Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева»

На правах рукописи

Трофимова Екатерина Сергеевна

Микроэмульсии на основе лецитина для медицинского применения

02.00.11 – Коллоидная химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук, доцент

Мурашова Н.М.

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений 5
Введение 6
1. Литературный обзор 11
1.1. Наночастицы и наноструктурированные системы как носители для доставки лекарственных веществ 11
1.1.1. Общая характеристика наноструктур для доставки лекарственных веществ 11
1.1.2. Мицеллы для доставки лекарственных веществ 22
1.1.3. Липосомы для доставки лекарственных веществ 24
1.1.4. Лиотропные жидкие кристаллы для доставки лекарственных веществ 28
1.1.5. Органогели для доставки лекарственных веществ 32
1.1.6. Микроэмульсии для доставки лекарственных веществ 36
1.2. Коллоидно-химические свойства лецитина 47
1.3. Микроэмульсии на основе лецитина 55
1.4. Заключение к главе 1 66
2. Методики экспериментов и анализов 68
2.1. Реактивы и материалы 68
2.2. Методики экспериментов 74
2.2.1. Приготовление образцов лецитин – соПАВ – органический растворитель – вода 74
2.2.2. Определение области существования микроэмульсии 75
2.2.3. Определение гидродинамического диаметра капель методом динамического светорассеяния 75
2.2.4. Вискозиметрия 76
2.2.5 Термогравиметрический анализ 76
2.2.6. Солюбилизация биологически активных веществ 76
2.2.7. Диализ 77

2.2.8. Кондуктометрия 79
2.2.9. Определение межфазного натяжения методом Вильгельми 79
3. Результаты и их обсуждение 81
3.1. Выбор соПАВ для формирования микроэмульсии лецитина 81
3.2. Влияние олеиновой кислоты на физико-химические свойства системы лецитин – олеиновая кислота - додекан – вода 82
3.2.1. Влияние олеиновой кислоты границу однофазной области в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода 83
3.2.2. Влияние олеиновой кислоты на вязкость системы лецитин – олеиновая кислота - додекан – вода 89
3.2.3. Влияние олеиновой кислоты на гидродинамический диаметр мицелл или капель микроэмульсии в системе лецитин - олеиновая кислота- додекан – вода. 91
3.3. Влияние замены компонентов системы 95
3.3.1. Влияние замены источника лецитина на границу однофазной области в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода 95
3.3.2. Влияние замены додекана органическими растворителями на солюбилизационную емкость системы по воде 97
3.4. Разработка состава и методики получения микроэмульсии для медицинского применения 104
3.4.1. Определение области существования микроэмульсии при различных соотношениях компонентов 105
3.4.2. Разработка методики получения микроэмульсии 111
3.4.3. Свойства разработанной композиции 113
3.5. Изучение скорости высвобождения водорастворимых веществ из микроэмульсии методом диализа 119
3.5.1. Разработка модельной системы 119
3.5.2. Сравнение скорости высвобождения водорастворимого красителя из микро- и наноструктурированных систем: обратной эмульсии и обратной микроэмульсии на основе лецитина 124

3.5.3. Сравнение скорости высвобождения водорастворимого красителя из двух наноструктурированных систем: обратной микроэмульсии и ламеллярных жидких кристаллов на основе лецитина 130
3.6. Получение опытной партии образцов на основе микроэмульсии лецитина и оценка их ранозаживляющего действия 139
4. Выводы 146
Библиографический список..... 148

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ПАВ	-	Поверхностно-активное вещество
соПАВ	-	Дополнительное поверхностно-активное вещество
ПЭГ	-	Полиэтиленгликоль
МЭ	-	Микроэмульсия
ЖК	-	Жидкие кристаллы
В/М	-	Вода-в-масле
М/В	-	Масло-в-воде
КПУ	-	Критический параметр упаковки
ГЛБ	-	Гидрофильно-липофильный баланс
БАВ	-	Биологически активные вещества
Д2ЭГФК	-	Ди-(2-этилгексил)фосфорная кислота
Д2ЭГФNa	-	Ди-(2-этилгексил)фосфат натрия
W	-	Отношение молярной концентрации воды к молярной концентрации поверхностно-активного вещества

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Разработка систем направленной доставки лекарственных веществ является одним из перспективных направлений применения наноструктурированных материалов для медицины. В качестве носителей для трансдермальной доставки лекарственных веществ могут выступать самоорганизующиеся наноструктуры фосфолипидов - лецитиновые органогели, жидкие кристаллы и микроэмульсии. Данные структуры – лиофильные коллоидные системы, они образуются самопроизвольно при смешивании компонентов и могут сохраняться неограниченно долго при условии неизменности химического состава и температуры. Наноматериалы для медицины на основе лецитина и других фосфолипидов обладают такими достоинствами, как биосовместимость, возможность солюбилизации биологически активных веществ с сохранением их активности, способность ускорять транспорт через кожу.

Известно, что в тройных системах лецитин – масло – вода существуют обратные мицеллы, а микроэмульсии не образуются. Для получения микроэмульсий на основе лецитина необходимо введение соПАВ. Чтобы разработать микроэмульсию для медицинского применения, нужно найти нетоксичные, биосовместимые соПАВ и органические растворители.

Целью работы является разработка новой микроэмульсионной системы на основе лецитина для медицинского применения, содержащей биосовместимые компоненты.

Для достижения цели необходимо найти решение следующих задач:

1. Изучить влияние соПАВ – олеиновой кислоты на физико-химические свойства системы лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода, в том числе ширину области существования органогеля или микроэмульсии, вязкость, гидродинамический диаметр агрегатов, структурный переход от геля из обратных цилиндрических мицелл к обратной микроэмульсии.

2. Изучить влияние замены высокоочищенного лецитина на фосфолипидный концентрат и додекана на масла, пригодные для медицинского применения, на область существования и свойства микроэмульсии лецитина, содержащей олеиновую кислоту.

3. Разработать состав и методику получения микроэмульсии на основе лецитина для медицинского применения, определить основные характеристики полученной микроэмульсии – вязкость, размер капель, температурную стабильность, солюбилизационную емкость по отношению к водо- и маслорастворимым лекарственным веществам, скорость высвобождения водорастворимых биологически активных веществ.

Научная новизна работы. Впервые изучен структурный переход от лецитиновых органогелей к микроэмульсии в присутствии биосовместимого соПАВ - олеиновой кислоты. Показано, что низкое содержание олеиновой кислоты ([олеиновая кислота]:[лецитин]<0,1) в системе лецитин - олеиновая кислота - додекан - вода приводит к расширению области существования и снижению вязкости органогелей лецитина. При высоком содержании олеиновой кислоты ([олеиновая кислота]:[лецитин]>0,6) в системе существует обратная микроэмульсия, с вязкостью порядка 0,01 Па·с, электропроводностью менее 0,11 См/м и размером капель менее 10 нм.

На фазовой диаграмме системы лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода установлена область существования обратной микроэмульсии при соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,8 и, для сравнения, лецитиновых органогелей при соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,1, при T=25ºC.

Установлено, что замена органического растворителя в микроэмульсии в системе лецитин – олеиновая кислота – органический растворитель – вода с додекана на смесь вазелинового масла, масла авокадо и масла чайного дерева, приводит к незначительному снижению максимально возможного содержания воды в микроэмульсии; максимум солюбилизационной емкости наблюдается при соотношениях [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,6-0,8.

Методом диализа показано, что скорость переноса водорастворимого красителя в физиологический раствор при T=37ºC из обратной микроэмульсии составила $14{,}3\cdot10^{-3}$ г/(м^2·ч), что выше, чем из обратной эмульсии ($9{,}9\cdot10^{-3}$ г/(м^2·ч)) и из ламеллярных жидких кристаллов на основе лецитина ($6{,}0\cdot10^{-3}$ г/(м^2·ч)).

Практическая значимость. Разработан и запатентован состав микроэмульсии на основе лецитина для трансдермальной доставки биологически активных веществ, содержащей фосфолипидный концентрат - 14,3-23,3 мас.%, вазелиновое масло - 29,6-34,7 мас.%, олеиновую кислоту - 5,0-7,1 мас.%, жирное растительное масло - 29,6-34,7 мас.%, эфирное растительное масло - 1,4-5,7 мас.% и воду, и разработана методика получения такой микроэмульсии.

Разработанная микроэмульсия может служить основой для медицинских средств с пролонгированным высвобождением лекарственных веществ, содержащих водорастворимые биологически активные вещества в концентрациях в десятые доли мас.%, а маслорастворимые - в концентрациях в единицы мас.%.

Показана возможность создания ранозаживляющего средства на основе разработанной микроэмульсии.

Положения, выносимые на защиту.

1. Структурный переход от обратных цилиндрических мицелл к обратной микроэмульсии при повышении концентрации олеиновой кислоты в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода; микроэмульсия существует при мольном соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]>0,6.

2. Состав микроэмульсии на основе лецитина для медицинского применения, содержащей в качестве соПАВ олеиновую кислоту, а также вазелиновое масло, жирное растительное масло, эфирное растительное масло и воду, и основные свойства разработанной микроэмульсии.

Личный вклад. Автор непосредственно принимал участие в разработке и планировании исследования, выполнении экспериментов (кроме опытов in vivo), анализе и интерпретации результатов, и формулировании выводов. Подготовка материалов для публикации проводилась совместно с научным руководителем.

Апробация работы и публикации. Основные результаты работы были представлены на X Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2014» (Москва, 28 – 31 октября 2014 г); Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Химическая технология функциональных наноматериалов» (Москва, 26 – 27 ноября 2015 г); VII Конференции Нанотехнологического общества России (Москва, 2 – 3 марта 2016 г); XII Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2016» (Москва, 18-21 октября 2016 г); VIII Конференции Нанотехнологического общества России (Москва, 31 марта 2017 г); XIII Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2017» (Москва, 16-20 октября 2017 г); Международной конференции со школой и мастер-классами для молодых учёных «Химическая технология функциональных наноматериалов» (Москва, 30 ноября – 1 декабря 2017); V International Conference on Colloid Chemistry and Physicochemical Mechanics (Санкт - Петербург, 10-14 сентября 2018 г); Научно – практической конференции «Актуальные аспекты химической технологии биологически активных веществ», (Москва, 25 мая 2018 г); XIV Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2018» (Москва, 30 октября – 2 ноября 2018 г); Международной конференции "Экстракция и мембранные методы в разделении веществ", посвященной 90-летию со дня рождения академика Пурина Б.А. (Москва, 3 декабря 2018 г); Научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития технологии материалов современной энергетики и наноматериалов» (Москва, 19 апреля 2019г).

По результатам работы опубликовано 3 статьи в журналах, входящих в международные базы данных, 1 патент РФ и 13 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из списка сокращений и условных обозначений, введения, 4 глав и библиографического

списка. Работа содержит 165 страниц, 35 таблиц, 54 рисунка. Библиографический список содержит 167 наименований.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Наночастицы и наноструктурированные системы как носители для доставки лекарственных веществ

1.1.1. Общая характеристика наноструктур для доставки лекарственных веществ

Разработка систем направленной доставки лекарственных веществ является одним из перспективных направлений применения наноструктурированных материалов для медицины. В качестве систем доставки могут выступать самоорганизующиеся наноструктуры, полимерные наноматериалы, супрамолекулярные структуры, а также другие наноструктуры, построенные из молекул поверхностно-активных веществ (ПАВ). В последние десятилетия особое внимание привлекают интеллектуальные липидные наноконтейнеры, такие как липосомы, твердые липидные наночастицы, мицеллы, лиотропные жидкие кристаллы, микро- и наноэмульсии благодаря их физическим и химическим свойствам – фото -, термо – и pH – чувствительности, способности образовывать структуры различной формы и возможности взаимодействовать с другими носителями, например, магнитными наночастицами [1, 2].

Наноносители с их уникальными физико-химическими и биологическими свойствами захватываются клетками легче, чем более крупные частицы; следовательно, они могут быть эффективно использованы в качестве инструментов доставки для доступных в настоящее время биоактивных соединений. Наноструктуры, используемые для медицинских целей, должны быть биосовместимыми (способными интегрироваться с биологическими системами, не вызывая иммунного ответа или отрицательного эффекта) и нетоксичными (безвредными для данной биологической системы) [3].

Идеальная система доставки лекарств обладает двумя особенностями: способность ориентироваться и контролируемое высвобождение лекарственного вещества. Целенаправленность обеспечивает высокую эффективность препарата и уменьшает побочные эффекты. Сокращение или предотвращение побочных эффектов также может быть достигнуто путем контролируемого высвобождения[4].

Развитие биомедицины, нанотехнологии и биотехнологии привело к созданию новых видов упаковки и доставки лекарственных средств, например, липосом, мицелл, наносом (наноразмерных липосом), а также многофункциональных наночастиц.

Одним из инструментов, позволяющим разобраться в большом объеме информации по рассматриваемой тематике и выявить наиболее перспективные направления исследований, является анализ динамики научных публикаций за достаточно длительный (не менее 15 лет) промежуток времени. Достоинствами этого метода является его быстрота и возможность охвата широкого круга научных направлений.

Среди наноматериалов и наноструктур, которые рассматриваются в качестве носителей для направленного транспорта биологически активных веществ, можно выделить следующие группы: самоорганизующие наноструктуры ПАВ, термодинамически нестабильные структуры ПАВ, полимерные наночастицы и наноструктуры, неорганические наночастицы, углеродные наночастицы, объекты супрамолекулярной химии.

1 группа - самоорганизующиеся (т.е. термодинамически стабильные) наностуктуры поверхностно-активных веществ - микроэмульсии, мицеллы, органогели из цилиндрических мицелл, например, лецитиновые органогели, лиотропные жидкие кристаллы (рис. 1.1.). Эти структуры являются традиционными объектами изучения в коллоидной химии.

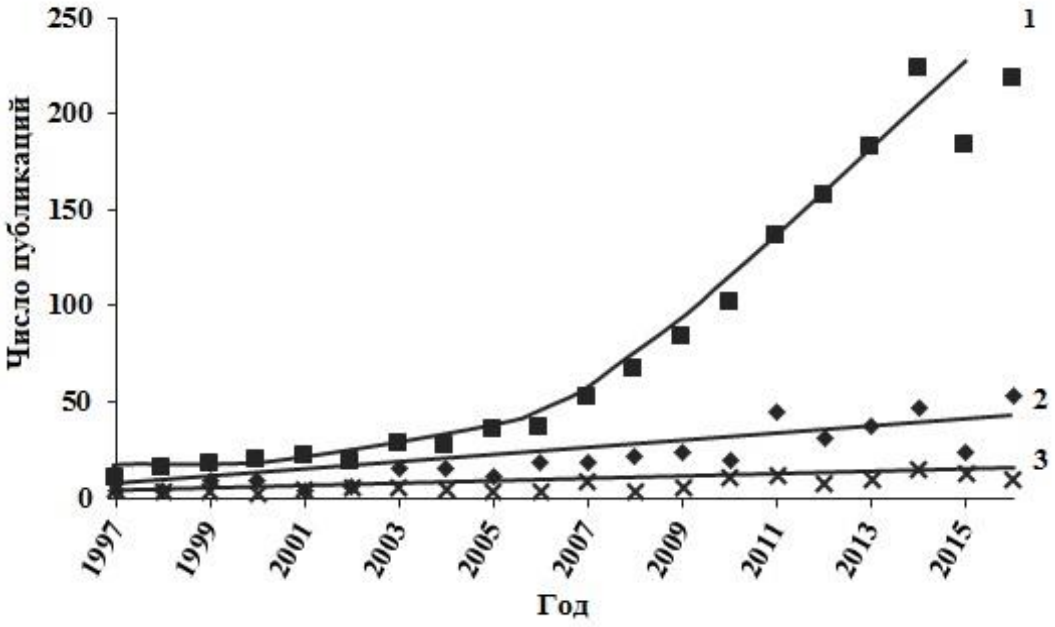

Рисунок. 1.1. Динамика публикаций по применению самоорганизующихся наноструктур поверхностно-активных веществ для адресной доставки лекарственных веществ. Поиск по сочетанию слов drug delivery и: 1 – micelle; 2 – microemulsion; 3 – lyotropic liquid crystal.

Благодаря спонтанной природе образования самоорганизующиеся материалы часто могут генерироваться с низким потреблением энергии и при температуре и значениях pH в физиологическом диапазоне. Механизм метода самосборки основан на слабой нековалентной связи, такой как гидрофобные, вандерваальсовые взаимодействия или ионные и водородные связи [3,5].

Наноструктуры данной группы являются термодинамически стабильными. Они обладают такими достоинствами, как простота методов получения, независимость свойств системы от условий смешивания компонентов, при постоянной температуре и составе данные структуры существуют неограниченно долго. Более подробно данные наноструктуры будут рассмотрены далее.

2 группа - термодинамически нестабильные структуры с участием поверхностно-активных веществ - наноэмульсии, множественные эмульсии,

твердые липидные наночастицы, липосомы, ниосомы, гексосомы, кубосомы (рис. 1.2).

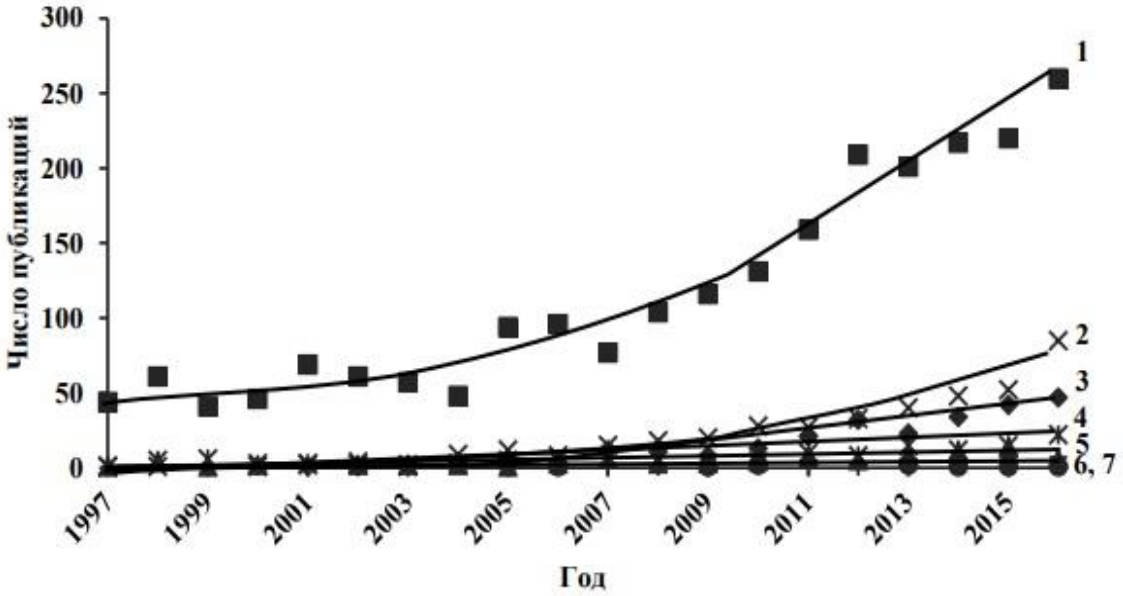

Рисунок 1.2. Динамика публикаций по применению термодинамически нестабильных наноструктур с участием поверхностно-активных веществ для адресной доставки лекарственных веществ. Поиск по сочетанию слов drug delivery и: 1 – liposomes; 2 – solid lipid nanoparticles; 3 – nanoemulsion; 4 – niosomes; 5 – multiple emulsion; 6 – hexosomes; 7 – cubosomes.

Так, например, твердые липидные наночастицы, обладающие маленьким размером частиц и большой площадью поверхности, играют решающую роль в улучшении локализации лекарственных веществ в месте действия через пассивное и активное нацеливание. Твердые липидные наночастицы находят применение в противораковой терапии при опухоли легких в качестве матрицы для загрузки препаратов. Показано, что при соотношении твердые липидные наночастицы: куркумин, равном 4:1, повышается растворимость, стабильность и биодоступность куркумина по сравнению с чистым куркумином [6, 7].

Также исследовано использование твердых липидных наночастиц олмесартана медоксомила, полученных методом горячей гомогенизации для

улучшения его пероральной биодоступности. Полученные частицы были нанометрового размера и сферической формы и имели долгосрочную стабильность. Исследование in vitro загруженных олмесартаном твердых липидных наночастиц показало профиль контролируемого высвобождения в течение 24 часов. Также были изучены скорость и степень распространения лекарственного средства с использованием диализного мешка, желудка крысы и ткани кишечника. Исследование показало, что высвобождение лекарственного средства из твердых липидных наночастиц значительно выше, чем из лекарственной суспензии. In vivo фармакокинетическое исследование показало рост биодоступности почти в 2,3 раза по сравнению с имеющимся в продаже составом. Таким образом, данная композиция – возможная альтернатива обычному пероральному составу при лечении гипертонии [8].

3 группа - полимерные наночастицы и наноструктуры - полимерные мицеллы, полимерные наночастицы, полимерные нанокапсулы, конъюгаты полимер – лекарственное вещество, дендримеры, белковые конъюгаты.

Биосовместимые полимеры не оказывают вредного воздействия на живые организмы вследствие их полного выведения, постепенного растворения или деструкции в организме. Среди используемых полимеров известны вещества как биологического происхождения, например, полисахариды и белки, так и синтетические биосовместимые полимеры, например, поли-D, L-молочная кислота, сополимер молочной и гликолевой кислот, поли-(бензил-L-аспартат), полилизин и другие полиаминокислоты, полиэтиленгликоль и ряд других веществ [9].

Долгое время использование дендримеров, синтетических полимеров, ограничивалось их неразлагаемостью, что зачастую вызывало местные побочные реакции, вызванные накоплением их в клетках и тканях. Последние исследования описывают разработку и применение биоразлагаемых дендримеров при терапии и диагностике опухолей, а также непосредственно в виде противовирусных лекарственных веществ и антибиотиков [10, 11].

4 группа - неорганические наночастицы - магнитные наночастицы, наночастицы золота, диоксида кремния, диоксида титана, фосфата кальция.

Магнитные наночастицы привлекли значительное внимание как носители для доставки лекарственных веществ благодаря их уникальным свойствам, таким как отличная биосовместимость, небольшой размер, низкая токсичность, высокая перестраиваемость поверхности и нацеливаемость приложением внешнего магнитного поля. Магнитные свойства таких наночастиц позволяют использовать их в качестве магнитных контрастных агентов в магнитно-резонансной томографии (МРТ); гипертермических агентов, когда магнитные частицы избирательно нагреваются путем приложения высокочастотного магнитного поля (например, при термической абляции или гипертермии опухолей); а также в качестве магнитных векторов, которые можно направлять посредством градиента магнитного поля в определенное место, например, в случае целевой доставки лекарственных веществ [12, 13].

В настоящее время известно о коммерциализации магнитных наночастиц, применяемых в качестве мишени для направленной доставки митоксантрона, включающих многодоменное магнетитовое ядро и сшитую матрицу крахмала с концевыми катионами, которые могут быть обратимо заменены положительно заряженным доксорубицином. Магнитные наночастицы уже успешно использовались на животных моделях при противоопухолевой терапии при раке печени [13].

Также известны результаты эксперимента in vivo, в котором использовались монодисперсные композитные наносферы Fe_3O_4 – наночастицы полистирола с большой объемной долей захваченного магнетита и флуорофоров. В этом исследовании магнитные наночастицы были успешно доставлены в сердце путем нацеливания с помощью магнитного поля. Магнитное нацеливание позволило локализовать монодисперсные наносферы Fe_3O_4 в миокарде сердца. Это увеличило количество доставленных к миоцитам сердца наносфер по сравнению с магнитными наносферами без магнитного нацеливания [14].

5 группа - углеродные наночастицы - фуллерены, углеродные нанотрубки, наноалмазы, графен.

Авторы работы [15] рассматривают применение графена и оксида графена для доставки биологически активных веществ в клетки. Для высвобождения действующего вещества, например, доксорубицина, предлагается использовать такие механизмы, как изменение pH и фототермическая реакция.

6 группа - объекты супрамолекулярной химии - каликсарены, кукурбитурилы, циклодекстрины, наноконтейнеры из цепочек ДНК.

Супрамолекулярные молекулы – «хозяева», которые в основном включают циклодекстрины, каликсарены, краун-эфиры и кукурбитурилы, часто используются в качестве строительных блоков для систем – носителей лекарственных средств. Многофункциональное использование циклодекстринов в наномедицине подчеркивается четырьмя важными свойствами. Во-первых, молекулы циклодекстринов способны защищать активное лекарственное вещество от специфических и неспецифических взаимодействий в физиологических средах. Во-вторых, они могут взаимодействовать с мембранами и дестабилизировать биологические мембраны для повышения проницаемости лекарств. В-третьих, у них есть возможность модулировать скорость и место высвобождения лекарств, то есть, их применение возможно при направленной доставке лекарственных веществ, и, в-четвертых, они нетоксичны. Циклодекстрины представляют собой полые усеченные конусообразные структуры, их внутренняя полость слегка гидрофобна, а внешняя – гидрофильна, следовательно, гидрофобные лекарственные средства могут быть инкапсулированы в полость циклодекстринов с образованием комплекса включения путем нековалентного взаимодействия без сложных химических реакций. В результате растворимость в воде и стабильность лекарств значительно улучшаются. Кроме того, побочные эффекты лекарств на организм человека значительно уменьшаются из – за экранирующего действия циклодекстринов на них. Циклодекстрины и основанные на них лекарственные средства находятся на

стадии клинических испытаний для применения в таких областях медицины, как генная инженерия и противораковая терапия, а также в качестве основы для пероральной доставки лекарств [16, 17].

Так, например, авторы работы [18] показывают, что циклодекстрины могут являться носителями бисфосфоната. Было продемонстрировано комплексообразование между бисфосфонатами и различными циклодекстринами. Результаты указывают на образование 1:1 комплекса циклодекстрин:бисфосфонат. В то время как бисфосфонаты связываются с различными циклодекстринами со слабым влиянием на размер полости в изученных производных циклодекстрина, длина боковой цепи бисфосфоната была основным параметром, контролирующим стабильность комплекса. Высокие значения константы образования показали, что циклодекстрины могут улучшить пероральную биодоступность бисфосфонатов и могут быть использованы в качестве новых многообещающих носителей.

Чтобы выявить наиболее перспективные и быстро развивающиеся подходы по применению наночастиц и наноструктур для направленного транспорта лекарственных веществ, было проведено сравнение динамики научных публикаций по двум показателям – среднему времени удвоения числа публикаций и общему количеству публикаций рассмотренный за период (табл.1.1). Общее число публикаций (N) дает возможность оценить объем накопленной научной информации по рассматриваемой проблеме, а среднее время удвоения (t_2, лет) характеризует интерес ученых к данному направлению исследований. Например, среднее время удвоения числа публикаций для ключевого слова drug delivery составляет 6,3 года, а для направления drug nanocarriers (наноструктурированные носители лекарственных веществ) – 1,9 лет. Средняя величина t_2 для двух указанных направлений составляет 4,1 года. Среднее количество публикаций N для всех рассмотренных в таблице 1.1 направлений исследований составляет 410. Основываясь на этих величинах, направления исследований можно разделить на 4 группы:

1 - медленный рост, большое число публикаций (t_2>4,1; N>400);

2 - быстрый рост, большое число публикаций (t_2≤4,1; N>400);

3 - быстрый рост, малое число публикаций (t_2≤4,1; N<400);

4 - медленный рост, малое число публикаций (t_2>4,1; N<400).

Таблица 1.1. Общее число публикаций и среднее время удвоения числа публикаций по применению наночастиц и наноструктур для адресной доставки лекарственных веществ

Drug delivery + Ключевое слово	**Время удвоения (t_2), лет**	**Общее число публикаций (N)**
1 группа: медленный рост, большое число публикаций		
polymer conjugates	4,7	642
cyclodextrins	4,7	685
microemulsion	5,4	415
protein conjugates	5,6	511
liposomes	7	2311
2 группа: быстрый рост, большое число публикаций		
magnetic nanoparticles	2,1	999
silica nanoparticles	2,4	416
polymer nanoparticles	2,9	1404
solid lipid nanoparticles	2,9	408
dendrimers	3,5	467
polymeric micelles	3,6	635
micelle	4,1	1631
3 группа: быстрый рост, малое число публикаций		
graphene	2,1	176
carbon nanotubes	2,2	348
nanoemulsion	2,6	257

gold nanoparticles	2,6	345
nanodiamonds	3,9	41
4 группа: медленный рост, малое число публикаций		
calcium phosphate nanoparticles	4,8	70
fullerenes	5	53
polymeric nanocapsules	5,5	72
niosomes	5,8	133
multiple emulsions	6	84
liquid crystals	8,5	130
cubosomes	9,6	32
calixarenes	18,8	11
nanoparticles of titanium dioxide	22,7	12
cucurbiturils	39,2	8
DNA origami	39,2	5
hexosome	55,4	9
DNA-nanocontainers	-	2

В первую группу, характеризующуюся относительно медленным ростом и большим числом публикаций, вошли наноструктуры, которые предложены для адресной доставки лекарственных веществ более 30 лет назад, такие как липосомы, мицеллы, микроэмульсии и конъюгаты лекарственных веществ с полимерами, в том числе с белками.

Согласно данным, приведенным в таблице 1.1, наиболее востребованы на сегодняшний день такие направления исследований, как применение для адресной доставки лекарственных веществ магнитных наночастиц, наночастиц диоксида кремния, наночастиц полимеров, твердых липидных наночастиц, дендримеров, полимерных мицелл и мицелл поверхностно-активных веществ. Можно прогнозировать, что в ближайшие 10-20 лет эти направления будут и

дальше развиваться, но, вероятно, с более низкой скоростью роста числа публикаций, которая характерна для направлений из первой группы.

Для ряда направлений из третьей группы (быстрый рост, малое число публикаций) в ближайшие 10-20 лет можно ожидать значительный рост общего числа публикаций, т.е. переход во вторую группу. Это будет обусловлено получением новых важных результатов, появления «прорывных» методов и технологий. Другие направления из этой группы, возможно, перестанут привлекать внимание, и ежегодное число публикаций по ним будет расти медленно или сокращаться.

Большинство направлений, выделенных в четвертую группу, являются поисковыми, они связаны с применением для адресной доставки малоизученных наноструктур. В ближайшие 10-20 лет часть из них, возможно, перестанет привлекать внимание ученых, и работы по ним прекратятся. Другая часть направлений из четвертой группы будет развиваться, но относительно медленно, без «взрывного» роста, характерного для третьей группы. Некоторые поисковые исследования, входящие сейчас в четвертую группу, приведут к получению интересных и важных результатов, привлекающих внимание ученых. Это приведет к быстрому росту числа публикаций по этим направлениям и их переходу в третью группу.

Таким образом, наночастицы и наноструктурированные системы пользуются повышенным интересом среди ученых, наблюдается экспоненциальный рост публикаций по данной тематике. Среди перспективных направлений можно выделить самоорганизующиеся наноструктуры ПАВ, такие как мицеллы, микроэмульсии и лиотропные жидкие кристаллы. Полученные результаты подтверждают актуальность выбранного направления исследований.

1.1.2. Мицеллы для доставки лекарственных веществ

Термин «мицелла» впервые был введен МакБейном в 1913 году. Мицеллы представляют собой наноразмерные структуры, образующиеся спонтанно из амфифильных молекул при определенной концентрации ПАВ – критической концентрации мицеллобразования. При этом образующиеся мицеллы могут быть разных типов, как показано на рис. 1.3. Образование мицелл в неводных средах обусловлено взаимодействием растворителя и углеводородных радикалов. В случае неполярных растворителей образуются обратные мицеллы, гидрофильное ядро которых образуют полярные группы, окруженные оболочкой углеводородных радикалов, при этом происходит понижение общей энергии системы. Средний диаметр сферических мицелл находится в диапазоне 1–10 нм [19 - 24].

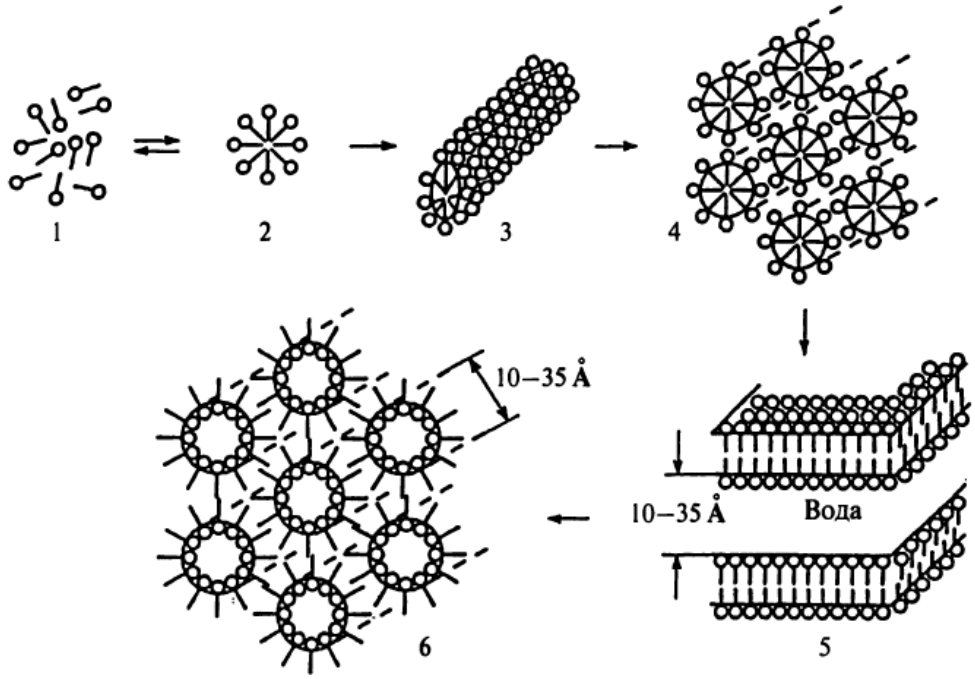

Рисунок 1.3. Структуры, образующиеся в результате действия ПАВ: 1 – мономеры ПАВ, 2 – мицелла, 3 – цилиндрическая мицелла, 4 – гексагонально упакованные цилиндрические мицеллы, 5 – ламеллярная мицелла, 6 – гексагонально упакованные капли воды в обратной мицеллярной системе [24]

Хорошо известно, что мицеллярные растворы способны влиять на растворимость и стабильность липофильных соединений в воде. Например, липофильные лекарственные средства могут быть солюбилизированы гидрофобной средой в мицеллах (прямые мицеллы), что позволяет повысить уровень биодоступности. Пример мицеллярной системы для переноса таксола был описан в [25]. В этом случае лекарство солюбилизировали в смешанных мицеллах, состоящих из холата натрия и фосфатидилхолина. После инъекции у мышей эта композиция проявляла противоопухолевую активность, сравнимую с противоопухолевым препаратом, но с таким преимуществом, как пониженная токсичность.

Также в работе [26] показана возможность увеличения растворимости фелодипина в смешанных мицеллярных системах на основе Tween 80 (полисорбат 80, полиэтиленгликоль сорбитан моноолеат) с увеличением концентрации Tween 80. Согласно полученным данным растворимость в мицеллах может превышать растворимость лекарственного средства в воде на 2-3 порядка и выше, что важно при создании систем доставки липофильных лекарств в биодоступной форме.

Мицеллярная система доставки эндонуклеазных агентов описана в патенте [27]. Мицеллы размером порядка 80 нм, образованные ПЭГ – липидами (липидами, соединенными с полиэтиленгликолем), предлагается использовать для адресной доставки эндонуклеазных агентов, например, транскриптов мРНК, в печень крыс при терапии заболеваний, связанных с редактированием генов, например, гепатита В.

Мицеллы находят применение и в косметике. Например, в патенте [28] описывается разработка мягкой мицеллярной воды для снятия макияжа, содержащей водорастворимое масло бабассу и дипропиленгликоль в количестве 15 – 30 мас.%. Также известно использование мицелл при анализе и выделении красящих пигментов в косметике [29].

Большое внимание при доставке лекарственных веществ привлекают полимерные мицеллы благодаря их способности к солюбилизации гидрофобных

молекул, небольшому размеру частиц, термодинамической стабильности раствора и хорошему высвобождению различных лекарственных веществ. Размер полимерных мицелл составляет от 10 до 100 нм. Критическая концентрация мицеллобразования (ККМ), аналогично низкомолекулярным поверхностно-активным веществам, является ключевым параметром при характеристике полимерных мицелл [4]. Кроме того, полимерные мицеллы имеют более крупное ядро, чем мицеллы поверхностно-активных веществ, что приводит к более высокой солюбилизирующей способности по сравнению с обычными мицеллами [30]. Тем не менее, в клиническом применении полимерных мицелл меньше опыта по сравнению с хорошо зарекомендовавшими себя липосомами.

Таким образом, мицеллярные системы уже нашли практическое применение как в медицине, так и в косметической промышленности, при этом они позволяют использовать различные пути введения: трансдермальный, внутривенный, пероральный. Дополнительным преимуществом мицеллярных систем является невысокая концентрация ПАВ.

1.1.3. Липосомы для доставки лекарственных веществ

Впервые липосомы были описаны в 1965 году британским профессором Бэнгхемом и его коллегами. При изучении липосом, полученных в лабораторных условиях, был сделан вывод о сходстве их с биологическими мембранами [31]. Липосомы представляют собой самоорганизующиеся структуры сферической формы, состоящие из липидного бислоя, одного или нескольких, окружающего водную сердцевину, способную включать для доставки различные виды биомолекул. В зависимости от используемого метода сборки размер везикул может составлять от десятков нанометров до микрометров [4, 31, 32]. Так, например, липосомы диаметром ~ 100 нм успешно используются для доставки химиотерапевтических агентов в опухоли [33]. Липосомы способны

инкапсулировать такие биологические макромолекулы, как ДНК и РНК, белки, пептиды и магнитные наночастицы [31].

В 1991 году был зарегистрирован липосомальный препарат «Липин», полученный на основе яичного лецитина, применяемый при терапии заболеваний, связанных с дыхательной недостаточностью и гипоксией, как у взрослых, так и у детей с рождения, при этом показана его высокая эффективность наряду с низкой токсичностью и отсутствием противопоказаний, кроме индивидуальной непереносимости компонентов [34, 35].

В первых исследованиях улучшенной активности липосомальных препаратов in vivo на животных использовали противораковый лекарственный препарат цитозин арабинозид. Было продемонстрировано значительное увеличение выживаемости мышей, являющихся носителями лейкоза L-1210. Данная система стала популярной «модельной системой» для тестирования влияния широкого спектра характеристик липосом на терапевтические результаты [36]. Результаты данного эксперимента привели к изучению использования липосомального амфотерицина В для лечения системных грибковых инфекций у пациентов, больных раком [37], а затем и к широким клиническим испытаниям.

