

Липосом үүсгэх аргуудыг харьцуулсан судалгааны дүн

Ж.Халиун¹, Т.Ариунгэрэл¹, Д.Буянхишиг¹, Д.Жамбанинжэ¹¹АШУУИС, Эм зүйн сургууль, Эмийн технологийн тэнхим
Цахим шуудан: dpt24e003@gt.mnms.edu.mn, Утас: 88642770

Түлхүүр үг:

Нимгэн үеэр
гидратжуулах
Этанол тарилгын
Халаах арга
Концентраци
Спектрофотометр

Товч утга:

Үндэслэл: Липосом нь үйлчлэгч бодисыг бай эд, эсэд идэвхтэй болон идэвхгүй замаар хүргэснээр дагалдан илрэх гаж нөлөөг багасгах, эмийн чөлөөлөгдөлтийг зохицуулах боломжийг олгодог тул сүүлийн жилүүдэд эм зүйн салбарт өргөнөөр судлагдах болсон. Липосомыг үүсгэх олон арга байдаг бөгөөд тэдгээр аргууд нь липосомын үүсэлт, гарц болон үүссэн липосомын хэмжээ зэргээрээ хоорондоо ялгаатай байдаг. Липосом үүсгэх аргуудыг харьцуулан судалж тохиромжтой аргыг сонгосноор цаашид үйлчлэгч бодисыг зөөвөрлүүлэх, эмийн хэлбэрт оруулах боломжтой болох тул энэхүү судалгааг хийж гүйцэтгэлээ.

Зорилго: Липосом үүсгэх аргуудыг харьцуулан судлах. **Арга, аргачлал:** Судалгааны ажлыг лабораторийн туршилт судалгааны загвараар АШУУИС-ийн Эм зүйн сургуулийн “Эм зохион бүтээх лаборатори” болон “Эм шинжилгээний итгэмжлэгдсэн лаборатори”-ийг түшиглэн хийж гүйцэтгэсэн. Липосомыг үүсгэхдээ нимгэн үеэр гидратжуулах, этанол тарилгын, халаах аргыг ашиглан тус бүр 5 өөр концентрацитай дээж бэлтгэсэн. Дээж тус бүрд спектрофотометрийн аргаар фосфолипидийн концентраци болон липосомын гэрэл шингээлтийг тодорхойлов. Үүссэн липосомын хэмжээг нанофокс багажаар тодорхойлсон. **Үр дүн:** Фосфатидилхолиныг 5, 10, 20, 30, 40, 50 мкг/мл концентрациар нэрмэл усанд уусган бэлтгэж спектрофотометрийн аргаар жишиг муруйг байгуулан липосомын дээж дэх фосфолипидийн концентрацийг тодорхойлов. Нимгэн үеэр гидратжуулах аргаар бэлтгэхэд 75 мг фосфолипид ашигласан нь хамгийн өндөр үүсэлттэй буюу 76.98%, этанол тарилгын аргаар бэлтгэхэд 50 мг фосфолипид ашигласан нь хамгийн өндөр үүсэлттэй буюу 85.17%, халаах аргаар бэлтгэхэд 50 мг фосфолипид ашигласан нь хамгийн өндөр үүсэлттэй буюу 58.45% байлаа. **Дүгнэлт:** 1. Этанол тарилгын аргаар бэлтгэсэн липосомын үүсэлт бусад аргуудтайгаа харьцуулахад өндөр байв. 2. Этанол тарилгын аргаар бэлтгэхэд липосомын хэмжээ 115 нм байна.

Үндэслэл: Нанотехнологи нь 21-р зууны хамгийн ирээдүйтэй технологид тооцогдох болж шинжлэх ухааны олон салбарт ашиглагдах болсны нэг нь анагаах ухааны салбар юм. Эмчилгээ, оношилгооны болон урьдчилан сэргийлэх зорилгоор ашиглахаас гадна сүүлийн жилүүдэд эм зүйн салбарт бай эд эсэд үйлчлэх эм бүтээх, бактери, вирусийн эсрэг идэвхтэй нанобөөмүүдийг гарган авах судалгаанууд өргөнөөр хийгдэж байна.^{1,2} Үүний нэгэн жишээ нь липосом бөгөөд үйлчлэгч бодисыг бай эд, эсэд идэвхтэй болон идэвхгүй замаар хүргэснээр дагалдан илрэх гаж нөлөөг багасгах, эмийн чөлөөлөгдөлтийг зохицуулах

