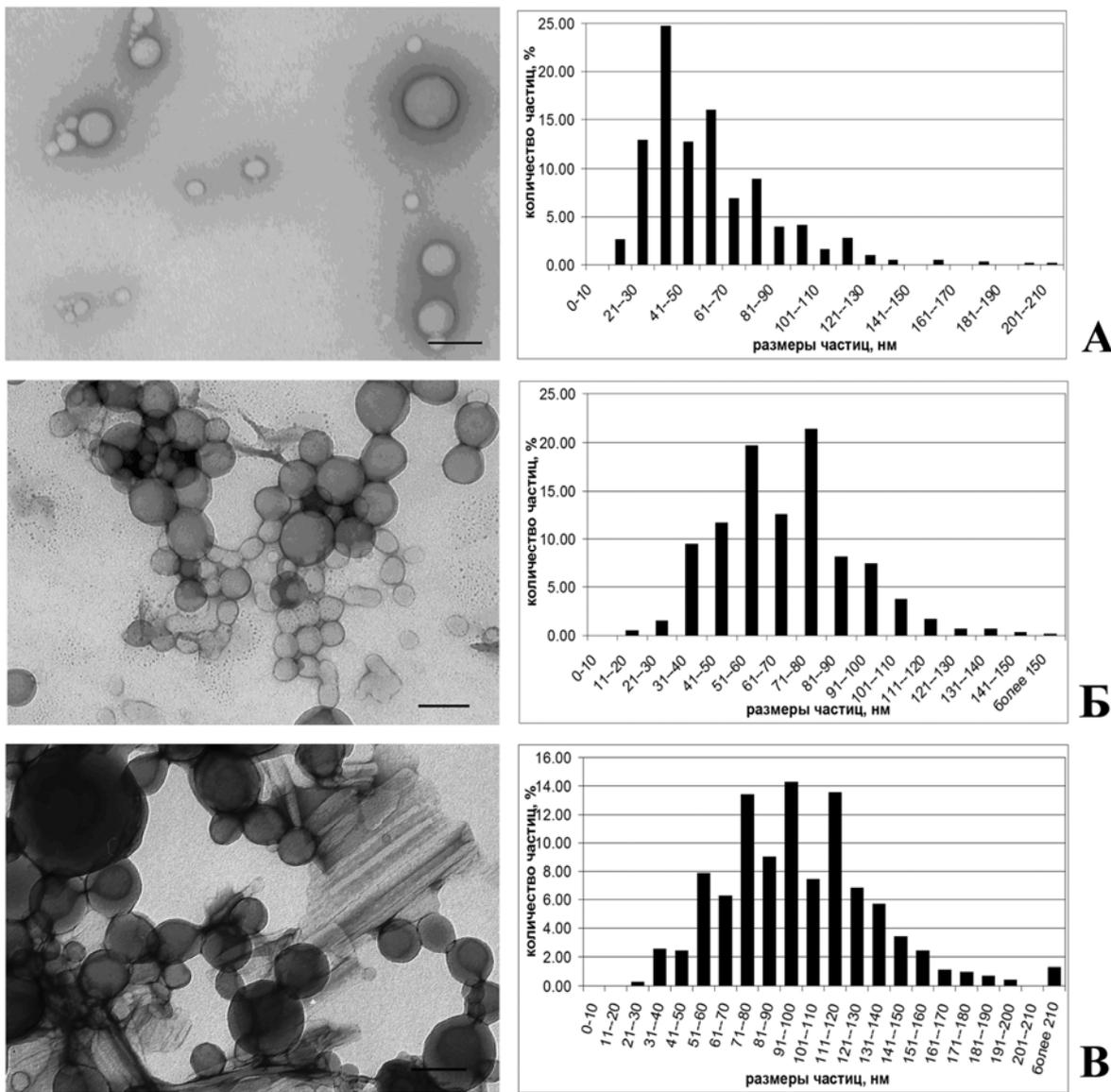


Рис. 2. Электронные микрофотографии (масштабный отрезок 100 нм) и гистограммы распределения размеров сферических частиц дисперсий, полученных из БЭС с различным соотношением МФФА/БЭС: А – 0.1; Б – 0.2; В – 0.4.