В зависимости от состава и способа применения выделяют 5 типов липосом [31, 38]:

- простые липосомы, образованные фосфолипидами и холестерином. Они циркулируют в кровотоке в течение довольно короткого периода времени и накапливаются в печени и селезенке. Применяются для доставки противомикробных и цитотоксических препаратов путем пассивного нацеливания против микобактериальной инфекции, ВИЧ, грибковой инфекции;

- стерически стабилизированные липосомы, на поверхности которых находятся блоки полиэтиленгликоля (ПЭГ), уменьшающие распознавание липосом клетками ретикуло-эндотелиальной системы, увеличивая при этом время нахождения их в кровотоке. Благодаря этим свойствам с помощью стерически

стабилизированных липосом удается реализовать EPR-эффект, или эффект повышенной проницаемости и удерживания, на основе которого была разработана новая лекарственная форма лизомустина – ПЭГ-липосома лизомустина – и показана ее противоопухолевая активность при лейкозе L-1210 и карциноме легкого Льюис [39];

- направленные липосомы (иммунолипосомы). Нацеливание является еще одним возможным подходом, который достигается путем связывания нацеливающих лигандов таких как моноклональные антитела или их фрагменты, с поверхностью липосом. Таким образом, липосомы могут селективно поглощаться клетками, что важно для улучшения терапевтических результатов за счет повышения эффективности и снижения токсичности при нецелевом воздействии. Среди различных фрагментов, которые могут быть ковалентно или нековалентно прикреплены к поверхности липосом, наиболее широко применяются антитела и фрагменты антител, образующие иммунолипосомы. Такие модифицированные антитела привлекают большой интерес для их потенциального использования при доставке конкретных лекарств к раковым клеткам, генной терапии, доставке лекарств через гематоэнцефалический барьер, для биоаналитического анализа или молекулярной визуализации. Так, для обнаружения сальмонеллы, одного из наиболее важных пищевых патогенов у людей, была разработана иммунолипосома, позволяющая выявить S. Typhimurium при концентрации 10^3 клеток/мл [40 - 42];

- катионные липосомы используют для доставки генетического материала в определенные клетки. Так, в исследовании [43] показано, что катионные ПЭГ-липосомы имеют высокую эффективность трансфекции in vivo. Никаких значительных побочных эффектов по весу, состоянию шерсти, поведению или аппетиту мышей не наблюдалось, при этом продолжительность жизни мышей была увеличена по сравнению с группой, подвергавшейся воздействию Lipofectamin 2000. Кроме того, среди всех мышей не было различий в смертности или патологических изменениях сердца, печени, селезенки, легких и почек;

- липосомы, чувствительные к химическим и физическим стимулам, таким как изменения значения pH, температура, свет. Высокий интерес привлекают термочувствительные липосомы, предложенные в качестве метода улучшения ограниченной доступности опухолевых препаратов, связанных с обычными нетермочувствительными липосомами. Единственной липосомальной композицией, находящейся на стадии клинических испытаний, является ThermoDox - лизолипидсодержащая термочувствительная липосомная композиция доксорубицина, которая обеспечивает быстрое высвобождение лекарственного средства при нагревании до температур в диапазоне легкой гипертермии, предложенная для лечения гепатоцеллюлярного рака и рака молочной железы [38, 44].

Липосомы были исследованы для различных применений, таких как отображение опухоли и места заражения, для доставки генных лекарств и противоопухолевых препаратов, лечения инфекций различной природы, доставки препарата, используемого в терапии болезни Паркинсона – дофамина или, например, эллаговой кислоты, используемой при профилактике и лечении диабетических осложнений и атеросклероза [45 - 47].

Например, известен препарат «Липодокс» на основе яичного лецитина и доксорубицина гидрохлорида, применяемый в онкологии при терапии рака молочной железы, мягких тканей, легких и пищевода. Липосомальная форма препарата имеет гораздо более низкую токсичность по сравнению со свободной формой доксорубицина гидрохлорида, что позволило увеличить продолжительность курса химиотерапии при снижении уровня общей интоксикации организма, при этом относительно небольшой размер липосом, 150± 40 нм, обеспечивает лучшую доставку лекарственного вещества к очагу опухоли [35, 48]. Также было показано, что в клинических применениях липосомальные препараты наиболее перспективны благодаря их способности «пассивно» накапливаться в местах повышенной сосудистой проницаемости и способности уменьшать побочные эффекты инкапсулированных препаратов

относительно свободных лекарств. Это привело к общему увеличению терапевтического индекса, который измеряет эффективность по сравнению с токсичностью [4, 36].

Таким образом, липосомы остаются перспективными носителями для адресной доставки на протяжении десятков лет. Липосомальные формы обладают более низкой токсичностью по сравнению со свободной формой и находят практическое применение в терапии различных заболеваний.

1.1.4. Лиотропные жидкие кристаллы для доставки лекарственных веществ

Впервые жидкие кристаллы были обнаружены австрийским ботаником Фридрихом Рейнитцером в 1888 году при получении и изучении холестерилбензоата. Жидкие кристаллы представляют собой отдельную фазу конденсированных материалов, которая обычно образуется в физических условиях, которые лежат между теми, которые приводят к образованию твердых веществ и жидкостей, вследствие этого их также называют мезофазами. Молекулы, которые могут образовывать мезофазы, называются мезогенами. Зачастую они являются вспомогательными в составах лекарственных средств, это, например, поверхностно-активные вещества. Даже сами лекарственные соединения, к примеру, соли органических кислот или оснований с анизометрической молекулярной формой могут удовлетворять требованиям к образованию жидких кристаллов [49 – 51].

Достигнуть жидкокристаллического состояния можно либо путем увеличения температуры, либо путем добавления растворителя. Соответственно, образуются термотропные или лиотропные жидкие кристаллы. Как и в случае термотропных жидких кристаллов, изменение температуры также может вызывать фазовое превращение между различными мезофазами лиотропных жидких кристаллов, так называемый, полиморфизм [51].

Несмотря на то, что характерной структурой для липидов является бислой, порядка 30% всех мембранных липидов, например, фосфатидилэтаноламин, либо представляют собой неламеллярную структуру, либо индуцируют образование такой структуры в смешанных липидных системах. При этом полиморфизм липидов может коррелироваться широким спектром физиологических факторов, таких как гидратация, ионная сила, уровень pH, температура, длина углеводородного радикала, присутствие других липидов, что позволяет регулировать образование той или иной фазы [4, 52].

Так, например, в зависимости от гидратации дифильных веществ наиболее типичная последовательность фазовых переходов для лиотропных жилких кристаллов выглядит следующим образом (рис. 1.4) [4]:

$$\xleftarrow{\text{Гидратация растет}}$$
$$I_I \Leftrightarrow H_I \Leftrightarrow V_I \Leftrightarrow L \Leftrightarrow V_{II} \Leftrightarrow H_{II} \Leftrightarrow I_{II}$$

Рисунок 1.4. Последовательность фазовых переходов, где: I – мицеллярные кубические фазы, H – гексагональные трубчатые фазы, V – биконтинуальные кубические фазы, L – ламеллярные (смектические) фазы. Индексами (I) и (II) обозначают структуры прямого (масло-в-воде) или обратного (вода-в-масле) типа, соответственно [4].

Основная причина, вследствие чего лиотропные жидкие кристаллы на основе липидов приобретают большой интерес в последние годы, заключается в том, что, помимо того, что они являются потенциальной системой для адресной доставки лекарств, они также предоставляют нам альтернативу более безопасных и эффективных путей введения лекарственного средства с минимальной токсичностью. Лиотропные жидкие кристаллы, образованные путем самосборки амфифильных молекул в растворителе (обычно в воде), могут в основном быть

классифицированы на ламеллярные (L_α), кубические (V_{II}) и гексагональные (H_{II}) фазы в соответствии с их различным внутренним строением. Среди них фазы V_{II} и H_{II} являются наиболее часто используемыми носителями лекарственных веществ [53 - 55].

В таблице 1.2 представлены фазовые состояния липидов в физиологических условиях и возможные переходы при изменении параметров окружающей их среды [52, 56].

Таблица 1.2. Полиморфные фазовые превращения мембранных липидов [52, 56]

Липид	**Структура**	
	в физиологических условиях	**при изменении параметров**
Фосфатидилхолин	L	H_{II}, при низкой гидратаций и высокой температуре
Фосфатидилэтаноламин	H_{II}	L, при pH ≥ 8,5 и низкой температуре
Фосфатидилсерин	L	H_{II}, при pH ≤ 3,5
Фосфатидилинозитол	L	–
Фосфатидилглицерин	L	H_{II}, высокая температура при высокой концентрации соли

Начиная с публикации первого патента в 1984 году [57], в котором описан способ получения композиции для контролируемого высвобождения биологически активных веществ, состоящей из дифильных веществ, способных образовывать в водной среде кубические жидкокристаллические фазы, жидкокристаллические системы на основе липидов были широко исследованы в качестве потенциальных систем доставки лекарственных веществ.

Так, в работе [54] описывается возможность применения гексакональной и кубической жидкокристаллической фаз на основе фитантриола для трансдермальной доставки транс-циннамальдегида. Оценка in vitro и in vivo проницаемости через кожу, а также исследование фармакодинамики составов в сравнении с «Вольтарен эмульгель» показали возможность использования данных жидкокристаллических составов как эффективных систем доставки для транс-циннамальдегида. Также известны примеры применения жидкокристаллических структур лецитина для трансдермальной доставки таких лекарственных веществ, как аскорбилпальмитат и гидрокортизон [58, 59].

В патенте [60] описывается жидкокристаллическая композиция, включающая в состав фосфолипидный концентрат «Мослецитин» в количестве 48,9-77,3 мас.%, жирное и эфирное растительные масла в количестве 7,1-23,8 и 2,1-6,7 мас.%, соответственно, и воду. При подборе компонентов авторы патента обращают особое внимание на такие свойства, как гипоаллергенность, противовоспалительный, смягчающий и ранозаживляющий эффекты. Полученная композиция обеспечивает высокую солюбилизационную емкость, как по воде, так и по биологически активным веществам, таким как метилурацил, аскорбиновая кислота, токоферола ацетат.

Жидкие кристаллы обладают широкой областью существования, в них можно вводить сопоставимые количества, как воды, так и масла. В жидкие кристаллы в системе фосфолипидный концентрат – вазелиновое масло – вода можно ввести от десятых до нескольких процентов масло- и водорастворимых лекарственных веществ. Снижение концентрации фосфатидилхолина в фосфолипидном концентрате с 60 до 22 мас.% приводит к расширению области существования жидких кристаллов и образованию более высоковязкой структуры. [61].

В исследовании [62] показана возможность применения жидкокристаллических структур не только трансдермально, но и для проникновения сквозь слизистые оболочки, например, для лечения

открытоугольной глаукомы. Было проведено исследование потенциала жидкокристаллической системы для глазной доставки нитрата пилокарпина. Исследование проницаемости роговицы ex vivo показало, что коэффициент проницаемости жидкокристаллических наночастиц, загруженных препаратом, в 2,05 раз выше, чем у коммерческих глазных капель, также было установлено снижение внутриглазного давления кроликов по сравнению с применением коммерческого лекарственного средства и физиологического раствора.

Таким образом, лиотропные жидкие кристаллы могут быть использованы для косметических и медицинских средств наружного применения. В качестве систем адресной доставки биологически активных веществ перспективны жидкие кристаллы на основе ПАВ природного происхождения, например, лецитина и других фосфолипидов.

1.1.5. Органогели для доставки лекарственных веществ

В последние десятилетия особый интерес в качестве системы доставки лекарственных веществ вызывают органогели, представляющие вязкоупругие системы, которые состоят из непрерывной жидкой фазы, органического растворителя, минерального или растительного масла, иммобилизованного в трехмерной сети. Эта сеть состоит из низкомолекулярных органических гелеобразователей с молекулярной массой до 3000 Да или полимерных структур, собранных в виде волокон [63, 64]. При этом низкомолекулярные гелеобразователи способны образовывать мицеллярные органогели, представляющие собой пространственную структуру из переплетенных между собой цилиндрических мицелл, например, лецитиновые органогели [65] и органогели из микрокристаллов, как описано в работе [66]. Поиск биосовместимых компонентов для образования органогелей привел к созданию органогелей на основе лецитина, биосовместимого, биоразлагаемого и нетоксичного природного компонента. Впервые лецитиновые органогели были

описаны в 1988 году Скартаззини [67]. Он описывал процесс получения лецитиновых органогелей в различных органических растворителях при добавлении определенного количества воды в исходную смесь лецитина и органического растворителя в пределах молярного соотношения вода: лецитин, равного от 1 до 12. Переизбыток воды приводил к разрушению структуры геля. При солюбилизации небольшого количества воды, молекулы лецитина ассоциируются в сферическую обратную мицеллярную форму, которая при дальнейшем добавлении воды трансформируется в цилиндрические мицеллярные агрегаты. При этом молекулы воды первоначально преимущественно связываются с кислородом фосфатной группы. Таким образом, они выступают в качестве связующего звена между двумя соседними молекулами лецитина, образуя линейные сети водородных связей между полярными молекулами и фосфатными группами молекул лецитина. Дальнейшее увеличение количества воды приводит к образованию длинных и гибких червеобразных мицеллярных структур [68 - 70]. Схематически гелеобразование в системах с можно показать следующим образом (рис. 1.5) [68]:

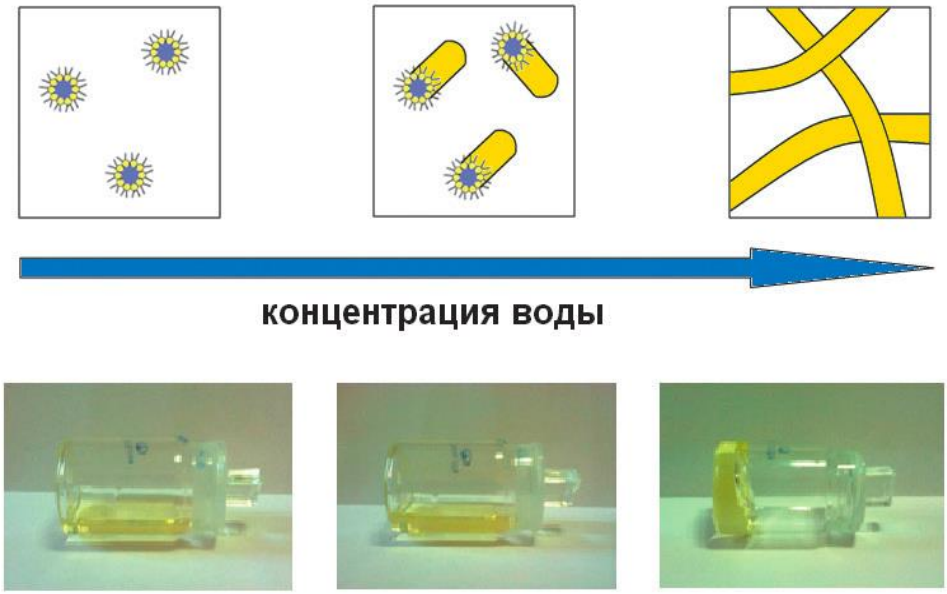

Рисунок 1.5. Изменение структуры обратных мицелл при образовании лецитинового органогеля [68]

Изучалось применение органогелей как платформы доставки лекарств и вакцин различными способами, такими как трансдермальное, пероральное, офтальмологическое и парентеральное введение. К сожалению, несмотря на хорошо зарекомендовавшие себя результаты, успех перевода в фактические клинические продукты затруднялся из-за отсутствия биосовместимости для этих составов; большинство используемых органических растворителей оказались токсичными. Однако использование в последнее время биосовместимых, биоразлагаемых органических растворителей и гелеобразователей привело к получению фармацевтически приемлемых, нетоксичных и экологически чистых носителей для доставки лекарственных веществ [71]. Так, например, разработан органогель на основе соевого масла и 12-гидроксистеариновой кислоты, применимый для доставки таких лекарственных веществ, как липофильный ибупрофен и гидрофильный офлоксацин [72]. Изучена скорость высвобождения данных препаратов из водной суспензии и органогеля. Данные свидетельствуют о том, что контролируемое высвобождение лекарств из органогеля приводило к постепенному и продолжительному всасыванию в кишечнике препаратов in vivo независимо от того, существует ли лекарственное средство в органогеле в твердом или растворенном состоянии. Результат говорит о том, что органогели являются перспективными носителями с контролируемым высвобождением не только липофильных, но и гидрофильных препаратов.

Лецитиновые органогели существуют в системе лецитин - органический растворитель - вода в широкой области концентраций лецитина (от десятых долей до десятков мас. %) при узком диапазоне концентрации воды (сотые и десятые доли процента). На треугольной фазовой диаграмме системы лецитин - органический растворитель - вода область существования лецитиновых гелей представляет узкую полосу, вытянутую вдоль оси «лецитин - органический растворитель» (рис. 1.6) [65].

Гелеобразование начинается при определенном соотношении молярных концентраций воды и лецитина W_0=[H_2O]:[лецитин] и сопровождается резким

возрастанием вязкости системы и появлением упругих свойств. При этом органогели проявляют свойства максвелловского, или вязкоупругого, тела. Когда концентрация воды превышает предел существования органогеля ($W_{кр}$), вязкость системы падает, и наблюдается ее разделение на две или три фазы [65, 67, 73, 74].

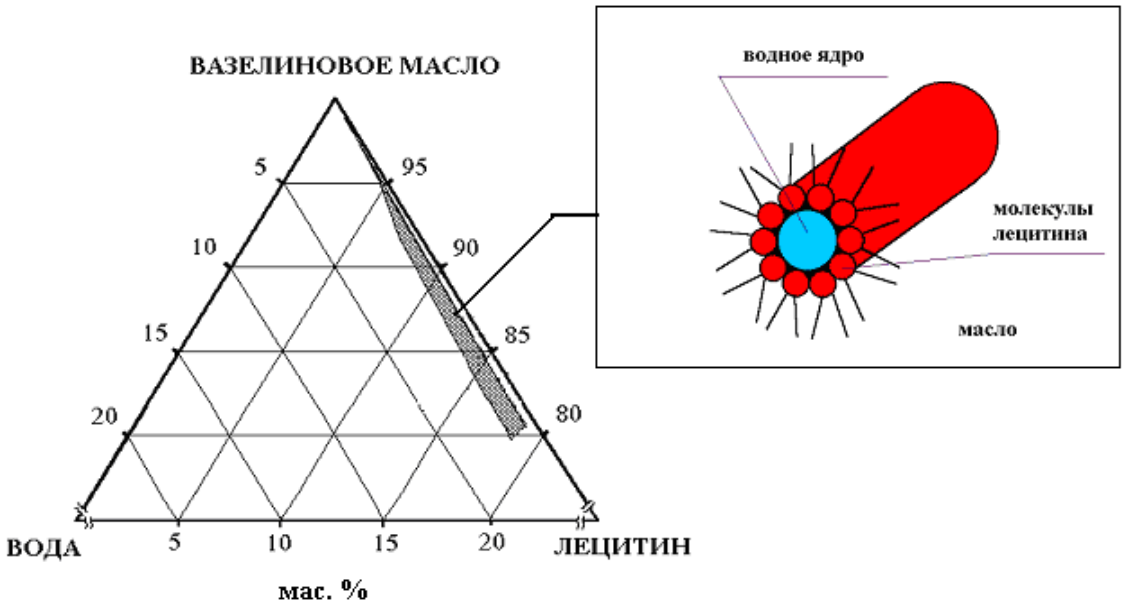

Рисунок 1.6. Фрагмент фазовой диаграммы системы лецитин – вазелиновое масло – вода [65]

Введение поверхностно-активных веществ, в том числе фосфолипидов, в систему лецитин – органический растворитель – вода вызывает либо изменение области существования геля и снижение его вязкости, либо препятствует гелеобразованию. Фосфатидилэтаноламин, ближайший структурный аналог фосфатидилхолина, препятствует образованию лецитинового органогеля, когда его содержание в смеси двух фосфолипидов превышает 50 мас.%. Введение фосфатидилэтаноламина в концентрации менее 50 мас.% сдвигает область существования органогеля в сторону больших концентраций воды [75]. Введение лизофосфатидилхолина в концентрации 0,7 мас.% вызывает снижение вязкости

лецитинового органогеля в 100 раз, в то время как введение фосфатидилглицерина незначительно влияет на вязкость гелей [76].

В качестве основы для косметических и медицинских препаратов разработана система лецитин – вазелиновое или высоковакуумное масло – вода, способная солюбилизировать как водорастворимые биологически активные вещества, так и маслорастворимые. Исследования in vivo на кроликах показали эффективность использования препарата на основе лецитинового органогеля при профилактике тромбозов и нарушений кровообращения. В качестве действующих компонентов были использованы такие липофильные вещества, как α-токоферола ацетат и омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты. Наноструктуры лецитина являлись трансдермальным переносчиком биологически активных веществ [68, 77, 78].

Таким образом, органогели могут применяться для контролируемого высвобождения как липофильных, так и гидрофильных лекарственных веществ. При разработке медицинских и косметических препаратов органогели на основе лецитина являются наиболее предпочтительными, благодаря биосовместимости, биоразлагаемости и отсутствию токсических эффектов.

1.1.6. Микроэмульсии для доставки лекарственных веществ

Последние исследования в области разработки носителей для доставки лекарственных веществ демонстрируют возросший интерес к микроэмульсиям - термодинамически устойчивым изотропным дисперсиям несмешивающихся между собой жидкостей, содержащим капли нанометрового размера, стабилизированные поверхностно-активным веществом (веществами), в качестве возможных систем адресной доставки [19, 24]. Характерный размер капель микроэмульсий находится в диапазоне от нескольких нанометров до десятков нанометров. Исследование микроэмульсий стимулировалось большим потенциалом для практических применений, связанным с их физическими,

химическими и физико-химическими свойствами, такими как термодинамическая стабильность, оптическая изотропия, простота приготовления, возможность включения как липофильных, так и гидрофильных препаратов [79].

Концепция микроэмульсий была введена еще в 1940-х годах Хоаром и Шульманом, которые создали прозрачный однофазный раствор путем титрования молочной эмульсии гексанолом. Впоследствии Шульман и его коллеги ввели термин микроэмульсия. Однако более точное определение микроэмульсии было введено Даниэльсоном и Линдманом в 1981 году, определившим микроэмульсию как «систему воды, масла и амфифила, которая представляет собой один оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор» [80, 81].

На практике ключевое различие между эмульсиями и микроэмульсиями заключается в том, что первые, хотя они и могут проявлять превосходную кинетическую стабильность, являются термодинамически нестабильными и в конечном итоге будут расслаиваться. Другое важное отличие касается их внешнего вида: эмульсии мутные, а микроэмульсии прозрачные. Кроме того, существуют четкие различия в способе их получения, поскольку эмульсии требуют большого расхода энергии, а микроэмульсии - нет. Последний пункт имеет очевидные последствия при рассмотрении относительной стоимости коммерческого производства двух типов систем [80, 82].

Существует несколько типов классификаций микроэмульсий. Например, микроэмульсионные системы в зависимости от относительных соотношений составляющих компонентов могут быть трех типов: масло-в-воде, вода-в-масле и бинепрерывные (рис. 1.7) [83 - 85].

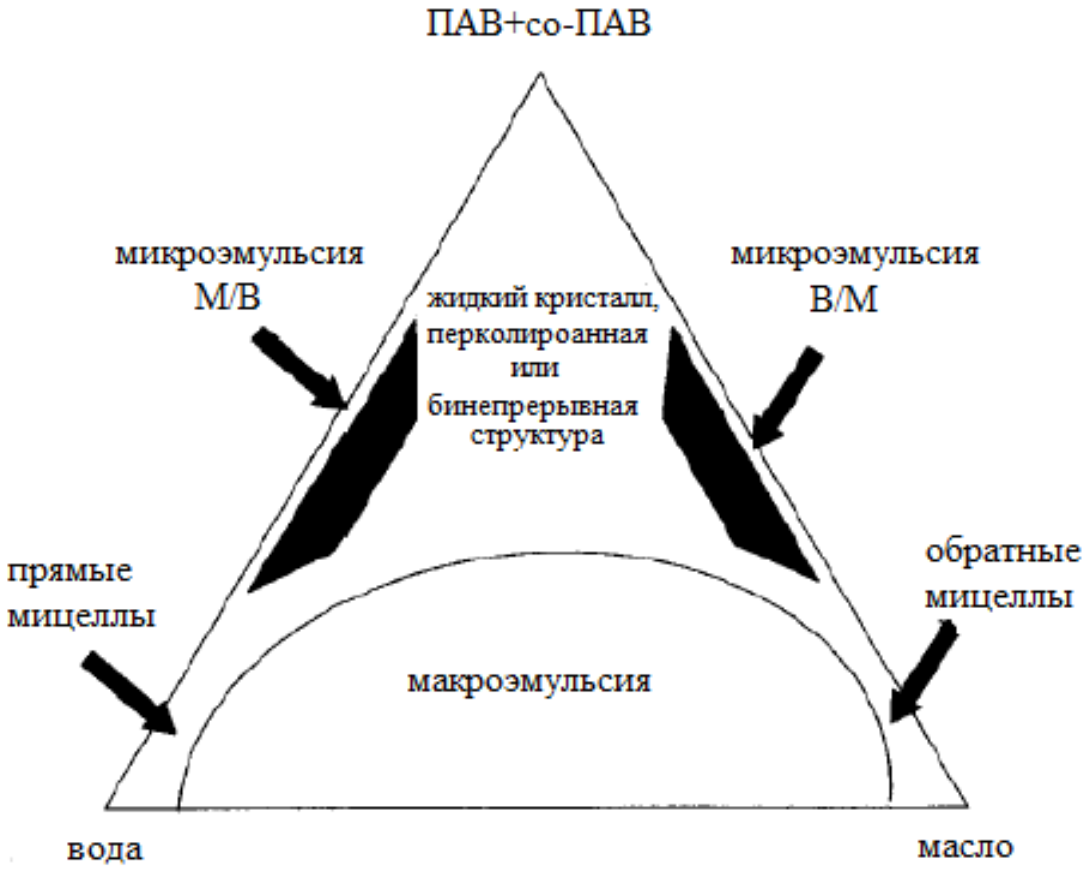

Рисунок 1.7. Обобщенная диаграмма, описывающая область существования однофазной и двухфазных систем [85]

В микроэмульсии типа масло - в - воде капли масла, окруженные пленкой ПАВ/со-ПАВ, диспергированы в воде. Гидрофильные полярные головки обращены к внешней фазе воды, а липофильные неполярные хвосты ориентированы к внутренней фазе масла. Микроэмульсии типа вода - в – масле представляют собой капли воды, рассеянные во внешней масляной фазе. Их называют обратными из-за их ориентации полярных головок и цепей жирных масел. Бинепрерывные микроэмульсии образуются при примерно равном количестве масляной и водной фаз. И масло, и вода существуют как непрерывная фаза. Они проявляют неньютоновскую текучесть и пластичность, что помогает при местной и внутривенной доставке лекарственных веществ [24, 81, 84, 85].

При низкой концентрации поверхностно-активного вещества существует последовательность равновесий между фазами, которую описывает Винзоровская теория классификации микроэмульсий. Четыре основных типа равновесия фаз были определены Винзором [81-86] (рис. 1.8):

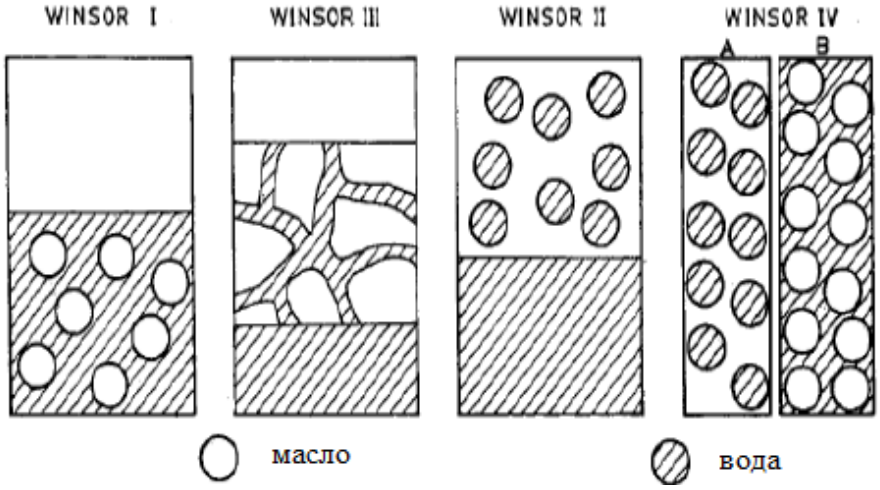

Рисунок 1.8. Схематичное изображение классификации микроэмульсий по Винзору; А – обратная микроэмульсия, В – прямая микроэмульсия [85]

Winsor I: система представляет собой две фазы, нижняя микроэмульсионная фаза в равновесии с верхним избытком масла;

Winsor II: две фазы, верхняя микроэмульсионная фаза в равновесии с избытком воды;

Winsor III: средняя микроэмульсионная фаза, называемая двунепрерывной, в равновесии с верхним избытком масла и нижним избытком воды.

Winsor IV: система представляет собой однородную микроэмульсию.

Взаимопревращение между вышеупомянутыми фазами может быть достигнуто путем корректировки пропорций составляющих, например, увеличения концентрации электролита для ионогенных ПАВ и изменения температуры для неионных ПАВ (рис. 1.9) [81, 85 - 87].

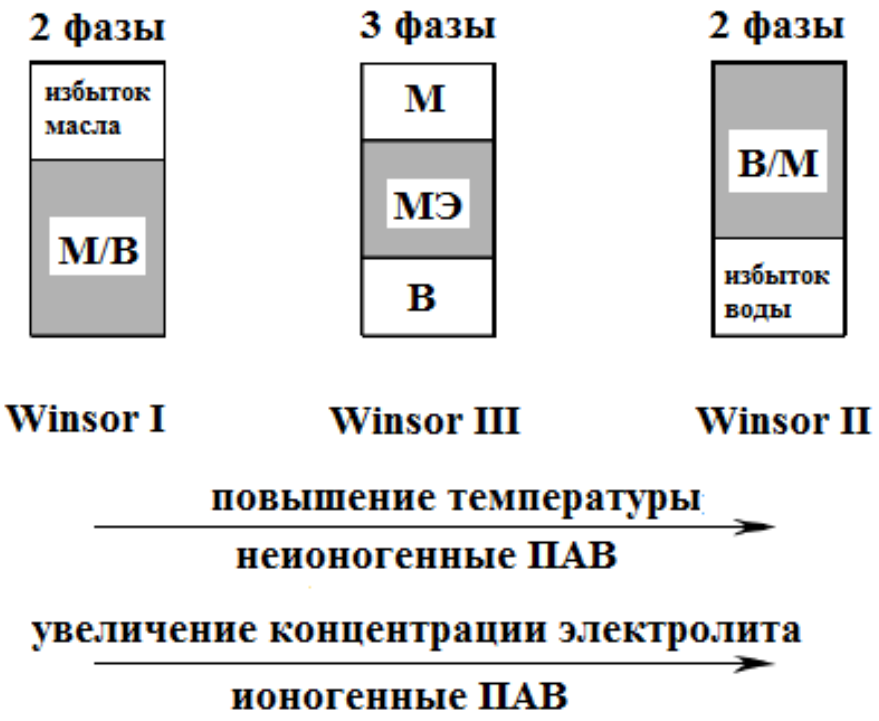

Рисунок 1.9. Последовательности фазовых переходов в классификации Винзора и влияние концентрации ПАВ и температуры [85]

Предложено несколько теорий формирования стабильных микроэмульсий, например, теория межфазного взаимодействия, солюбилизационная и термодинамическая теории.

Первой попыткой объяснить образование микроэмульсий была ***теория межфазной, или смешанной, пленки***. В 1955 году Боукотт и Шульман объяснили значение межфазной пленки. Самопроизвольное образование капель микроэмульсии происходит из-за образования двойной пленки ПАВом и соПАВом на границе раздела масло-вода. Взаимодействие пленки на границе раздела приводит к снижению межфазного натяжения до очень низких значений, вплоть до нуля и даже до отрицательных значений. Образовавшаяся пленка находится в равновесии по отношению, как к маслу, так и к воде, и рассматривается как жидкая и двойственная по природе, имеющая двумерное

давление растекания $П_i$, которое определяет межфазное натяжение. Межфазное натяжение математически выражается уравнением (1.1) [84]:

$$\gamma_i=\gamma_{o/w}-П_i, \quad (1.1)$$

где γ_i - межфазное натяжение на границе раздела, $\gamma_{o/w}$ - межфазное натяжение масло/ вода без пленки, а $П_i$ - давление растекания.

В случае если избыточное количество ПАВ и соПАВ адсорбируется для создания границы раздела, давление растекания может быть больше, чем $\gamma_{o/w}$. В результате межфазное натяжение становится отрицательным, и происходит спонтанное образование капель микроэмульсий. Однако наличие отрицательного межфазного натяжения является мгновенным, и в состоянии равновесия оно становится равным нулю или достигает низкого положительного значения, способствующего стабильности капель микроэмульсии [84, 85, 87].

Согласно ***теории солюбилизации***, предложенной Шинодой и Фрибергом, микроэмульсии рассматриваются как набухшие мицеллярные сферические системы. Связь между обратными мицеллами и микроэмульсией типа вода-в-масле была продемонстрирована Рансом и Фрибергом в 1977 году. Связь между микроэмульсионной областью и областью обратных мицелл была проиллюстрирована добавлением р-ксилола к области обратных мицелл тройной системы пентанола, воды и додецилсульфата натрия. При достижении определенной концентрации р-ксилола, наблюдалось образование прозрачной области микроэмульсии типа вода-в-масле [84, 85, 88].

Поверхностно-активные вещества могут образовывать обратные мицеллы в неполярных органических средах при солюбилизации воды. Различие между микроэмульсией и обратной мицеллой заключается в том, что в обратной мицелле количество воды мало и ограничивается максимальной гидратационной способностью гидрофильной головки ПАВа. Соотношение [вода]:[поверхностно-активное вещество], обозначаемое как «W», является значением, которое

определяет, образуется ли обратная мицелла или микроэмульсия. Значение «W» и образующаяся система соотносятся следующим образом: W<10 – образуется система обратных мицелл, W>10-15 - микроэмульсия, точкой перехода можно принять W = 15 [21, 79, 84].

Термодинамическая теория объясняет образование микроэмульсии без соПАВ. Она описывает изменения свободной энергии, рассчитываемой по уравнению (1.2), необходимой для образования микроэмульсии [81, 82, 84]:

$$\Delta G_m = \Delta G_1 + \Delta G_2 + \Delta G_3 - T\Delta S, \quad (1.2)$$

где ΔG_m - изменение свободной энергии, необходимой для образования микроэмульсии, ΔG_1 - изменение свободной энергии вследствие увеличения общей площади поверхности, ΔG_2 - изменение свободной энергии вследствие взаимодействия между каплями, ΔG_3 - изменение свободной энергии вследствие адсорбции поверхностно-активного вещества на границе раздела масло / вода из объема масла или воды, а ΔS - увеличение энтропии из-за рассеивания небольших капель масла.

Свободная энергия, участвующая в образовании микроэмульсии, также зависит от снижения поверхностного натяжения поверхностно-активным веществом и изменения энтропии системы. Упрощенное соотношение между свободной энергией, межфазным натяжением и энтропией выражается уравнением, представленным ниже (1.3) [81, 82, 84]:

$$\Delta G_f = \gamma_{AB}\Delta A - T\Delta S_{conf}, \quad (1.3)$$

где ΔG_f - изменение свободной энергии образования, γ_{AB} - поверхностное натяжение границы раздела масло/вода, ΔA - изменение площади поверхности

при микроэмульгировании, ΔS_{conf} - изменение энтропии системы, а T-температура, при которой осуществляется микроэмульгирование.

Следует отметить, что при образовании микроэмульсии изменение ΔA очень велико из-за большого количества образовавшихся очень маленьких капелек. Первоначально исследователи предполагали, что для образования микроэмульсии требовалось отрицательное значение γ, хотя бы кратковременное, теперь признается, что, хотя значение γ всегда положительно, оно очень мало (порядка долей мН / м), и компенсируется энтропийным компонентом [19, 80, 84].

Ребиндером и Щукиным сформулирован критерий самопроизвольного диспергирования из макрофазы (1.4), или образования термодинамически стабильной системы [82]:

$$\sigma \leq \sigma_{\text{кр}} = \gamma \frac{k_{\text{Б}} T}{a^2}, \tag{1.4}$$

для выражения в числовом значении его можно представить в следующем виде (1.5):

$$RS = \frac{a_{\text{ч}}}{b} = \sqrt{\frac{\gamma k_{\text{Б}} T}{b^2 \sigma}} \approx 5 \div 10, \tag{1.5}$$

где, γ – безразмерная постоянная, *a* – средний размер образующихся частиц, $k_{\text{Б}}$ – константа Больцмана, *b* – средний размер частиц.

При соблюдении данного критерия образуется лиофильная система, размер частиц которой заметно превышает молекулярные размеры, и при этом не наблюдается тенденция к дальнейшему диспергированию до молекулярных размеров [82].

Таким образом, спонтанное образование термодинамически стабильной микроэмульсии, происходит при отрицательной свободной энергии образования и уменьшении поверхностного натяжения, сопровождаемого благоприятным изменением энтропии [19, 80, 82, 84].

Для того чтобы понимать и иметь возможность предсказать тип образующейся в процессе микроэмульгирования системы, можно рассчитать

такие параметры, как критический параметр упаковки (КПУ) поверхностно-активного вещества, или форм – фактор, спонтанная кривизна монослоя ПАВ и значение гидрофильно – липофильного баланса (ГЛБ). Критический параметр упаковки является геометрической характеристикой ПАВ и рассчитывается по формуле (1.6) [79 - 81, 89]:

$$КПУ = v / (al_{max}), \quad (1.6)$$

где объем поверхностно-активного вещества обозначен *v*, площадь поверхности головок – *a* и длина вытянутого углеводородного радикала – *l*.

Если упаковочный параметр имеет значения между 0 и 1, то формируется микроэмульсия типа масло-в-воде, тогда как микроэмульсия вода-в-масле формируется, когда КПУ>1. Когда КПУ=1, наблюдается ламеллярная жидкокристаллическая фаза или бинепрерывные микроэмульсии [83, 86, 89].

Также можно отличить тип микроэмульсии по значению спонтанной кривизны монослоя ПАВ, уравнение для расчета которой выглядит так (1.7) [81]:

$$H = 1 / a, \quad (1.7)$$

где а - радиус разделяющей поверхности.

Таким образом, если Н отрицательно, это способствует образованию микроэмульсии типа «вода - в - масле», а положительное значение указывает на образование системы типа «масло - в - воде». При использовании поверхностно-активных веществ с критическим параметром упаковки, приблизительно равным единице, и при почти равных объемах воды и масла, значение спонтанной кривизны приближается к нулю, а капли сливаются в бинепрерывную структуру. В случае использования для образования микроэмульсии неионных ПАВ фактором, влияющим на спонтанную кривизну, является температура. При

низких температурах наблюдаются положительные значения спонтанной кривизны, при высоких – отрицательные [79, 81, 84].

Также, параметром, влияющим на структуру микроэмульсии, является соотношение гидрофильных и гидрофобных групп молекул поверхностно-активных веществ, то есть их гидрофильно – липофильный баланс. Параметр ГЛБ неионных поверхностно-активных веществ для оценки по шкале Гриффина, созданной в 1949 году, рассчитывают по формуле (1.8) [90 - 93]:

$$\mathrm{H} = 20\frac{M_h}{M}\ , \tag{1.8}$$

где M_h— молярная масса гидрофильной части, M — молярная масса всей молекулы.

Результат оценивается по шкале от 0 до 20, где 0 - полностью липофильная молекула, а 20 - полностью гидрофильная. Так, например, микроэмульсии вода-в-масле образуются при значениях ГЛБ в диапазоне 3–6, а масло-в-воде – 8–18. Поверхностно-активные вещества с величинами ГЛБ=7-9 считаются смачивающими агентами и поэтому обладают свойствами обеих групп. Иногда можно использовать сразу два или несколько поверхностно-активных веществ для достижения желаемого эффекта стабилизации [83 – 85, 94, 95].

