

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-62-67>



СТАНДАРТИЗАЦИЯ КРИТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ЛИПОСОМ ЭКСТРАКТА ПРЕПУЦИАЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МУСКУСА КАБАРГИ СИБИРСКОЙ

М.С. Нестеров*, Р.А. Агельдинов, Д.В. Хвостов, В.С. Кохан, А.И. Левашова,
С.Л. Люблинский, В.Н. Каркищенко

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

Стандартизована и охарактеризована липосомальная форма нового оригинального продукта на основе препуциальной железы мускуса кабарги сибирской. Для препаративного выделения липосом мускуса кабарги использован эффективный и масштабируемый метод гомогенизации при высоком давлении. Полученный липосомальный продукт охарактеризован методами просвечивающей электронной микроскопии, динамического светорассеяния, препаративной и аналитической хроматографии, хромато-масс-спектрометрии. Разработана спецификация на липосомальную форму экстракта препуциальной железы кабарги сибирской, включающей все критические показатели качества продукта. Получены гомогенные дисперсии липосом мускуса кабарги с равномерным распределением по размерам — с максимумами распределения при 50 и 240 нм. Установлена высокая физико-химическая стабильность липосомальной дисперсии: дзета-потенциал полученных наночастиц составил $-5...-35$ мВ. Степень включения в липосомы целевых компонентов мускуса кабарги по данным гель-размерной хроматографии и масс-спектрометрии для липосом мускуса по стероидным компонентам и общему белку составила 58–75%. Разработанные показатели качества липосомального продукта позволяют проводить серийную стандартизацию выпускающего контроля качества и формируют предпосылки к гарантированной высокой эффективности продукта на основе липосомальной формы экстракта мускуса кабарги как адаптогена природного происхождения с усиленным и выраженным действием.

Ключевые слова: кабарга, мускус, стандартизация, критические показатели качества, препуциальная железа, липосомы, хроматография, масс-спектрометрия, адаптогены, пептиды, белки, андростероиды

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Нестеров М.С., Агельдинов Р.А., Хвостов Д.В., Кохан В.С., Левашова А.И., Люблинский С.Л., Каркищенко В.Н. Стандартизация критических показателей качества липосом экстракта препуциальной железы мускуса кабарги сибирской. *Биомедицина*. 2021;17(3):62–67. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-62-67>

Поступила 01.04.2021

Принята после доработки 30.04.2021

Опубликована 10.09.2021

STANDARDIZATION OF CRITICAL QUALITY INDICATORS OF LIPOSOMES OF SIBERIAN MUSK DEER PREPUCIAL GLAND EXTRACT

Maxim S. Nesterov*, Ruslan A. Ageldinov, Daniil V. Khvostov, Victor S. Kokhan,
Anna I. Levashova, Stanislav L. Lyublinskiy, Vladislav N. Karkischenko

Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

The liposomal form of a new original remedy based on the preputial gland of Siberian musk has been standardized and characterized. For the preparative isolation of musk liposomes, an effective and scalable method of high-pressure homogenization was used. The resulting liposomal product was characterized by transmission electron microscopy, dynamic light scattering, preparative and analytical chromatography, and chromatography-mass spectrometry. A specification for the liposomal form of the extract of the preputial gland of Siberian musk deer, including all critical indicators of the product quality, has been developed. Homogeneous dispersions of musk liposomes with uniform size distribution — with distribution maxima at 50 and 240 nm — were obtained. The high physical and chemical stability of the liposomal dispersion was established: the zeta potential of the obtained nanoparticles was $-5 \dots -35$ mV. The degree of inclusion in the liposomes of the target components of musk according to gel-size chromatography and mass spectrometry for musk liposomes for steroid components and total protein was 58–75%. The developed quality indicators of the liposomal product allow for serial standardization of the manufacturing quality control and form the prerequisites for guaranteed high efficiency of the product based on the liposomal form of musk extract as an adaptogen of natural origin with an enhanced and pronounced effect.