Кристаллы такой формы характерны для бетулина, являющегося одним из компонентов БЭС; очевидно, при таком соотношении МФФА/БЭС часть бетулина выкристаллизовывается из частиц. Наличие кристаллов бетулина в дисперсии может способствовать ухудшению ее агрегационной устойчивости. На основе электронных микрофотографий

дисперсий был произведен расчет средних размеров сферических частиц и распределения размеров частиц (см. гистограммы на рис. 2). Средний размер сферических частиц дисперсий с соотношением МФФА/БЭС 0.1 составляет 56 нм, для МФФА/БЭС 0.2 – 68 нм, для МФФА/БЭС 0.4 – 101 нм. Также из гистограмм видно, что при увеличении количества

включенного МФФА диапазон размеров частиц дисперсии становится более широким.

Оптимальным соотношением выбрано соотношение МФФА/БЭС, равное 0.2 – максимальное соотношение, при котором в полученной дисперсии не образуются «доски» кристаллов.

б) Доксорубицин загружали в соотношении ДР/БЭС 0.02, 0.05, 0.1 и 0.2. Так как ДР все же

частично растворим в воде, определяли эффективность включения и реальное соотношение ДР/БЭС в частицах. Для отделения частиц от невключившегося вещества применяли гель-эксклюзионную хроматографию (колонка NAP-5) с последующим анализом фракций при 495 нм (поглощение ДР) и 600 нм (контроль рассеивания света); полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Эффективность включения ДР и соотношение ДР/БЭС в частицах для дисперсий БЭС с различными исходными нагрузками.

Исходное соотношение ДР/БЭС	Эффективность включения ДР в частицы, %	Соотношение ДР/БЭС в частицах
0.02	100	0.020
0.05	79	0.039
0.10	67	0.067
0.20	73	0.170

Для дисперсии с минимальной эффективностью включения ДР были получены электронные микрофотографии, на основе которых вычислен средний размер сферических частиц в

дисперсии – 109 нм. Следует отметить, что помимо сферических частиц в дисперсии присутствуют также кристаллы, очевидно, не включившегося в наночастицы доксорубицина (рис. 3).

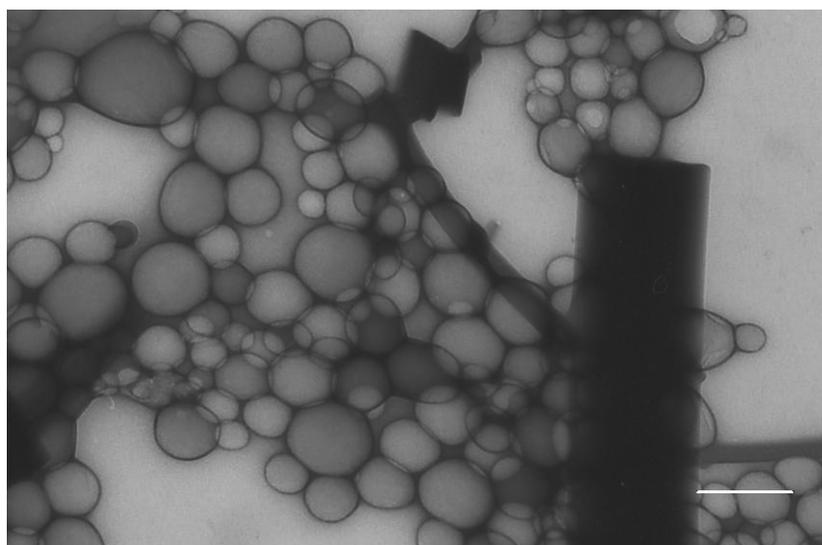


Рис. 3. Электронная микрофотография дисперсии, полученной из БЭС с соотношением ДР/БЭС 0.1, масштабный отрезок 200 нм.