В случае использования смеси поверхностно-активных веществ ГЛБ смеси определяют по формуле (1.9) [19]:

$$\text{ГЛБ}_{\text{см}} = \frac{W_A\text{ГЛБ}_A + W_B\text{ГЛБ}_B}{W_A + W_B}, \tag{1.9}$$

где: W_A – количество ПАВ А с известным значением ГЛБ, W_B – количество ПАВ В с известным значением ГЛБ.

Наличие капель размером единицы и десятки нанометров обеспечивает высокую удельную поверхность границы «масло-вода», это существенно ускоряет диффузию лекарственных веществ из капель микроэмульсии по сравнению с традиционными эмульсиями. Микроэмульсии обладают значительно большим, по сравнению с мицеллярными системами, внутренним объемом капель, это обеспечивает большую солибилизационную емкость таких систем. Сравнение микроэмульсий с другими наноструктурами позволяет сделать вывод о преимуществе их над традиционными эмульсиями и мицеллярными системами [96].

До настоящего времени известно не очень много успешных примеров использования микроэмульсий в качестве носителей для доставки лекарственных веществ. В первую очередь это связано с ограничениями, связанными с выбором компонентов, использование некоторых ПАВ требуют наличия амина или короткоцепочечного спирта в качестве соПАВ, что приводит к раздражениям кожи или аллергии [97].

Пример замены спирта другими ингредиентами описан в [98]. Группа исследователей из Индии описывает структуру, строение, свойства и переходы микроэмульсии, состоящей из Tween 80 (полиэтиленгликоль сорбитан моноолеат), бутиллактата в качестве нетоксичного соПАВ, применение которого хорошо известно в фармацевтике, изопропилмиристата и воды. Была построена фазовая диаграмма данной системы с довольно обширной областью однофазной микроэмульсии, изучены свойства системы и переход от микроэмульсии вода-в-масле, к бинепрерывной и к микроэмульсии типа масло-в-воде.

В литературе приведено несколько работ, описывающих использование микроэмульсий в качестве систем доставки цитотоксических алкалоидов. Например, в случае камптотецина была описана микроэмульсия, состоящая из ПАВ – Labrasol® (каприлокапроил полиоксил-8 глицериды), соПАВ – Plurol isostearate® (полиглицерил-3 диизостеарат), масла – изостеарил изостеарата и воды. Стабильность состава оценивали в течение 30 дней при комнатной

температуре. После этого периода не наблюдалось никаких изменений в цвете, разделения фаз или осаждения камптотецина. В этом отношении микроэмульсия оказалась оптимальной композицией для камптотецина. Растворимость камптотецина в микроэмульсии была почти в 23 раза выше, чем в воде [99].

Таким образом, благодаря присутствию водной и органической фаз, микроэмульсии являются «универсальными растворителями», способными одновременно включать гидрофильные и гидрофобные вещества. Микроэмульсии, являясь термодинамически стабильными системами, обладают большим, по сравнению с мицеллярными системами, внутренним объемом капель, что также является преимуществом при доставке биологически активных веществ. Применение микроэмульсий в качестве носителей для адресной доставки зачастую ограничивается необходимостью подбора нетоксичного, биосовместимого ПАВ. В качестве такого ПАВ может выступать лецитин.

1.2. Коллоидно-химические свойства лецитина

В фармацевтической промышленности применение поверхностно-активных веществ обусловлено их эмульгирующей и стабилизирующей способностью, возможностью оказывать влияние на скорость и степень высвобождения лекарственных веществ, нацеливание при адресной доставке, а также стабильность получаемых систем. Наиболее часто применяют неионные поверхностно-активные вещества. Например, применение Tween-80 в качестве ПАВ позволяет увеличивать скорость высвобождение ципрофлоксацина. Span-60 (сорбитан моностеарат) в качестве поверхностно-активного вещества образует систему с пролонгированным высвобождением доксорубицина. Также применение полиоксиэтилированных ПАВ показано при местной доставке офтальмологических препаратов [94, 100 – 103].

Наиболее благоприятными ввиду отсутствия, либо незначительного, токсичного воздействия на организм человека, а также благодаря

антибактериальным, противогрибковым и противовирусным свойствам, широкое применение при создании лекарственных средств и систем адресной доставки в качестве компонентов коллоидных систем, модификаторов поверхности и солюбилизаторов находят природные биосовместимые поверхностно-активные вещества, например, липопротеины, моноолеаты, софоролипиды [104-105]. Для применения в медицине и косметической промышленности перспективными являются такие природные ПАВ, как полярные липиды. На их основе создаются препараты, например, для пероральной и трансдермальной доставки лекарственных веществ [106 - 108].

Фосфолипиды, изучаемые с начала 18 века, стали коммерчески доступными в виде лецитина в начале прошлого столетия. Их основным коммерческим источником на сегодняшний день является соя. Фосфолипиды присутствуют во всех живых клетках, являясь частью клеточных мембран. Обладая исключительной биосовместимостью и амфифильностью, фосфолипиды находят широкое применение в системах доставки. Это обусловлено их способностью повышать биодоступность малорастворимых лекарственных веществ, изменять профиль поглощения и высвобождения препарата, защищать активные вещества от разрушения в желудочно-кишечном тракте и снижать побочные эффекты [109, 110].

Все липиды, в состав которых входит фосфатидная кислота, называются фосфолипидами. Фосфолипиды представляют собой цвиттер-ионные поверхностно-активные молекулы, которые включают полярную головную группу и липофильный хвост, что позволяет использовать их в качестве смачивателей, солюбилизаторов и эмульгаторов. При pH=7 молекула лецитина нейтральна. Молекула фосфолипида содержит основную цепь глицерина, которая этерифицирована в положениях 1 и 2 жирными кислотами и в положении 3 фосфатом (рис. 1.10) [89, 111 – 113].

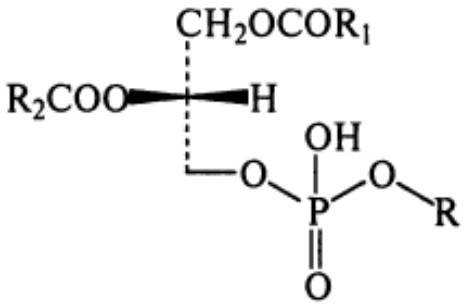

Рисунок 1.10. Общая формула глицерофосфолипидов, где R_1 и R_2 – остатки жирных кислот; R – полярная группа [112]

В типичных мембранных фосфолипидах фосфатная группа этерифицируется дополнительным спиртом, например, в фосфатидилхолине – холином, в фосфатидилэтаноламине – этаноламином и в фосфатидилглицерине – глицерином. Наиболее распространенным фосфолипидом является фофатидилхолин, или лецитин (от греч. «λέκιθος» - желток), который в большом количестве содержится в желтках яиц птиц. В зависимости от того, с каким атомом глицерина связана фосфорная кислота (α — с углеродом в крайнем положении, β — в срединном) различают два вида фосфатидилхолина (рис. 1.11):

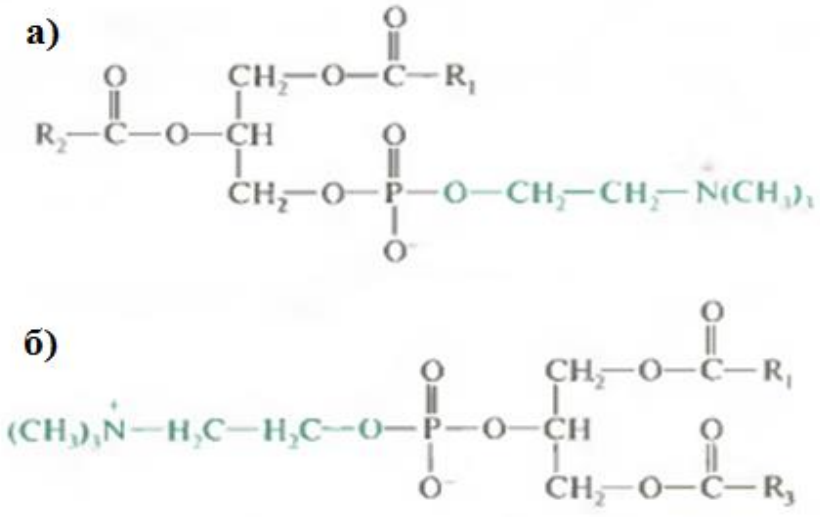

Рисунок 1.11. Структурная формула: а) α – фосфатидилхолина, б) β – фосфатидилхолина [113]

В Фармакопее США лецитин описан как «сложная смесь нерастворимых в ацетоне фосфатидов, состоящая в основном из фосфитидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола в сочетании с различным количеством других веществ, таких как триглицериды, жирные кислоты и углеводы, выделенные из источника сырого растительного масла. Он содержит не менее 50% нерастворимых в ацетоне веществ». На данный момент «лецитин» стал торговой маркой смеси фосфолипидов, обычно используемой в пищевой и косметической промышленности [113].

Составы фосфолипидов и содержание остатков жирных кислот в лецитине зависят от источников сырья. В качестве примера приведены составы фосфолипидов и жирнокислотный состав для соевого, подсолнечного и яичного лецитина (таблицы 1.3 и 1.4) [111].

Таблица 1.3 Содержание фосфолипидов в зависимости от источника лецитина, мас.% [111]

Фосфолипид	**Лецитин**		
	Соевый	Подсолнечный	Яичный
Фосфатидилхолин	20-22	20-26	64-79
Фосфатидилэнатонамин	16-22	4-10	2
Фосфатидилинозитол	13-16	15-19	-
Фосфатидная кислота	5-10	2-5	-
Лизофосфатидилхолин	<3	<3	2
Лизофосфатидилэтаноламин	-	-	1
Сфингомиелин	-	-	2

Таблица 1.4 Жирнокислотный состав лецитинов в зависимости от источника, мас.% [111]

Жирная кислота	**Лецитин**		
	Соевый	Подсолнечный	Яичный
С 14:0	0,1	0,1	0,2
С 16:0	21,0	16,0	31,0
С 18:0	4,7	5,3	15,0
С 18:1	9,9	21,0	24,0
С 18:2	57,0	54,0	16,0
С 18:3	5,0	0,2	-
С 20:0	0,1	0,3	-
С 22:0	0,4	1,5	-
С 20:4	-	-	5,6
С 22:4	-	-	0,3
С 22:5	-	-	0,2
С 22:6	-	-	2,2

Независимо от источника происхождения, основным фосфолипидным компонентом лецитина является фосфатидилхолин.

В зависимости от степени очистки лецитин подразделяют на сырой, очищенный и фракционированный, или химически чистый (обогащенный преимущественно одной фракцией) (табл. 1.5) [114].

Таблица 1.5. Состав лецитина в зависимости от степени очистки, мас.%. [114]

Фракции	Содержание фракций, %		
	Лецитин		
	сырой	очищенный	х.ч.
Фосфатидилхолины	15	23	95–98
Фосфатидилинозиты	13	19	–
Фосфатидилэтаноламины	14	21	–
Фосфатидилсерины	10	15	–
Свободные фосфатиды	4	6	–
Гликолипиды	9	14	–
Нейтральные жиры	35	Около 2	Около 5

Существует два основных физических состояния лецитинов: жидкое и воскообразное твердое. Фракционированный лецитин обычно представляет собой грануляты желтоватого цвета. Лецитин хорошо растворим в углеводородах и жирах, нерастворим в ацетоне и холодной воде. Жидкие лецитины могут иметь вязкость от 5000 до 100 000 сП в зависимости от условий обработки и растворителей. Продукты с низкой вязкостью получают путем добавления жирных кислот и растительного масла, в зависимости от требуемой функции и стабильности. Содержание воды также имеет большое значение. Уровень воды выше 1 мас.% увеличивает вязкость, в конечном итоге, до пластического состояния. Неочищенные лецитины представляют собой воскообразное твердое вещество, которое может быть измельчено до стабильных сыпучих гранул различного размера [109 - 115].

Для характеристики лецитина как ПАВ важное значение имеет параметр ГЛБ. Для фракционированного, преимущественно содержащего фосфатидилхолин, и коммерческих модифицированных лецитинов числа ГЛБ представлены в таблице 1.6 [114].

Таблица 1.6. Величины гидрофильно-липофильного баланса лецитинов [114]

Лецитин	**Величина ГЛБ**
Фракционированный (обогащенный фосфатидилхолином)	2
Стандартный	4
Обезжиренный	5
Гидролизованный	8
Обезжиренный гидролизованный	9
Ацетилированный гидролизованный	10

Молекула лецитина способна к мицеллообразованию при концентрации выше ККМ. Изменение межфазного натяжения в присутствии лецитина фиксируется с концентрации порядка 10^{-7} моль/л [21, 116, 117].

В работе [118] определены ККМ синтетических фосфатидилхолинов путем измерения поверхностного натяжения (табл. 1.7):

Таблица 1.7. Критическая концентрация мицеллообразования некоторых фосфатидилхолинов в водном растворе (10^{-2} М фосфатный буфер) [118]

Соединение	ККМ, мг/мл
Дигексаноилфосфатидилхолин	6,9
Дигептаноилфосфатидилхолин	0,71
Диоктаноилфосфатидилхолин	0,12-0,16
Динонаноилфосфатидилхолин	0,016

Также проводилось сравнение значений ККМ для фосфолипидного концентрата с содержанием лецитинов 70 мас.%, полученного из яичных желтков, в различных физиологических средах: дистиллированной воде, физиологическом растворе (0,89% р-р NaCl) и фосфатном буфере (pH=7,4). ККМ определяли

оптическим, кондуктометрическим и вискозиметрическим методами. Критическая концентрация мицеллообразования составила $5{,}43\cdot10^{-4}\pm0{,}732\cdot10^{-4}$ моль/л для дистиллированной воды; $4{,}76\cdot10^{-4}\pm0{,}342\cdot10^{-4}$ моль/л для физиологического раствора и $9{,}37\cdot10^{-4}\pm0{,}803\cdot10^{-4}$ моль/л для фосфатного буфера [119].

Изучение ККМ в органических растворителях описано в [120]. Значения ККМ L-α-дипальмитоилфосфатидилхолина, выделенного из яичного желтка, определяли в метиловом и этиловом спиртах различной объемной концентрации, результаты исследования представлены в табл. 1.8.

Таблица 1.8. Критическая концентрация мицеллообразования L-α-дипальмитоилфосфатидилхолина в спиртах [120]

Растворитель	**ККМ, моль/л**
Этанол, 93,4 %	$4{,}9\cdot10^{-2}$
Этанол, 80 %	$1{,}3\cdot10^{-2}$
Этанол, 70 %	$1{,}2\cdot10^{-2}$
Метанол, 93 %	$2{,}3\cdot10^{-2}$
Метанол, 84%	$6{,}1\cdot10^{-2}$

Амфифильное строение молекулы лецитина способствует образованию липосом и нелипосомных наноструктур, таких как обратные мицеллы, лиотропные жидкие кристаллы, мицеллярные лецитиновые органогели, эмульсии и микроэмульсии (в присутствии соПАВ).

Липосомы нашли широкое применение в медицине, фармацевтике и косметике как носители лекарственных препаратов и биологически активных веществ. Нелипосомные наноструктуры лецитина также находят широкое применение в медицине и косметике. Среди них особое внимание в последнее десятилетие привлекают микроэмульсии [121].

Таким образом, лецитин, являясь природным биосовместимым и не токсичным ПАВ, перспективен для создания носителей с различной структурой для доставки лекарственных веществ. Особый интерес для медицины и косметической промышленности представляют самоорганизующиеся наноструктуры лецитина, такие как микроэмульсии.

1.3. Микроэмульсии на основе лецитина

Для достижения наилучшего фармакологического эффекта при наименьшем количестве побочных эффектов лекарственные вещества должны доставляться в целевые участки без значительного распространения в нецелевые районы. Микроэмульсионные системы как новые носители для доставки лекарств обеспечивают замедленное или контролируемое высвобождение для трансдермального, местного, перорального, назального, глазного и других путей введения лекарств. Микроэмульсионная доставка лекарств является практической платформой доставки для улучшения специфичности мишени, терапевтической активности и снижения токсичности лекарств [122].

Особенно интересны с точки зрения применения в медицине микроэмульсии на основе лецитина. Как носитель лекарственных веществ, микроэмульсии на основе лецитина имеют ряд важных достоинств. Благодаря наличию доменов различной полярности они обладают огромным потенциалом для использования в качестве средств доставки для биологически-активных веществ как гидрофильной, так и липофильной природы. Также, вследствие термодинамической стабильности микроэмульсий, они имеют ряд технологических преимуществ, такие как простые методы получения, зависимость свойств только от состава системы и их независимость от условий смешивания компонентов, возможность длительных сроков хранения. Лецитин и другие фосфолипиды являются природными поверхностно-активными

веществами, они не токсичны, являются биосовместимыми, способны ускорять транспорт веществ через кожу.

В тройных системах лецитин – масло – вода, т.е. в отсутствии второго ПАВ (соПАВ), лецитин не образует микроэмульсии. Для тройных систем лецитин – алифатический углеводородный растворитель – вода характерно образование других наноструктур – лиотропных жидких кристаллов и лецитиновых органогелей [123].

Первые исследования условий образования микроэмульсий в многокомпонентных системах с лецитином приведены в работе [97] Шиноды с соавторами в 1991 году. Лецитин способствует образованию гомогенной микроэмульсии в присутствии спирта, такого как пропанол или этанол. Содержание спирта оказывает большое влияние на тип образующейся микроэмульсии: микроэмульсия в равновесии с избытком масла или воды или микроэмульсия в равновесии с обоими растворителями. При низком содержании спирта образуется микроэмульсия, насыщенная масляной фазой, при высоком содержании спирта – водой. В случае пропанола и гексадекана для образования гомогенной микроэмульсионной фазы необходимо введение 1-2,5 мас. % лецитина. В случае смешивания равных объемов двух растворителей требуется порядка 2,5% лецитина. Добавление спирта в качестве соПАВ приводит к резкому понижению межфазного натяжения. В работе также показано, что винзоровские структуры и гомогенная микроэмульсия образуются лишь в присутствии этанола и пропанола.

Также показано образование микроэмульсий в системе лецитин – соПАВ – изопропилмиристат – вода, в которой качестве соПАВ использованы алифатические кислоты, спирты, амины, алкандиолы и эфиры диэтиленгликоля с длиной алкильной цепи 4-6 атомов углерода. Образование микроэмульсий объясняют снижением жесткости монослоя лецитина и изменением критического параметра упаковки молекул ПАВ в присутствии перечисленных выше веществ [123, 124].

В работе [125] было показано влияние введения лецитина в микроэмульсионную систему, содержащую Peceol® (глицерил моноолеат), этанол и воду, разработанную для инкапсулирования гидрофильных препаратов. Установлено, что добавление этанола разупорядочивает молекулярную структуру Peceol®, а введение лецитина в систему повышает солюбилизационную емкость. Также было обнаружено, что солюбилизация воды в четырехкомпонентной системе зависит от соотношения этанол: лецитин. Было установлено оптимальное соотношение этанол: лецитин – 40:60 (рис. 1.12). Критическая концентрация этанола, необходимая для образования стабильной микроэмульсии составила 1,6 – 1,7 мас.%.

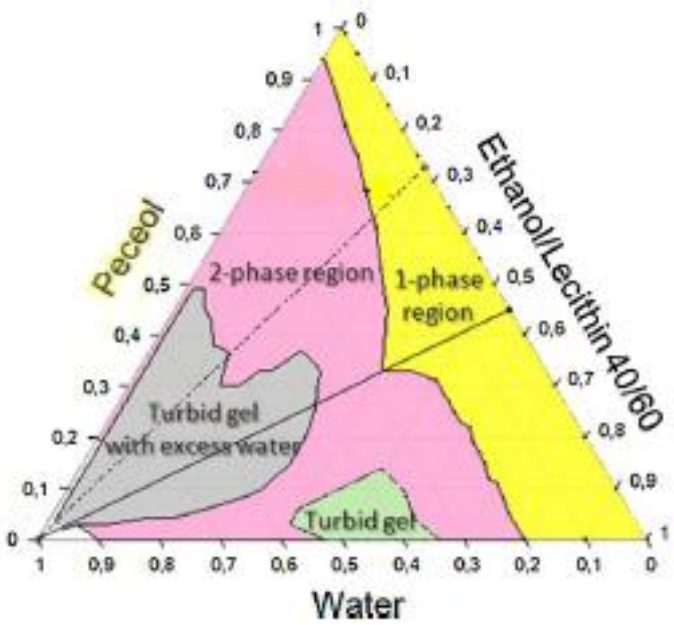

Рисунок 1.12. Фазовая диаграмма для системы Peceol® - лецитин/этанол – вода при соотношении этанол/лецитин = 40/60 и температуре 25ºС [125]

Смешивание с гидрофильным ПАВ Triton X–100 (октилфенол этоксилат) и липофильным соПАВом - бутиллактатом позволяет получить низковязкие микроэмульсионные системы с расширенной однофазной областью по сравнению с отдельно взятыми поверхностно-активными веществами, демонстрирующие максимальную солюбилизационную емкость [126]. Рассмотренная в работе

микроэмульсия состоит из лецитина и Triton X–100, используемых в качестве ПАВ, бутиллактата - в качестве соПАВ, изопропилмиристата - в качестве масляной фазы и воды. Было показано, что система, содержащая в качестве ПАВа смесь лецитин и Triton X-100, позволяет получить большую однофазную область по сравнению с отдельно взятым лецитином, такое смешивание поверхностно-активных веществ обуславливает повышенную солюбилизационную емкость системы по воде (рис. 1.13). Измерения физико-химических свойств полученной системы показывают независимость от pH и от присутствия электролитов, с дополнительным преимуществом того, что система является менее вязкой, что делает ее пригодной для фармацевтического применения.

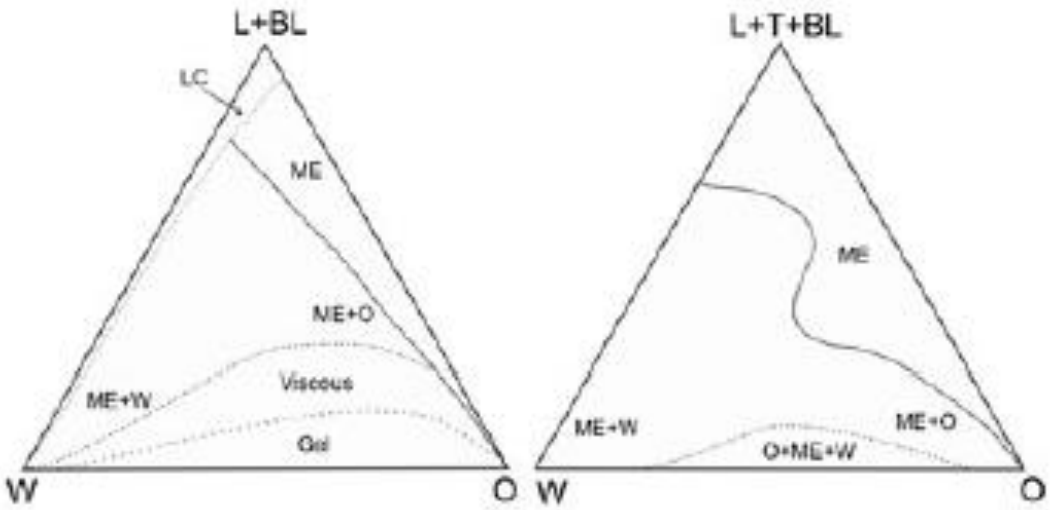

Рисунок 1.13. Фазовая диаграмма системы лецитин (L)/ Triton X-100 (T)/ бутиллактат (BL) – изопропилмиристат – вода. Соотношение ПАВ / со-ПАВ фиксировано и составляет 1: 2 (мас./мас.). W, O, ME и LC означают водная, масляная, микроэмульсионная и жидкокристаллическая фаза соответственно [126]

Известно несколько микроэмульсионных систем на основе лецитина, пригодных для применения в качестве носителей для адресной доставки, например, внутривенной и парентеральной, Амфотерицина B [127-129]. Так, в работе [127] была изучена система, содержащая лецитин – Tween 80 –

изопропилмиристат – воду при различных массовых соотношениях Tween 80: лецитин от 1:1 до 6:1. Было изучено влияние этого соотношения на область существования микроэмульсии и на основании данных по солюбилизационной емкости, вязкости, размеру капель и стабильности системы в течение 7 суток установлено оптимальное соотношение, равное 2:1 (рис. 1.14).

Рисунок 1.14. Фазовая диаграмма системы полисорбат 80 – лецитин – изопропилмиристат (ИПМ) – вода, где L_1 – область существования микроэмульсии масло-в-воде при массовом соотношении полисорбат 80:лецитин равном 2:1 [127]

Исследованная система представляет собой микроэмульсию типа масло-в-воде, общее содержание смеси ПАВ в которой равно 35 мас.%. Размер капель, определенный методом динамического светорассеяния, составляет порядка 20 нм. Исследование реологических свойств системы подтверждает неньютоновский характер текучести системы [127].

В статье [128] описывается получение микроэмульсии, включающей в себя лецитин, Brij®96V (полиоксил 10 – олеиловый эфир) в качестве соПАВ,

изопропилмиристат и воду, и сравнение ее с коммерческим препаратом Фунгизоном. Была определена область существавния микроэмульсии при различных соотношения лецитин: Brij®96V (рис. 1.15):

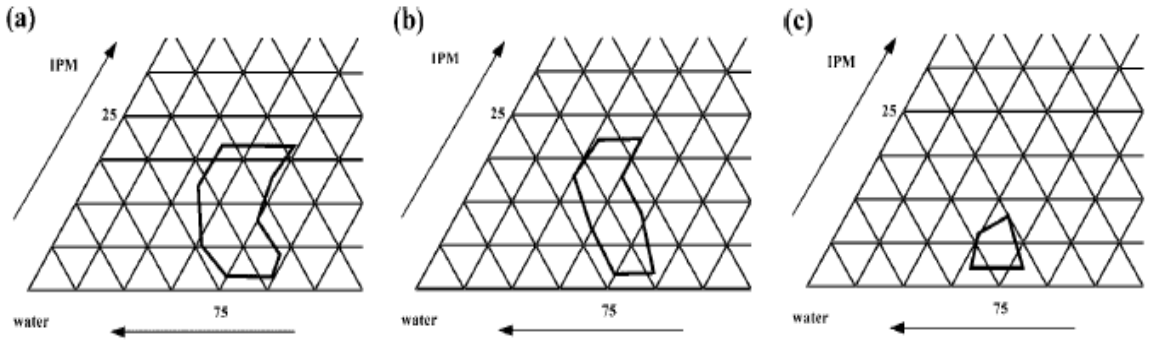

Рисунок 1.15. Фазовые диаграммы системы лецитин – Brij®96V – изопропилмиристат (IPM) – вода при соотношениях лецитин: Brij®96V: a) 1:2; b) 1:1,5; c) 1:1 [128]

Область существования микроэмульсии расширяется при добавлении Brij®96V, так как добавление более высоких количеств Brij®96V для увеличения гидрофильности лецитина благоприятствует искривлению межфазного слоя, которое приводит к образованию микроэмульсии масло – в – воде. На основании полученных данных о солюбилизационной емкости, реологических свойствах (рис. 1.16), размере капель в качестве оптимальной была выбрана микроэмульсия, содержащая 10 мас.% лецитина, 15 мас.% Brij®96V, 5 мас.% изопропилмиристата и 70 мас.% воды. Средний размер капель микроэмульсии составил 52,5 нм, также установлено, что включение Амфотерицина В в микроэмульсию не изменяло распределение частиц по размерам.

Сравнение полученной микроэмульсии с включенным лекарственным веществом Амфотерицином В с препаратом Фунгизон, показало преимущество разработанного состава. При внутривенном введении через хвостовую вену у

мышей – альбиносов летальная доза LD_{50} для микроэмульсии с Амфотерицином В составила 2,9 мг/кг, для Фунгизона летальная доза равна 1,4 мг/кг.

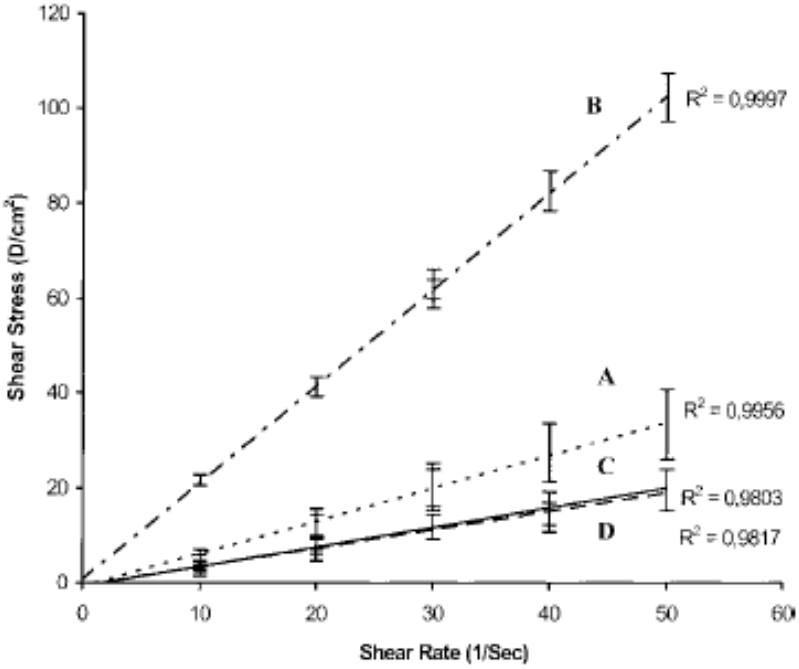

Рисунок 1.16. Напряжение сдвига (дин/см^2) в зависимости от скорости сдвига (1/сек) для микроэмульсий с различным соотношением лецитин: Brij®96V: (A) 1: 1,5, 70 мас.% воды; (B) 1: 1,5, 65 мас.% воды, (C) 1: 1, 72,5 мас.% воды, (D) 1:2, 67,5 мас.% воды [128]

Также системой, пригодной для доставки Амфотерицина В является микроэмульсия, включающая в качестве ПАВ смесь соевый лецитин + Tween 20 (полиоксиэтилен(20) сорбитан монолаурат) в соотношении 1:1, в качестве масляной фазы Captex™ 200 (пропиленгликоль дикаприлат / дикапрат) и 10мМ фосфатный буфер (pH= 7,2) в качестве водной фазы. Максимальное содержание введенного в микроэмульсию Амфотерицина В составило 6,8 мг/мл при содержании смеси ПАВ 20 мас.% [129].

Влияние типа лецитиновой микроэмульсии вода-в-масле и масло-в-воде на трансдермальное проникновение гидрохлорида тетракаина, используемого в медицине в качестве местного анестетика, описано в статье [130]. В работе исследовалась система лецитин – н-пропанол – изопропилмиристат – вода при различных соотношениях лецитин: н-пропанол: K_m= 0,5:1; 0,8:1; 1:1 и 1,5:1 (рис. 1.17).

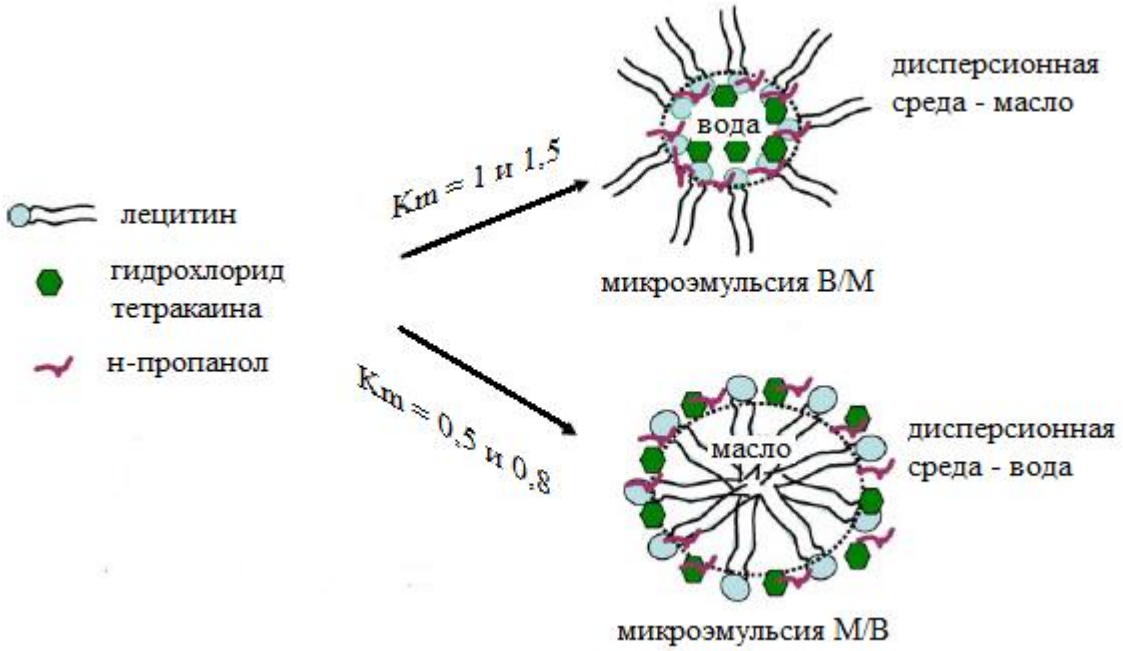

Рисунок 1.17. Структуры, образующиеся при различных мольных соотношениях (K_m) лецитин:н-пропанол [130]

Исследование проводилось с помощью диффузионной ячейки Франца с образцом кожи. Установлено, что проницаемость гидрохлорида тетракаина зависит от типа образующейся микроэмульсии. При низком отношении K_m (то есть 0,5:1 и 0,8:1) скорость проникновения гидрохлорида тетракаина была выше по сравнению с микроэмульсией с более высоким отношением K_m (1:1 и 1,5:1). Коэффициент проницаемости для микроэмульсии масло-в-воде составил 30-70×10^{-4} см/ч, для микроэмульсии вода-в-масле значения находились в диапазоне 30-50×10^{-4} см/ч, при этом коэффициент проницаемости для водного раствора гидрохлорида тетракаина составляет 2,78×10^{-4} см/ч. Проникновение тетракаина в

основном происходит через межклеточную область рогового слоя, волосы и потовые железы [130].

Разработка пероральных микроэмульсий паклитаксела, применяемого в противораковой терапии, для повышения его проницаемости описана в [131-132]. Для паклитаксела были разработаны микроэмульсии, которые могли включать значительное количество воды. Применение смеси лецитина и 1-бутанола в качестве ПАВ показало наиболее высокую солюбилизацию воды. Больший объем воды способствует разбавлению, что потенциально предотвращает осаждение паклитаксела. Проницаемость in situ паклитаксела через кишечник самца крысы была в 3 раза выше, чем в контрольной клинической композиции.

Микроэмульсии лецитина могут применяться не только в медицине, но и в пищевой промышленности. Лецитин способен образовывать обратную микроэмульсию с маслом канолы, или рапсовым маслом, в сочетании с н-пропанолом при различных соотношениях ПАВ/соПАВ. В исследовании [133] изучено влияние соотношения лецитин/н-пропанол, изменения ионной силы, pH и температуры на свойства данной микроэмульсии, построены фазовые диаграммы для наглядного изображения влияния параметров. Установлено оптимальное массовое соотношение, равное 60:40. Для данного соотношения изучено влияние ионной силы на примере солей NaCl и $CaCl_2$. Показано, что присутствие солей незначительно увеличивает область микроэмульсии вода-в-масле. Более значительное расширение области существования микроэмульсии происходит с увеличением температуры. Что касается pH, никаких значительных различий в области однофазной микроэмульсии в широком диапазоне изменений pH от 3 до 10,5 не наблюдалось. Полученные данные показывают возможность использования микроэмульсионных систем на основе лецитина для экстракции и выделения триглицеридов из масличных культур.

В патенте [134] описывается изобретение нетоксичной микроэмульсии типа масло-в-воде или бинепрерывной микроэмульсия, в которой в качестве ПАВ использована смесь гидрофобного и гидрофильного поверхностно-активных

веществ в количестве до 15 мас. %. Наиболее предпочтительным гидрофобным ПАВ является фракционированный соевый лецитин, содержащий минимум 90 мас.% фосфатидилхолина. Полярная фаза представляет собой воду и компонент для регулирования полярности, например, этанол. Неполярная фаза включает одно или несколько фармацевтически приемлемых масел.

Следующим примером использования микроэмульсий лецитина для трансдермального введения является патент [135], в котором описываемая лецитиновая микроэмульсия является средой, содержащей протеолитические ферменты, и применяется для долговременной депиляции. В качестве соПАВ авторы использовали алифатический спирт – пропанол-1. Преимуществом разработанного состава является его универсальность применения для любого типа кожи.

Ограничением использования микроэмульсий лецитина долгое время являлось использование токсичных соПАВ. Была изучена возможность использования биосовместимых лецитиновых микроэмульсий для трансдермальной доставки лидокаина [136, 137]. Трансдермальная доставка имеет преимущество снижения побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта. Описано исследование трех типов микроэмульсий лецитина, образованных с использованием сорбитан моноолеата в качестве липофильного линкера и комбинации каприлата натрия и каприловой кислоты в качестве гидрофильного линкера. Увеличение концентрации каприлата натрия в системах увеличивает гидрофильность составов и вызывает винзоровский фазовый переход типа II-IV-I (рис. 1.18.).

Диаметр капель всех исследованных микроэмульсий составил менее 10 нм, что предполагает наличие большой площади поверхности для массопереноса и объясняет относительно низкую вязкость этих составов. Исследования цитотоксичности показали преимущество структуры Винзор II. Количество солюбилизированного лидокаина составило 4 мас.%. Исследование пролонгированного высвобождения лидокаина in situ способом показало, что в

течение 24-часового периода происходит высвобождение 90 мас. % содержимого микроэмульсии.