Keywords: musk deer, musk, gland, liposomes, chromatography, mass spectrometry, adaptogens, peptides, proteins, androsteroids

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Nesterov M.S., Ageldinov R.A., Khvostov D.V., Kokhan V.S., Levashova A.I., Lyublinskiy S.L., Karkischenko V.N. Standardization of Critical Quality Indicators of Liposomes of Siberian Musk Deer Preputial Gland Extract. *Journal Biomed.* 2021;17(3):62–67. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-62-67>

Submitted 01.04.2021

Revised 30.04.2021

Published 10.09.2021

Введение

Мускус — продукт препуциальной железы кабарги сибирской (*Moschus moschiferus*) — давно известный как обладающий широким спектром биологической активности, обусловленной многокомпонентным составом: андростероиды и их метаболиты, гетероциклические соединения (пиримидины и фураны), воски, жиры, сложные эфиры холестерина, белки и пептиды и т. д. [1]. Такой сложный и многокомпонентный состав предъявляет особые требования к форме лекарственного средства, обеспечивающей биологическую доступ-

ность, снижение системной токсичности, защиту от деградации, контроль высвобождения и целевую доставку фармацевтической субстанции. Одной из подходящих форм лекарственного средства являются липосомы.

С момента открытия Bangham и Horne в 1964 году, потенциал использования липосом как носителей для целевой доставки лекарств был хорошо исследован и значительно расширен; пути доставки включают парентеральный, пероральный, легочный, назальный, глазной и трансдермальный. Липосомы в упрощённом представле-

нии являются сферическими везикулами из бислоя липидов с внутренней водной полостью. Фосфолипиды или синтетические амфифильные молекулы с включениями из стеринов, такие как холестерин, являются основными структурными компонентами липосом. Гидрофильные компоненты фармацевтических субстанций включаются в полость, тогда как гидрофобные внедряются непосредственно в везикулярную мембрану [2].

Ввиду большого разнообразия липосом как по строению, так и по составу липидной мембраны, ряд критериев используется для стандартизации липосомированных форм препаратов. Анализ химической стабильности липосом включает в себя оценку степени окисления и гидролиза фосфолипидных компонентов, самоокисления холестерина и деградацию антиоксидантного компонента. Анализ физических характеристик липосом включает в себя показатели распределения по размеру, электрического поверхностного потенциала (ζ -потенциал), температуру фазового перехода, эффективности включения фармакологических субстанций, а также их высвобождения в целевой биосреде [5].

Наиболее часто встречающийся диаметр коммерческих одноламеллярных липосом лежит в диапазоне 70–200 нм, притом что в исследовательских работах встречаются везикулы диаметром от нескольких нм до нескольких мкм. Везикулы с диаметром более 200 нм имеют тенденцию к преобразованию в мультламеллярный тип, при котором стенка состоит из десятков или сотен бислоев фосфолипидов, что существенно замедляет высвобождение активных компонентов [4]. Принято считать, что чем выше ζ -потенциал (вне зависимости от знака), тем более стабильны коллоидные растворы липосом. Однако рост потенциала выше 40 мВ приводит к взаимодействию с растворителем и формированию крупных агрегатов. Исходя из назначения везикул, так-

же существует оптимум ζ -потенциала. Так, в экспериментах на мышах было показано, что $\zeta = -7,6$ мВ обеспечивает более длительное циркулирование липосом в организме и их высокое накопление в опухоли [3].

Целью работы явилось комплексное изучение физико-химических свойств и разработка перечня критических показателей качества липосомированной формы мускуса кабарги сибирской в форме спецификации.

Материалы и методы

Липосомированную форму мускуса кабарги сибирской получали методом гомогенизации высоким давлением, описанным ранее [1].