Соотношение ДР/БЭС 0.02 принято за оптимальное, так как в данном случае достигается максимальная эффективность включения ДР – 100%.

в), г) Силимарин – комплекс флавоноидов [12], основным компонентом которого является силибинин. Получали дисперсии БЭС с силимарином и с силибинином, исходное соотношение лекарственная субстанция/носитель составляет 0.02, 0.05, 0.1 и 0.2. Эффективность включения и реальное соотношение вещество/носитель определяли, отделяя частицы от невключившегося вещества при помощи гель-эксклюзионной хроматографии на колонке NAP-5. Было установлено, что как для СЛМ, так и для СБ эффективность

включения составляет 100%, за исключением дисперсий с долей исходно загружаемого вещества (от БЭС) 0.1, в этом случае эффективность включения для СЛМ составляет 76%, для СБ – 71%. Средний размер сферических частиц полученных дисперсий для соотношения СБ/БЭС 0.02 составил 111 нм, для СБ/БЭС 0.05 – 152 нм, для СБ/БЭС 0.1 – 77 нм, для СБ/БЭС 0.2 – 98 нм, однако следует учитывать, что в случае дисперсий с наибольшими нагрузками (соотношение СБ/БЭС 0.1 и 0.2) помимо сферических частиц присутствовали также и кристаллы, причем в дисперсии с соотношением СБ/БЭС 0.1 их существенно больше (рис. 4).

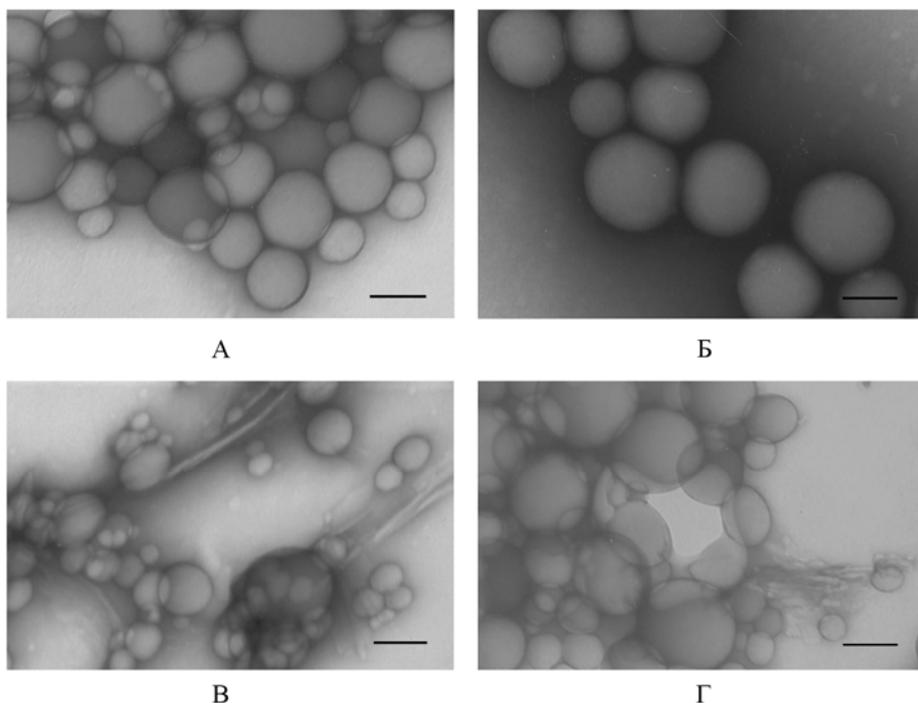


Рис. 4. Электронные микрофотографии (масштабный отрезок 100 нм) дисперсий, полученных из БЭС с различным соотношением СБ/БЭС:

А – 0.02; Б – 0.05; В – 0.1; Г – 0.2.

Оптимальным соотношением субстанции/БЭС для СЛМ и СБ было выбрано соотношение 0.05, для которого характерны максимальная эффективность включения – 100% и отсутствие кристаллов в дисперсии.