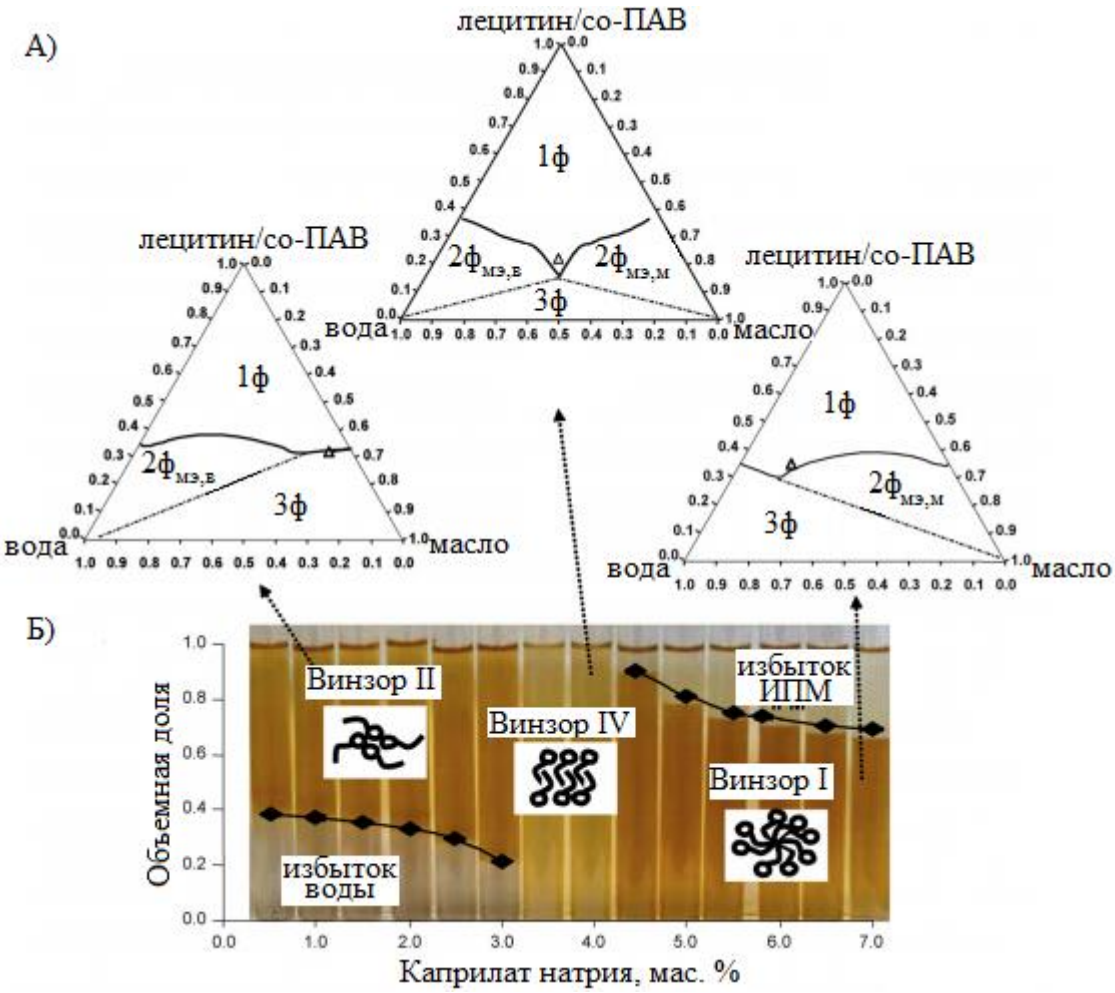

Рисунок 1.18. Фазовые диаграммы составов, содержащих лидокаин при комнатной температуре и NaCl 0,9 мас.%. (А) Фазовые диаграммы составов, показывающие наличие одной, двух и трех сосуществующих фаз. Индексы МЭ, М и В обозначают микроэмульсионную фазу, обогащенную поверхностно-активным веществом, избыток масляной фазы и избыток водной фазы, соответственно. (Б) Фазовый переход типа II-IV-I для состава с 4 мас.% лецитина [137]

Еще одним примером использования в микроэмульсиях лецитина нетоксичного соПАВ является состав, описанный в работе [138]. Для

трансдермальной доставки лекарственных веществ предлагается получать микроэмульсию лецитина, в качестве соПАВ в которую вводится смесь липофильного и гидрофильного ПАВ – сорбитан моноолеата и частично ионизированной каприловой кислоты, соответственно.

Таким образом, лецитин не образует микроэмульсий в тройной системе лецитин – масло – вода, необходима более сложная композиция, содержащая соПАВ. Микроэмульсии, образованные фармацевтически приемлемыми компонентами, могут применяться в качестве носителей для доставки и введения биологически активных веществ.

1.4. Заключение к главе 1

Анализ динамики научных публикаций позволяет сделать вывод о возросшем интересе к самоорганизующимся наноструктурам как носителям для адресной доставки биологически активных веществ. Так, мицеллярные системы и липосомы уже имеют практическое применение, препараты на основе микроэмульсий, органогелей и жидких кристаллов находятся на стадии лабораторных и клинических испытаний. Среднее время удвоения числа публикаций по ключевым словам «microemulsion + drug delivery» составляет 5,4 года, общее число публикаций с 1997 по 2017 год составляет 415, что подтверждает актуальность выбранной темы.

Особенно интересны с точки зрения применения в медицине микроэмульсии на основе лецитина – не токсичного, биосовместимого поверхностно-активного вещества природного происхождения. Известно, что лецитин не образует микроэмульсии в отсутствии соПАВ. Анализ литературы показал, что в качестве соПАВ при получении микроэмульсий часто используют низкомолекулярные алифатические спирты и амины. Основным недостатком таких микроэмульсий является токсичность компонентов. Поэтому поиск нетоксичных и биосовместимых соПАВ, способствующих образованию

микроэмульсий лецитина в нетоксичных растворителях, является актуальной задачей.

Для создания фармацевтически приемлемой микроэмульсии лецитина необходимо найти решение следующих задач:

1. Изучить влияние соПАВ – олеиновой кислоты на физико-химические свойства системы лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода, в том числе ширину области существования органогеля или микроэмульсии, вязкость, гидродинамический диаметр агрегатов, структурный переход от геля из обратных цилиндрических мицелл к обратной микроэмульсии.
2. Изучить влияние замены высокоочищенного лецитина на фосфолипидный концентрат и додекана на масла, пригодные для медицинского применения, на область существования и свойства микроэмульсии лецитина, содержащей олеиновую кислоту.
3. Разработать состав и методику получения микроэмульсии на основе лецитина для медицинского применения, определить основные характеристики полученной микроэмульсии – вязкость, размер капель, температурную стабильность, солюбилизационную емкость по отношению к водо- и маслорастворимым лекарственным веществам, скорость высвобождения водорастворимых биологически активных веществ.

2. МЕТОДИКИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И АНАЛИЗОВ

2.1. Реактивы и материалы

Основные реактивы и материалы, использованные в работе, приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1. Реактивы и материалы, использованные в работе

№ п/п	Наименование	Формула	Стандарт, производитель	Примечание
ПАВ и соПАВ				
1	Фосфолипидный концентрат Lipoid S100	Смесь фосфатидилхолинов жирных кислот	«Lipoid GmbH», Германия	Содержание фосфолипидов не менее 96 %
2	Лецитин гранулированный из соевого масла	Смесь фосфатидилхолинов жирных кислот	Каталожный номер CAS 8002-43-5, «Acros organics», США	Содержание фосфолипидов не менее 97,7%
3	Фосфолипидный концентрат «Мослецитин»	Смесь фосфатидилхолинов жирных кислот, табл. 2.2.	ТУ 9146-012-4996414-2006, ООО «Витапром», Россия	Содержание фосфолипидов не менее 97%
4	Олеиновая кислота	$C_{18}H_{34}O_2$	ТУ 6-09-5290-86, ООО «Химмед», Россия	ρ=0,892 кг/м^3 $T_{крист}$ =12,8 °С
Органические растворители				
5	Додекан	$C_{12}H_{26}$	ТУ 6-09-3730-74,	≥99 %

			ООО «Кемикал Лайн», Россия	основного вещества $T_{кип}$= 217°С, ρ=750 кг/м^3
6	Масло вазелиновое медицинское	Смесь углеводородов	ГОСТ 3164-78, ОАО «Татхимфармпрепараты», Россия	$T_{кип}$ выше 360°С ρ=853-859 кг/м^3
7	Масло авокадо	Состав см. в табл. 2.3	ОАО «Botanika», Россия	
8	Масло арганы	Состав см. в табл. 2.4	ОАО «Botanika», Россия	
9	Масло жожоба	Состав см. в табл. 2.5	ОАО «Botanika», Россия	
10	Масло из косточек винограда	Состав см. в табл. 2.6	ОАО «Botanika», Россия	
11	Эфирное масло чайного дерева	Состав см. в табл. 2.7	ОАО «Botanika», Россия	
12	Эфирное масло лаванды		ОАО «Botanika», Россия	
13	Эфирное розовое масло		ОАО «Botanika», Россия	
14	Вода дистил-лированная	H_2O	ГОСТ 6709-72	Приготовлена стандартным методом
15	Натрия хлорид		Рег. номер: ЛС-	pH=4,5-7,0

	изотонический раствор 0,9 %		001564 от 17.10.2011, ООО «Гематек», Россия	
Биологически активные вещества				
18	Аскорбиновая кислота	$C_6H_8O_6$	ЛС-002248, ООО «Марбиофарм», Россия	
19	6-метилурацил	$C_5H_6N_2O_2$	РК-ЛС-5 №010794, ООО «Кемикал Лайн», Россия	
20	α-токоферол ацетат	$C_{29}H_{50}O_2$	ГОСТ 27547-87, DSM Nutritional Products LTD, Швейцария	
21	Глюкоза	$C_6H_{12}O_6$	ГОСТ 6038-79, ООО «НПО Лабтех», Россия	
Краситель				
22	Родамин С	$C_{28}H_{29}N_2NaO_7S_2$	ТУ 6-09-07-67-73, ООО НПП «Реахим»	Водорастворимый краситель красного цвета

Таблица 2.2 Состав фосфолипидного концентрата «Мослецитин», согласно данным производителя

Компонент	**Содержание, мас.%**
1. Смесь липидов:	89
Фосфатидилхолин (лецитин)	**22**
Фосфатидилэтаноламин	20
Фосфатидилинозитол	14
Жирные кислоты	18
Гликолипиды	15
2. Натуральные углеводы	8
3. Стабилизатор	3

С химической точки зрения растительные жирные масла представляют собой сложные эфиры, образуемые глицерином и жирными кислотами. Они называются триглециридами.

Химический состав масла авокадо

Согласно данным производителя, используемое масло авокадо имеет следующий жирнокислотный состав, указанный в таблице 2.3.

Таблица 2.3. Жирнокислотный состав масла авокадо

Компонент	**Содержание, мас.%**
Олеиновая кислота	36-80
Пальмитиновая кислота	7-32
Линолевая кислота	6-18
Линоленовая кислота	0-5
Пальмитолеиновая кислота	2-13
Стеариновая кислота	0,5-1,5

Химический состав масла арганы

Согласно данным производителя, используемое масло арганы имеет следующий жирнокислотный состав, указанный в таблице 2.4.

Таблица 2.4. Жирнокислотный состав масла арганы

Компонент	**Содержание, мас.%**
Олеиновая кислота	45-55
Пальмитиновая кислота	10-15
Линолевая кислота	26-36
Линоленовая кислота	До 0,5
Стеариновая кислота	4-7

Химический состав масла жожоба

Согласно данным производителя, используемое масло жожоба имеет следующий жирнокислотный состав, указанный в таблице 2.5.

Таблица 2.5. Жирнокислотный состав масла жожоба

Компонент	**Содержание, мас.%**
Гадолеиновая кислота	65-80
Олеиновая кислота	< 15
Эруковая кислота	< 20
Пальмитиновая кислота	< 3
Бегеновая кислота	< 1
Нервоновая кислота	< 3

Химический состав масла из косточек винограда

Согласно данным производителя, используемое масло из косточек винограда имеет следующий жирнокислотный состав, указанный в таблице 2.6.

Таблица 2.6. Жирнокислотный состав масла из косточек винограда

Компонент	**Содержание, мас.%**
Олеиновая кислота	~16
Пальмитиновая кислота	~7
Линолевая кислота	до 78
Линоленовая кислота	< 1
Пальмитолеиновая кислота	< 1
Стеариновая кислота	~4

Химический состав эфирных масел

С химической точки зрения в состав эфирных масел входят терпены и терпеноиды, предельные и непредельные углеводороды, ароматические соединения, органические кислоты, альдегиды, спирты и их сложные эфиры. Состав эфирных масел зависит от вида растения, подготовки растительного сырья, условий его хранения, способа извлечения, а также нередко от длительности и условий хранения конечного продукта [139].

В таблице 2.7 указан состав эфирного масла чайного дерева.

Таблица 2.7. Химический состав эфирного масла чайного дерева [140]

Компонент	**Содержание, мас.%**
Терпинен-4-ол	30–48%
γ-терпинен	10–28%
α-терпинен	5–13%
1,8-цинеол	0–15%
α-терпинолен	1,5–5%
α-терпинеол	1,5–8%
α-пинен	1–6%
р-цимол	0,5–8%

Эфирное масло чайного дерева представляет собой прозрачную подвижную желтоватую жидкость с пряным запахом и оттенками запаха мускатного ореха и кардамона. Плотность масла при 20ºС составляет 0,885-0,906 г/см^3, показатель преломления 1,475-1,482. Получают эфирное масло чайного дерева перегонкой с водяным паром. Выход масла достигает до 1,8 мас.% [139].

Эфирное масло лаванды извлекают из соцветий путём перегонки с водяным паром, выход масла 0,78-1,1 мас.%. Плотность масла при 20ºС составляет 0,877-0,896 г/см^3 [140].

Розовое эфирное масло получают методом гидродистилляции. Плотность масла при 20ºС составляет 0,855-0,865 г/см^3 [141].

2.2. Методики экспериментов

2.2.1. Приготовление образцов лецитин – соПАВ – органический растворитель – вода

Для приготовления образцов навеску лецитина растворяли в органическом растворителе: додекане, вазелиновом масле или смеси вазелинового и растительного жирного масла при температуре 50±1°С и механическом перемешивании в течение 1-2 часов. Контроль полноты растворения – визуально. После полного растворения лецитина образец охлаждали до комнатной температуры. В полученный раствор лецитина вводили олеиновую кислоту и, при необходимости, растительное эфирное масло. Смешивание компонентов проводили при механическом перемешивании при температуре 25±1°С. В образец с помощью пипет-дозатора вводили воду. Солюбилизацию воды проводили под действием ультразвука с частотой 22 кГц и мощностью 26,2 Вт в течение 1 минуты, затем образец охлаждали до комнатной температуры. Ультразвуковую обработку проводили 3-4 раза до полной солюбилизации воды. Гомогенность образца, отсутствие капель воды и частиц жидкокристаллической фазы

контролировали с помощью поляризационного оптического микроскопа Axiostar plus (Zeiss, Германия) при комнатной температуре.

2.2.2. Определение области существования микроэмульсии

Область существования микроэмульсии как гомогенной системы определяли путем добавления в исходный образец порций дистиллированной воды с шагом титрования ΔW=0,5-1,0. После добавления дистиллированной воды в образец происходило ее распределение под воздействием ультразвука длительностью не более 1 минуты при частоте 22 кГц и мощности 26,2 Вт. Ультразвуковую обработку повторяли до полной солюбилизации воды. Границей области существования микроэмульсии считали максимальное содержание воды, при котором не наблюдалось помутнение микроэмульсии, расслаивание образца или образование жидкокристаллической фазы. Однородность образца и отсутствие жидкокристаллической фазы и везикул контролировали при помощи поляризационного оптического микроскопа Axiostar plus (Zeiss, Германия) при не скрещенных и скрещенных поляризаторах.

2.2.3. Определение гидродинамического диаметра капель методом динамического светорассеяния

Гидродинамический диаметр капель микроэмульсии определяли методом динамического светорассеяния с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Перед измерением образец центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут. Далее кювету с 1 мл микроэмульсии устанавливали в кюветное отделение прибора. Процесс измерения проводится автоматически компьютерной программой. Перед началом измерения образец термостатировали в кюветном отделении в течение 20 минут при заданной температуре. Результат измерения представляет собой гистограмму распределения частиц по размеру. В

зависимости от органического растворителя и заданной температуры измерение проводилось при следующих параметрах: дисперсионная среда – вазелиновое масло (n_D = 1,480) или додекан (n_D = 1,4216), дисперсная фаза – вода (n_D = 1,33; Абсорбция света = 1,0).

Параметры проведения измерения (положение источника света, количество шагов, выбор светопоглощающего фильтра) задавались программой прибора автоматически. Каждое измерение проводилось не менее 5 раз.

2.2.4. Вискозиметрия

Динамическая вязкость исследуемых систем измерялась при 25,0±0,5°С при помощи ротационного вискозиметра Rheotest 2 (RheoTest Messgerate Medingen GmbH, Германия) с коаксиальными цилиндрами в диапазоне скоростей сдвига 0,167 – 145,9 $с^{-1}$ (для образцов с высокой вязкостью) и 1,5 – 1312 $с^{-1}$ (для образцов с низкой вязкостью).

2.2.5 Термогравиметрический анализ

Температурная стабильность системы была исследована с помощью прибора синхронного термического анализа STA 449 F5 Jupiter (Netzch, Германия). Измерение проводили при нагревании печи от 25 до 110°С со скоростью нагрева 10°С в минуту.

2.2.6. Солюбилизация биологически активных веществ

Для изучения солюбилизационной емкости микроэмульсий в исходный образец добавляли биологически активное вещество с шагом 0,5 мас. %. Солюбилизация БАВ в микроэмульсии проходила при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки RCT Basic (IKA-Werke GmbH &

Co. KG, Германия) при 80 об/мин и температуре 40±1°С в течении 24 часов. Границей области существования микроэмульсии считали максимальное содержание БАВ, при котором не наблюдалось помутнение микроэмульсии, расслаивание образца или образование жидкокристаллической фазы. Определение области существования микроэмульсии проводили при температуре 25±1°С.

2.2.7. Диализ

В образцы микроэмульсии, приготовленные по методике 2.2.1 добавляли 0,2 мас. % водорастворимого красителя Родамина С. Растворение Родамина С проводили при механическом перемешивании при температуре 40±1°С с помощью мешалки с подогревом RCT Basic (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Германия) при 80-90 об/мин до полного растворения красителя. Контроль растворения – визуально.

Для определения кинетики высвобождения водорастворимых лекарственных веществ используется модельная система с водорастворимым красителем Родамином С. При проведении диализа использовалась регенерированная целлюлозная трубчатая мембрана Cellu·Sep (MFPI, США) с размером пор 3,5 кДа.

Перед началом эксперимента диализный мешок размером 4,6×3,9 см замачивали в дистиллированной воде на 30 минут. Далее в диализный мешок вносили 5 г готового образца с красителем и зажимали с двух сторон зажимами. Затем диализный мешок с образцом погружали в сосуд с дистиллированной водой, или другим буферным раствором, объемом 1000 мл, предварительно нагретой до 37±1°С, при постоянном перемешивании с помощью магнитной мешалки RCT Basic (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Германия) при 90 об/мин и поддержанием температуры 37±1°С.

Отбор проб для определения оптической плотности проводили каждый час в чистую кювету из полистирола с длиной оптического пути 1 см. Оптическую плотность раствора с Родамином С измеряли с помощью спектрофотометра Cary 50 (Varian, США) при длине волны λ=553 нм.

Данные, полученные с помощью спектрофотометра, представляли в виде зависимости оптической плотности (D) от времени (t, ч). Затем проводили определение концентрации высвободившегося красителя с помощью калибровочного графика. Калибровочный график для определения концентрации высвободившегося красителя Родамина С представлен на рисунке 2.1.

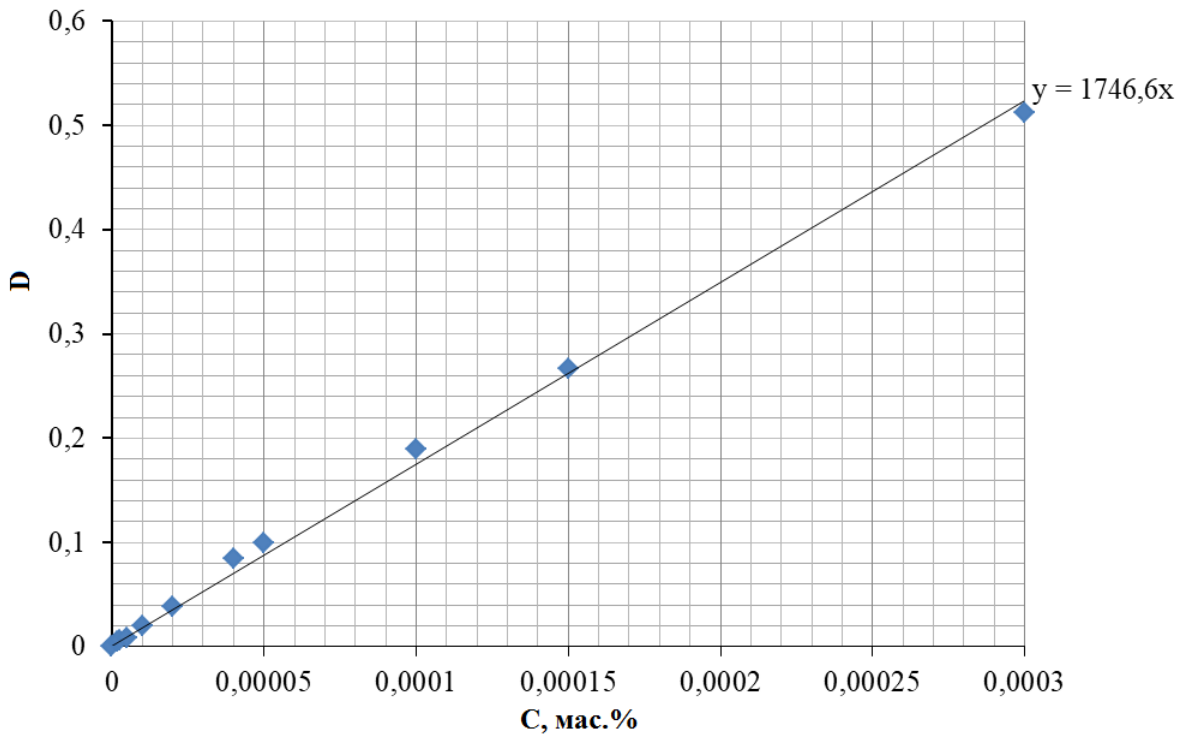

Рисунок 2.1. График зависимости оптической плотности (D) от концентрации водного раствора Родамина С.

На основе полученных данных по линейному участку рассчитывали скорость переноса вещества из микроэмульсии в раствор по следующей формуле:

$$V = \frac{m}{t \times S}\ , \qquad (2.1)$$

где m – масса выделившегося вещества, t – промежуток времени, S – площадь поверхности, через которую идет диализ.

2.2.8. Кондуктометрия

Электропроводность микроэмульсии измеряли при температуре 20°С с помощью полевого многодиапазонного кондуктометра HI 8733 N (Hanna Instruments, Германия), предварительно откалибровав его. Относительная погрешность метода составляла не более 1%. Значение коэффициента температурной компенсации во всех опытах было равно 0,0.

2.2.9. Определение межфазного натяжения методом Вильгельми

Межфазное натяжение на границе «ПАВ/соПАВ-додекан» определяли при температуре 25 °С методом Вильгельми. Измерение межфазного натяжения проводили на границе «масло-вода» для трех систем: раствор лецитина в додекане– вода, раствор олеиновой кислоты в додекане – вода, раствор лецитина и олеиновой кислоты в додекане – вода, мольное соотношение [олеиновая кислота]: [лецитин] составляло 0,8. Полученные двухфазные системы выдерживали при температуре 25 °С в течение суток. Объёмы контактирующих фаз были равны 5 мл.

Измерения проводили с помощью платиновой пластины Вильгельми, подвешенной на коромысле торсионных весов типа ВТ-500 (НПП «Госметр», Россия). Пластину вертикально погружали в исследуемый образец таким образом, чтобы межфазная граница находилась на середине высоты пластины, после чего медленно поднимали коромысло весов до отрыва нижней границы пластины от

межфазной границы. Регистрировали показание торсионных весов, при котором происходил отрыв пластины от межфазной границы. Для получения статистически достоверного результата каждое измерение проводили не менее 5 раз. Межфазное натяжение γ рассчитывали по формуле:

$$\gamma = \frac{(m_{\text{отр}} - m_{\text{пл}}) \cdot \text{g}}{2l}, \tag{2.2}$$

где $m_{\text{пл}}$ – масса пластины ($m_{\text{пл}}$ = 46 мг); $m_{\text{отр}}$ – показание весов при отрыве пластины от межфазной границы (мг); g – ускорение свободного падения (g = 9,81 м/с^2); l–длина пластины Вильгельми (l=7,4 мм).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выбор соПАВ для формирования микроэмульсии лецитина

На основании литературных данных о том, что лецитин не образует микроэмульсии в тройных системах, сделан вывод о необходимости подбора соПАВ. В качестве соПАВ для образования микроэмульсий могут выступать вещества биологического происхождения, например, олеиновая кислота или фосфолипиды, содержащиеся в виде примесей в коммерческих образцах соевого лецитина.

Распространенная в природе биосовместимая непредельная олеиновая кислота (мононенасыщенная цис-9-октадеценовая кислота), структурная формула которой представлена на рисунке 3.1, является маслорастворимым анионным ПАВ со значением ГЛБ, равным 1 [95, 142].

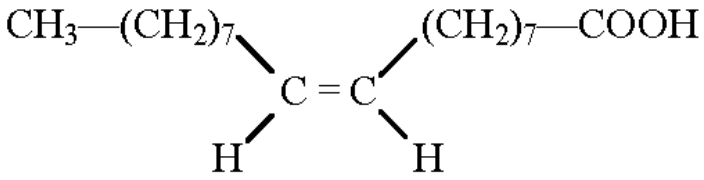

Рисунок 3.1. Структурная формула олеиновой кислоты

Олеиновая кислота способна усиливать проницаемость при трансдермальной доставке биологически активных веществ, а также сама проявляет антибактериальные свойства, что позволяет усиливать действие инкапсулированных лекарственных веществ [143, 144].

Олеиновая кислота оказывает влияние на самоорганизацию молекул лецитина. Например, олеиновая кислота дестабилизирует ламеллярный бислой и способствует образованию обратной гексагональной фазы в системе соевый

лецитин – олеиновая кислота – вода [145]. Наличие изогнутого углеводородного хвоста дает возможность олеиновой кислоте делать межфазный слой молекул лецитина на границе масло – вода гибким, что будет способствовать формированию микроэмульсии. Применение в качестве соПАВ алифатических кислот с короткой цепью, например, пентановой и гексановой, показано в работе [124] при получении микроэмульсий в системе лецитин – изопропилмиристат – вода – алифатическая кислота. При этом в системе образовывалась обратная микроэмульсия.

3.2. Влияние олеиновой кислоты на физико-химические свойства системы лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода

При исследовании влияния олеиновой кислоты на физико-химические свойства системы лецитин – олеиновая кислота - додекан – вода в качестве источника лецитина использовался высокоочищенный фосфолипидный концентрат Lipoid S100 с содержанием фосфатидилхолина 97 мас.%.

Это дает возможность понять действие олеиновой кислоты как соПАВ в системе лецитин – соПАВ – масло – вода, исключив влияние примесных фосфолипидов, присутствующих в коммерческих образцах соевого лецитина, таких как фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол и др. Известно, что фосфолипиды влияют на структурообразование в системе лецитин – органический растворитель – вода. Например, фосфатидилэтаноламин, ближайший структурный аналог фосфатидилхолина, препятствует образованию лецитинового органогеля, когда его содержание в смеси двух фосфолипидов превышает 50 %. Введение фосфатидилэтаноламина в концентрации менее 50% от массы смеси сдвигает область существования органогеля в сторону больших концентраций воды [75]. Введение лизофосфатидилхолина в концентрации 0,7 мас.% вызывает снижение вязкости лецитинового органогеля в 100 раз, в то время как введение фосфатидилглицерина незначительно влияет на вязкость гелей [76].

3.2.1. Влияние олеиновой кислоты границу однофазной области в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода

Для того чтобы лучше понять структурные переходы в системе лецитин - олеиновая кислота - додекан – вода и определить область существования органогеля или микроэмульсии, было исследовано влияние олеиновой кислоты на верхнюю по воде границу однофазной области ($W_{кр}$=[H_2O_{max}]:[лецитин]) при 25°С. Введение воды в образцы проводили с шагом ΔW=0,5. При содержании воды выше $W_{кр}$ наблюдалось помутнение образцов и образование жидкокристаллической фазы. Полученная зависимость значений $W_{кр}$ от соотношения молярных концентраций соПАВ и ПАВ (олеиновой кислоты и лецитина) представлена на рис. 3.2.

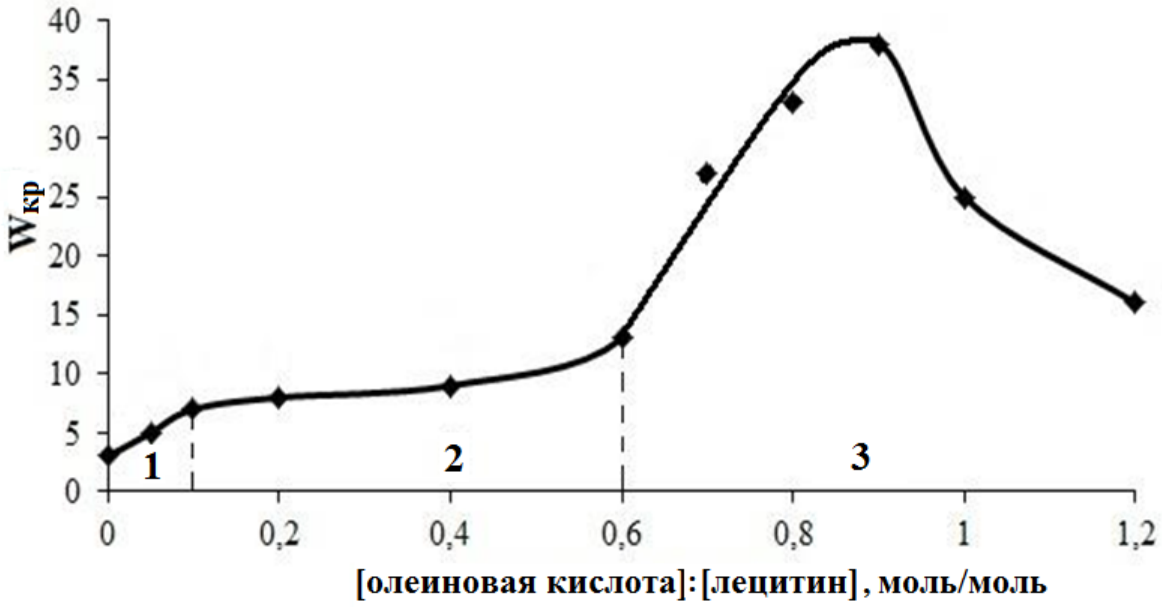

Рисунок 3.2. Граница однофазной области (геля или микроэмульсии) в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан - вода. Концентрация лецитина 10 мас. %. Т=25˚С. 1-низкие значения $W_{кр}$, высокая вязкость; 2-низкие значения $W_{кр}$, низкая вязкость; 3-высокие значения $W_{кр}$, низкая вязкость.

Анализируя ход кривой на рисунке 3.2, можно выделить 3 области.

1. Область соотношений концентраций олеиновой кислоты и лецитина a=[олеиновая кислота]:[лецитин] менее 0,1, где наблюдается рост $W_{кр}$ от 3 до 7 при повышении концентрации соПАВ. Образцы обладают высокой и средней вязкостью и представляют собой известный из литературных данных лецитиновый органогель, состоящий из длинных цилиндрических переплетенных между собой мицелл [68, 69]. Эту область можно охарактеризовать как «низкие значения $W_{кр}$, высокая вязкость».

2. Область соотношений концентраций олеиновой кислоты и лецитина от 0,1 до 0,6, в которой наблюдается незначительный рост $W_{кр}$ с повышением концентрации соПАВ. Это переходная область между областями 1 и 3. Эту область можно охарактеризовать как «низкие значения $W_{кр}$, низкая вязкость».

3. Область соотношений концентраций олеиновой кислоты и лецитина от 0,6 до 1,2, где значения $W_{кр}$ для изученных образцов больше 15. Считается, что систему можно называть микроэмульсией, если значения W превышают 10 или 15, меньшие значения W соответствуют обратным мицеллам [83]. Образцы обладают низкой вязкостью, характерной для микроэмульсий. При увеличении концентрации соПАВ наблюдается сначала значительное расширение однофазной области до $W_{кр}$=38, что соответствует содержанию воды 8,4 мас.% при a=0,9, а потом снижение $W_{кр}$. Расширение и последующее сужение области существования микроэмульсии при росте концентрации соПАВ было отмечено и для других микроэмульсий, например, для микроэмульсии Д2ЭГФNa в керосине при повышении концентрации Д2ЭГФК [146]. Эту область можно охарактеризовать как «высокие значения $W_{кр}$, низкая вязкость».

Образование микроэмульсий обычно объясняют снижением межфазного натяжения между водной и органической фазами до сверхнизких значений (порядка 10^{-3} Н/м). Было изучено межфазное натяжение между водой и раствором лецитина и олеиновой кислоты в додекане при соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,8, а также между водой и раствором олеиновой кислоты в

додекане и водой и раствором лецитина в додекане. Полученные данные представлены на рисунке 3.3.

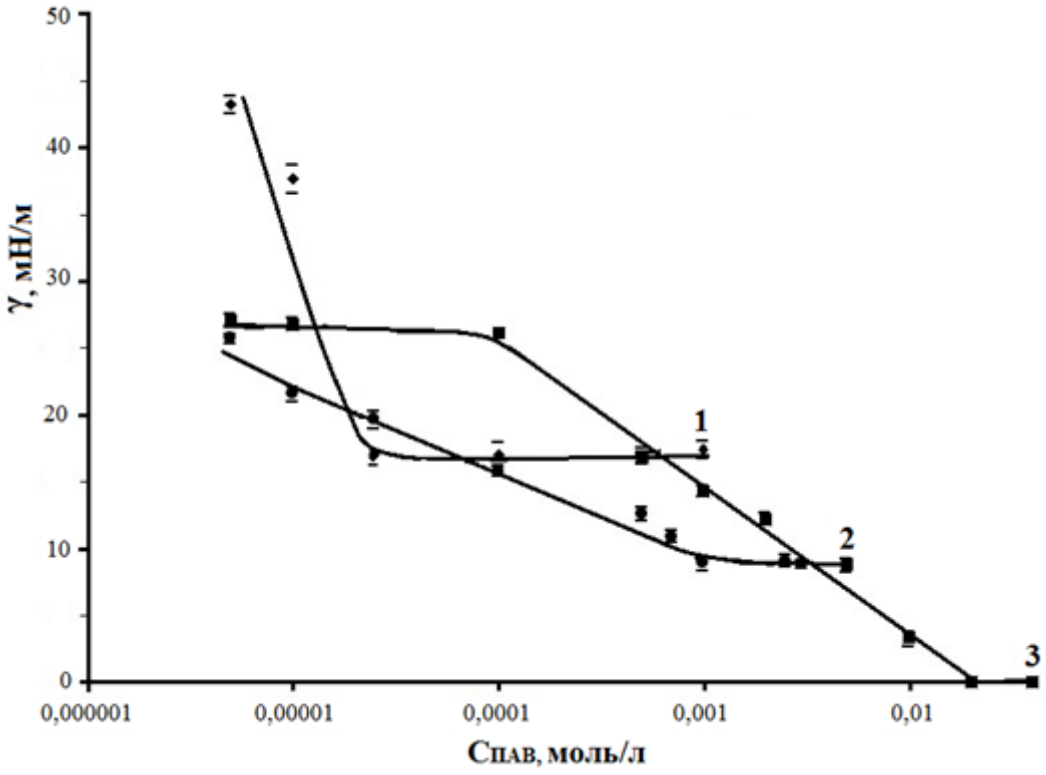

Рисунок 3.3. Зависимость межфазного натяжения (γ) на границе вода – раствор ПАВ в додекане от состава системы и концентрации ПАВ. В качестве ПАВ: 1 – олеиновая кислота; 2 – лецитин; 3 – смесь лецитин и олеиновая кислота при соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,8. T=25°C.

Межфазное натяжение в изученной системе достигает сверхнизких значений (менее 10^{-2} Н/м) (кривая 3 на рис. 3.3), что свидетельствует об образовании микроэмульсии. В исследованных для сравнения системах олеиновая кислота – додекан – вода и лецитин – додекан – вода сверхнизкие значения межфазного натяжения не достигаются.

На рисунке 3.4 представлена фазовая диаграмма системы лецитин+ олеиновая кислота – додекан – вода при T=25°C при соотношениях [олеиновая

кислота]:[лецитин]=0,8 и 0,1. Для соотношения 0,8 наблюдается широкая область однофазной микроэмульсии с максимальным содержанием воды 16,8 мас.%. Соотношение 0,1 характеризует область существования лецитинового органогеля с максимальным содержанием воды 3,7 мас.%.

Форма микроэмульсионной области в исследуемой системе весьма схожа с микроэмульсионной областью в системе лецитин – изопропилмиристат – н-гексановая кислота – вода. Микроэмульсионная область расположена вдоль оси «ПАВ + соПАВ – масло» [124]. Разница между системами проявляется при концентрациях лецитин + олеиновая кислота более 60 мас.%. Вместо микроэмульсионной при высоких концентрациях ПАВ + соПАВ в системе существует жидкокристаллическая фаза. Максимальное содержание воды в микроэмульсиях с олеиновой кислотой довольно низкое. Для микроэмульсий в системах лецитин – изопропилмиристат – вода – алифатическая кислота достигались концентрации воды 17 мас.% для н – гексановой кислоты и 20 мас.% для н-пентановой кислоты. Разницу можно объяснить большей гидрофобностью олеиновой кислоты из-за наличия более длинного углеводородного «хвоста». В отличие от короткоцепочечных алифатических кислот, олеиновая кислота будет в большей степени распределяться в масляную фазу и в меньшей степени включаться в монослой ПАВ на межфазной границе.

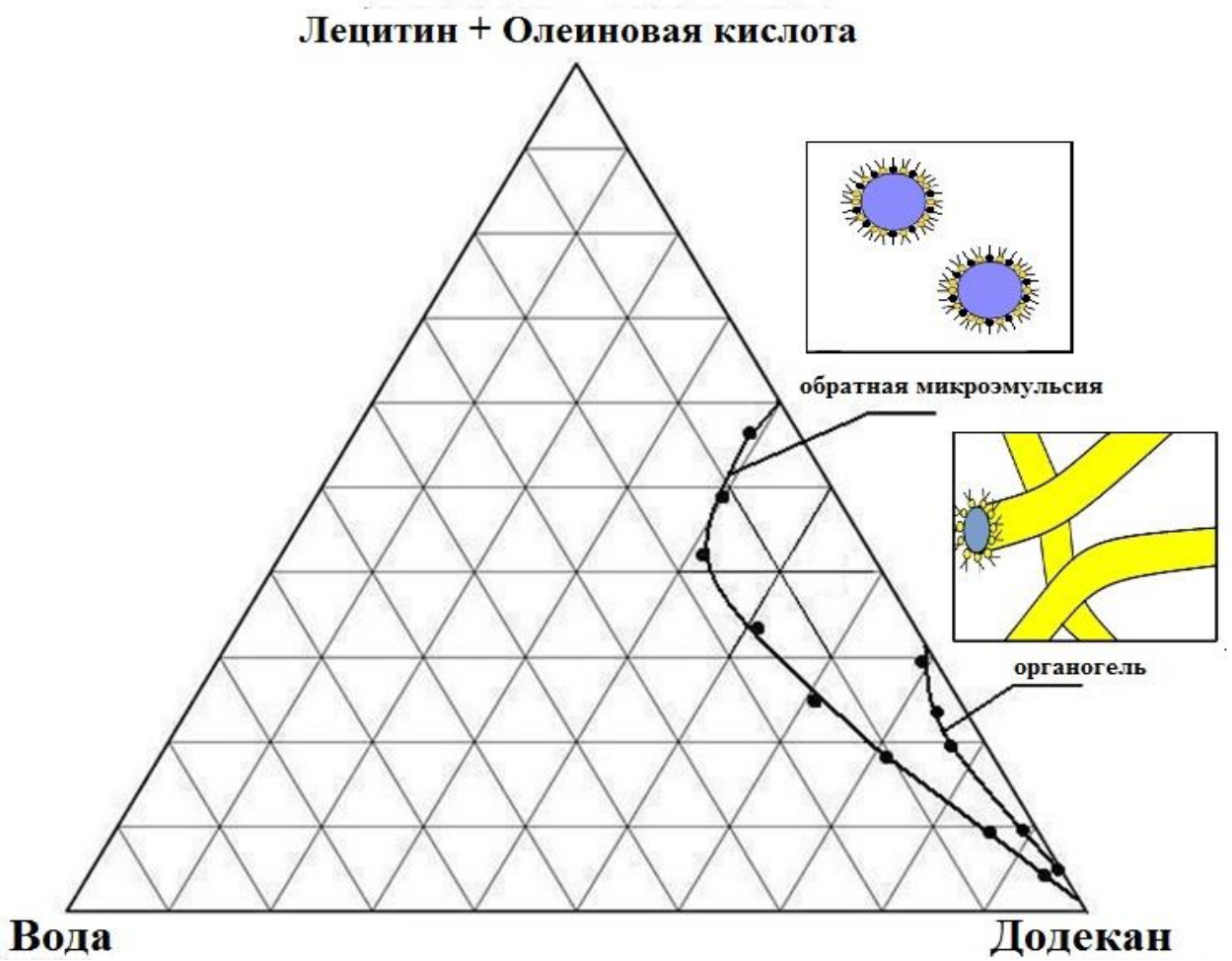

Рисунок 3.4. Фазовая диаграмма системы лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода при соотношениях [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,8 (обратная микроэмульсия) и 0,1 (органогель), T=25°C

87

Чтобы определить структуру полученных микроэмульсий, исследовали их электропроводность. На рисунке 3.5 представлен график зависимости десятичного логарифма удельной электропроводности (lg æ) от содержания воды (W) для микроэмульсии в системе лецитин - олеиновая кислота - додекан- вода.