боломжийг олгодог гэж судлаачид онцолдог.³

Липосом нь нэг буюу хэд хэдэн липидийн хос давхаргаас тогтох хэдэн нанометрээс микрометр хүртэл хэмжээтэй бөмбөрцөг хэлбэрийн цэврүү юм. Усан орчинд фосфолипидийн гидрофоб сүүл хэсэг нь дотогш чиглэн хоорондоо нийлснээр эсийн мембрантай ижил бүтцийг үүсгэн, гидрофил толгой хэсэг нь гадагш чиглэж цэврүү хэлбэрийн бүтэц үүсдэг болохыг судлаачид тогтоосон байдаг.^{4,5} Дээрх шинж чанараас хамааран липосом нь гидрофил, гидрофоб шинж чанартай олон төрлийн үйлчлэгч бодисыг зөөвөрлөх боломжтой гэж үздэг.⁶

Липосомын шинж чанар нь түүний бүтцийг үүсгэж буй байгалийн болон синтетик липидийн онцлог, усан орчны температур, pH зэргээс хамаарах бөгөөд хамгийн чухал нь липосомыг үүсгэхэд ашиглаж буй арга байдаг.⁷⁻⁹ Липосомыг үүсгэх олон аргууд байдгаас хамгийн түгээмэл хэрэглэгддэг энгийн аргууд нь нимгэн үеэр гидратжуулах Бангемийн арга, этанол тарилгын арга, халаах арга юм.¹⁰⁻¹² Дээрх аргуудыг хооронд нь харьцуулж, үр дүнтэйг нь сонгосноор олон төрлийн эмийн бодисыг зөөвөрлүүлэх, цаашид эмийн хэлбэрт оруулах судалгаануудыг гүйцэтгэхэд чухал ач холбогдолтой юм. Бид Витамин Е зөөвөрлөсөн липосомын гель эмийн хэлбэр гарган авах технологийн судалгааны хүрээнд липосом үүсгэх аргуудаас хамгийн тохиромжтой аргыг сонгох шаардлагатай байгаа нь энэхүү судалгааг хийх үндэслэл боллоо.

Зорилго: Липосом үүсгэх аргуудыг харьцуулан судлах

Зорилт:

1. Липосом үүсгэх этанол тарилгын, нимгэн үеэр гидратжуулах, халаах аргаар үүсгэж, үүсэлтийг нь харьцуулах
2. Үүссэн липосомын хэмжээг тодорхойлох

Арга, аргачлал: Бид энэхүү судалгааны ажлыг лабораторийн туршилт судалгааны загвараар АШУҮИС-ийн Эм зүйн сургуулийн “Эм туршин бүтээх лаборатори” болон “Эм шинжилгээний итгэмжлэгдсэн лаборатори”-ийг түшиглэн хийж гүйцэтгэлээ. Липосомыг үүсгэхдээ БНХАУ-ын Jiangsu Med Technology үйлдвэрийн 90% цэвэршилтгүй фосфатидилхолиныг ашиглав.

Нимгэн үеэр гидратжуулах аргаар липосом үүсгэхдээ 25-125 мг фосфатидилхолиныг (0.0001 г нарийвчлалтайгаар) хэмжин авч түүнийгээ хлороформ:метанол (2:1) органик уусгагчид уусган, вакуум ууршуулагч төхөөрөмжинд уусгагчийг нь ууршуулсны дараа 10 мл нэрмэл ус нэмж бэлтгэсэн. Этанол тарилгын аргаар липосом үүсгэхдээ: 25-125 мг фосфатидилхолиныг (0.0001 г нарийвчлалтайгаар) хэмжин авч тус тус 7.5 мл 99.5% этанолд уусган бэлтгэсэн. 50 мл нэрмэл усыг соронзон холигчид 40°C хүртэл халаан минутад 200 эргэлтийн хурдтайгаар эргэлдүүлсэн бөгөөд этанолд уусган бэлтгэсэн фосфатидилхолиныг 1 мл/мин хурдтайгаар тарьж, органик уусгагчийг ууршуулав.