Следует отметить, что как для ДР, так и для СЛМ и СБ при соотношении субстанции/БЭС 0.1 наблюдается спад эффективности включения, причем при дальнейшем увеличении соотношения субстанции/БЭС (точка 0.2) эффективность включения снова возрастает. Наличие кристаллов в дисперсии при соотношении 0.1 и 0.2 говорит о неполном включении вещества в частицы. Такое явление можно объяснить за счет особенностей метода определения эффективности включения – используется разделение на фракции частиц и невключившегося вещества с помощью гель-фильтрации. В таком случае возможно, что невключившееся вещество само образует кристаллы, причем кристаллы с размером, существенно меньшим, чем частицы БЭС, выходят с колонки в отдельной фракции, а сравнимые по размерам с частицами БЭС кристаллы – в той же фракции, что и частицы БЭС. При этом рассчитанная эффективность включения оказывается завышенной. Возможно, что в точке 0.1 образуются более мелкие кристаллы или мицеллы, а в точке 0.2 – более крупные кристаллы.

Из полученных результатов видно, что дисперсии БЭС могут быть использованы для солюбилизации плохо растворимых в воде веществ различной природы. Дисперсии с

оптимальной эффективностью включения (для всех субстанций составляет 100%), в которых не наблюдается частиц, отличных от сферических, получают при начальной доле загружаемых субстанций от 0.05 до 0.2. Использование дисперсий БЭС является уникальным случаем, когда солюбилизация плохо растворимого в воде вещества достигается без ПАВ. Также следует упомянуть, что применение нанодисперсий БЭС позволит использовать пассивное нацеливание лекарственных субстанций при внутривенном введении. Кроме того, вероятным плюсом такой формы является биологическая активность самого БЭС и дисперсий на его основе, к примеру, гепатопротекторные свойства БЭС могут быть полезны при применении частиц с ДР, использование которого отрицательным образом сказывается на работе печени.

Экспериментальная часть

Получение нанодисперсий. К 5 мг БЭС (предоставлен фирмой «Березовый мир») добавляли ТГФ («Химмед», хч) и раствор субстанции (метилфеофорбид А – предоставлен д.х.н. Г.В. Пономаревым, ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН, доксорубин (Merck), силимарин или силибинин (ВИЛАР)) в ТГФ (3 мг/мл) в объемах, указанных в табл. 2. При интенсивном перемешивании в полученный раствор пипеткой впрыскивали 25 мл воды. Дисперсию перемешивали еще в течение 5 мин. Полученную дисперсию обрабатывали на ультразвуковой бане Sonogex ТК-52 (Bandelin, Германия), затем удаляли

растворитель и концентрировали на роторном испарителе Laborota 4000 (Heidolph Instruments, Германия) при температуре не выше 40°C.

Таблица 2. Объемы ТГФ и раствора субстанции в ТГФ (3 мг/мл), добавляемые к БЭС, в зависимости от соотношения вещество/БЭС.

Доля субстанции	0.02	0.05	0.1	0.2	0.4
Объем раствора субстанции, мл	0.03	0.08	0.17	0.33	0.66
Объем ТГФ, мл	0.97	0.92	0.83	0.67	0.34

Определение степени включения субстанций в наночастицы.

На колонку NAP-5 (Amersham, США) наносили 500 мкл дисперсии. Элюировали дистиллированной водой, собирали 12 фракций по 1 мл. Измеряли оптическое поглощение каждой фракции при 495 нм (контроль ДР), 290 (контроль СЛМ, СБ) и 600 нм (спектрофото-метр DU®-7, Beckman, США). Объединяли фракции с вышедшими наночастицами и с не включившимся веществом, измеряли их объем и оптическое поглощение, рассчитывали процент включившейся субстанции от массы

БЭС по формуле: $E = \frac{D \cdot M \cdot V}{\varepsilon \cdot \omega \cdot m_{\text{нан}}} \cdot 100\%$, где

D – оптическая плотность фракции не включившегося вещества (на характеристической длине волны), M – молекулярная масса вещества, V – объем фракции не включившегося вещества, ε – мольный коэффициент экстинкции, ω – выход колонки (определяется

при калибровке колонки по соотношению количества вещества, вышедшего с колонки, к количеству нанесенного на колонку вещества), $m_{\text{нан}}$ – масса вещества, нанесенного на колонку.