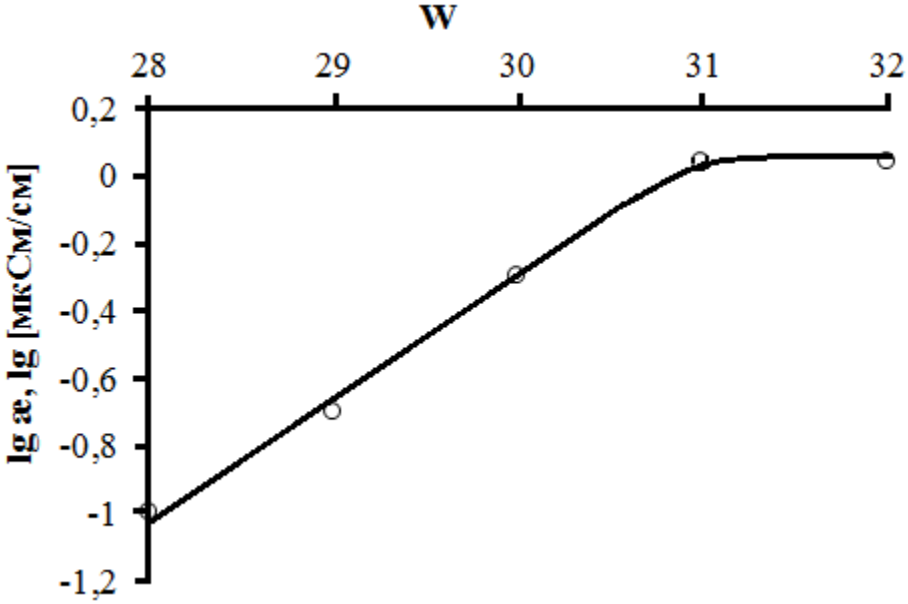

Рисунок 3.5. Зависимость десятичного логарифма удельной электропроводности (lg æ) от содержания воды (W) для микроэмульсии в системе лецитин - олеиновая кислота - додекан - вода при соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,8, T=25°C

Во всем исследуемом диапазоне концентраций воды электропроводность незначительно возрастала при повышении содержания воды. Значения электропроводности составляют величины от 0,1 до 1,1 мкСм/см при W от 28 до 32. При меньших значениях W значения электропроводности находились ниже предела обнаружения прибора. Такие значения удельной электропроводности характерны для обратной микроэмульсии.

Например, подобное поведение также показано для систем лецитин – короткоцепочечный спирт – Mygliol 810 (каприловый триглицерид) – вода, при

исследовании которой, в зависимости от использованного спирта (C_3 – C_5) электропроводность системы составляла 0,021-0,482 мкСм/см. Все системы представляли собой обратные микроэмульсии [147].

3.2.2. Влияние олеиновой кислоты на вязкость системы лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода

Переход от геля к микроэмульсии должен сопровождаться изменением вязкости системы. Для того чтобы оценить влияние содержания олеиновой кислоты на вязкость, были получены зависимости динамической вязкости от скорости сдвига (кривые течения) – образцов с одинаковым содержанием воды W=5,0 и различной концентрацией олеиновой кислоты (рис.3.6). Для сравнения на этом же графике приведена кривая течения органогеля без олеиновой кислоты при W=2,0 (линия 1). Все исследованные образцы представляют собой неньютоновские жидкости, их вязкость снижается с увеличением скорости сдвига. В зависимости от содержания олеиновой кислоты значения вязкости исследованных образцов изменяются на несколько порядков - от десятков Па·с для органогеля без олеиновой кислоты до сотых и тысячных долей Па·с для микроэмульсии при a=0,8 и a=0,9. При низких скоростях сдвига наблюдается существенное снижение вязкости при повышении концентрации олеиновой кислоты. Например, при скорости сдвига 3,0 $с^{-1}$ вязкость органогеля без олеиновой кислоты равна 22,8 Па·с, для образцов с a=0,1, 0,2 и 0,4 ее величина составляет 2,2, 1,4 и 0,53 Па·с, соответственно.

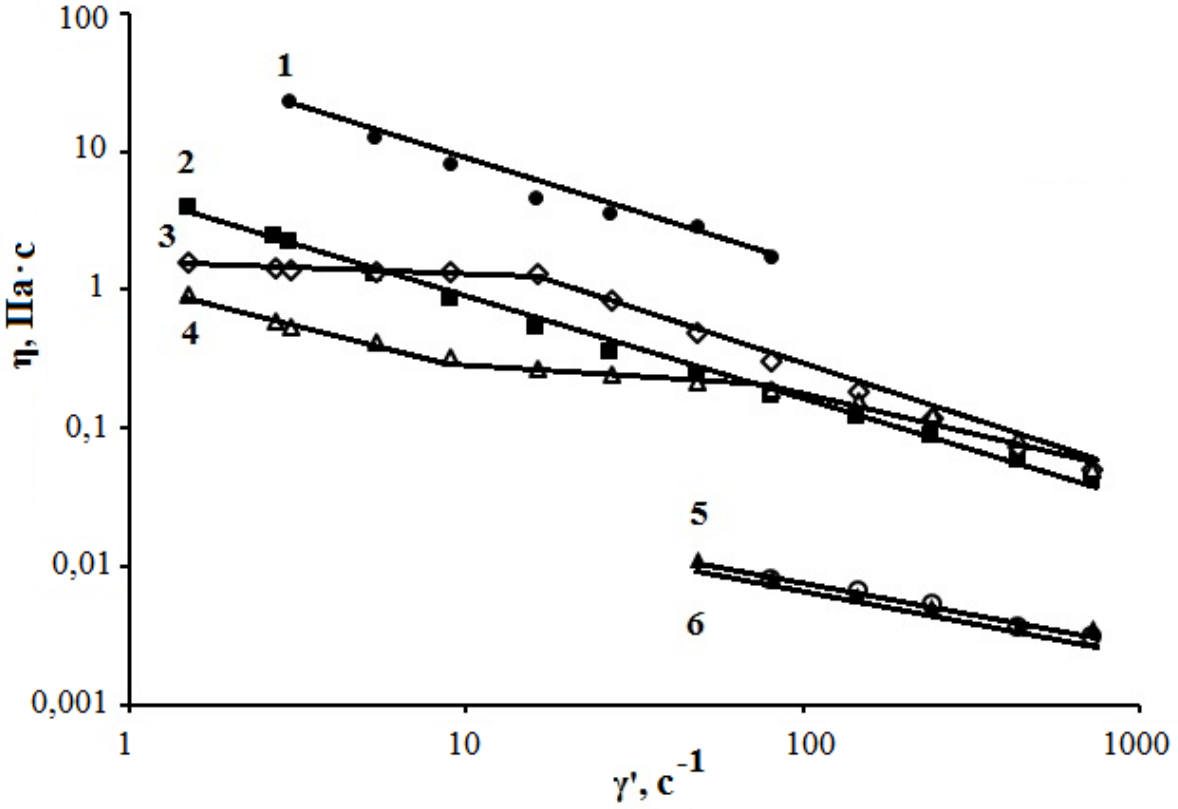

Рисунок 3.6. Кривые течения образцов в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода ($C_{лец}$=10 мас.%) с различным соотношением a= [олеиновая кислота]:[лецитин]: 1 – 0,0 (W=2); 2 – 0,1; 3 – 0,2; 4 – 0,4; 5 – 0,8; 6 – 0,9. T=25°C.

Можно предположить, что происходит разрушение пространственной структуры органогеля и постепенный переход к структуре микроэмульсии. Для образцов микроэмульсии при a=0,8 и a=0,9 вязкость при высоких скоростях сдвига становится сопоставима по порядку величин с вязкостью растворителя - додекана, которая равна $1{,}38 \cdot 10^{-3}$ Па·с.

3.2.3. Влияние олеиновой кислоты на гидродинамический диаметр мицелл или капель микроэмульсии в системе лецитин - олеиновая кислота-додекан – вода

С помощью метода динамического светорассеяния было проанализировано влияние концентрации олеиновой кислоты на структуру и гидродинамический диаметр агрегатов (гибких цилиндрических мицелл или капель микроэмульсии) в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода (таблица 3.1).

При изучении лецитиновых органогелей методом динамического светорассеяния нужно иметь в виду, что при низкой объемной доле лецитина (порядка 0,01 и ниже) метод позволяет определить гидродинамический диаметр единичной длинной и гибкой мицеллы, которая ведет себя в растворе аналогично молекуле полимера с гибкой цепью. Повышение концентрации лецитина в этих условиях приводит к росту гидродинамического диаметра. При более высокой концентрации лецитина (объемная доля выше 0,01) образуется динамическая пространственная сеть из длинных гибких мицелл. В этом случае метод динамического светорассеяния характеризует средний размер ячейки пространственной сети, его величина снижается с ростом объемной доли лецитина [148]. Концентрация лецитина в исследованных образцах существенно превышает указанное выше значение объемной доли, что позволяет говорить об определении размера ячейки пространственной сети геля для гелеобразных образцов. Результаты представлены на рис. 3.7 и в таблице 3.1

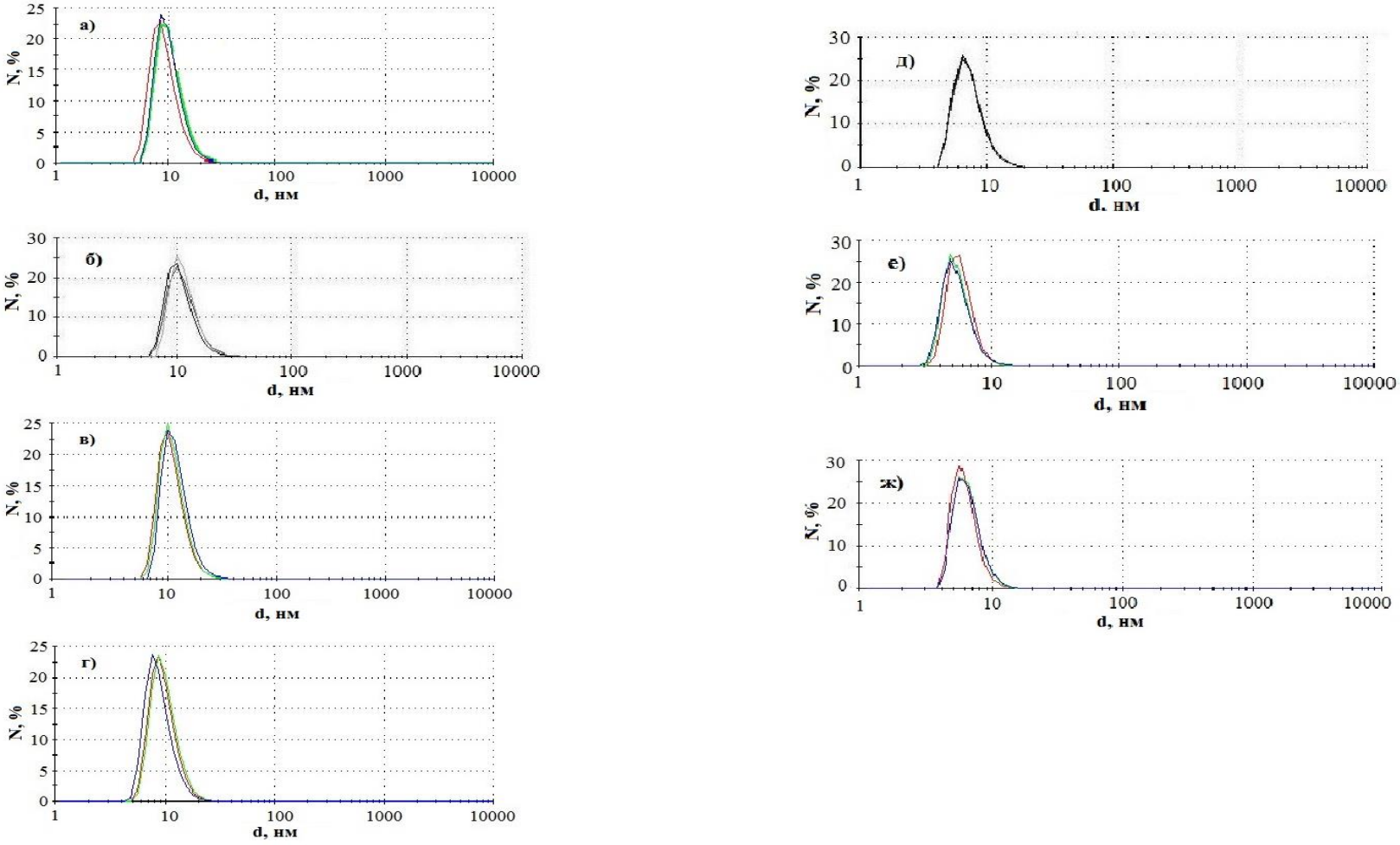

Рисунок 3.7. Гидродинамический диаметр капель в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода с различным соотношением [олеиновая кислота]:[лецитин]: а) 0,1; б) 0,2; в) 0,4; г) 0,6; д) 0,8; е) 1,0; ж) 1,2. Концентрация лецитина 10 мас.%, W=5,0, T=25°C.

92

Таблица 3.1. Значения гидродинамического диаметра капель в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода

[олеиновая кислота]:[лецитин]	**Гидродинамический диаметр капель при W=5,0, нм**
0,0	11,5±5.5 (при W=2,0)
0,0	≈ 10 в циклогексане [6]
0,1	9,1±0,5
0,2	10,1±0,1
0,4	10,1±0,1
0,6	8,3±0,5
0,8	6,5±0,1
1,0	5,1±0,3
1,2	5,6±0,1

Во всех образцах присутствовали только агрегаты нанометрового размера, микрочастицы не обнаружены (рис. 3.7). Из данных, представленных в таблице 3.1 видно, что значения гидродинамического диаметра для образцов с высоким содержанием олеиновой кислоты, соответствующих области 3 (область микроэмульсии), ниже, чем для образцов с низким содержанием соПАВ, соответствующих области органогеля.

Для сравнения в таблице приведены данные о гидродинамическом диаметре для лецитинового органогеля в циклогексане в аналогичных условиях (объемная доля дисперсной фазы Ф≈0,86, W=5,0 и T=25ºC) [149]. Значения схожи, порядка 10 нм.

Для образцов с параметром a=[олеиновая кислота]:[лецитин], равным от 0,1 до 0,4, величины гидродинамического диаметра имеют близкие значения. Можно предположить, что введение олеиновой кислоты до соотношения a≤0,4 не приводит к значительному изменению формы агрегатов – мицеллы остаются

цилиндрическими, но более короткими. Наблюдаемое снижение вязкости гелей при повышении количества олеиновой кислоты обусловлено уменьшением прочности пространственной сети геля за счет снижения контурной длины мицелл. При дальнейшем росте концентрации олеиновой кислоты форма агрегатов все больше приближается к сферической, пространственная сеть распадается. При соотношении a>0,6 образуется микроэмульсия. Схема предполагаемого структурного перехода представлена на рис. 3.8.

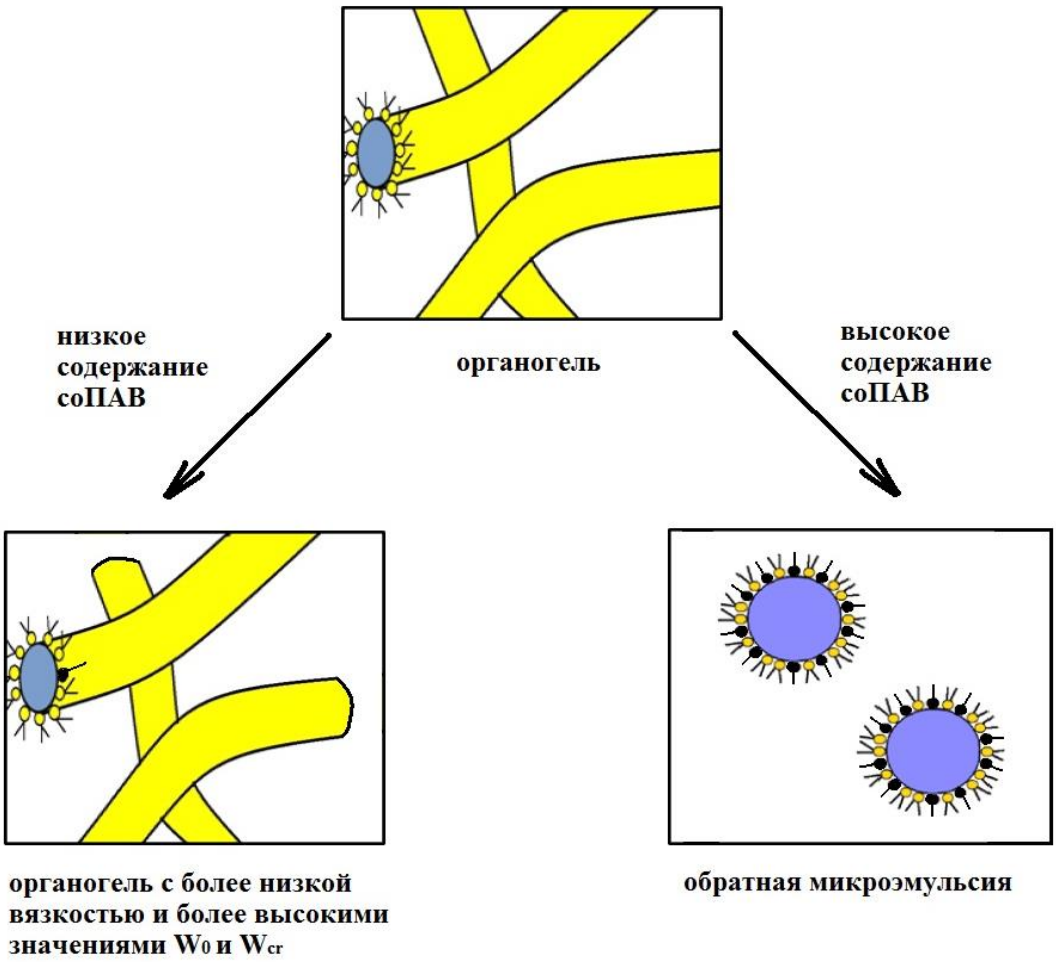

Рисунок 3.8. Схема структурного перехода от лецитинового органогеля, образованного цилиндрическими мицеллами, к микроэмульсии

Таким образом, присутствие олеиновой кислоты в низких концентрациях (a=[олеиновая кислота]:[лецитин]<0,1) приводит к расширению области

существования лецитиновых органогелей, при этом пространственная структура гелей сохраняется. Рост соотношения а= [олеиновая кислота]:[лецитин] от 0,1 до 0,6 приводит к плавному расширению однофазной области и перестройке структуры агрегатов от обратных цилиндрических мицелл к каплям микроэмульсии (рис. 3.8). При а>0,6 в системе лецитин - олеиновая кислота - додекан - вода существует низковязкая обратная микроэмульсия, которая может содержать до 8,4 мас. % воды.

3.3. Влияние замены компонентов системы

3.3.1. Влияние замены источника лецитина на границу однофазной области в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода

Так как высокоочищенный лецитин имеет высокую стоимость, для создания конкурентоспособной микроэмульсии необходимо заменить источник лецитина на более дешевый, с более низким содержанием фосфатидилхолина. В качестве такого источника был выбран соевый L-α-фосфатидилхолин производства «Acros Organics», общее содержание фосфолипидов в котором по данным производителя составляет 97,7 мас.%, в том числе 22 мас.% фосфатидилхолина. Изучено влияние замены источника лецитина на верхнюю по воде границу однофазной области (рис. 3.9).

Как видно из рисунка 3.9, замена источника лецитина приводит к сужению области существования микроэмульсии. При содержании воды больше $W_{кр}$ наблюдалось помутнение образцов и образование жидкокристаллической фазы. При этом максимальное значение $W_{кр}$ для системы с лецитином «Acros Organics» равно 19, что характерно для микроэмульсий. Положение максимума сдвигается с соотношения [олеиновая кислота]:[лецитин] равного 0,9 для лецитина Lipoid S100, на соотношение [олеиновая кислота]:[лецитин], равное 0,6 для лецитина

«Acros Organics». При этом при a<0,6 область существования шире для системы с лецитином «Acros Organics», при a>0,6 - для системы с лецитином Lipoid S100.

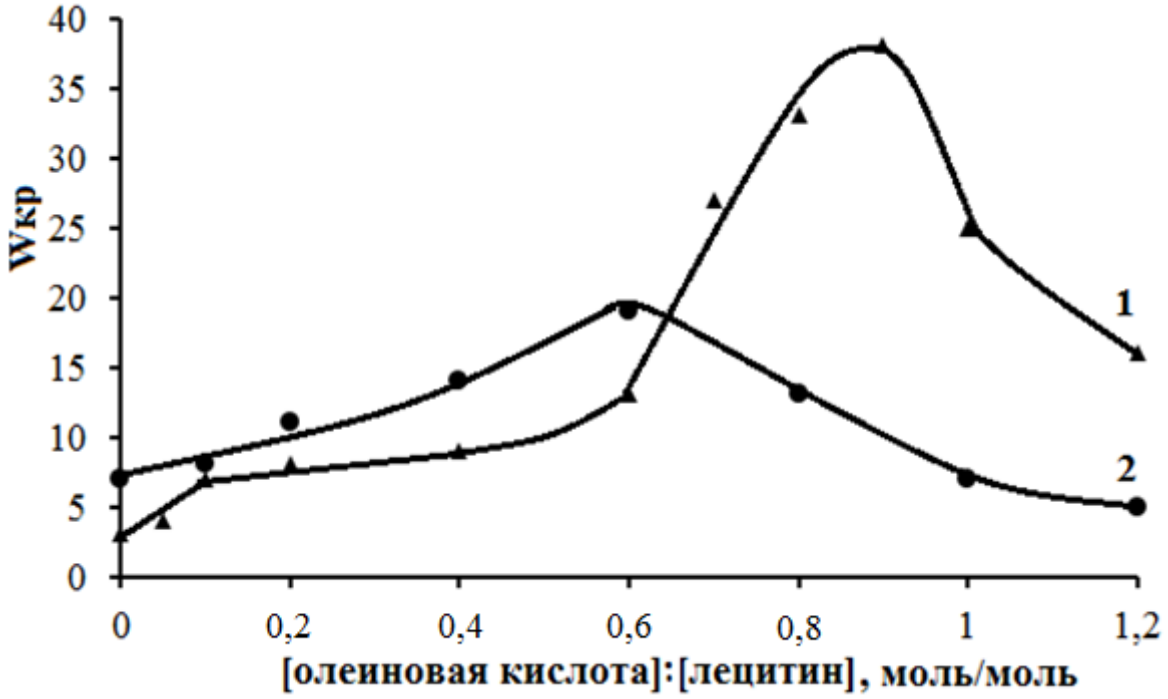

Рисунок 3.9. Граница однофазной области микроэмульсии в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода, источник лецитина: 1 – Lipoid S100, 2 – лецитин «Acros Organics». Концентрация лецитина 10 мас. %, T=25˚C.

Полученные данные подтверждают возможность применения фосфолипидного концентрата «Acros Organics» в качестве источника лецитина для получения микроэмульсий. Отметим, что стоимость лецитина «Acros Organics» по каталогу составляет 52 000 рублей (CAS номер: 8002-43-5) за килограмм, а стоимость высокоочищенного лецитина за килограмм примерно 120 000 рублей (по данным каталога Sigma-Aldrich).

Для того чтобы расширить область существования, можно заменить растворитель и ввести дополнительные компоненты.

3.3.2. Влияние замены додекана органическими растворителями на солюбилизационную емкость системы по воде

Для того чтобы микроэмульсию можно было применять для доставки биологически активных веществ, она должна включать в себя фармацевтически приемлемые компоненты. Поэтому необходимо заменить органический растворитель – додекан биосовместимым и нетоксичным веществом. В качестве такого вещества может быть использовано вазелиновое масло, растительное жирное масло, растительное эфирное масло.

При выборе жирных и эфирных растительных масел в составе композиции предпочтительно использовать гипоаллергенные масла, обладающие смягчающим, питательным, регенерирующим, антиоксидантным, противовоспалительным и ранозаживляющим действием на кожу и имеющие приятный запах. Среди жирных растительных масел такими свойствами обладают, например, масло авокадо, масло арганы, масло жожоба и масло из косточек винограда. Среди эфирных масел можно использовать масло чайного дерева, масло лаванды и розовое масло, которые обладают выраженными регенерирующими и ранозаживляющими свойствами и приятным запахом [140, 150].

Для того чтобы подтвердить возможность замены додекана на биосовместимый растворитель, была определена солюбилизационная емкость системы по воде при таких органических растворителях, как вазелиновое масло, масло авокадо, смесь вазелинового масла и эфирного масла чайного дерева, смесь вазелинового масла, масла авокадо и эфирного масла чайного дерева при соотношениях [олеиновая кислота]: [лецитин] от 0 до 1,2 (табл. 3.2, 3.3; рис. 3.10, 3.11).

Таблица 3.2. Максимальное содержание воды (мас. %) в системе лецитин – олеиновая кислота – органический растворитель – вода

Органический растворитель	**Содержание воды при мольном соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]:**							
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2
Додекан	1,8	2	2,5	3,3	4,4	3,1	1,7	1
Вазелиновое масло	2,5	2,9	3,2	3,6	4,0	3,4	2,6	2,0
Масло авокадо	Микроэмульсия не образуется							
Вазелиновое масло + масло чайного дерева	1,6	1,9	2,3	2,9	3,8	5,2	3,5	2,3
Вазелиновое масло + масло авокадо + масло чайного дерева	2,2	2,7	3,1	3,4	3,7	3,3	2,8	2,0

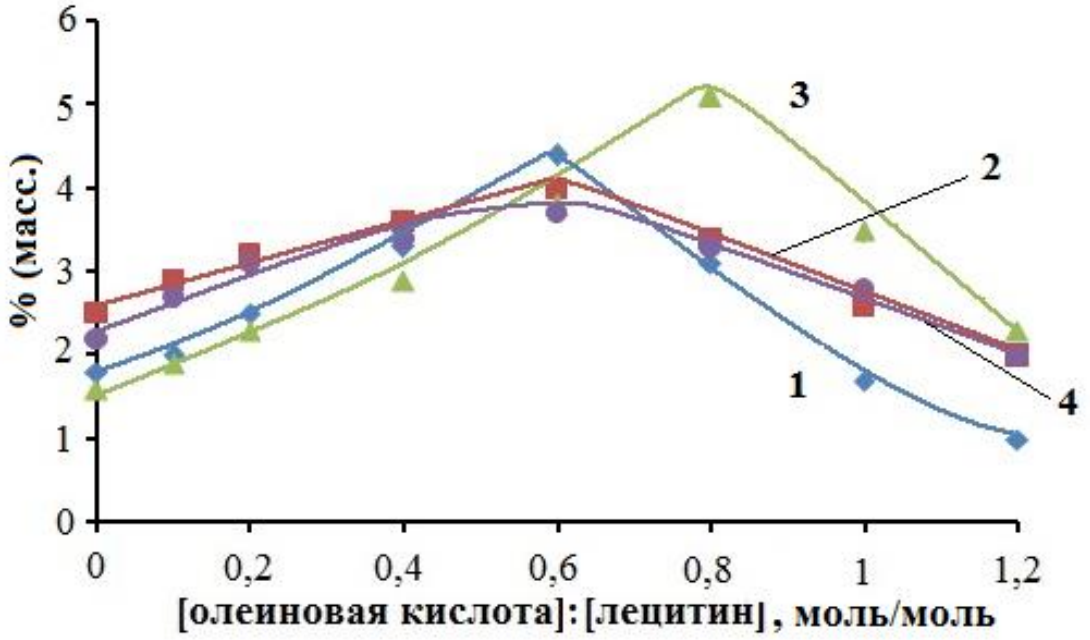

Рисунок 3.10. Зависимость содержания воды, % (масс.), от мольного соотношения [олеиновая кислота]: [лецитин]. Органический растворитель: 1-додекан, 2 - вазелиновое масло, 3 - смесь вазелинового масла и масла чайного дерева, 4- смесь вазелинового масла, масла авокадо и масла чайного дерева. T=25°C, лецитин «Acros Organics», $C_{лец}$ = 10 мас.%.

Таблица 3.3. Максимальное содержание воды ($W_{кр}$) в системе лецитин – олеиновая кислота – органический растворитель – вода

Органический растворитель	**$W_{кр}$ при мольном соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]:**							
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2
Додекан	7	8	11	14	19	13	7	5
Вазелиновое масло	11	13	14	16	17	15	11	8
Масло авокадо	Микроэмульсия не образуется							
Вазелиновое масло + масло чайного дерева	7	9	11	13	18	21	16	12
Вазелиновое масло + масло авокадо + масло чайного дерева	10	12	13	15	16	15	12	11

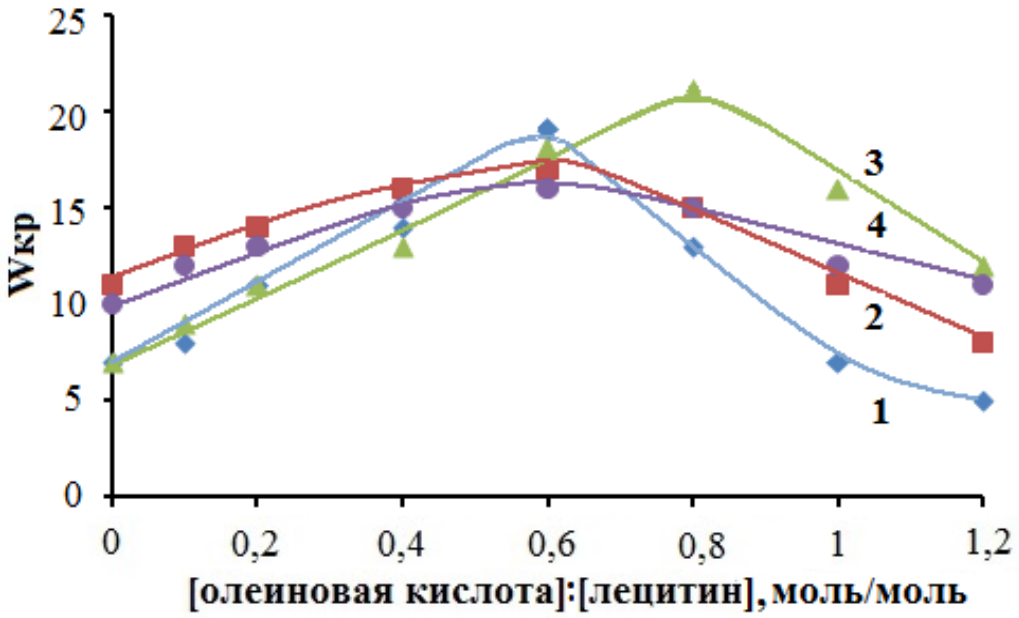

Рисунок 3.11. Зависимость $W_{кр}$ от мольного соотношения [олеиновая кислота]:[лецитин]. Органический растворитель: 1 – додекан, 2 – вазелиновое масло, 3 – смесь вазелинового масла и масла чайного дерева, 4 – смесь вазелинового масла, масла авокадо и масла чайного дерева. T=25°C, лецитин «Acros Organics», $C_{лец}$=10 мас.%.

Полученные данные свидетельствуют о том, что замена додекана на смесь масел приводит к незначительному снижению солюбилизационной емкости системы. Максимальные значения $W_{кр}$ составили 19 (4,4 мас. % воды) – для додекана, 18 (5,2 мас. % воды) – смеси вазелинового масла и масла чайного дерева, 17 (4,0 мас % воды) – для вазелинового масла и 16 (3,7 мас. % воды) для смеси вазелинового масла, масла авокадо и эфирного масла чайного дерева. Полученные зависимости имеют схожий вид, возрастают при увеличении соотношения [олеиновая кислота]: [лецитин] и проходят через максимум. При этом максимум для систем с додеканом, вазелиновым маслом и смесью масел вазелинового, авокадо и чайного дерева наблюдется при соотношении 0,6. Для системы, в качестве органической фазы в которой использовали смесь вазелинового масла и эфирного масла чайного дерева, максимум приходится на соотношение 0,8.

При полной замене додекана маслом авокадо микроэмульсия не образуется, максимальное значение W составило 2,5. Это соответствует известному факту, что растительные масла, такие как оливковое, подсолнечное, масло канолы и др., которые являются триглицеридами жирных кислот с длинной углеводородной цепью, плохо микроэмульгируются [151].

Введение эфирного масла чайного дерева в систему расширяет область существования микроэмульсии, приводит к повышению солюбилизационной емкости по воде. Это можно объяснить тем, что эфирное масло чайного дерева играет роль еще одного соПАВ, так как имеет в своем составе монотерпеновые спирты, например, терпинен-4-ол в количестве 30 – 48 мас.% (табл. 2.7). Он содержит полярную ОН-группу (рис.3.12) и может встраиваться в межфазный слой, образованный лецитином и олеиновой кислотой, оказывая влияние на кривизну и гибкость монослоя и способствуя образованию микроэмульсии. Схема расположения компонентов в микроэмульсии состава лецитин – олеиновая

кислота – вазелиновое масло - эфирное масло чайного дерева - вода приведена на рис. 3.13

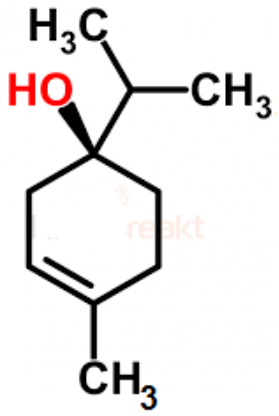

Рисунок 3.12. Структурная формула терпинен-4-ола (1-изопропил-4-метил-циклогекс-3-ен-1-ол)

Рисунок 3.13. Схема расположения компонентов в микроэмульсии состава лецитин – олеиновая кислота – вазелиновое масло – эфирное масло чайного дерева – вода

Аналогичное поведение показано для другого представителя терпеновых спиртов – гераниола (*транс*-3,7-диметил-2,6-октадиен-1-ол) [152]. В системе

октил моноголюкозид – гераниол – циклогексан – вода гераниол одновременно выступает в качестве соПАВ и сорастворителя. Являясь соПАВ, гераниол встраивается в межфазный слой и изменяет кривизну монослоя оксил моноголюкозида с положительных значений в сторону отрицательных, способствуя образованию микроэмульсии типа вода–в–масле (рис. 3.14).

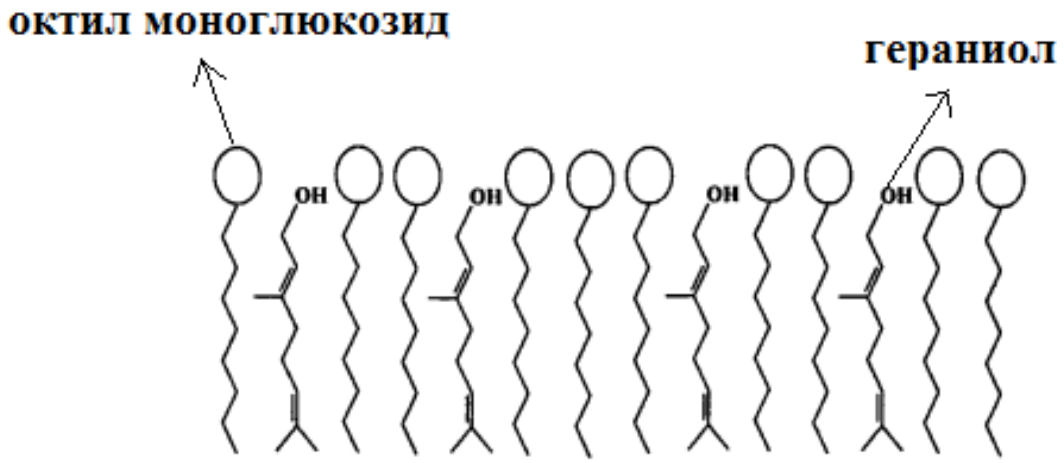

Рисунок 3.14. Схема расположения октил моноглюкозила и гераниола в межфазном слое [152]

С помощью метода динамического светорассеяния было проанализировано влияние замены органического растворителя на размер агрегатов в системе лецитин – олеиновая кислота – органический растворитель – вода (рис. 3.15). Для анализа использовали микроэмульсии при одинаковом мольном соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин], равном 0,6 и одинаковом содержании воды в системе – 3 мас.%.

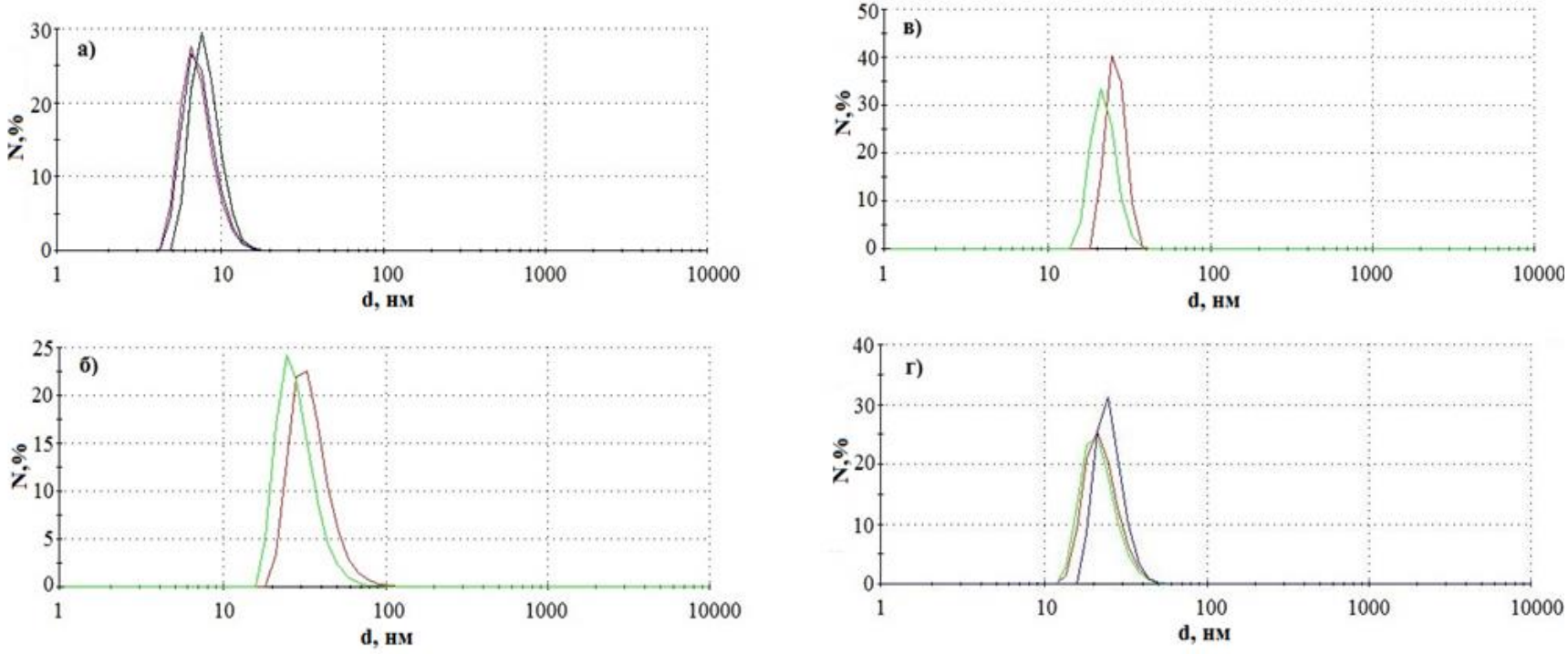

Рисунок 3.15. Гидродинамический диаметр капель микроэмульсий в системе лецитин - олеиновая кислота – органический растворитель - вода с различными растворителями: а) додекан; б) вазелиновое масло; в) смесь вазелинового масла и масла чайного дерева; г) смесь вазелинового масла, масла авокадо и масла чайного дерева. Мольное соотношение [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,6. $C_{лец}$=10 мас. %, T=25ºC.