Халаах аргаар липосом үүсгэхдээ: 25-125 мг фосфатидилхолиныг (0.0001 г нарийвчлалтайгаар) хэмжин авч 10 мл нэрмэл усанд уусган 1 цагийн турш соронзон холигчинд хольсны дараа 0.01 мл глицерол нэмж 70°C хүртэл халаан, 1 цагийн турш хольж бэлтгэв. Липосомын үүсэлтийг үнэлэхдээ: Дээж тус бүрийг 24 цагийн турш усан орчинд диализ хийж, чөлөөт фосфатидилхолиныг зайлуулсны дараа спектрофотомерийн аргаар үүсэлтийг тодорхойллоо. Фосфолипидийн хамгийн өндөр гэрэл шингээлтийн утгыг тодорхойлж концентраци, гэрэл шингээлтийн хамаарлын жишиг муруйг байгуулан липосомын

дээж тус бүр дэх фосфолипидийн концентрацийг тодорхойлсон. Дээжийг кварцан кюветэнд хийж Uv-vis спектрофотометр ашиглан шингээлтийг 190-400 нм долгионы уртад ± 1 нм нарийвчлалтай, 200 нм/мин сканердах хурдаар шинжилж, хамгийн өндөр үүсэлтэй дээжийн липосомын хэмжээг нанофокс багажаар тодорхойлсон. Судалгааны үр дүнгийн тоон үзүүлэлтийн статистик боловсруулалтыг Microsoft excel, SPSS 26.0 программ ашиглан тооцоолов.

Ёс зүйн зөвшөөрөл: АШУҮИС-ийн Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2024 оны 04 сарын 19-ний өдрийн №2024/3-04 тоот хурлын шийдвэрээр судалгааны ажлыг эхлүүлэх ёс зүйн зөвшөөрөл авсан.

Үр дүн: Нимгэн үеэр гидратжуулах аргаар бэлтгэсэн липосомын үүсэлтийг үнэлэхэд үүсэлт нь харилцан адилгүй байсан ба 75 мг фосфатидилхолиныг ашиглахад үүсэлт хамгийн өндөр буюу 76.98% байсан. Харин 25 мг фосфатидилхолиныг ашиглахад үүсэлт хамгийн бага буюу 43.49% байгаа нь тус тус тодорхойлогдлоо. (Хүснэгт 1)

Хүснэгт 1. Нимгэн үеэр гидратжуулах аргаар бэлтгэсэн липосомын үүсэлт

Фосфатидилхолин	Гэрэл шингээлт	Концентраци (мкг/мл)	Үүсэлт (%)
125 мг	2.2308	62.6894	50.1515
100 мг	2.2507	63.2564	63.2564
75 мг	2.0569	57.7350	76.9801
50 мг	1.2793	35.5812	71.1624
25 мг	0.4121	10.8746	43.4985

Этанол тарилгын аргаар бэлтгэсэн липосомын үүсэлтийг тодорхойлоход 50 мг фосфатидилхолиныг ашиглан бэлтгэсэн дээжин дэх липосомын үүсэлт хамгийн их буюу 85.17% байсан бол 125 мг фосфатидилхолиныг ашиглан бэлтгэсэн дээжийн липосомын үүсэлт хамгийн бага буюу 54.35% байв. (Хүснэгт 2)

Хүснэгт 2. Этанол тарилгын аргаар бэлтгэсэн липосомын үүсэлт

Фосфатидилхолин	Гэрэл шингээлт	Концентраци (мкг/мл)	Үүсэлт (%)
125 мг	2.4152	67.9430	54.3544
100 мг	1.8245	51.1139	63.8925
75 мг	2.1874	61.4528	81.9370
50 мг	1.5253	42.5897	85.1794
25 мг	0.6783	18.4586	73.8347