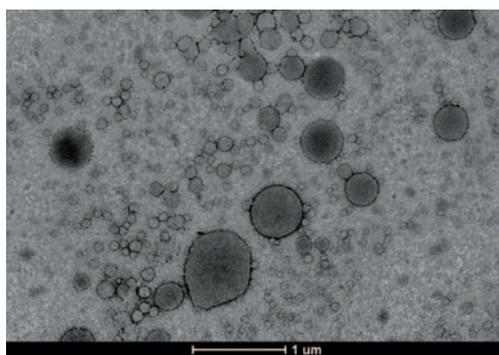
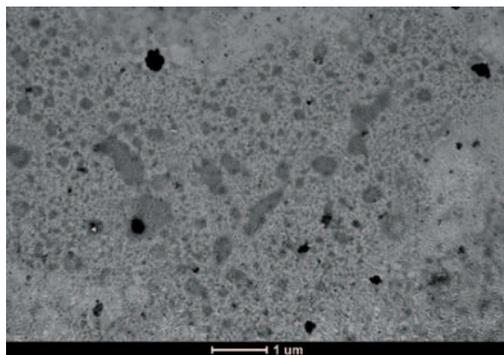
Визуализацию липосом мускуса кабарги проводили в просвечивающем электронном микроскопе Tecnai G2 Spirit bioTWIN («FEI», США) при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличениях от 5000 до 80000 крат. методом негативного контрастирования.

Оценку среднего диаметра и распределения по размеру липосом проводили методом динамического рассеяния света на анализаторе Photocor Compact-Z (ООО «Фотокор», Россия).

Оценку ζ -потенциала проводили методом электрофоретического рассеяния света на анализаторе Photocor Compact-Z (ООО «Фотокор», Россия).

Индекс окисленности определяли спектрофотометрически (Multiscan Go, «Thermo Scientific», США) как соотношение интенсивности полос поглощения в УФ-спектре анализируемых липосом (A233/A215), что достаточно полно отражает процессы окисления, проходящие в липидах как в ходе получения и хранения липидов, так и при формировании липосом.

Хромато-масс-спектрометрический анализ для подтверждения стероидной подлинности получаемого продукта выпол-



*Рис. Микрофотографии липосом мускуса кабарги.
Fig. Micrographs of musk liposomes.*

няли на ГХ–МС анализаторе «Хроматэк», состоящем из газового хроматографа «Хроматэк-Кристалл 5000» и жидкостного дозатора ДАЖ-2 М (3 Д).

Оценку степени включения биологически активных компонентов мускуса кабарги в состав липосом проводили методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения на хроматографической системе 1290 Q-TOFF 6545 XT («Agilent Technologies», США). В анализ на оценку степени включения отбирали фракции липосом после гель-размерной хроматографии, очищенные от невключённых компонентов липидной мембраны и исходного сырья. Целевыми маркерами продукта служили стероидная фракция, общий белок и холестерин.

Результаты исследований

Микрофотографии липосом мускуса кабарги, приведенные на рисунке, убедительно подтверждают подлинность полученной в условиях технологического процесса липосомальной субстанции для трёх испытуемых серий продукта. Видны моноламеллярные везикулы (липосомы) округлой формы размером от 50 до 350 нм с преобладающей фракцией частиц размером около 200 нм.

Прослеживаются отдельные моноламеллярные липосомы сферической формы, что также подтверждает подлинность субстанции. На переднем фоне четко видны несколько крупных липосом от 300 до 500 нм, хорошо нагруженных (окрашенных) гидрофильными (внутренний объем везикул) и гидрофобными (пространство внутри внешнего бислоя везикул, образованного фосфолипидами) компонентами, входящими в состав мускуса кабарги. Необходимо подчеркнуть, что на всех микрофотографиях основная фракция липосом представлена частицами с диаметром около 200 нм. Значение индекса окисленности испытуемых растворов липосом мускуса кабарги не превышает показателя 0,5.

Выводы

В результате мультиметодического анализа трёх технологических серий липосомальной формы экстракта мускуса кабарги разработан проект спецификации продукта для применения в стандартизации и валидации технологического процесса получения субстанции и готовых форм на основе экстрактивного материала мускуса кабарги сибирской (таблица).