103

Из представленных на рис. 3.15 данных видно, что во всех исследованных системах значения гидродинамического диаметра находятся в нанометровой области, агрегаты микронных размеров отсутствуют. Значения гидродинамического диаметра капель для образцов составили величины от 7 до 28 нм (табл. 3.4).

Таблица 3.4. Значения гидродинамического диаметра капель микроэмульсий в системе лецитин – олеиновая кислота – органический растворитель – вода при различных органических растворителях. T = 25ºC

Органический растворитель	**Гидродинамический диаметр капель, нм**
Додекан	7±0,5
Вазелиновое масло	28±4
Вазелиновое масло + масло чайного дерева	21,5±1,5
Вазелиновое масло +масло авокадо + масло чайного дерева	21,5±1,5

Таким образом, замена додекана на вазелиновое масло или смесь масел приводит к укрупнению капель, но при этом размер сохраняется характерным для микроэмульсий. Полученные системы являются пригодными для трансдермальной доставки, так как диаметр липидных каналов в межклеточных мембранах в роговом слое кожи составляет ~ 6-40 нм [153].

3.4. Разработка состава и методики получения микроэмульсии для медицинского применения

Для разработки микроэмульсии на основе лецитина, применимой в медицине, необходимо использовать биосовместимые и нетоксичные компоненты. При этом она должна удовлетворять следующим требованиям:

1) высокая солюбилизационная емкость по воде, чтобы обеспечить максимальную солюбилизацию водорастворимых лекарственных веществ;

2) частичная или полная замена вазелинового масла на растительное;

3) невысокая стоимость основных компонентов.

Для того чтобы микроэмульсия удовлетворяла заявленным выше требованиям, необходимо заменить источник лецитина, так как в соответствии с данными производителя лецитин «Acros Organics» не пригоден для использования в медицинских и косметических композициях. В качестве источника лецитина был выбран соевый лецитин «Мослецитин». Согласно данным производителя, «Мослецитин», так же, как и использованный ранее лецитин «Acros Organics», содержит фосфолипидный комплекс - 97 мас.%, в том числе фосфатидилхолин - 22 мас.%. Этот фосфолипидный концентрат сертифицирован и разрешен Министерством здравоохранения к применению в качестве биологически активной добавки (свидетельство о государственной регистрации № 77.99.23.3.У.2624.3.06 от 27.03.2006). Стоимость лецитина «Мослецитин» в аптеках составляет примерно 1500 рублей за килограмм, что в 80 раз меньше, чем стоимость высокоочищенного лецитина.

3.4.1. Определение области существования микроэмульсии при различных соотношениях компонентов

Было проведено изучение максимально возможного содержания воды в образцах микроэмульсий различного состава и определены концентрации компонентов, при которых микроэмульсия может содержать (солюбилизировать) не менее 5 мас. % воды, что дает возможность обеспечить приемлемые уровни солюбилизации водорастворимых биологически активных веществ.

Максимально возможное содержание воды в микроэмульсии (солюбилизационную емкость по воде) определяли методом титрования водой.

Данные по составу образцов и их состоянию (наличию или отсутствию гомогенной микроэмульсии) представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5. Состав образцов и их состояние при T=25ºC

№	**Содержание компонентов, мас.%**						**Состояние образца**
	Фосфолипид-ный концентрат	Вазелиновое масло	Жирное масло (масло авокадо)	Эфирное масло (масло чайного дерева)	Олеиновая кислота	Вода	
1	**18,7**	**32,0**	**32,1**	**4,2**	**6,5**	**6,5**	**Гомогенная микроэмульсия**
2	**19,1**	**32,5**	**32,5**	**4,2**	**6,7**	**5,0**	**Гомогенная микроэмульсия**
3	**18,5**	**31,4**	**31,3**	**4,0**	**6,5**	**8,3**	**Гомогенная микроэмульсия**
4	18,2	31,0	31,0	4,0	6,4	9,4	Образец помутнел и расслоился
5	**19,4**	**33,3**	**32,9**	**4,3**	**5,1**	**5,0**	**Гомогенная микроэмульсия**
6	**18,9**	**32,4**	**32,1**	**4,2**	**5,0**	**7,4**	**Гомогенная микроэмульсия**
7	**19,4**	**33,0**	**33,0**	**2,7**	**6,8**	**5,0**	**Гомогенная микроэмульсия**
8	**18,9**	**32,2**	**32,2**	**2,6**	**6,7**	**7,4**	**Гомогенная микроэмульсия**
9	**18,9**	**31,9**	**32,0**	**5,7**	**6,5**	**5,0**	**Гомогенная микроэмульсия**
10	**18,3**	**31,1**	**31,2**	**5,6**	**6,4**	**7,4**	**Гомогенная микроэмульсия**
11	**21,0**	**31,6**	**31,6**	**4,2**	**6,6**	**5,0**	**Гомогенная микроэмульсия**
12	**20,4**	**30,8**	**30,8**	**4,1**	**6,5**	**7,4**	**Гомогенная микроэмульсия**
13	**23,3**	**30,4**	**30,4**	**4,3**	**6,6**	**5,0**	**Гомогенная микроэмульсия**
14	**22,7**	**29,6**	**29,6**	**4,2**	**6,5**	**7,4**	**Гомогенная**

							микроэмульсия
15	**16,1**	**32,9**	**32,9**	**4,2**	**6,5**	**7,4**	**Гомогенная микроэмульсия**
16	**14,7**	**34,7**	**34,7**	**4,3**	**6,6**	**5,0**	**Гомогенная микроэмульсия**
17	**14,3**	**33,8**	**33,8**	**4,2**	**6,5**	**7,4**	**Гомогенная микроэмульсия**
18	**19,0**	**32,3**	**32,3**	**4,3**	**7,1**	**5,0**	**Гомогенная микроэмульсия**
19	**18,5**	**33,1**	**33,1**	**1,4**	**6,5**	**7,4**	**Гомогенная микроэмульсия**
20	8,4	37,9	37,9	4,2	6,8	4,8	Образец помутнел и расслоился
21	25,3	29,5	29,5	4,3	6,7	4,7	Образец помутнел и расслоился
22	19,8	33,7	33,7	4,3	3,5	5,0	Образец помутнел и расслоился
23	18,8	32,0	32,0	4,2	8,3	4,7	Образец помутнел и расслоился
24	19,1	48,7	16,4	4,2	6,6	5,0	Образец помутнел и расслоился
25	19,7	16,7	50,3	4,5	6,8	2,0	Образец помутнел и расслоился

Как видно из представленных в таблице 3.5 данных, область существования гомогенной микроэмульсии в системе фосфолипидный концентрат - вазелиновое масло - масло авокадо – эфирное масло чайного дерева – олеиновая кислота - вода соответствует соотношению компонентов, мас.%:

- фосфолипидный концентрат - 14,3-23,3;
- олеиновая кислота - 5,0-7,1;
- вазелиновое масло - 29,6-34,7;
- жирное растительное масло - 29,6-34,7;
- эфирное растительное масло - 1,4-5,7;
- вода – остальное.

Вводить в состав композиции более высокие концентрации эфирных масел не целесообразно из-за их высокой стоимости, сильного запаха и возможности при высоких концентрациях вызывать раздражение кожи.

Оптимальное мольное соотношение [олеиновая кислота]:[лецитин] составило 0,7 – 0,9, что близко к величинам, показанным в разделе 3.3.2.

Было определено оптимальное соотношение вазелиновое масло:растительное жирное масло, при котором образуется микроэмульсия с требуемым значением солюбилизационной емкости по воде (табл. 3.6). Образцы до титрования водой содержали 20,1 мас.% лецитина, 7,1 мас.% олеиновой кислоты, 4,4 мас.% эфирного масла чайного дерева и 68,4 мас.% смеси вазелинового масла и масла авокадо.

Таблица 3.6. Содержание вазелинового масла и растительного жирного масла и состояние системы на примере растительного масла авокадо

Содержание вазелинового масла, мас. %	**Содержание масла авокадо, мас. %**	**Содержание воды, мас. %**	**Состояние образца**
48,7	16,4	5,0	Образец помутнел и расслоился
16,7	50,3	2,0	Образец помутнел и расслоился
31,4	31,3	8,3	**Гомогенная микроэмульсия**
-	68,3	0	Лецитин полностью не растворился
68,3	-	4,0	Образец помутнел и расслоился

Как видно из таблицы 3.6 оптимальное соотношение вазелиновое масло:растительное жирное масло составляет 1:1. При данном соотношении образуется гомогенная микроэмульсия и достигается максимальная солюбилизационная емкость по воде - 8,3 мас.%.

Наличие наноструктуры и размер капель микроэмульсии определяли методом динамического светорассеяния. На рисунке 3.16 представлен результат определения гидродинамического диаметра капель микроэмульсии при 25°С.

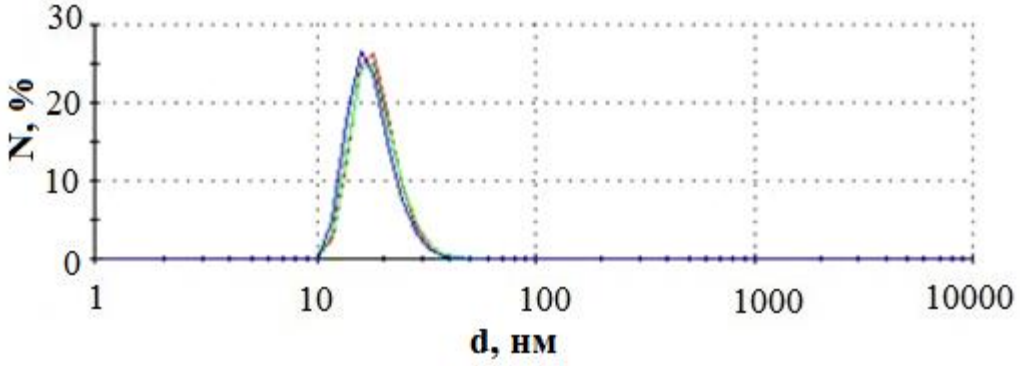

Рисунок 3.16. Гидродинамический диаметр капель микроэмульсии в системе лецитин - олеиновая кислота – вазелиновое масло – масло авокадо – эфирное масло чайного дерева – вода. Состав образца: 18,7 мас.% фосфолипидного концентрата, 32,0 мас.% вазелинового масла, 32,1 мас.% масла авокадо, 6,5 мас.% олеиновой кислоты, 4,2 мас.% масла чайного дерева, 6,5 мас.% воды. Т=25°С.

Согласно полученным данным, средний гидродинамический диаметр капель микроэмульсии составляет 17±2 нм.

Были исследованы образцы микроэмульсий, содержащих различные жирные и эфирные масла. Для получения микроэмульсий использовали фосфолипидный концентрат «Мослецитин» и натуральные жирные и эфирные масла (ООО «Ботаника», Россия). Все полученные образцы представляли собой

прозрачные маслянистые жидкости желтоватого цвета с приятным запахом. Наличие наноструктуры и размер капель микроэмульсии определяли методом динамического светорассеяния. Составы образцов и гидродинамический диаметр капель микроэмульсий представлены в таблице 3.7.

Таблица 3.7. Составы образцов и гидродинамический диаметр капель микроэмульсий, полученных с различными маслами

Состав образца	**Диаметр капель, нм**
Фосфолипидный концентрат «Мослецитин» - 1,88 г (19,0 мас.%) Масло вазелиновое медицинское - 3,20 г (32,5 мас.%) Масло арганы - 3,20 г (32,5 мас.%) Масло чайного дерева - 0,42 г (4,3 мас.%) Олеиновая кислота - 0,65 г (6,6 мас.%) Вода - 0,50 г (5,1 мас.%)	24
Фосфолипидный концентрат «Мослецитин» - 1,88 г (18,8 мас.%) Масло вазелиновое медицинское - 3,20 г (32,0 мас.%) Масло авокадо - 1,60 г (16,0 мас.%) Масло из косточек винограда - 1,60 г (16,0 мас.%) Масло лаванды - 0,42 г (4,2 мас.%) Олеиновая кислота - 0,65 г (6,5 мас.%) Вода - 0,65 г (6,5 мас.%)	40
Фосфолипидный концентрат «Мослецитин» - 1,88 г (19,0 мас.%) Масло вазелиновое медицинское - 3,20 г (32,5 мас.%) Масло жожоба - 3,20 г (32,5 мас.%) Розовое масло - 0,21 г (2,15 мас.%) Масло лаванды - 0,21 г (2,15 мас.%) Олеиновая кислота - 0,65 г (6,6 мас.%) Вода - 0,50 г (5,1 мас.%)	79

Как видно из данных таблицы 3.7, для получения композиции для доставки биологически активных веществ в форме микроэмульсии с каплями размером в десятки нанометров можно использовать составы, содержащие различные жирные и эфирные масла.

На основе полученных данных был запатентован состав на основе лецитина для трансдермальной доставки биологически активных веществ. Технический результат достигается композицией на основе лецитина для трансдермальной доставки биологически активных веществ, которая образует структуру обратной микроэмульсии и содержит лецитин в составе фосфолипидного концентрата, вазелиновое масло, воду, олеиновую кислоту, жирное растительное масло и эфирное растительное масло при следующем соотношении компонентов (мас.%): фосфолипидный концентрат - 14,3-23,3; вазелиновое масло - 29,6-34,7; олеиновая кислота - 5,0-7,1; жирное растительное масло - 29,6-34,7; эфирное растительное масло - 1,4-5,7; вода – остальное. Частичная замена вазелинового масла на природные растительные жирные и эфирные масла дает возможность улучшить впитывание состава без образования на коже жирной пленки, характерной для вазелинового масла и улучшить органолептические свойства композиции. В качестве жирного растительного масла может быть использовано масло авокадо и/или масло арганы, и/или масло жожоба, и/или масло из косточек винограда, а в качестве эфирного растительного масла может быть использовано масло чайного дерева и/или масло лаванды, и/или розовое масло.

3.4.2. Разработка методики получения микроэмульсии

В ходе работы была разработана методика приготовления образцов микроэмульсии. Процесс получения микроэмульсии включает в себя стадии, отображенные на рисунке 3.17.

Рисунок 3.17. Схема получения микроэмульсии лецитина

Для получения образца микроэмульсии расчетное количество лецитина при механическом перемешивании растворяли в смеси вазелинового и растительного жирного масла при температуре 50±1°С в закрытом бюксе с притертой крышкой. Время проведения процесса 60-90 мин. Контроль полноты растворения – визуально. После полного растворения фосфолипидного концентрата образец охлаждали до комнатной температуры.

Далее в полученный раствор при комнатной температуре вводили в требуемых количествах эфирное масло чайного дерева и олеиновую кислоту.

Затем также подвергали механическому перемешиванию с помощью магнитной мешалки при комнатной температуре.

Далее в полученную органическую фазу вводили воду в требуемом количестве. Систему можно подвергнуть механическому перемешиванию с помощью магнитной мешалки, либо проводить солюбилизацию воды с помощью ультразвукового диспергатора. Озвучивание следует проводить циклами до 1 минуты, чтобы не допустить нагревания системы.

Данная методика пригодна для получения микроэмульсий лецитина, содержащих биологически активные вещества (БАВ), в том числе не устойчивые к высоким температурам.

3.4.3. Свойства разработанной композиции

Параметрами, определяющими возможность использования той или иной композиции в медицине или косметике в качестве носителя биологически активных веществ, являются такие показатели, как вязкость системы, температурная стабильность, солюбилизация и высвобождение БАВ.

Вязкость микроэмульсии состава 18,7 мас.% фосфолипидного концентрата, 32,0 мас.% вазелинового масла, 32,1 мас.% масла авокадо, 6,5 мас.% олеиновой кислоты, 4,2 мас.% масла чайного дерева, 6,5 мас.% воды исследовали при помощи ротационного вискозиметра при температуре 25°С. Зависимости динамической вязкости от скорости сдвига (кривые течения) полученной микроэмульсии и образца лецитинового органогеля, содержащего лецитин ($C_{лец}$=0,025 моль/л), вазелиновое масло и воду (W=4,0) [65], представлены на рис. 3.18.

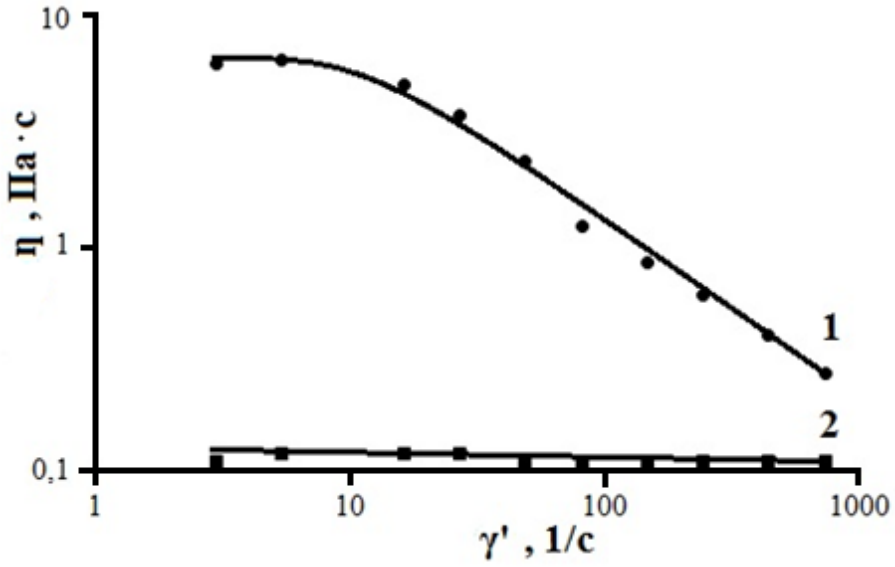

Рисунок 3.18. Зависимость динамической вязкости образцов от скорости сдвига 1 – лецитинового органогеля (данные Н.М. Мурашовой [65]) и 2 – микроэмульсии. T=25ºC.

Как видно из рис. 3.18, вязкость микроэмульсии практически не зависит от скорости сдвига. Вид ее кривой течения свидетельствует об отсутствии пространственной структуры, характерной для органогелей, построенных из переплетенных цилиндрических обратных мицелл. Значения вязкости микроэмульсии при низких скоростях сдвига лежат в диапазоне 0,11-0,12 Па·с, что в десятки раз ниже, чем для лецитинового органогеля.

Для применения в качестве носителя для трансдермальной доставки биологически активных веществ система должна выдерживать температуры в диапазоне 25-45°C, то есть должна быть устойчива к температуре человеческого тела и транспортабельна без специальных охладительных установок в жаркую погоду. Для того чтобы подтвердить температурную стабильность системы, был проведен сравнительный термогравиметрический анализ микроэмульсии состава 19,1 мас.% фосфолипидного концентрата, 32,5 мас.% вазелинового масла, 32,5 мас.% масла авокадо, 6,7 мас.% олеиновой кислоты, 4,2 мас.% масла чайного дерева, 5 мас.% воды, и раствора лецитина в маслах (21,6 мас.% фосфолипидного

концентрата, 36,8 мас. % вазелинового масла, 36,8 мас. % масла авокадо, 4,8 мас.% масла чайного дерева) на приборе STA 449 F5 Jupiter (рис.3.19).

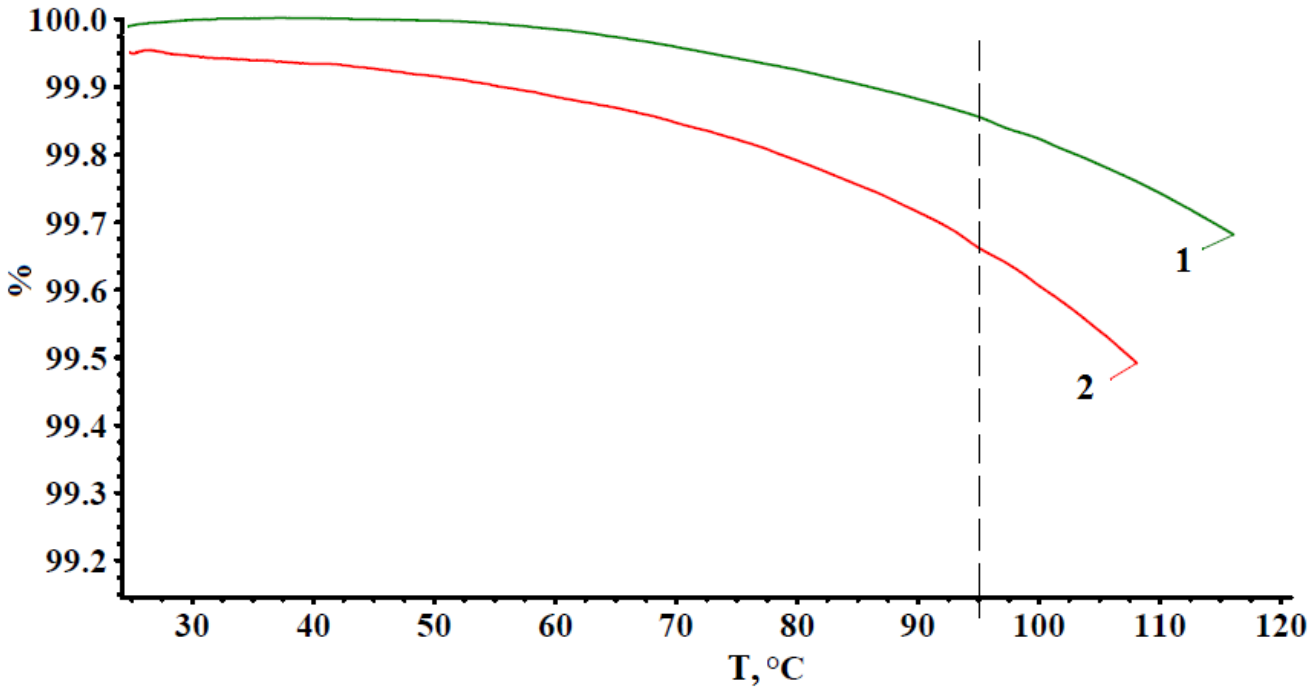

Рисунок 3.19. Зависимость потери массы образца (в % от исходной массы) от температуры при нагревании для: 1 – раствора в системе лецитин – вазелиновое масло – масло авокадо – эфирное масло чайного дерева; 2 – микроэмульсии в системе лецитин – олеиновая кислота – вазелиновое масло – масло авокадо – эфирное масло чайного дерева – вода

Как видно из кривых, приведенных на рисунке 3.19, образцы остаются термически стабильными практически во всем диапазоне заданных температур. Потери массы образцов до температуры 95ºС составляют менее 0,3 мас.%. Видимое изменение массы приходится на температурный интервал T>95°C, которое объясняется испарением воды и компонентов эфирного масла чайного дерева (температура вспышки эфирного масла чайного дерева составляет 59ºС [154], температура кипения отдельных компонентов эфирного масла находится в

диапазоне 160-240°С [150]) из образцов. Таким образом, микроэмульсионная система удовлетворяет условию стабильности в пределах 25-45°С.

Также было определено изменение среднего гидродинамического диаметра капель микроэмульсии в зависимости от температуры. Полученные данные представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8. Зависимость гидродинамического диаметра капель микроэмульсии от температуры

Температура, °С, и другие условия	25	37	45	37 (после нагревания до 45°С)	25 (через 23 дня после получения)
Средний гидродинамический диаметр капель, нм	17	16	135	11	16

Как видно из представленных в таблице 3.8 данных, в диапазоне температур 25-37°С средний гидродинамический диаметр капель микроэмульсии составляет 16-17 нм. Такой размер капель является характерным для микроэмульсий, в то время как для обратных сферических мицелл гидродинамический диаметр не превышает 1-2 нм. При нагревании до 45°С наблюдалось резкое увеличение среднего гидродинамического размера капель до 135 нм. Однако визуально при нагревании образца до 50ºС помутнения и расслоения микроэмульсии на две фазы не наблюдалось. Возможно при повышении температуры до 45ºС происходит образование везикул лецитина, но это предположение требует дальнейшего изучения. При охлаждении от 45 до 37°С наноструктура образца восстанавливалась. Диаметр капель микроэмульсии практически не изменялся с течением времени. Это свидетельствует о термодинамической стабильности изученной системы и отличает полученную микроэмульсию от традиционных эмульсий. Капли традиционных эмульсий (в том числе и эмульсий с

нанометровым размером капель – наноэмульсий) с течением времени укрупняются, и после нагревания и охлаждения размер капель не восстанавливается до исходных значений.

Для того чтобы проверить возможность использования микроэмульсии на основе лецитина в качестве носителя для трансдермальной доставки лекарственных веществ была определена солюбилизационная ёмкость ее по отношению к биологически активным веществам с различными физико-химическими свойствами. Были выбраны водорастворимые (аскорбиновая кислота, глюкоза), маслорастворимые (α-токоферола ацетат) и плохо растворимые в воде и масле (метилурацил и стрептоцид (сульфаниламид) лекарственные вещества. Водорастворимые биологически активные вещества вносили в виде водного раствора с концентрацией 10 мас.%. Полученные данные по возможности включения выбранных лекарственных веществ в микроэмульсию приведены в табл. 3.9.

Таблица 3.9. Включение лекарственных веществ

Вещество	**Максимальное содержание в микроэмульсии, мас.%**
аскорбиновая кислота	0,21
метилурацил	выпадает в осадок
α-токоферола ацетат	9,9
стрептоцид	выпадает в осадок
глюкоза	0,50

В разработанной микроэмульсии можно солюбилизировать сравнимое с жидкими кристаллами [60] количество маслорастворимых биологически активных веществ, но существенно меньше водорастворимых БАВ. Например, количество солюбилизированной глюкозы для микроэмульсии – 0,50 мас.%, для

сравнения, для жидких кристаллов это значение составляет 2,45 мас.%, а лецитиновый органогель позволяет включать 0,20 мас.% глюкозы [155]. При этом концентрация лецитина в предложенной микроэмульсии ниже, чем в органогеле и жидких кристаллах.

В обратной микроэмульсии водорастворимые лекарственные вещества будут солюбилизироваться в водном ядре капель микроэмульсии, маслорастворимые – растворятся в сплошной масляной фазе (рис. 3.20).

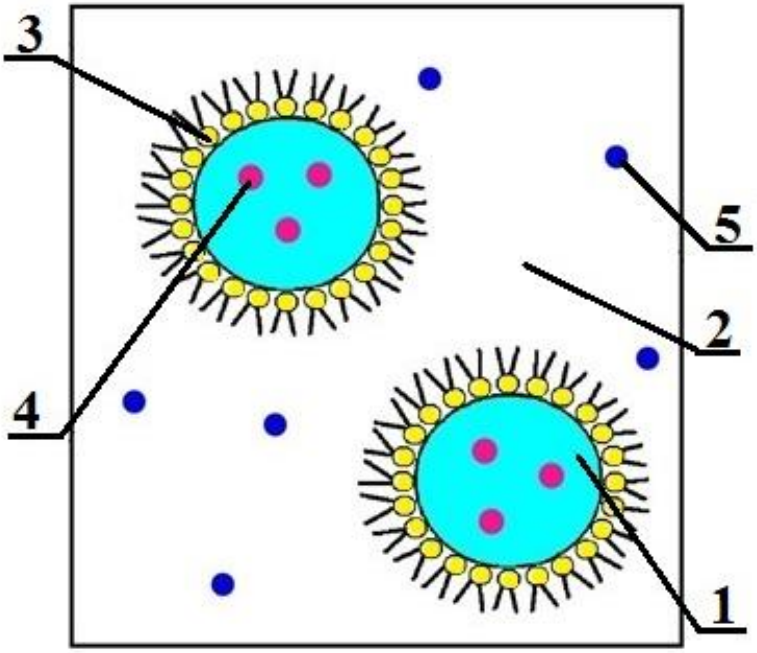

Рисунок 3.20. Схема включения водо- и маслорастворимых лекарственных веществ в обратной микроэмульсии. 1 – водная фаза; 2 – масляная фаза; 3 – молекулы лецитина; 4 – водорастворимое лекарственное вещество, 5 – маслорастворимое лекарственное вещество

Поскольку в изученной микроэмульсии объем масляной фазы существенно превышает объем водной фазы, то маслорастворимых компонентов в нее можно вводить значительное больше, чем водорастворимых. Для токоферола ацетата и аскорбиновой кислоты эти значения различаются примерно в 50 раз (табл.3.9).

Нерастворимые в воде и масле вещества в виде кристаллов твёрдой фазы будут образовывать суспензию и с течением времени выпадать в осадок. Поэтому плохо растворимые вещества в микроэмульсию вводить нецелесообразно.

3.5. Изучение скорости высвобождения водорастворимых веществ из микроэмульсии методом диализа

Одной из важнейших биофармацевтических характеристик любой лекарственной формы является высвобождение лекарственного вещества. Для того чтобы оценить пригодность использования обратной микроэмульсии в качестве носителя для адресной доставки, необходимо изучить высвобождение из нее водорастворимых биологически активных веществ и сравнить полученные результаты с аналогичными системами.

3.5.1. Разработка модельной системы

На стадии фармацевтической разработки для изучения высвобождения БАВ из микроэмульсионных носителей можно использовать методы, основанные на диализе через полупроницаемую мембрану [156 – 160].

Прототипом водорастворимого лекарственного вещества был выбран краситель Родамин С с молекулярной массой 479 г/моль. Спектр поглощения Родамина С с концентрацией $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ г/г в физиологическом растворе приведен на рисунке 3.21. Максимум поглощения соответствует длине волны 553 нм.

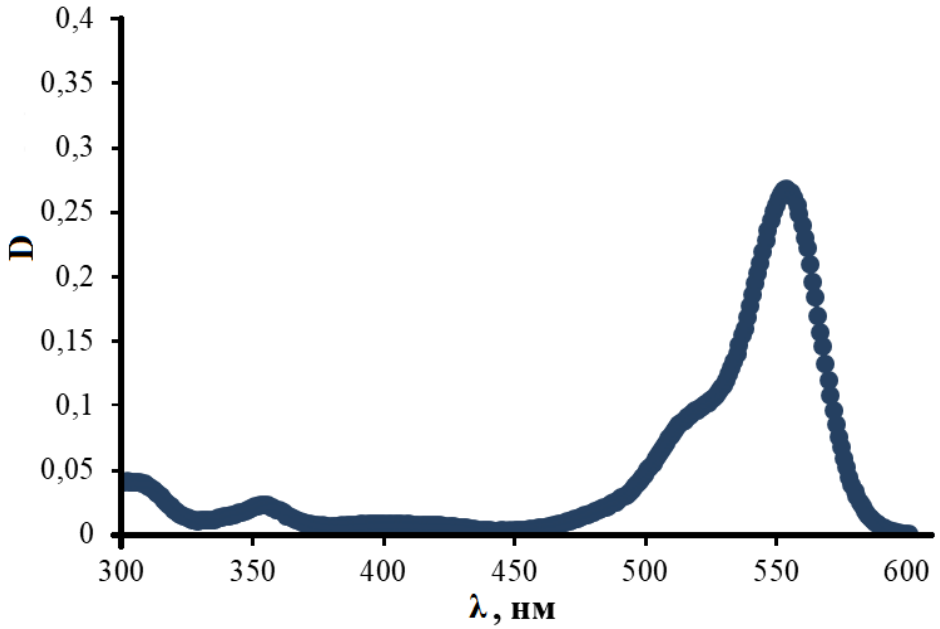

Рисунок 3.21. Спектр поглощения красителя Родамина С в физиологическом растворе при концентрации Родамина С = $1 \cdot 10^{-4}$ г/г

Концентрация красителя, равная 0,2 мас. %, была выбрана, исходя из предварительных экспериментов. При такой концентрации обеспечивается приемлемый уровень оптической плотности раствора в ходе диализа (т.е. концентрацию красителя можно измерить фотометрически даже при времени диализа 1 час). При более низких концентрациях затруднительно определить концентрацию в принимающем растворе. При более высоких концентрациях Родамина С возникают трудности с его введением в микроэмульсию из-за ограничений по растворимости красителя в воде и по солюбилизационной емкости микроэмульсии.

В качестве диализной мембраны использовали целлюлозную трубчатую мембрану Cellu·Sep (MFPI, США) с размером пор 3,5 кДа. Такой размер пор обеспечивает свободное прохождение красителя и препятствует прохождению агрегатов, образуемых молекулами лецитина, например, везикул.

Масса образца для проведения диализа составляла 5 г. Такое количество помещается и равномерно распределяется в диализном мешке размером 4,6×3,9

см. При введении образца в диализный мешок контролировали, чтобы в мешке с образцом не было пузырьков воздуха, так как наличие пузырьков может исказить результат.

Температура принимающей среды при проведении диализа составляла 37±1ºС, что соответствует температуре человеческого тела.

Для моделирования состава биологических жидкостей в качестве принимающей среды использовали физиологический раствор (водный раствор хлорида натрия 0,9 мас.%). Объем физиологического раствора, в который переносился краситель – 1000 мл. Значение pH принимающей среды находилось в диапазоне 6,0-7,0.

Рассматривали два способа расположения диализного мешка – вертикальное и горизонтальное. Горизонтальное положение обеспечивало лучшую фиксацию мешка с образцом и более воспроизводимые результаты, чем вертикальное. Поэтому для эксперимента было использовано горизонтальное положение. Схема и фотография установки приведены на рисунках 3.22 и 3.23, соответственно.

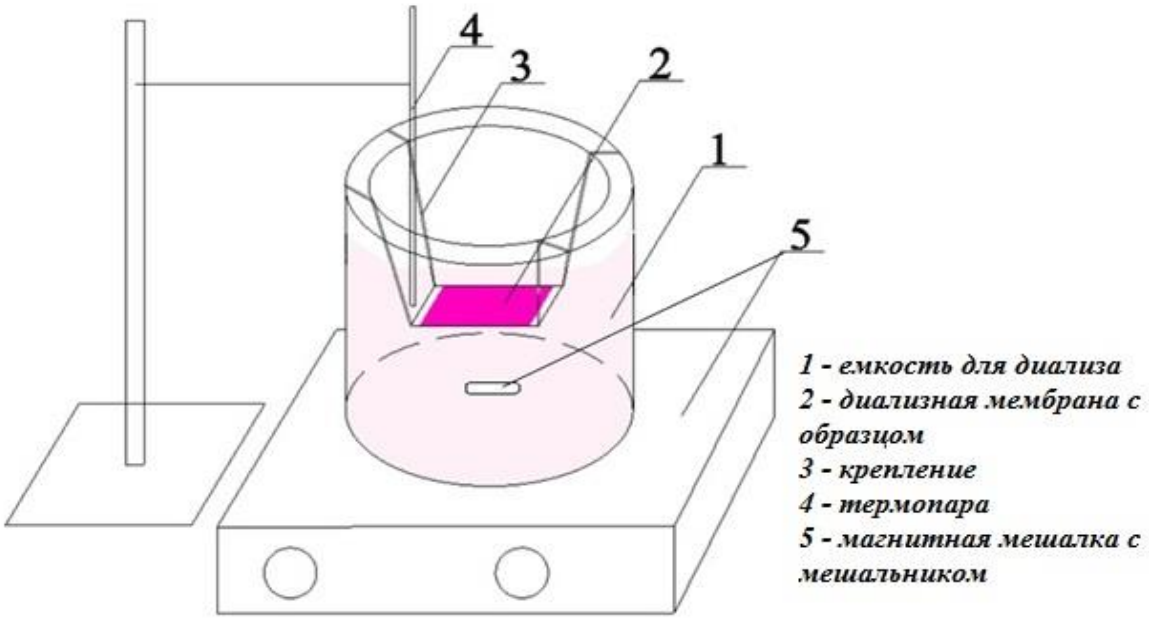

Рисунок 3.22. Схема установки для проведения диализа

а) б)

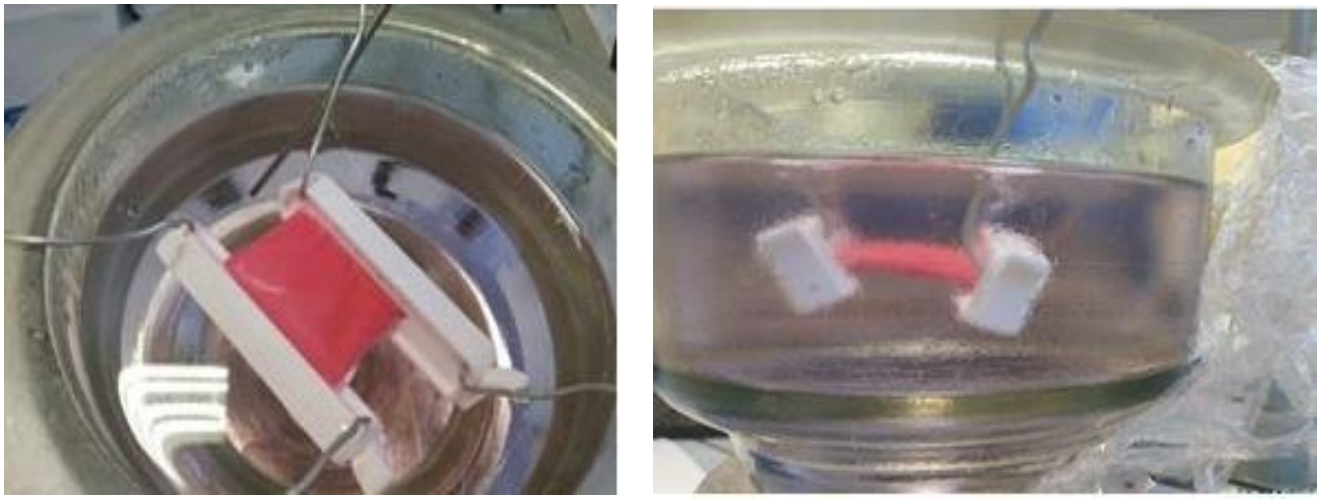

Рисунок 3.23. Фотографии размещения диализного мешка с образцом в сосуде с принимающей средой

Для каждой системы эксперимент по диализу проводили не менее трех раз. Полученные значения оптической плотности усредняли и пересчитывали в значения концентраций, масс и процентов массы выделившегося Родамина С.