Электронные микрофотографии. 10 мкл дисперсии наносили на свежееионизированную коллодий-угольную пленку-подложку, через 3 мин избыток влаги удаляли фильтровальной бумагой и препараты контрастировали 1% водным раствором ацетата уранила в течение 2 мин. Избыток контрастера удаляли фильтровальной бумагой, препараты высушивали на воздухе и изучали в электронном микроскопе JEM-100СХ (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и приборном увеличении 10000–50000 х.

Часть работы выполнялась в рамках проекта РНП 2.1.1.3243 аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2006–2008 гг.)».

ЛИТЕРАТУРА:

1. Соловский, М. В. Соли антибиотика гентамицина с карбоксилсодержащими сополимерами N-винилпирролидона / М. В. Соловский, Н. В. Никольская, В. М. Денисов // Хим.-фарм. журн. – 2000. – Т. 34, № 11. – С. 21–24.
2. Boas, U. Dendrimers in drug research / U. Boas, P. M. Heegaard // Chem. Soc. Rev. – 2004. – Vol. 33, № 1. – P. 43–63.
3. Wells, J. Localized delivery to CT-26 tumors in mice using thermosensitive liposomes / J. Wells, A. Sen, S. W. Hui // Int. J. Pharm. – 2003. – Vol. 261. – P. 105–114.
4. Microemulsion formation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. I. Prescription design / K. Kawakami, T. Yoshikawa, Y. Moroto, E. Kanaoka, K. Takahashi, Y. Nishihara, K. Masuda // J. Control. Release. – 2002. – Vol. 81. – P. 65–74.
5. Study of the drug release mechanism from tyrophostin AG-1295-loaded nanospheres by *in situ* and external sink methods / M. Chorny, I. Fishbein, H. D. Danenberg, G. Golomb. // J. Control. Release. – 2002. – Vol. 83. – P. 401–414.
6. Sahoo, S. K. Nanotech approaches to drug delivery and imaging / S. K. Sahoo, V. Labhasetwar // Drug Deliv. Today. – 2003. – Vol. 8, № 24. – P. 1112–1120.
7. Trotta, M. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique / M. Trotta, F. Debernardi, O. Caputo // Int. J. Pharm. – 2003. – Vol. 257. – P. 153–160.
8. Gal-Fuzy, M. Cyclodextrin-stabilized volatile substances for inhalation therapy. / M. Gal-Fuzy, L. Szejtli, J. Harangi // J. Pharmazie. – 1985. – Vol. 39. – P. 558–559.
9. Lukyanov, A. N. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs / A. N. Lukyanov, V. P. Torchilin. // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2004. – Vol. 56. – P. 1273–1289.
10. Kushida, I. Improvement of dissolution and oral absorption of ER-34122, a poorly water-soluble dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor with anti-inflammatory activity by preparing solid dispersion / I. Kushida, M. Ichikawa, N. Asakawa // J. Pharm. Sci. – 2002. – Vol. 91, № 1. – P. 258–266.
11. Preparation of clofazimine nanosuspension for intravenous use and evaluation of its therapeutic efficacy in murine *Mycobacterium avium* infection / K. Peters, S. Leitzke, J. E. Diederichs, K. Borner, H. Hahn, R. H. Müller, S. Ehlers // J. Antimicrob. Chemother. – 2000. – Vol. 45. – P. 77–83.
12. Машковский, М. Д. Лекарственные средства, 15-е изд. / М. Д. Машковский. – М.: РИА «Новая волна», 2007. – С. 526.