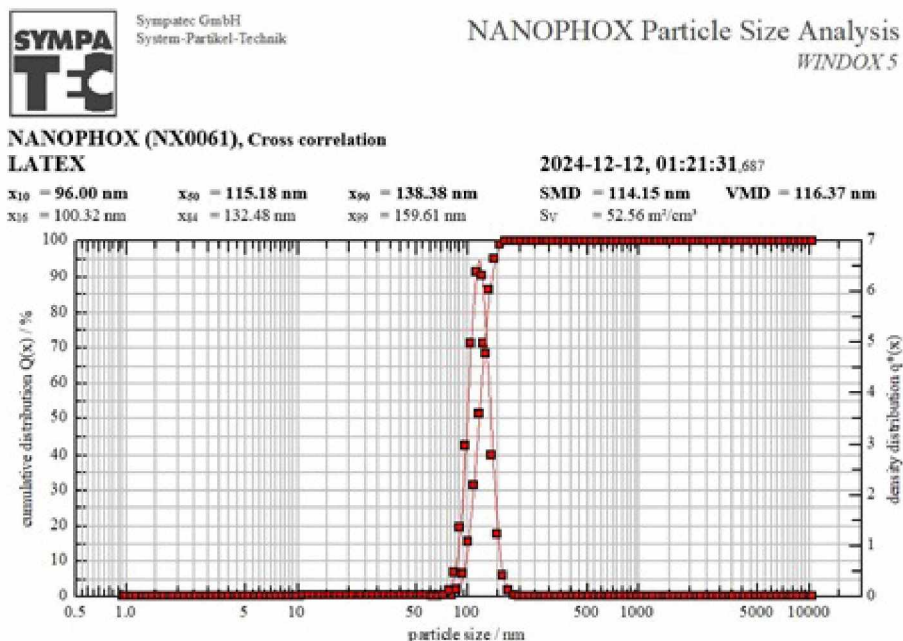
Халаах аргаар бэлтгэсэн липосомын үүсэлтийг тодорхойлоход 50 мг фосфолипид ашиглахад үүсэлт хамгийн их буюу 58.45% байв. 125 мг фосфолипид ашиглахад үүсэлт хамгийн бага буюу 47.75% байв. (Хүснэгт 3)

Хүснэгт 3. Халаах аргаар бэлтгэсэн липосомын үүсэлт

Фосфатидилхолин	Гэрэл шингээлт	Концентраци (мкг/мл)	Үүсэлт (%)
125 мГ	2.1256	59.6923	47.7538
100 мГ	1.8879	52.9202	52.9202
75 мГ	1.3183	36.6923	48.9231
50 мГ	1.0563	29.2279	58.4558
25 мГ	0.5300	14.2336	56.9345

Липосомын хэмжээг тодорхойлсон дүн: Этанол тарилгын аргаар бэлтгэсэн липосомын хэмжээг

нанофокс багажаар тодорхойлоход дундаж хэмжээ нь 115 нм байв. (Зураг 1)



Зураг 1. Нанофокс багажаар липосомын хэмжээг тодорхойлсон дүн

Хэлцэмж: Липосомын үүсэлт, шинж чанарыг тодорхойлохдоо гэрэл шингээлтэд үндэслэсэн аргуудыг ашиглах боломжтой байдаг.^{13,14} Энэхүү судалгаагаар бид липосом үүсгэх энгийн бөгөөд уламжлалт аргууд болох нимгэн үеэр гидратжуулах, этанол тарилгын, халаах аргуудыг ашиглан липосомыг бэлтгэж, үүсэлтийн хувийг спектрофотометрийн аргаар харьцуулан судаллаа.

Суплаач Thi Thuan D (2021) нар этанол тарилгын арга болон нимгэн үеэр гидратжуулах аргаар бэлтгэсэн липосомын бүтэц болон хэмжээг харьцуулсан бөгөөд үүссэн липосомын хэмжээ нь бүтцээс нь хамаараад өөр байгааг тогтоожээ.¹⁵ Этанол тарилгын аргаар бэлтгэсэн липосом нь 50-224 нм хэмжээтэй ганц давхаргат цэврүү бүтэцтэй байсан бол нимгэн үеэр гидратжуулах аргаар бэлтгэсэн липосом нь хэмжээний хувьд 182-449 нм бөгөөд олон давхаргат том цэврүү бүтэцтэй байжээ. Харин судлаач Aisha AF (2014) нарын судалгаагаар нимгэн үеэр гидратжуулах аргаар үүсгэсэн липосомын дундаж хэмжээ 153-177 нм байжээ.¹⁶

Бид хамгийн өндөр үүсэлттэй буюу этанол тарилгын аргаар бэлтгэсэн нэг дээжийг сонгон авч хэмжээг нь нанофокс буюу фотоны хөндлөн корреляцийн спектроскопи ашиглан тодорхойлоход дундаж хэмжээ нь 115 нм байсан нь дээрх судлаачдын үр дүнтэй дүйж байгаа бөгөөд цаашид электрон

микроскопоор бүтцийг нь тодорхойлох шаардлагатай байна.