В ходе предварительного эксперимента было исследовано высвобождение красителя Родамина С в течение 24 часов. Концентрация Родамина С составила 0,2 мас.%, в качестве принимающей среды была дистиллированная вода, температура принимающей среды 37±1ºС. Результаты эксперимента представлены в таблице 3.10 и на рисунке 3.24.

Таблица 3.10. Высвобождение Родамина С из образца микроэмульсии

Время, ч	1	2	3	4	8	24
Количество выделившегося красителя, мас.%	0,3	0,9	1,3	1,8	3,3	8,1

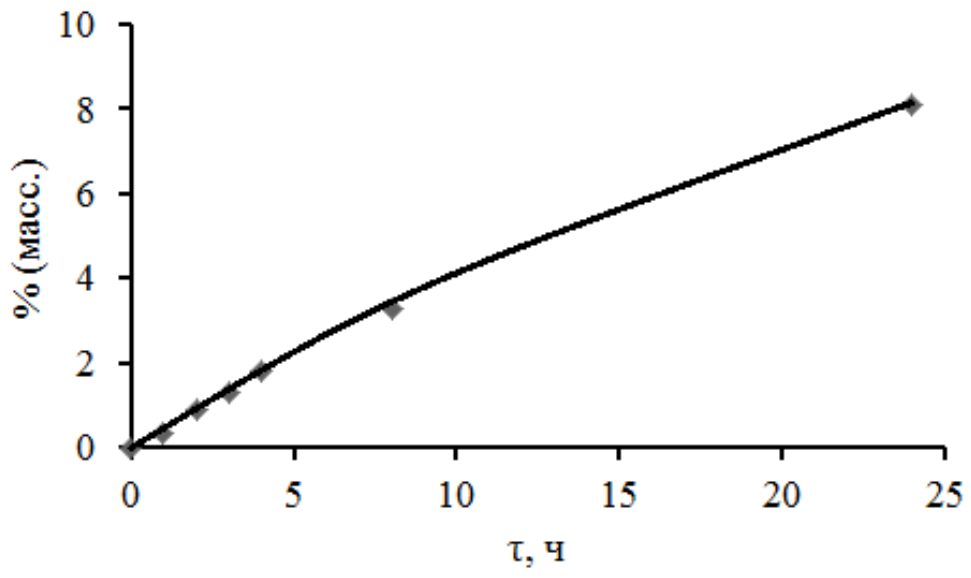

Рисунок 3.24. Профиль высвобождения красителя Родамина С из микроэмульсии в дистиллированную воду

Для дальнейших экспериментов выбран начальный участок кинетической кривой, соответствующий периоду 7 часов, на котором наблюдается линейная зависимость.

Таким образом, была разработана методика оценки скорости высвобождения водорастворимых веществ из обратной микроэмульсии с помощью диализа через целлюлозную мембрану с размером пор 3,5 кДа, модельное вещество – краситель Родамин С с концентрацией 0,2 мас.%, принимающая среда - физиологический раствор, температура 37±1ºС, масса образца 5 г, размер диализного мешка 4,6×3,9 см, объем физиологического раствора, в который переносился краситель – 1000 мл, время эксперимента 7 часов.

3.5.2. Сравнение скорости высвобождения водорастворимого красителя из микро- и наноструктурированных систем: обратной эмульсии и обратной микроэмульсии на основе лецитина

Выбор состава микроструктурированной системы был основан на результатах предварительного исследования стабильности обратных эмульсий в системе лецитин - вазелиновое масло - масло авокадо - масло чайного дерева - олеиновая кислота-вода с различным массовым содержанием воды. Эмульсии в количестве 10 г получали путем смешивания органической (раствор лецитина и олеиновой кислоты в маслах) и водной фаз в стакане емкостью 50 мл под действием ультразвука с частотой 22 кГц и мощностью 26,2 Вт в течение 30 секунд с последующим охлаждением до комнатной температуры. Обработку ультразвуком проводили 5-7 раз до получения однородной эмульсии. Ультразвуковая обработка, а не механическое перемешивание, была выбрана для сходства с методикой получения микроэмульсии. Затем по 10 мл эмульсии каждого состава было помещено в градуированную пробирку на 10 мл с ценой деления 0,2 мл. Наблюдения проводили на протяжении 5 месяцев. Полученные результаты продемонстрированы в таблице 3.11.

Таблица 3.11. Процент отслоившейся органической фазы (от общего объема эмульсии)

Количество дней	**% отслоившейся органической фазы при различном содержании воды**				
	10 мас.%	15 мас.%	20 мас.%	25 мас.%	30 мас.%
1	56	8	4	6	4
14	56	8	6	6	4
28	56	10	6	6	4
42	56	10	6	6	4
56	56	10	6	6	4

70	56	10	6	6	4
84	56	10	6	6	4
98	56	10	6	6	4
112	56	10	6	6	4
126	56	12	6	6	4
140	56	12	6	6	4

В качестве системы для сравнения скорости высвобождения была выбрана эмульсия с содержанием 20 мас.% воды. Эта система показала лучшую стабильность относительно эмульсий, содержащих 10 мас.% и 15 мас.% воды, и была ближе по составу к разработанной микроэмульсии, чем образцы с содержанием воды 25 мас.% и 30 мас.%. Состав образцов для проведения эксперимента приведен в таблице 3.12. Состав органической фазы эмульсии и микроэмульсии был одинаков, они отличались только содержанием воды – 5 мас.% в микроэмульсии и 20 мас.% в эмульсии. В готовый образец вводили водорастворимый краситель Родамин С в количестве 0,2 мас.%.

Таблица 3.12. Содержание компонентов в образцах микроэмульсии и эмульсии

Тип структуры	**Содержание компонентов, мас.%**					
	Лецитин «Acros Organics»	Масло авокадо	Вазелиновое масло	Масло чайного дерева	Олеиновая кислота	Водная фаза
Микроэмульсия	19,1	32,5	32,5	4,2	6,7	5,0
Эмульсия	16,1	27,4	27,4	3,5	5,7	20,0

Для подтверждения структуры был измерен средний гидродинамический диаметр капель образцов. Образец эмульсии перед измерением разбавляли в 10 раз органической фазой. На рисунке 3.25 представлена зависимость распределения (N, %) числа частиц по размеру (d, нм).

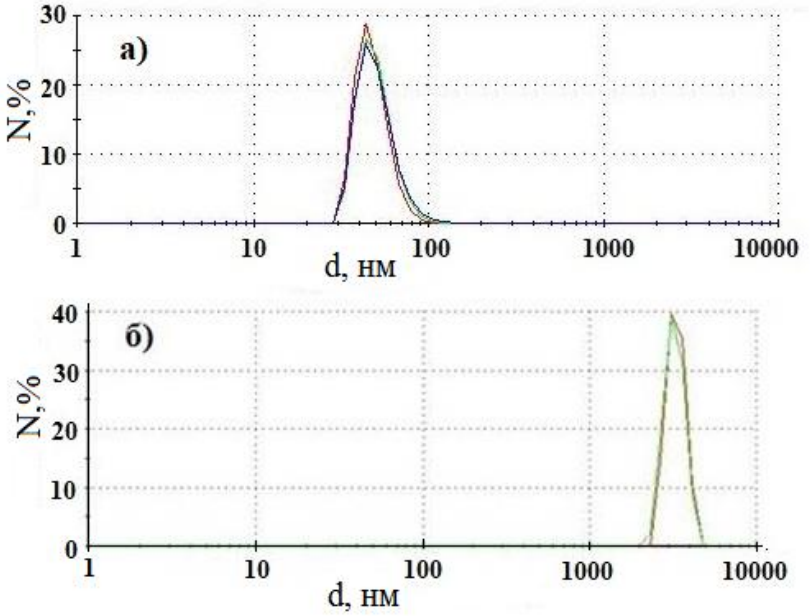

Рисунок 3.25. Гидродинамический диаметр капель в системе лецитин – олеиновая кислота – вазелиновое масло – масло авокадо – эфирное масло чайного дерева – вода для а) микроэмульсии; б) эмульсии. T=25 °C

Средний гидродинамический диаметр капель составил 43±7 нм и 3,4±0,2 мкм для микроэмульсии и эмульсии, соответственно.

Результаты эксперимента по диализу для микроэмульсии и эмульсии представлены на рис. 3.26-3.28. На рис.3.26 показаны данные по оптической плотности принимающей среды при длине волны 553 нм.

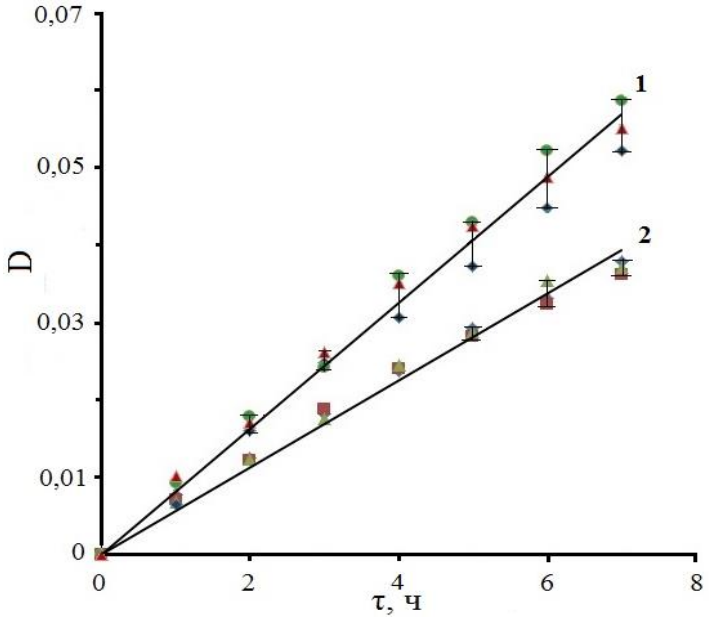

Рисунок 3.26. Зависимость оптической плотности (λ=553 нм) принимающей среды (D) от времени (τ) для: 1 – микроэмульсии; 2– эмульсии

График зависимости массы высвободившегося вещества из микроэмульсии и эмульсии от времени представлен на рис. 3.27.

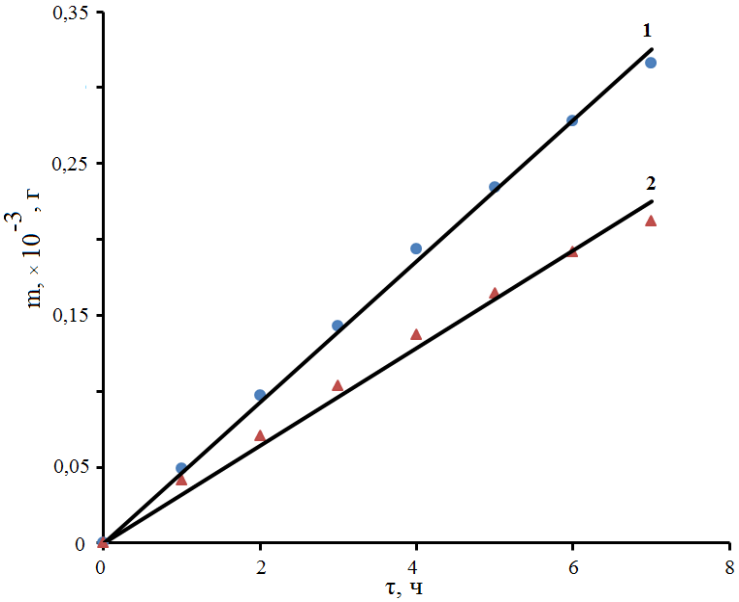

Рисунок 3.27. Масса высвободившегося вещества из: 1 – микроэмульсии; 2– эмульсии

Полученные зависимости имеют линейный характер, это позволяет рассчитать скорость переноса вещества из микроэмульсии.

Рассчитанные средние скорости переноса красителя из микроэмульсии и эмульсии составили 14,3 мг/(м^2·ч) и 9,9 мг/(м^2·ч), соответственно.

Значения масс и процентов выделившегося Родамина С от времени представлены в таблице 3.13.

Таблица 3.13. Результаты эксперимента по диализу для микроэмульсии и эмульсии

Время, ч	**Количество выделившегося красителя, мг**		**Количество выделившегося красителя, %**	
	МЭ	**Эмульсия**	**МЭ**	**Эмульсия**
0	0	0	0	0
1	0,049	0,041	0,49	0,41
2	0,097	0,070	0,97	0,7
3	0,143	0,104	1,43	1,04
4	0,194	0,137	1,94	1,37
5	0,234	0,164	2,34	1,64
6	0,278	0,192	2,78	1,92
7	0,316	0,212	3,16	2,12

График зависимости процента выделившегося Родамина С представлен на рис. 3.28.

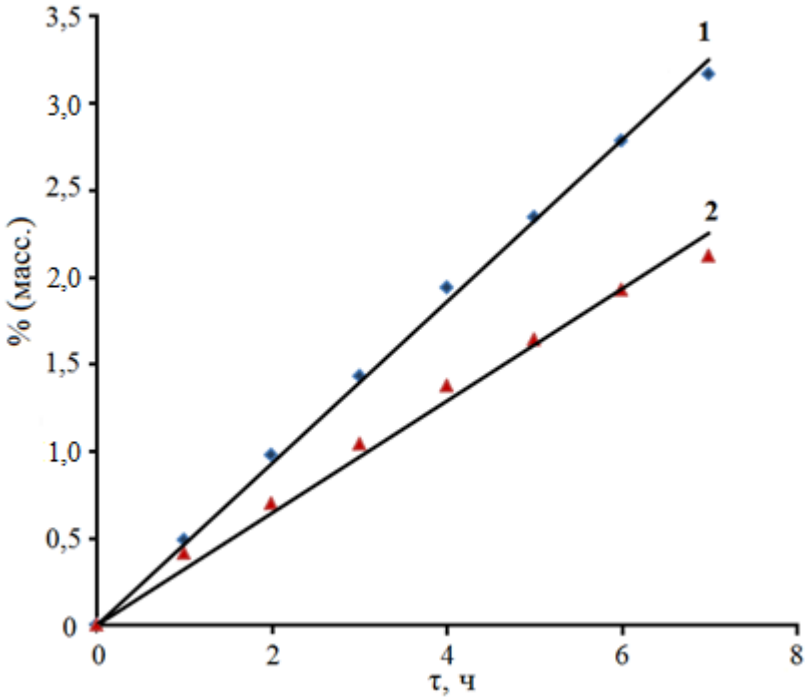

Рисунок 3.28. Высвобождение красителя Родамина С (процент выделившегося вещества) в физиологический раствор из 1 – микроэмульсии; 2 – эмульсии. T=37°C.

В результате эксперимента продемонстрировано, что скорость высвобождения Родамина С из обратной микроэмульсии с содержанием воды 5 мас.% и средним гидродинамическим диаметром капель 43 нм выше, чем для обратной эмульсии с содержанием воды 20 мас.% и средним гидродинамическим диаметром капель 3,4 мкм. Скорость высвобождения красителя из микроэмульсии и эмульсии составила $14{,}3 \cdot 10^{-3}$ г/(м^2·ч) и $9{,}9 \cdot 10^{-3}$ г/(м^2·ч), соответственно. Таким образом, из наноструктурированной системы высвобождение идет примерно в 1,5 раза быстрее, чем из микроструктурированной, несмотря на более высокое содержание воды в последней.

3.5.3. Сравнение скорости высвобождения водорастворимого красителя из двух наноструктурированных систем: обратной микроэмульсии и ламеллярных жидких кристаллов на основе лецитина

Далее сравнили высвобождение водорастворимого красителя из двух наноструктурированных систем – микроэмульсии и ламеллярных жидких кристаллов в системе лецитин – смесь масел – вода, ранее также предложенных в качестве носителя лекарственных веществ [60]. Образец жидких кристаллов получали путем смешивания необходимых компонентов согласно методике [60]. Составы образцов представлены в таблице 3.14. В готовый образец вводили водорастворимый краситель Родамин С в количестве 0,2 мас.%.

Таблица 3.14. Содержание компонентов в образцах микроэмульсии и ламеллярных жидких кристаллов

Тип структуры	**Содержание компонентов, мас.%**					
	Лецитин «Мослецитин»	Масло авокадо	Вазелиновое масло	Масло чайного дерева	Олеиновая кислота	Водная фаза
Микроэмульсия	19,1	32,5	32,5	4,2	6,7	5,0
Ламеллярные жидкие кристаллы	70,0	10,0	-	5,0	-	15,0

Согласно данным оптической поляризационной микроскопии образец жидких кристаллов имел ламеллярную структуру (рис. 3.29).

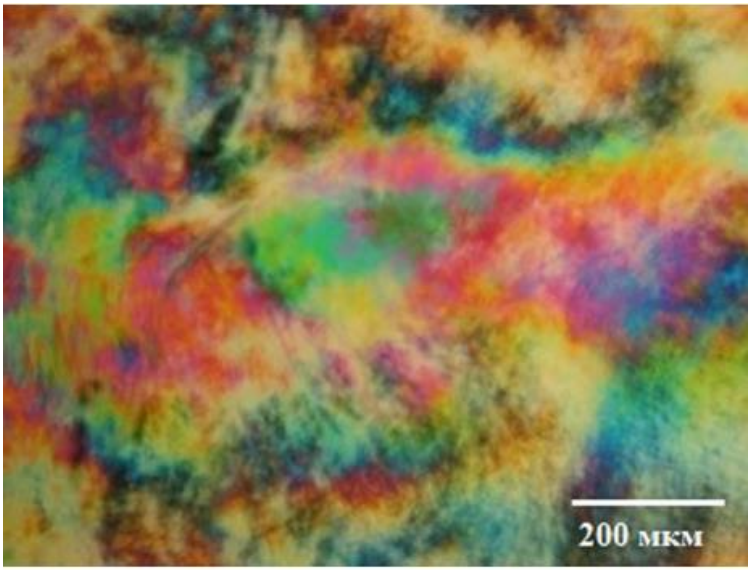

Рисунок 3.29. Микрофотография образца жидких кристаллов (поляризаторы скрещены).

Полученные данные по высвобождению красителя из микроэмульсии и жидких кристаллов (средние значения по трем опытам) представлены в таблице 3.15 и на рис. 3.30-3.32.

Таблица 3.15. Результаты эксперимента по диализу для микроэмульсии и жидких кристаллов

Время, ч	**Количество выделившегося красителя, мг**		**Количество выделившегося красителя, %**	
	МЭ	**ЖК**	**МЭ**	**ЖК**
0	0	0	0	0
1	0,066	0,019	0,66	0,19
2	0,120	0,040	1,20	0,40
3	0,164	0,064	1,64	0,64
4	0,210	0,088	2,11	0,88
5	0,252	0,112	2,52	1,12
6	0,301	0,131	3,01	1,31
7	0,361	0,152	3,61	1,53

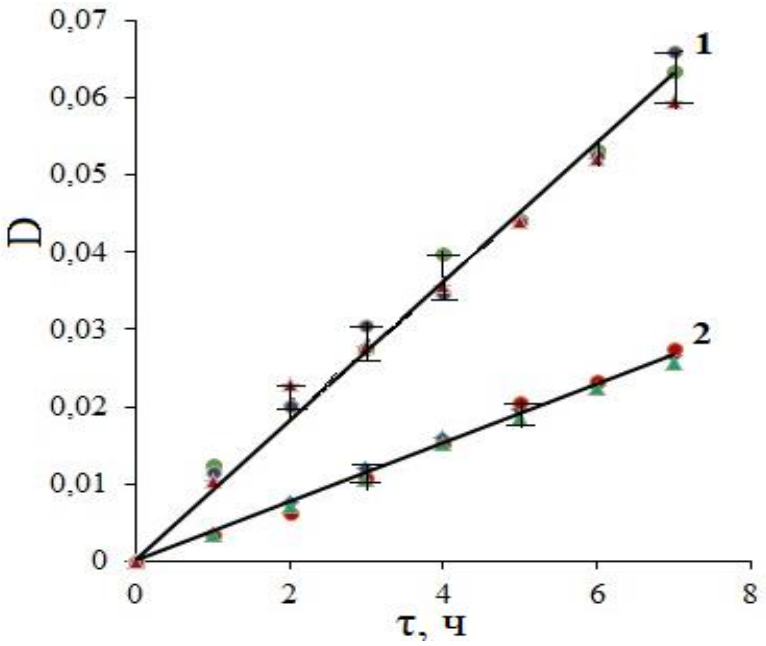

Рисунок 3.30. Зависимость оптической плотности (λ=553 нм) принимающей среды (D) от времени (τ) для: 1–микроэмульсии; 2–жидких кристаллов

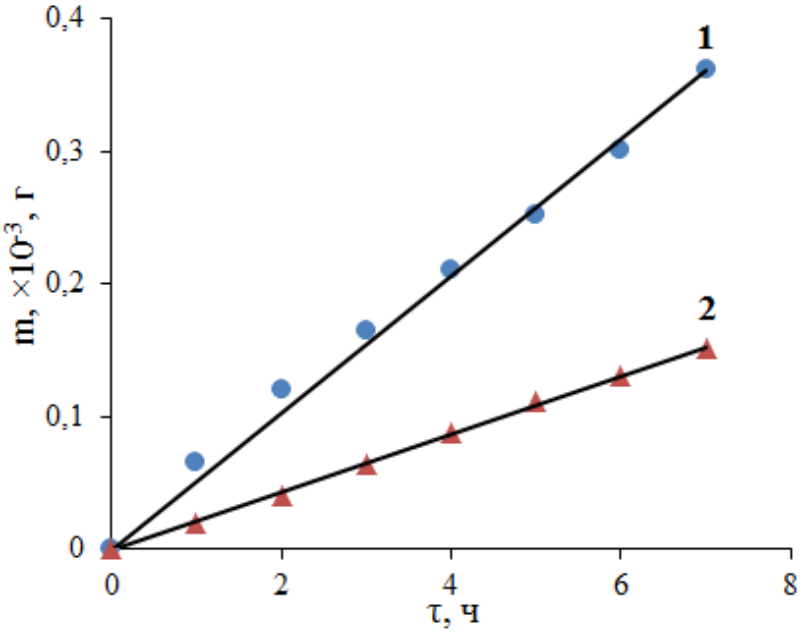

Рисунок 3.31. Масса высвободившегося вещества из: 1 – микроэмульсии; 2–жидких кристаллов

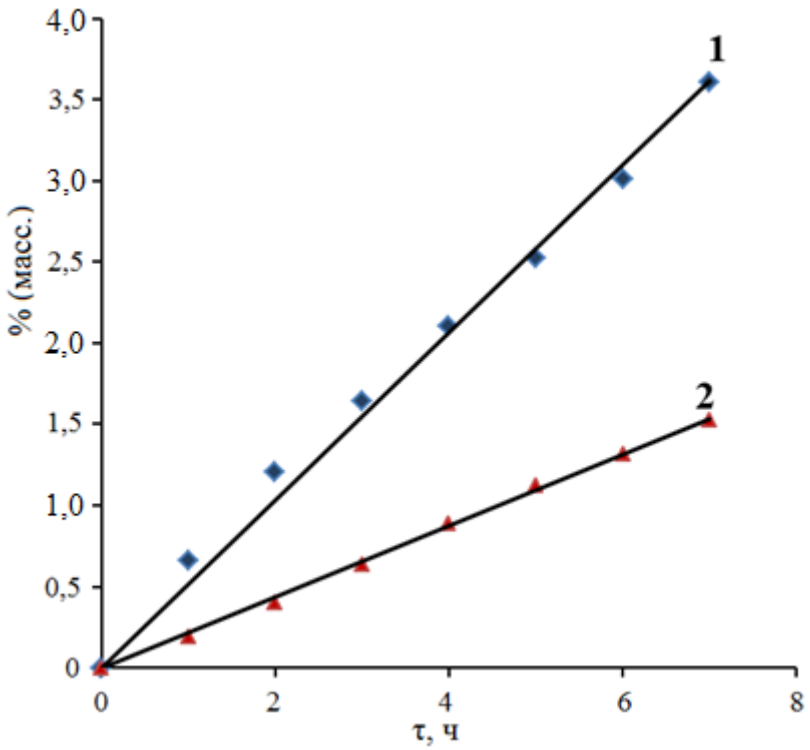

Рисунок 3.32. Высвобождение красителя Родамина С (процент выделившегося вещества) в физиологический раствор из: 1–микроэмульсии; 2–жидких кристаллов. Т=37 °С.

Полученные зависимости имеют линейный характер, это позволяет рассчитать скорость переноса вещества из жидких кристаллов и микроэмульсии.

Скорость переноса красителя в физиологический раствор из микроэмульсии составила $14{,}3 \cdot 10^{-3}$ г/(м^2·ч), из жидких кристаллов – $6{,}0 \cdot 10^{-3}$ г/(м^2·ч). За 7 часов из жидкокристаллического носителя выделилось 1,5% Родамина С, из микроэмульсии – 3,6% (рис.3.32).

Скорость переноса веществ из лиотропных жидких кристаллов или микроэмульсии через диализную мембрану зависит от многих факторов: от структурной организации носителя (например, типа жидких кристаллов), от содержания водной фазы в составе носителя, от гидрофильности или липофильности переносимого вещества [158, 159]. В обратной микроэмульсии диффузия водорастворимого красителя будет происходить за счет столкновения и

слияния капель. Чем ниже содержание воды в микроэмульсии, тем меньше вероятность таких столкновений, тем ниже скорость диффузии водорастворимого вещества. В ламеллярных жидких кристаллах молекулы красителя будут двигаться по прослойкам воды, находящимся между бислоями лецитина. Чем ниже содержание воды в жидких кристаллах, тем уже будут водные каналы, по которым может двигаться молекула красителя, тем ниже будет скорость ее передвижения. Таким образом, скорость высвобождения водорастворимых веществ из обеих исследованных систем должна зависеть от содержания в них воды. Можно было бы ожидать, что скорость высвобождения Родамина С из носителя с большим содержанием воды будет выше. В изученных жидких кристаллах воды содержится 15,0 мас.%, что в 3 раза выше, чем в микроэмульсии (5,0 мас.%). Однако скорость высвобождения красителя из жидких кристаллов примерно в 2,5 раза ниже, чем из микроэмульсии.

Кроме содержания воды, образцы микроэмульсии и жидких кристаллов отличаются еще по одному параметру, влияющему на скорость диффузии – по вязкости. Можно предположить, что несмотря на более высокое содержание воды в жидких кристаллах, меньшая скорость высвобождения Родамина С из жидких кристаллов по сравнению с обратной микроэмульсией объясняется их более высокой вязкостью. Для того чтобы подтвердить данное объяснение, было проведено сравнение вязкости жидких кристаллов и микроэмульсии лецитина при различных скоростях сдвига. Зависимости динамической вязкости образцов от скорости сдвига приведены на рис. 3.33.

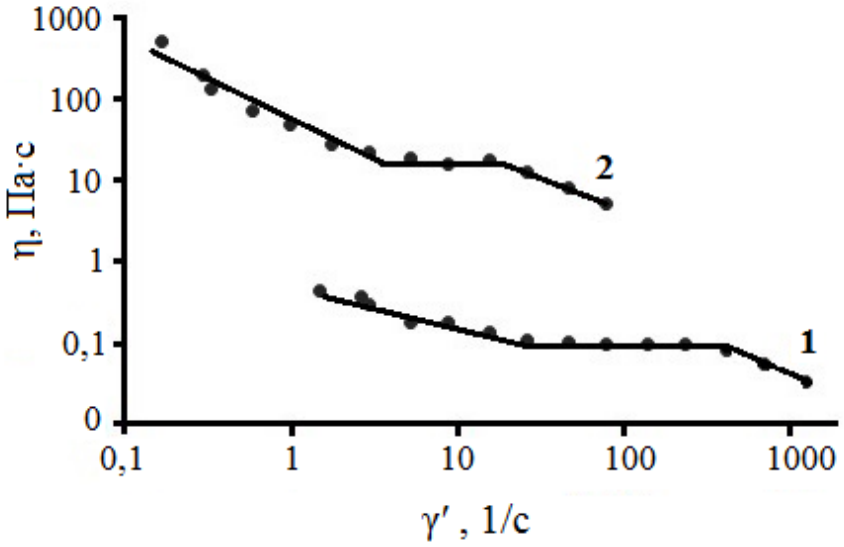

Рисунок 3.33. Зависимость динамической вязкости (η) образцов от скорости сдвига (γ′). 1 – микроэмульсия; 2 – жидкие кристаллы. T=25°C.

Обе исследованные системы являются неньютоновскими жидкостями, их вязкость снижается с увеличением скорости сдвига. Как видно из представленных данных (рис.3.37), вязкость жидких кристаллов превышает вязкость микроэмульсий более чем в 100 раз. Такое существенное различие вязкости объясняет разницу в наблюдаемых скоростях высвобождения Родамина С из микроэмульсии и жидких кристаллов лецитина. Таким образом, именно вязкость является определяющим фактором при сравнении способности изученных наноструктурированных носителей к высвобождению лекарственных веществ.

В таблице 3.16 приведены результаты сравнения трех систем на основе лецитина с аналогичным составом и разной структурой, которые могут использоваться в качестве носителей для доставки лекарственных веществ – микроэмульсии, эмульсии и жидких кристаллов.

Таблица 3.16. Характеристика систем на основе лецитина для доставки лекарственных веществ

		Микроэмульсия	**Эмульсия**	**Жидкие кристаллы**
Состав, мас. %	Лецитин	19,1	16,1	70,0
	Масло авокадо	32,5	27,4	10,0
	Вазелиновое масло	32,5	27,4	-
	Масло чайного дерева	4,2	3,5	5,0
	Олеиновая кислота	6,7	5,7	-
	Вода	5,0	20,0	15,0
Скорость высвобождения, $\times 10^{-3}$ г/(м^2·ч)		14,3	9,9	6,0
Количество выделившегося за 7 часов красителя,%		3,6	2,1	1,5

Таким образом, из трех рассмотренных систем с похожим составом и разной структурой, для микроэмульсии была получена самая высокая скорость высвобождения водорастворимого вещества. За 7 часов из жидкокристаллического носителя выделилось 1,5%, из эмульсии – 2,1%, из микроэмульсии – 3,6% красителя Родамина С. Это свидетельствует о преимуществе разработанной микроэмульсионной системы по сравнению с аналогами.

Для оценки эффективности высвобождения водорастворимых веществ из разработанной обратной микроэмульсии лецитина был проведен анализ

литературных данных о других возможных носителях лекарственных веществ со сходным строением.

Так, в работе [160] авторами изучена кинетика высвобождения доксорубицина из обратной микроэмульсии состава: парафиновое масло – 36 мас.%, смесь ПАВ: соПАВ - полиглицерил полирицинолеат:Tween 80 – 54 мас.% и водная фаза – 10 мас.%. Показано, что за 7 часов из микроэмульсии выделился примерно 1% доксорубицина.

Аналогичное поведение показано для микроэмульсии, описанной в работе [161]. В работе исследованы профили высвобождения коллагена и гиалуроновой кислоты из обратной микроэмульсии, включающей изопропилмиристат в качестве масляной фазы, смесь Span 80 и Tween 80 в качестве ПАВ и смесь пропиленгликоль и этиловый спирт в качестве соПАВ. Показано, что за 7 часов из микроэмульсии, содержащей гиалуроновую кислоту или коллаген в водной фазе в количестве 2 мас.%, в принимающую среду диффундируется примерно 1,5% гиалуроновой кислоты, а коллагена – 2,3%.

В работе [162] в качестве носителей с пролонгированным высвобождением действующего вещества использованы лиотропные жидкие кристаллы. В случае использования в качестве ПАВ фитанилглицерата, образующего гексагональную жидкокристаллическую фазу, высвобождение водорастворимых лекарственных веществ, например, октреотида и гистидина, за 7 часов составляет примерно 4,7% и 2%, соответственно.

Высвобождение ибупрофена из органогеля, образованного бис-(аминоспирт)-оксаламидным гелеобразователем, показано в работе [163]. Высвобождение ибупрофена происходило в буферный раствор со значением pH, равным 5,5. За 7 часов высвободилось порядка 5% ибупрофена.

Анализ литературных данных показывает конкурентоспособность разработанной обратной микроэмульсии на основе лецитина в качестве носителя

для доставки водорастворимых лекарственных веществ. Сравнение описанных систем представлено в таблице 3.17.

Таблица 3.17. Сравнение систем-носителей для адресной доставки лекарственных веществ

Система	**Высвобождаемое вещество**	**Количество выделившегося за 7 часов вещества, %**
Обратная микроэмульсия [160]	Доксорубицин	~ 1
Обратная микроэмульсия [161]	Гиалуроновая кислота	~ 1,5
	Коллаген	~ 2,3
Лиотропные жидкие кристаллы [162]	Октреотид	~ 4,7
	Гистидин	~ 2
Органогель [163]	Ибупрофен	~ 5
Разработанная микроэмульсия	**Водорастворимый краситель Родамин С**	**3,6**

Таким образом, данные, полученные в ходе исследования свойств разработанной композиции, позволяют предложить микроэмульсию в системе лецитин – олеиновая кислота – вазелиновое масло – жирное растительное масло – эфирное растительное масло - вода для медицины. Ее можно использовать для создания средств пролонгированного действия с медленным высвобождением действующих веществ.

3.6. Получение опытной партии образцов на основе микроэмульсии лецитина и оценка их ранозаживляющего действия

Для подтверждения возможности применения разработанной микроэмульсии в качестве носителя для ранозаживляющего лекарственного средства были получены опытные образцы, переданные для дальнейших экспериментов in vivo в ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН.

В качестве активного вещества с ранозаживляющим и иммуностимулирующим действием сотрудниками Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН Л.В. Федуловой и Е.Р. Василевской был предложен белково-пептидный водно-солевой экстракт из иммунокомпетентных органов свиньи (тимуса, селезенки и лимфоузлов). Ранее было показано его иммуностимулирующее действие при пероральном введении [164, 165].

Составы опытных образцов представлены в таблице 3.18

Таблица 3.18. Составы образцов микроэмульсий

Компонент	**Содержание в контрольном образце, мас. %**	**Содержание в образце с белково-пептидным экстрактом, мас. %**
Лецитин (содержание фосфолипидов более 97 мас. %)	19,1	19,1
Олеиновая кислота	6,7	6,7
Вазелиновое масло	32,5	32,5
Масло авокадо	32,5	32,5
Эфирное масло чайного дерева	4,2	4,2

Дисперсная (водная) фаза	5,0 (дистиллированная вода)	5,0 (белково-пептидный водный экстракт, концентрация белка 20 г/л)

Солюбилизацию как воды, так и белково-пептидного экстракта проводили под действием ультразвука с частотой 22 кГц и мощностью 26,2 Вт в течение 1 мин, затем образец охлаждали до комнатной температуры. Обработку ультразвуком повторяли 3-4 раза до полной солюбилизации водной фазы. Методика солюбилизации была подобрана таким образом, чтобы снизить риск денатурации и снижения активности белково-пептидных компонентов.

Наноструктуру образцов полученных микроэмульсий исследовали методом динамического светорассеяния. Во всех образцах присутствовали агрегаты только нанометрового размера, микрочастиц не обнаружено (рис. 3.34).

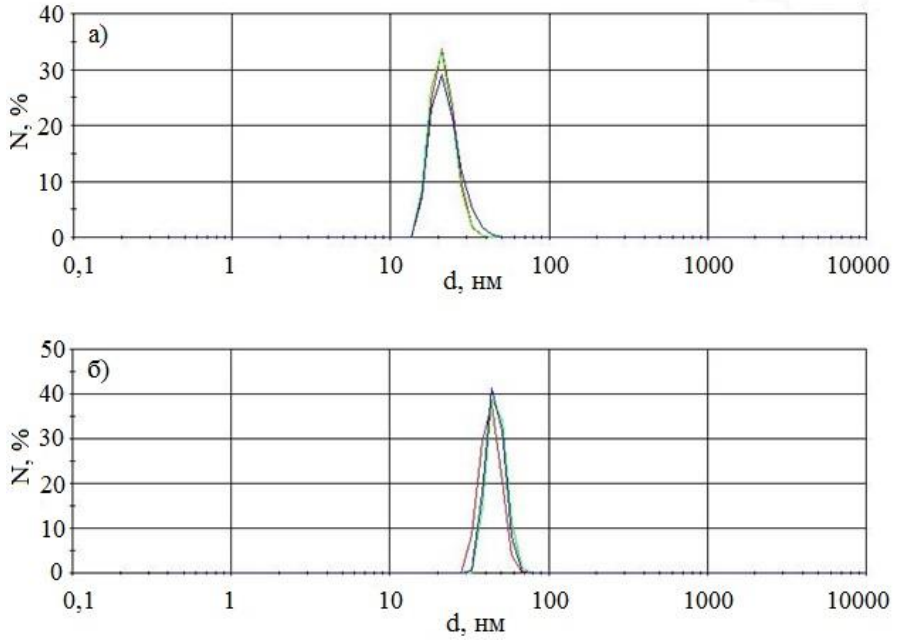

Рисунок 3.34. Распределение (N, %) частиц по размерам (d, нм) для микроэмульсий лецитина, содержащих в качестве водной фазы: а) воду; б) белково-пептидный экстракт. T = 25°C.

Средний гидродинамический диаметр капель микроэмульсии для образца, содержащего воду, составил 21±3 нм (рис. 3.34 а)), для образца, содержащего белково-пептидный экстракт - 44±2 нм (рис. 3.34 б)). Таким образом, введение белка в микроэмульсии приводит к увеличению размера капель, возможно, из-за локализации белковых глобул на границе раздела масло-вода, но образцы остаются наноструктурированными.

В Экспериментальной клинике-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения в «Федеральном научном центре пищевых систем им. В.М. Горбатова» были проведены исследования ранозаживляющего действия полученных образцов на мышах. Работу с животными проводили с соблюдением Директив Европейского сообщества 86/609EEC, исследование одобрено биоэтической комиссией ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН (протокол №02/2018 от 09.11.2018).

Для оценки эффективности была использована модель плоскостных ран [166]. Аналогичный эксперимент был проделан ранее для системы с ламеллярными жидкими кристаллами лецитина [167].

Под анестезией у мышей проводили моделирование линейной раны: удаляли шерсть и подшерсток в области середины спины, затем делали продольный разрез кожи и подкожной жировой клетчатки по средней линии спины длиной 20±1 мм. После выполнения разреза по краям раны накладывали 2 шва на равном расстоянии друг от друга. Затем животным в течение 8 суток ежедневно наносили исследуемые образцы.

После эвтаназии у мышей брали образец кожи и проводили оценку тензиометрических показателей рубца. С помощью модифицированных аптечных весов определяли прочность рубца на разрыв, подвешивая к лоскуту раневой поверхности кожи (по 1,5 см в обе стороны от рубца) груз увеличивающейся

массы: начальная масса груза равнялась 100 г, пошаговое увеличение груза составляло 5 г.

Исследование было проведено на трех группах мышей, отбор в группы происходил случайным образом:

1 группа – отрицательный контроль – включала мышей, которые не получали лечение;

2 группа – МЭ-1 – мыши, получающие лечение микроэмульсией лецитина без белково-пептидного экстракта;

3 группа – МЭ-2 – мыши, получающие лечение микроэмульсией лецитина, которая включала белково-пептидный экстракт.

На рис. 3.35 представлены этапы эксперимента на 2 и 7 сутки.