Таблица. Критические показатели качества липосом, содержащих комплекс БАВ, выделенных из мускуса кабарги

Table. Critical quality indicators of liposomes containing a complex of biological activity substances isolated from musk

Показатель	Метод	Норма
Описание	Органолептический ГФ XIII, ОФС 1.1.0006.15, ч. 1	Лиофилизированный аморфный порошок светло-коричневого цвета с характерным запахом и вкусом мускуса
Растворимость	ГФ XIII, ОФС 1.2.1.0005.15, ч. 1, с. 531	Мало растворим в воде, мало растворим в спирте 96%, практически не растворим в гексане
Подлинность: - присутствие липосом; - наличие БАВ мускуса	1. Электронная микроскопия (метод негативного контрастирования). 2. ГХ-МС (ГХ-ПИД). 3. ВЭЖХ-УФ.	Моноамеллярные липосомы сферической формы. Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца субстанции. Время удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного образца субстанции.
Размер частиц	ГФ XII, ч. 2 Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	250±100 нм
Индекс полидисперсности	Фотодинамическое и лазерное светорассеяние	Не более 0,5
Дзета-потенциал	Динамическое светорассеяние	- 5...-20 мВ
Процент включения БАВ мускуса	Гель-хроматография	Не менее 50%
Индекс окисленности	Спектрофотометрия	Не более 0,5
pH	ГФ РФ, ОФС 1.1.0006.15 (потенциометрический метод)	От 6,0 до 8,0 (1% p-p)
Вода	ГФ РФ, ОФС 1.2.3.0002.15	Не более 6,0%
Общий белок	ГФ РФ, ОФС 1.2.3.0012.15. Метод Бредфорд (колориметрический)	Не более 4,0%
Сульфатная зола	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0014.15	Не более 5,0%
Тяжелые металлы	ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0012.15	Не более 0,002%
Остаточные органические растворители	ГХ РФ	Этанола – не более 0,5%. Изопропилового спирта – не более 0,5%
Микробиологическая чистота	ГФ РФ, ОФС 1.2.4.0002.15	Категория 3.2
Количественное определение	ВЭЖХ	Не менее 90,0% и не более 110,0% в пересчете на безводное вещество

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Каркищенко В.Н., Дуля М.С., Агельдинов Р.А., Люблинский С.Л., Каркищенко Н.Н. Липосомированная форма экстракта препуциальной железы кабарги — новое средство адаптогенного действия. *Биомедицина*. 2019;15(4):34–45. [Karkischenko V.N., Dulya M.S., Ageldinov R.A., Lyublinskiy S.L., Karkischenko N.N. Liposomirovannaya forma ekstrakta prepucial'noj zhelezy kabargi — novoe sredstvo adaptogennoho dejstvija [A liposomal composition of musc deer preputial gland extract as a new agent of adaptogenic]. *Biomeditsina [Journal Biomed.]*. 2019;15(4):34–45. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-4-34-45.
- Bulbake U., Doppalapudi S., Kommineni N., Khan W. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*. 2017;9(2). DOI: 10.3390/pharmaceutics9020012.

- Lee J.S., Ankone M., Pieters E., Schiffelers R.M., Hennink W.E., Feijen J. Circulation kinetics and biodistribution of dual-labeled polymersomes with modulated surface charge in tumor-bearing mice: comparison with stealth liposomes. *J. Control Release*. 2011;155(2):282–288. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.028.
- Maherani B., Arab-tehrany E., Kheirloomoom A., Reshetov V., Stebe M.J., Linder M. Optimization and characterization of liposome formulation by mixture design. *The Analyst*. 2012;137(3):773–786. DOI: 10.1039/c1an15794a.
- Zylberberg C., Matosevic S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Deliv*. 2016;23(9):3319–3329. DOI: 10.1080/10717544.2016.1177136.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Нестеров Максим Сергеевич*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: mdulya@gmail.com

Агельдинов Руслан Андреевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Хвостов Даниил Владиславович, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Кохан Виктор Сергеевич, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: viktor_kohan@hotmail.com

Левашова Анна Игоревна, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: annalevashova3@gmail.com

Люблинский Станислав Людвигович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: mobitek-m@mail.ru

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Maxim S. Nesterov*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mdulya@gmail.com

Ruslan A. Ageldinov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ageldinov@gmail.com

Daniil V. Khvostov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: daniil_hvostov@mail.ru

Viktor S. Kokhan, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: viktor_kohan@hotmail.com

Anna I. Levashova, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: annalevashova3@gmail.com

Stanislav L. Lyublinskiy, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: mobitek-m@mail.ru

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author