Халаах аргын хувьд үүсэлт харьцангуй бага буюу 58.45% байв. Энэхүү аргын хувьд органик уусгагч ашиглах шаардлагагүй, хугацаа бага шаардагддаг боловч үүсэлтийг нэмэгдүүлэхийн тулд инертийн хий бүхий орчин шаардлагатай болохыг Jalilian Z нар тогтоожээ.¹⁷

Бид судалгааг гүйцэтгэхдээ буурцгийн шошоос ялган авсан фосфатидилхолиныг ашигласан бөгөөд байгалийн гаралтай фосфолипидийг ашиглах нь нийлэг болон хагас нийлэг фосфолипидийг ашигласнаас бага өртөг зарцуулдаг.^{18,19} Түүнчлэн липосом үүсгээгүй чөлөөт фосфолипидийг ялгахдаа диализын мембраныг ашиглан орчныг тодорхой хугацааны давтамжтай солих шаардлагатай байдаг бөгөөд чөлөөт фосфолипидийн 95%-ийг зайлуулахын тулд ойролцоогоор 24 цаг шаардагддаг. Иймд бид нэрмэл усыг 4,8,12 цагийн зайтай сольж диализ хийсэн.²⁰

Судалгааны дүнд этанол тарилгын аргаар бэлтгэсэн липосом үүсэлт сайтай байсан боловч цаашид бусад багажит шинжилгээний аргуудаар үүссэн липосомын бүтэц, шинж чанар, химийн бүтэц зэргийг тодорхойлох шаардлагатай байна.

Дүгнэлт:

1. Этанол тарилгын аргаар бэлтгэсэн липосомын үүсэлт бусад аргуудтайгаа харьцуулахад өндөр байв.
2. Этанол тарилгын аргаар бэлтгэсэн липосомын хэмжээ 115 нм байна.

Ном зүй:

1. Malik S, Muhammad K, Waheed Y. Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare and Medicine. *Molecules*. 2023;28(18):6624. doi:10.3390/molecules28186624
2. Amiri MR, Alavi M, Taran M, Kahrizi D. Antibacterial, antifungal, antiviral, and photocatalytic activities of TiO₂ nanoparticles, nanocomposites, and bio-nanocomposites: Recent advances and challenges. *J Public Health Res*. 2022;11(2). doi:10.1177/22799036221104151
3. Liu P, Chen G, Zhang J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules*. 2022;27(4):1372. doi:10.3390/molecules27041372
4. Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaer W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*. 2022;8(5):e09394. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09394
5. Lombardo D, Kiselev MA. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics*. 2022;14(3):543. doi:10.3390/pharmaceutics14030543
6. Tripathy S, Srivastav PP. Encapsulation of Centella asiatica leaf extract in liposome: Study on structural stability, degradation kinetics and fate of bioactive compounds during storage. *Food Chemistry Advances*. 2023;2:100202. doi:10.1016/j.focha.2023.100202
7. Sharma M, Joshi J, Kumar Chouhan N, N. Talati M, Vaidya S, Kumar A. Liposome-A Comprehensive Approach for Researchers. In: *Molecular Pharmacology*. IntechOpen; 2020. doi:10.5772/intechopen.93256
8. Ateeq R, Veikko U, Daniel L. Mini review on emerging methods of preparation of liposome and its application as Liposome drug delivery systems. *Open Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 2018;3(1):005-021. doi:10.17352/ojpp.000007
9. Chen W, Duša F, Witos J, Ruokonen SK, Wiedmer SK. Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. *Sci Rep*. 2018;8(1):14815. doi:10.1038/s41598-018-33107-5
10. Gouda A, Sakr OS, Nasr M, Sammour O. Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2021;61:102174. doi:10.1016/j.jddst.2020.102174
11. Umbarkar M, Thakare S, Surushe T, Giri A, Chopade V. Formulation and Evaluation of Liposome by Thin Film Hydration Method. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2021;11(1):72-76. doi:10.22270/jddt.v11i1.4677
12. Andra VVSNL, Pammi SVN, Bhatraju LVKP, Ruddaraju LK. A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents. *Bionanoscience*. 2022;12(1):274-291. doi:10.1007/s12668-022-00941-x
13. Castañeda-Reyes ED, Perea-Flores M de J, Davila-Ortiz G, Lee Y, Gonzalez de Mejia E. Development, Characterization and Use of Liposomes as Amphipathic Transporters of Bioactive Compounds for Melanoma Treatment and Reduction of Skin Inflammation: A Review. *Int J Nanomedicine*. 2020;Volume 15:7627-7650. doi:10.2147/IJN.S263516
14. Giordani S, Marassi V, Zattoni A, Roda B, Reschiglian P. Liposomes characterization for market approval as pharmaceutical products: Analytical methods, guidelines and standardized protocols. *J Pharm Biomed Ana*. 2023;236:115751. doi:10.1016/j.jpba.2023.115751
15. Thi Thuan D, Isomäki A, Paaver U, et al. Berberine-loaded Nano-Liposomes Generated with Ethanol-Injection and Thin-film Hydration Methods. *Acta Pharm Hung*. 2021;91(3-4):293-295. doi:10.3389/aph.2021.91.293-295
16. Aisha AF, Majid AMSA, Ismail Z. Preparation and characterization of nano liposomes of Orthosiphon stamineus ethanolic extract in soybean phospholipids. *BMC Biotechnol*. 2014;14(1):23. doi:10.1186/1472-6750-14-23
17. Jalilian Z, Mozafari MR, Aminnezhad S, Taghavi E. Insight into heating method and Mozafari method as green processing techniques for the synthesis of micro- and nano-drug carriers. *Green Processing and Synthesis*. 2024;13(1). doi:10.1515/gps-2023-0136
18. Li J, Wang X, Zhang T, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci*. 2015;10(2):81-98. doi:10.1016/j.ajps.2014.09.004
19. Thomas AH, Catalá Á, Vignoni M. Soybean phosphatidylcholine liposomes as model membranes to study lipid peroxidation photoinduced by pterin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2016;1858(1):139-145. doi:10.1016/j.bbame.2015.11.002
20. Lin M, Qi XR. Purification Method of Drug-Loaded Liposome. In: ; 2019:1-11. doi:10.1007/978-3-662-49231-4_24-1

Results of comparative study of liposome formation methods

Khalium J.¹, Ariungerel T¹, Buyankhishig D¹, Jambaninj D¹

¹Department of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, MNUMS
E-mail: dpt24e003@gt.mnnums.edu.mn, Tel: +976-88642770

Background: Liposomes have been widely studied in the field of medicine in recent years for they can reduce side effects and regulate drug release by delivering active ingredients to target tissues and cells through active or passive routes. There are many types of methods for formulating liposomes, and comparing those methods and choosing the most suitable one will allow the delivery of active ingredients and their incorporation into pharmaceutical forms, so this research was carried out.

Aim: To compare liposome formation methods.

Materials and Methods: The research work was carried out with the support of “Drug Design Laboratory” and “Pharmaceutical Analysis Laboratory” of the School of Pharmacy of MNUMS. To formulate liposomes, 5 different concentrations of samples were prepared using thin-film hydration, ethanol injection, and heating methods. Phospholipid concentration and light absorption were determined by spectrophotometer in each sample. The size of the resulting liposome was determined using a Nanophox.

Results: Phosphatidilcholines were dissolved in distilled water at concentrations of 5, 10, 20, 30, 40, and 50 µg/ml and a standard curve was established by spectrophotometry to determine the concentration of phospholipids in liposome samples. The highest formulation was 76.98% when 75 mg of phospholipid was used in the preparation by thin film hydration method, when 50 mg of phospholipid was used in the preparation by ethanol injection method, the highest formulation was 85.17%, and for when 50 mg of phospholipid was used in the preparation by heating method, the highest formulation was 58.45%. The mean liposome size by ethanol injection method was 115 nm.

Conclusions:

1. Ethanol injection method for liposome formulation is more efficient compared to thin-film hydration method and heating method.
2. Liposome size was 115 nm when prepared by ethanol injection.

Keywords: Thin film hydration, Ethanol injection, Heating method, Concentration, Spectrophotometer