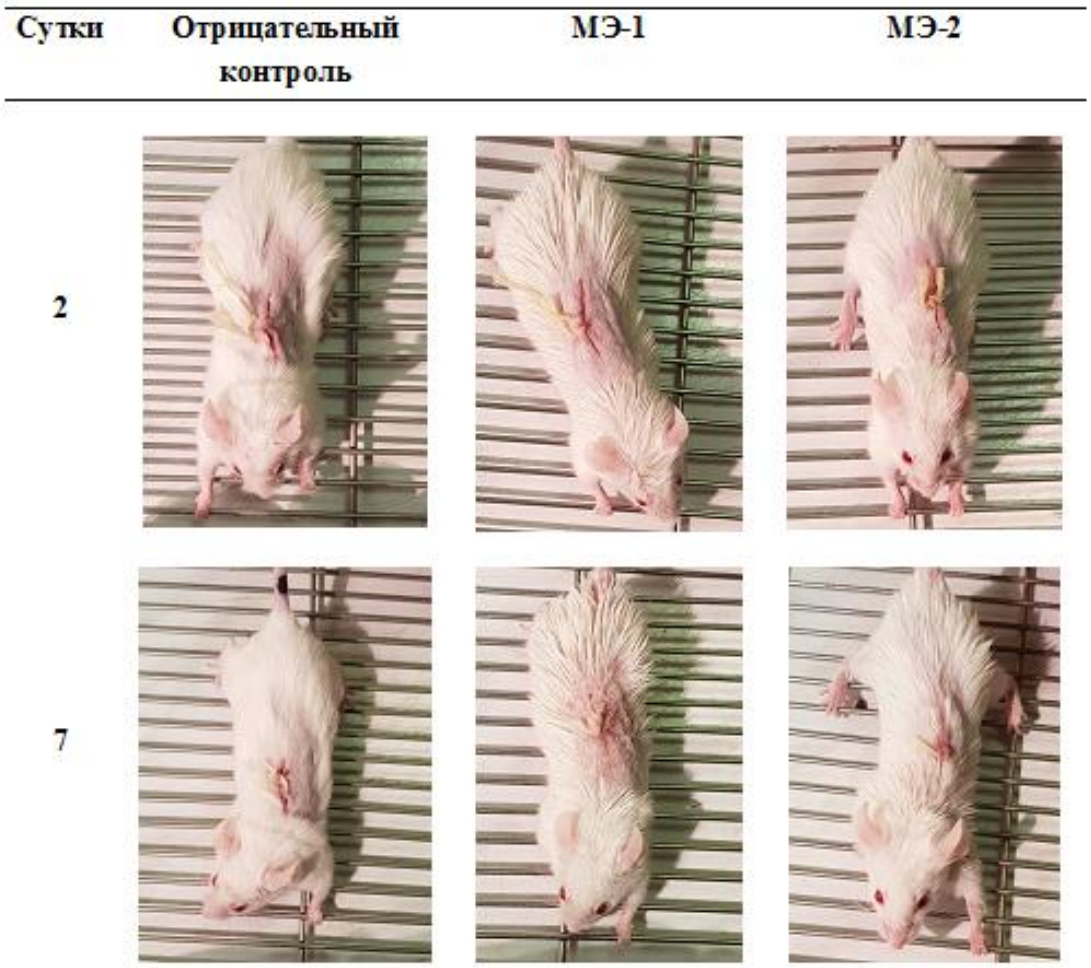

Рисунок. 3.35. Этапы заживления ран

В ходе эксперимента отмечено активное восстановление волосяного покрова в области нанесения ран у групп, получавших лечение микроэмульсией лецитина. Результаты тензиометрических показателей рубца приведены в таблице 3.19

Таблица 3.19. Результаты исследования тензиометрических показателей рубца

№ животного	**Максимальная масса груза при разрыве (г) для групп животных:**		
	Отрицательный контроль	**МЭ-1**	**МЭ-2**
1	130	290	290
2	125	200	280
3	150	210	390
4	140	235	340
5	100	230	340
6	140	270	295
7	90	210	350
8	90	190	385
9	110	230	370
10		285	
Среднее значение	**119±23**	**235±35**	**338±41**

Таким образом, установлено, что наиболее эффективным для заживления ран является образец микроэмульсии лецитина с белково-пептидным комплексом (табл. 3.20).

Таблица 3.20. Результаты исследования ранозаживляющего действия образцов на основе разработанной микроэмульсии

Тип микроэмульсии	**МЭ-1**	**МЭ-2**
Водная фаза	Дистиллированная вода	Белково-пептидный экстракт, концентрация белка 20 г/л
Размер капель, нм	21±3	44±2
Прочность рубца по сравнению с контролем, % (через 8 суток после нанесения раны)*	197±15	282±12

*Контроль принят за 100%.

Полученные результаты подтверждают, что введение в разработанную микроэмульсию веществ белково-пептидной природы позволяет сохранять их биологическую (в частности, иммуностимулирующую) активность.

Следует отметить, что использование микроэмульсии лецитина без белково-пептидного экстракта улучшает ранозаживление и приводит к увеличению прочности рубца. Можно предположить, что данный эффект связан с антисептическим и ранозаживляющим действием эфирного масла чайного дерева [150]. Таким образом, ранозаживляющий эффект обусловлен сочетанием действия водорастворимых веществ (белково-пептидный концентрат) и маслорастворимого компонента – эфирного масла чайного дерева.

Аналогичный результат по увеличению прочности рубцов показано и для составов ламеллярных жидких кристаллов на основе лецитина. При использовании жидких кристаллов лецитина в качестве носителя биологически активных веществ относительно негативного контроля повышение составляло примерно 150% для образцов без биологически активных веществ и 300% для жидких кристаллов с белково – пептидным экстрактом [167].

Таким образом, в эксперименте *in vivo* показано, что разработанная микроэмульсия лецитина проявляет ранозаживляющее действие не только в присутствии биологически активных компонентов, но и без них, что делает ее перспективной в качестве основы ранозаживляющего средства.

На основе полученных данных об исследовании свойств разработанной микроэмульсии лецитина можно сделать вывод о том, что она обладает такими достоинствами, как:

- биосовместимые компоненты в составе, в том числе обладающие регенерирующим и ранозаживляющим действием;
- стабильность при хранении;
- простота методов получения;
- невысокая стоимость основных компонентов;
- вязкость в диапазоне 0,11-0,12 Па·с, что позволяет ее легко наносить на кожу;
- скорость высвобождения водорастворимых веществ, позволяющая создавать носители с пролонгированным высвобождением лекарственных веществ;
- возможность включения водо- и маслорастворимых веществ, в том числе белково-пептидной природы, с сохранением их активности.

Обозначенные достоинства позволяют рекомендовать разработанную обратную микроэмульсию в системе лецитин – олеиновая кислота – вазелиновое масло – масло авокадо – эфирное масло чайного дерева – вода для создания препаратов с пролонгированным действием, предназначенных для нанесения на кожу и слизистые оболочки, в том числе для разработки ранозаживляющих средств.

4. ВЫВОДЫ

1. Показано, что в системе лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода рост концентрации олеиновой кислоты приводит к расширению однофазной области, снижению вязкости и уменьшению гидродинамического диаметра, что объясняется переходом от обратных цилиндрических мицелл к каплям обратной микроэмульсии, которая существует при мольном соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]>0,6. Образование микроэмульсии подтверждается сверхнизким межфазным натяжением на границе вода – раствор лецитина и олеиновой кислоты в додекане при соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,8.

2. На фазовой диаграмме системы лецитин – олеиновая кислота – додекан – вода определена область существования обратной микроэмульсии при соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,8, и для сравнения, лецитиновых органогелей при соотношении [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,1. Максимальное содержание воды в микроэмульсии составило 16,8 мас.%.

3. Показано, что замена додекана на масла, пригодные для медицинского применения, приводит к незначительному снижению солюбилизационной емкости системы по воде, максимум солюбилизационной емкости наблюдается при соотношениях [олеиновая кислота]:[лецитин]=0,6-0,8. При этом образуется микроэмульсия с размером капель 21 – 28 нм.

4. Разработан и запатентован состав микроэмульсии для трансдермальной доставки биологически активных веществ, содержащей фосфолипидный концентрат - 14,3-23,3 мас.%, вазелиновое масло - 29,6-34,7 мас.%, олеиновую кислоту - 5,0-7,1 мас.%, жирное растительное масло - 29,6-34,7 мас.%, эфирное растительное масло - 1,4-5,7 мас.% и воду, и методика ее получения. В микроэмульсию можно вводить водорастворимые биологически

активные вещества в концентрациях в десятые доли мас.%, а маслорастворимые - в концентрациях в единицы мас.%.

5. Показано, что скорость переноса водорастворимого красителя в физиологический раствор из микроэмульсии составила $14{,}3 \cdot 10^{-3}$ г/(м^2·ч), из эмульсии $9{,}9 \cdot 10^{-3}$ г/(м^2·ч), из ламеллярных жидких кристаллов на основе лецитина– $6{,}0 \cdot 10^{-3}$ г/(м^2·ч).

6. Показана возможность включения в микроэмульсию веществ белково-пептидной природы с сохранением их ранозаживляющей активности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Лампрехт А. (ред.) Нанолекарства. Концепции доставки лекарств в нанонауке. М.: Научный мир, 2010. 232 с.

2. Тараховский Ю. С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ. М.: Издательство ЛКИ, 2011. 280 с.

3. B. Kumar, K. Jajodia, P. Kumar, H.K. Gautam. Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery// Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2017. Vol. 41. P. 260-268,

4. Deepak Thassu, Yashwant Pathak, Michel Deleers. Nanoparticulate Drug-Delivery Systems: An Overview // Nanoparticulate drug delivery systems (Edited by Deepak Thassu, Michel Deleers, Yashwant Pathak). - CRC Press, USA, 2007. P. 1-31.

5. Tostanoski L. H., Jewell C. M. Engineering self-assembled materials to study and direct immune function //Advanced drug delivery reviews. 2017. Vol. 114. P. 60-78.

6. Abdelaziz H. M., Freag M. S., Elzoghby A. O. Solid Lipid Nanoparticle-Based Drug Delivery for Lung Cancer //Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer. – Academic Press, 2019. P. 95-121.

7. Abdelaziz H. M. et al. Inhalable particulate drug delivery systems for lung cancer therapy: nanoparticles, microparticles, nanocomposites and nanoaggregates //Journal of controlled release. 2018. Vol. 269. P. 374-392.

8. Pandya N. T. et al. Solid lipid nanoparticles as an efficient drug delivery system of olmesartan medoxomil for the treatment of hypertension //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2018. Vol. 165. P. 37-44.

9. Кедик С.А., Жаворонок Е.С., Седишев И.П. и др. Полимеры для систем доставки лекарственных веществ пролонгированного действия. Перспективные синтетические и природные полимеры // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. Т.3. № 4. С. 22-35.

10. Kesharwani P., Choudhury H., Meher J. G., Pandey M., Gorain B. Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as promising nanocarriers for anticancer therapeutics and imaging // Progress in Materials Science. 2019. Vol. 103. P. 484-508.

11. Huang D., Wu D. Biodegradable dendrimers for drug delivery // Materials Science and Engineering: C. 2018. Vol. 90. P. 713-727.

12. Li Z. et al. Preparation and Evaluation of Multifunctional Autofluorescent Magnetic Nanoparticle–Based Drug Delivery Systems Against Mammary Cancer //Journal of pharmaceutical sciences. 2018. Vol. 107. № 10. P. 2694-2701.

13. Arruebo M. et al. Magnetic nanoparticles for drug delivery // Nano today. 2007. Vol. 2. № 3. P. 22-32.

14. Lim B. K., Tighe E. C., Kong S. D. The use of magnetic targeting for drug delivery into cardiac myocytes // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2019. Vol. 473. P. 21-25.

15. Goenka, S., Sant, V., Sant, S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering // Journal of Controlled Release. 2014. Vol. 173. P. 75–88.

16. Dongjing Zhang, Pin Lv, Cheng Zhou, Yulin Zhao, Xiali Liao, Bo Yang. Cyclodextrin-based delivery systems for cancer treatment // Materials Science and Engineering: C. 2019. Vol. 96. P. 872-886.

17. Adeoye O., Cabral-Marques H. Cyclodextrin nanosystems in oral drug delivery: A mini review // International journal of pharmaceutics. 2017. Vol. 531. № 2. P. 521-531.

18. Monteil M. et al. Cyclodextrins: A promising drug delivery vehicle for bisphosphonate // Carbohydrate polymers. 2017. Vol. 156. P. 285-293.

19. Фролов Ю. Г. Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы. Учебник для вузов. — 2-е изд., перераб. и доп. М.: Химия, 1988. 464 с: ил.

20. Алексеев К. В. и др. Наноразмерные системы доставки лекарственных веществ // Вестник новых медицинских технологий. 2009. Т. 16. №. 2. С. 17 – 20.

21. Русанов А. И. Мицеллообразование в растворах поверхностно-активных веществ. СПб: Химия, 1992. 280 с.

22. Walde P., Giuliani A.M., Boicelli C.A., Lyisi P.L. High-Performance Liquid Chromatography and Lipids: A Practical Guide: William W. Christie // Chemistry and Physics of Lipids. 1990. Vol. 53. P. 265-288.

23. Фридрихсберг Д.А. Курс коллоидной химии. Учеб. для вузов. – 2-е изд., перераб. и доп. Л.: Химия, 1984. 368 с., ил.

24. Суздалев И.П. Нанотехнология: физико - химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов. М.: КомКнига, 2006. 592 с.

25. Cortesi R., Nastruzzi C. Liposomes, micelles and microemulsions as new delivery systems for cytotoxic alkaloids // Pharmaceutical science & technology today. 1999. Vol. №. 7. P. 288-298.

26. Задымова Н.М., Иванова Н.И. Смешанные мицеллы на основе Твина 80 как носители фелодипина в водной среде // Коллоидный журнал. 2013. Т. 75. № 2. С. 179.

27. Micelle based system nuclease encapsulation for in-vivo gene editing: пат. 20190032088A1 США № US2019/0032088 A1; заявл. 24.02.2017; опубл. 31.01.2019.

28. Effective gentle makeup-removing micelle liquid: пат. 104000766 Китай № CN104000766 A; заявл. 17.06.2014; опубл. 27.08.2016.

29. Method for separating and analyzing coloring agent in cosmetics by use of reverse micelle: пат. 104020234 Китай № CN104020234 A; заявл. 24.06.2014; опубл. 03.09.2014.

30. Safari J., Zarnegar Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review //Journal of Saudi Chemical Society. 2014. Vol. 18. №. 2. P. 85-99.

31. Li T., Takeoka S. Smart Liposomes for Drug Delivery // Smart Nanoparticles for Biomedicine. 2018. P. 31-47.

32. Барсуков Л.И., Липосомы // Соровский образовательный журнал. 1998. Т. 10. С. 2–9.

33. Lehner R. et al. Intelligent nanomaterials for medicine: carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2013. Vol. 9. №. 6. P. 742-757.

34. Стефанов А.В., Брыгинский С.А., Лишко В.К., Краснопольский Ю.М. Способ получения антигипоксического средства в липосомальной форме// Авторское свидетельство СССР. № 1699343 А3, 15.12.1991. Бюл. № 46.

35. Краснопольский Ю. М., Григорьева А. С., Кацай А. Г., Конахович Н. Ф., Прохоров В. В., Стадниченко А. В., Балабаньян В. Ю., Лютик А. И., Швец В. И. Технологии и перспективы использования липосомальных лекарственных препаратов в клинической практике // Российские нанотехнологии. 2017. Том 12. № 7-8. С. 132-141.

36. Allen T. M., Cullis P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications // Advanced drug delivery reviews. 2013. Vol. 65. №. 1. P. 36-48.

37. Lopez-Berestein G. et al. Liposomal Amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study //Journal of Infectious Diseases. 1985. Vol. 151. №. 4. P. 704-710.

38. Саквина О. И., Барышников А. Ю. Липосомы в направленной доставке противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. 2008. №4. С. 80 – 85.

39. Ланцова А. В., Полозкова А. П., Перетолчина Н. М., Шпрах З. С., Шоуа И.Б., Оборотова Н. А., Барышников А. Ю. Разработка и изучение стерически стабилизированной липосомальной формы лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. 2004. Т.3. №4. С.19-23.

40. Eloy, J. O., Petrilli, R., Trevizan, L. N. F., Chorilli, M. Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2017. Vol. 159. P. 454-467.

41. Shukla S. et al. Development of immunoliposome-based assay for the detection of Salmonella Typhimurium // European Food Research and Technology. 2012. Vol. 234. №. 1. P. 53-59.

42. Paszko E., Senge M. O. Immunoliposomes // Current medicinal chemistry. 2012. Vol. 19. №. 31. P. 5239-5277.

43. Qi P. et al. The biological activity of cationic liposomes in drug delivery and toxicity test in animal models // Environmental toxicology and pharmacology. 2016. Vol. 47. P. 159-164.

44. Dou Y., Hynynen K., Allen C. To heat or not to heat: Challenges with clinical translation of thermosensitive liposomes // Journal of controlled release. 2017. Vol. 249. P. 63-73.

45. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. 2012. № 3. С. 23-31

46. Каплун А. П. и др. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ // Вопросы медицинской химии. 1999. Т. 45. №. 1. С. 3-12.

47. Madrigal-Carballo S. et al. Biopolymer coating of soybean lecithin liposomes via layer-by-layer self-assembly as novel delivery system for ellagic acid // Journal of Functional Foods. 2010. Vol. 2. №. 2. P. 99-106.

48. Способ получения липосомальной формы противоопухолевого антибиотика: пат. 64591 Украина; опубл. 16.01.2006, Бюл. № 1.

49. Браун Г., Уолкен Дж. Жидкие кристаллы и биологические структуры. М.: Мир, 1982. 198 с.

50. Krister Holmberg (ed.) Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd, 2001. P. 299-300.

51. Müller-Goymann C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2004. Vol. 58. №. 2. P. 343-356.

52. Tilcock C. P. S. Lipid polymorphism // Chemistry and Physics of Lipids/ 1986. Vol. 40. № 2–4. P.109-125.

53. Grumezescu A. M. (ed.) Organic Materials as Smart Nanocarriers for Drug Delivery. William Andrew, 2018. P. 471 – 517.

54. Wan J. et al. Phytantriol-based lyotropic liquid crystal as a transdermal delivery system //European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018. Vol. 125. P. 93-101.

55. Шибаев В.П., Необычные кристаллы или загадочные жидкости // Соровский образовательный журнал. 1996. № 11. С. 37-46.

56. Cullis P. R., Hope M. J., Tilcock C. P. S. Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes // Chemistry and physics of lipids. 1986. Vol. 40. №. 2-4. P. 127-144.

57. Method of preparing controlled-release preparations for biologically active materials: пат. EP № 0126751B2; заявл. 26.11.1982; опубл. 12.05.1984.

58. Gosenca M., Gasperlin M. Lecithin based lamellar liquid crystals as a physiologically acceptable dermal delivery system for ascorbyl palmitate // European Journal of Pharmaceutical Science. 2013. Vol. 50. P.114-122.

59. Wahlgren S., Lindstorm A.L. Liquid Crystals as Potential Ointment Vehicle // Journal of Pharmaceutical Sciences. 1984. Vol.73. №10. P. 1484-1488.

60. Жидкокристаллическая композиция для трансдермальной доставки биологически активных веществ: пат. 2623210 Рос. Федерация № 2016115054; заявл. 19.04.2016; опубл. 22.06.2017, Бюл. № 18, 12 с.

61. Мурашова Н.М., Юртов Е.В., Кузнецова Е.А. Получение и свойства жидких кристаллов в системе фосфолипиды — вазелиновое масло — вода // Химическая технология. 2013. № 8. С. 492-498.

62. Li J. et al. A potential carrier based on liquid crystal nanoparticles for ophthalmic delivery of pilocarpine nitrate // International journal of pharmaceutics. 2013. Vol. 455. №. 1-2. P. 75-84.

63. Murdan S. Organogels in Drug Delivery (Review) // Expert Opinion on Drug Delivery. 2005. Vol. 2. № 3. P. 489–505.

64. Sagiri S.S., Behera B., Rafanan R.R., Bhattacharya C., Pal K., Banerjee I., Rousseau D. Organogels as Matrices for Controlled Drug Delivery: A Review on the Current State // Soft Materials. 2014. Vol. 12. P. 47–72.

65. Юртов Е.В., Мурашова Н.М. Лецитиновые органогели в углеводородном масле // Коллоидный журнал. 2003. №1. С.124-128.

66. Satapathy D. et al. Sunflower-oil-based lecithin organogels as matrices for controlled drug delivery // Journal of Applied Polymer Science. 2013. Vol. 129. №. 2. P. 585-594.

67. Scartazzini R, Luisi P.L, Organogels from lecithins. // The Journal of Physical Chemistry. 1988. Vol. 92. P. 829-833.

68. Мурашова Н.М., Юртов Е.В. Лецитиновые органогели как перспективные функциональные наноматериалы // Российские нанотехнологии, 2015. Т.10. №7-8. С. 5-14

69. Schipunov Y.A., Mezzasalma S.A., Koper G.J.M., Hoffman H. Lecithin organogels with new rheological and scaling behavior // The Journal of Physical Chemistry B. 2001. Vol. 105. P. 10484-10488.

70. Cirkel P., Koper G., The structure of LOs // In: Horvoelgyi Z., Nemeth Zs., Paszli I., editors. Proceedings of conference of colloid chemistry. 1996. P.36-39.

71. Esposito C.L., Kirilov P., Roullin V.G. Organogels, promising drug delivery systems: an update of state-of-the-art and recent applications. / Journal of Controlled Release. 2018. Vol. 271. P. 1-20.

72. Kazunori Iwanaga, Mineo Kawai, Makoto Miyazaki, Masawo Kakemi Application of organogels as oral controlled release formulations of hydrophilic drugs // International Journal of Pharmaceutics. 2012. Vol. 436. P. 869– 872.

73. Luisi P.L., Scartazzini R., Haering G., Schurtenberg P. Organogels from Water-in-Oil Microemulsions // Colloid & Polymer Sci. 1990. Vol. 268. P. 356-374.

74. Shumilina E.V., Khromova Yu.L., Shchipunov Yu.A. A Study of the Structure of Lecithin Organic Gels by Fourier–Transform IR Spectroscopy // Russian Journal of Physical Chemistry A. 2000. Vol. 74. № 7. P. 1083-1092.

75. Shumilina E.V., Khromova Yu.L., Shchipunov Yu.A. Lecithin Organogels: The Effect of Phosphatidylethanolamine Additives // Colloid Journal. 1997. Vol. 59. № 4. P. 514-518.

76. Shumilina E.V., Khromova Yu.L., Shchipunov Yu.A. The Effect of Lysophosphatidylcholine and Phosphatidylglycerol on Lecithin Polymer-Like Micelles// Colloid Journal. 2006. Vol. 68. № 2. P. 241-247.

77. Лецитиновый органогель: пат. 2155604 Рос. Федерация № 98102149/14; заявл. 29.01.1998; опубл. 10.09.2000, 7 с.

78. Средство для профилактики тромбозов и нарушений кровообращения: пат. 2366409 Рос. Федерация № 2008125892/15; заявл. 26.06.2008, опубл. 10.09.2009, Бюл. № 25, 7 с.

79. Kumar P., Mittal K. L. (ed.). Handbook of microemulsion science and technology. CRC press, 1999. 842 p.

80. Lawrence M.J., Rees G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems // Advanced Drug Delivery Reviews. 2012. Vol. 64. P. 175-193.

81. Холмберг К., Йёнсон Б., Кронберг Б., Линдман Б.. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007. 528 с.

82. Щукин Е.Д., Перцев А.В., Амелина Е.А. Коллоидная химия: Учебник для университетов и химико-технологических ВУЗов // 3-е. изд., перераб. и доп. М.: Высшая школа, 2004. 445 с.

83. Fanun M. (ed.) Microemulsions: Properties and Applications. CRC Press. 2008. 533 p.

84. Harini Chowdary V., Prasanna Raju Y., Basaveswara Rao M.V., Sundaresan C.R. Insights of Microemulsions – A Thermodynamic Comprehension // Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017. Vol. 10. № 1. P. 23-40.

85. Munir R. et al. Microemulsion: promising and novel system for drug delivery //J Toxicol Pharmaceut Sci. 2017. Vol. 1. №. 2. P. 128-134.

86. Tan T. T. Y., Liu S., Zhang Y., Han M. -Y., Selvan S. T. Microemulsion Preparative Methods (Overview) // Comprehensive Nanoscience and Technology. 2011. Vol.5. P. 399-441.

87. Chen, S.H., Rajagopalan R. (ed.) Micellar Solutions and Microemulsions-Structure, Dynamics and Statistical Thermodynamics. New York: Springer-Verlag, 1990. 309 p.

88. Shevachman M., Garti N., Shani A., Sintov A.C. Enhanced Percutaneous Permeability of Diclofenac Using a New U-Type Dilutable Microemulsion // Drug Development and Industrial Pharmacy. 2008. Vol. 34. P. 403-412.

89. Израелашвили Джейкоб Н. Межмолекулярные и поверхностные силы/ Пер. с англ. И. М. Охапкин, К. Б. Зельдович; науч. ред. рус. изд. И. В. Яминский. М.: Научный мир, 2011. 456 с.

90. Griffin W.C. Classification of surface-active agents by “HLB” // Journal of the Society of Cosmetic Chemists. 1949. Vol. 1. №. 5. P. 311-326.

91. Griffin W.C. Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants // Journal of the Society of Cosmetic Chemists. 1954. Vol. 5. № 4. P. 249-56.

92. Kothencz R., Nagy R., Bartha L. Determination of HLB values of some nonionic surfactants and their mixtures // Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia. 2017. Vol. 62. № 4. P. 451-458.

93. List G. R. Soybean Lecithin: Food, Industrial Uses, and Other Applications // Polar Lipids. Elsevier, 2015. P. 1-33.

94. Bnyan R. et al. Surfactant effects on lipid-based vesicles properties // Journal of pharmaceutical sciences. 2018. Vol. 107. №. 5. P. 1237-1246.

95. Плетнев М. Ю. (ред.) Поверхностно – активные вещества и композиции. Справочник. М.: ООО «Фирма Клавель», 2002. 768с.

96. Композиция на основе лецитина: пат. 2620250 Рос. Федерация № 2016123390; заявл. 14.06.2016; опубл. 23.05.2017, Бюл. № 15, 12 с.

97. Shinoda K., Araki M., Sadaghiani A.,Khan A.,Lindman B., Lecithin – Based Microemulsions: Phase Behavior and Microstructure // Journal of Physical Chemistry. 1991. Vol. 95. P. 989-993.

98. Saha R., Rakshit S., Mitra R. K., Pal S. K. Microstructure, Morphology, and Ultrafast Dynamics of a Novel Edible Microemulsion // Langmuir. 2012. Vol. 28. № 22. P. 8309–8317.

99. Cortesi R., Esposito E., Maietti A., Menegatti E., Nastruzzi C. Formulation study for the antitumor drug camptothecin: liposomes, micellar solutions and a microemulsion // International Journal of Pharmaceutics. 1997. Vol. 159. P. 95-103.

100. Ажгихин И.С. Технология лекарств. 2 е издание. М.: Медицина, 2000. 440 с.

101. Tadros T. Colloid and interface aspects of pharmaceutical science // Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development. Elsevier, 2014. P. 29-54.

102. Сумм Б.Д. Основы коллоидной химии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. М.: Издательский центр «Академия», 2007. 240 с.

103. Jiao J. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery // Advanced Drug Delivery Reviews. 2008. Vol. 60. № 15. P. 1663–1673.

104. Eduardo J. Gudiña, Vivek Rangarajan, Ramkrishna Sen, Lígia R. Rodrigues. Potential therapeutic applications of biosurfactants // Trends in Pharmacological Sciences. 2013. Vol. 34. № 12. P. 667-675.

105. Santos V. L., Nardi Drummond R. M., Dias-Souza M. V. Biosurfactants as Antimicrobial and Antibiofilm Agents // in Current Developments in Biotechnology and Bioengineering // edited by Vanete Thomaz-Soccol, Ashok Pandey, Rodrigo R. Resende. 2017. P. 371-402.

106. Acosta E. et al. Self-emulsifying Delivery Systems and Lipid Transport // Lipids in Nanotechnology. 2012. P. 135-170.

107. Пантюхин А.В. Степанова Э.Ф., Петров А.Ю. Современные аспекты использования природных поверхностно активных веществ в фармацевтической технологии // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2012. Вып. 17. № 4 (123). С. 228-234.

108. Hauss D. J. Oral lipid-based formulations // Advanced Drug Delivery Reviews. 2007. Vol. 59. № 7. P. 667-676.

109. Szuhaj B. F. Phospholipids: Properties and Occurrence // in The Encyclopedia of Food and Health // edited by Caballero B., Finglas P. M., Toldrá F. 2016. P. 360-364.

110. Singh R. P., Gangadharappa H. V., Mruthunjaya K. Phospholipids: unique carriers for drug delivery systems // Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2017. Vol. 39. P. 166-179.

111. Van Hoogevest P., Wendel A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients // European journal of lipid science and technology. 2014. Vol. 116. №. 9. P. 1088-1107.

112. Анисимов, А.А., Леонтьева А.Н., Александрова И.Ф. и др. Основы биохимии: Учебник для студ. биол. спец. ун-тов / под ред. А.А.Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. С. 420-458.

113. Комов В.П., Шведова В.Н. (ред.) Биохимия: Учеб. для вузов. М.: Дрофа, 2004. С. 284-300.

114. Сарафановой Л.А. (ред.) Пищевые добавки: Энциклопедия – 2-е изд., испр. и доп. СПБ: ГИОРД, 2004. С. 375-378.

115. Li J. et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems // Asian journal of pharmaceutical sciences. 2015. Vol. 10. №. 2. P. 81-98.

116. Воюцкий С.С. (ред.) Курс коллоидной химии. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: Химия, 1975. С. 399-415.

117. Shchipunov Yu.A., Kolpakov A.F., Phospholipids at the oil/water interface: adsorption and interfacial phenomena in an electric field // Advances in Colloid and Interface Science. 1991. Vol. 35. P.31-138.

118. Tausk R.J.M., Karmiggelt J., Oudshoorn C., Overbeek J.Th.G. Physical chemical studies of short-chain lecithin homologues. I.: Influence of the chain length of the fatty acid ester and of electrolytes on the critical micelle concentration // Biophysical Chemistry. 1974. Vol.1. № 3. P. 175-183.

119. Мартынюк В. С., Панов Д. А. Поверхностно активные свойства природных фосфолипидов в различных физиологических средах // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2002. Т. 15 (54). №1. С. 46-49.

120. Smith R., Tanford C. The critical micelle concentration of l-α-dipalmitoylphosphatidylcholine in water and water/methanol solutions // Journal of molecular biology. 1972. Vol. 67. №. 1. P. 75-83.

121. Alany R.G., El Maghraby G., Krauel-Goellner K., Graf A. Microemulsion Systems and Their Potential as Drug Carriers // Microemulsions: Properties and Applications. (Ed. by Fanun M.). CRC Press. 2008. P. 247–291.

122. Fanun M. Microemulsions as delivery systems // Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2012. Vol. 17. P. 306–313.

123. Angelico R., Ceglie A., Colafemmina G., Delfine F., Olsson U., Palazzo G. Phase Behavior of the Lecithin/ Water/ Isooctane and Lecithin/ Water/Decane Systems // Langmuir. 2004. Vol. 20. №. 3. P. 619-631.

124. Aboofazeli R., Lawrence C.B., Wicks S.R., Lawrence M.J. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water - lecithin - isopropyl myristate and either an alkanoic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant // International Journal of Pharmaceutics. 1994. Vol. 111. №. 1. P. 63-72.

125. Mouri A. et al. Water solubilization capacity of pharmaceutical microemulsions based on Peceol®, lecithin and ethanol // International Journal of Pharmaceutics. 2014. Vol 475. P. 324–334.

126. Das A., Mitra R.K. Formulation and characterization of a biocompatible microemulsion composed of mixed surfactants: lecithin and Triton X–100 // Colloid and Polymer Science. 2014. Vol. 292. P. 635-644.

127. Moreno M. A., Ballesteros M. P., Frutos P. Lecithin-Based Oil-in-Water Microemulsions for Parenteral Use: Pseudoternary Phase Diagrams, Characterization and Toxicity Studies // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2003. Vol. 92. №. 7. P.1428-1437.

128. Brime B. et al. Amphotericin B in Oil–Water Lecithin-Based Microemulsions: Formulation and Toxicity Evaluation. // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2002. Vol. 91. № 4. P. 1178–1185.

129. Pestana K.C. et al. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2008. Vol. 66. P. 253–259.

130. Changez M. et al. Effect of the composition of lecithin/n-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: In vitro. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2006. Vol. 50. P. 18–25.

131. Nornoo A. O. et al. Oral microemulsions of paclitaxel: In situ and pharmacokinetic studies // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2009. Vol. 71. №. 2. P. 310-317.

132. Kaur G., Mehta S.K. Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, Toxicity and antimicrobial applications // International Journal of Pharmaceutics. 2017. Vol. 529. № 1–2. P. 134-160.

133. Abbasi S., Radi M. Food grade microemulsion systems: Canola oil/lecithin:n-propanol/ water. // Food Chemistry. 2016. Vol. 194. P. 972–979.

134. Микроэмульсия для применения в качестве носителя для введения активных соединений и способ ее получения: пат. 2164134 Рос. Федерация № 98106482/14; заявл. 04.09.1996; опубл. 20.03.2001, 19 с.

135. Микроэмульсии на основе лецитина, содержащие протеолитические ферменты, и способ, применяемый для ферментной долговременной депиляции: пат. 2183452 Рос. Федерация № 98123304/14; заявл. 19.05.1997; опубл. 20.06.2002. Бюл. № 17, 7 с.

136. Yuan J. S. et al. Linker-based lecithin microemulsions for transdermal delivery of lidocaine // International Journal of Pharmaceutics. 2008. Vol. 349. P.130–143.

137. Yuan J. S., Acosta E. J. Extended release of lidocaine from linker-based lecithin microemulsions // International Journal of Pharmaceutics. 2009. Vol. 56. P.234–240.

138. Acosta E., Chung O., Xuang X.Y. Lecithin-linker microemulsions in transdermal delivery // Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2011. Vol. 21. № 1. P. 77-87.

139. Писарев Д. И., Новиков О. О. Методы выделения и анализа эфирных масел // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2012. Т. 18. №10 (129). С. 25-30.

140. Войткевич С. А. Эфирные масла для парфюмерии и ароматерапии. М.: Пищевая промышленность, 1999. 329 с.

141. Энциклопедический словарь / под ред. проф. И. Е. Андреевского. Санкт-Петербург: Ф. А. Брокгауз, И. А. Ефрон. Т. 27: Розавен - Репа. 1899. с. 17-19.

142. Шерман Ф. Эмульсии / Пер. под ред. Абрамзона А. Л.: Химия, 1972. 448 с.

143. Mhule D. et al. Synthesis of an oleic acid based pH-responsive lipid and its application in nanodelivery of vancomycin // International journal of pharmaceutics. 2018. Vol. 550. №. 1-2. P. 149-159.

144. ElMasry S. R. et al. In Vitro transdermal delivery of sesamol using oleic acid chemically - modified gelatin nanoparticles as a potential breast cancer medication // Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2018. Vol. 48. P. 30-39.

145. Godoy. C. A. et al. Effect of fatty acids on self-assembly of soybean lecithin systems // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015. Vol. 131. P. 21-28.

146. Murashova N.M., Levchishin S.Yu., Yurtov E.V. Effect of bis-(2-ethylhexyl)phosphoric acid on sodium bis-(2-ethylhexyl)phosphate microemulsion for selective extraction of non-ferrous metals // Journal of Surfactants and Detergents. 2014. Vol.17. № 6. P. 1249-1258.

147. Leser M. E., Van Evert W. C., Agterol W. G. M. Phase behaviour of lecithin – water – alcohol – triacylglycerol mixtures // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 1996. Vol. 116. №. 3. P. 293-308.

148. Palazzo G. Wormlike reverse micelles // Soft Matter. 2013. Vol. 9. P.10668-10677.

149. Schurtenberger P., Cavaco C. Polymer-like lecithin reverse micelles. 1. A light scattering study // Langmuir, 1994. Vol. 10. P. 100–108.

150. Самуйлова Л.В., Пучкова Т.В. Косметическая химия: учеб. издание. В 2 ч. Ч.1: Ингредиенты. М.: Школа косметических химиков, 2005. 336 с.

151. Gupta S. Biocompatible microemulsion systems for drug encapsulation and delivery // Current Science. 2011. P. 174-188.

152. Stubenrauch C., Paeplow B., Findenegg G. H. Microemulsions supported by octyl monoglucoside and geraniol. 1. The role of the alcohol in the interfacial layer // Langmuir. 1997. Vol. 13. №. 14. P. 3652-3658.

153. Cevc G., Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. // J. Control. Release. 2010. Vol. 141. P.277-299.

154. ГОСТ ISO 4730-2017. Масло эфирное Мелалеуки типа терпинен-4-ол (масло чайного дерева). Технические условия. Минск, 2017, 16 с. (Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации).

155. Фосфолипидная композиция: пат. 2448731 Рос. Федерация № 2010128120/15; заявл. 08.07.2010; опубл. 27.04.2012, Бюл. № 12, 10 с.

156. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно – практическое руководство для фармацевтической отрасли. Под ред. Быковского С.Н. и др. М.: Изд-во Перо, 2015. 472 с.

157. Kadhum W.R., Hada T., Hijikuro I., Todo H., Sugibayashi K. Development and Optimization of Orally and Topically Applied Liquid Crystal Drug Formulations // Journal of Oleo Science. 2017. Vol. 66. № 9. P. 939-950.

158. Ebenazer A., Franklyne J.S., Mukherjee A., Chandrasekaran N. Development of azithromycin loaded lemongrass oil based microemulsion and determination of antibacterial potential // International Journal of Applied Pharmaceutics. 2018. Vol. 10. № 6. P. 72-81.

159. Zabara A., Mezzenga R. Controlling molecular transport and sustained drug release in lipid-based liquid crystalline mesophases // Journal of Controlled Release. 2014. Vol. 188. P. 31-43.

160. Sedyakina N.E., Krivoshchepov A.F., Zasypko A.Ya., Demchenko A.G., Rozofarov A.L., Kuryakov V.N., Feldman N.B., Lutsenko S.V. Formulation, drug release features and in vitro cytotoxic evaluation of nonionic mixed surfactant stabilized water-in-oil microemulsion loaded with doxorubicin // Mendeleev Communications. 2019. Vol. 29. P. 320-322.

161. Szumala P., Jungnickel C., Kozlowska-Tylingo K., Jacyna B., Cal K. Transdermal transport of collagen and hyaluronic acid using water in oil microemulsion // International Journal of Pharmaceutics. 2019. Vol. 572. P. 118738-118745.

162. Ben J. Boyd, Darryl V. Whittaker, Shui-Mei Khoo, Greg Davey. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems // Pharmaceutical Nanotechnology. 2006. Vol. 309. P. 218-226.

163. Serhat Uzan, Deniz Barış, Mehmet Çolak, Haluk Aydın, Halil Hoşgören. Organogels as novel carriers for dermal and topical drug delivery vehicles // Tetrahedron. 2016. Vol. 72. P. 7517-7525.

164. Федулова Л.В., Василевская Е.Р. Перспективные источники природных стимуляторов иммунитета // Мясные технологии. 2016. № 12. С. 37-39.

165. Лисицын А.Б., Люблинская Л.А., Федулова Л.В., Василевская Е.Р., Чернуха И.М., Макаренко А.Н. Изучение in vivo природного иммуномодулирующего средства «Динормин» // Все о мясе. 2015. № 3. С. 14-17.

166. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. С. 738-744.

167. Федулова Л.В., Мурашова Н.М., Василевская Е.Р., Пчелкина В.А., Новикова А.А., Юртов Е.В. Лиотропные жидкие кристаллы лецитина как система доставки биомолекул животного происхождения // Биофармацевтический Журнал. 2019. Т.11. № 5. С. 19-23.