

**РАЗРАБОТКА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ
КОМПОЗИЦИИ ХОЛЕКАЛЬЦИФЕРОЛА
DEVELOPMENT OF LIPOSOMAL COMPOSITION
OF CHOLECALCIFEROL**

Аннотация:

Представлена разработка липосомальной композиции холекальциферола (витамина D₃) для повышения его биодоступности. Актуальность исследования обусловлена высокой распространенностью дефицита витамина D в России (до 89,92 % у молодых людей 18—25 лет, согласно данным INVITRO и НМИЦ эндокринологии), и его важной ролью в поддержании здоровья костей, иммунитета и в профилактике различных заболеваний. Липосомы используются в качестве носителя для повышения растворимости и биодоступности гидрофобного витамина D₃. В ходе исследования оптимизирован состав липосомальной композиции на основе подсолнечного лецитина, оливкового масла, глицерина и сорбата калия. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования разработанной липосомальной композиции в качестве пищевой добавки для повышения уровня витамина D в организме.

Ключевые слова: холекальциферол, витамин D₃, липосомы, биодоступность, подсолнечный лецитин, индекс полидисперсности, дзета-потенциал.

Abstract:

The paper presents the development of a liposomal composition of cholecalciferol (vitamin D₃) to increase its bioavailability. The relevance of the study is due to the high prevalence of vitamin D deficiency in Russia (up to 89,92 % in young people aged 18—25, according to INVITRO and the National Research Institute of Endocrinology), and its important role in maintaining bone health, immunity, and the prevention of various diseases. Liposomes are used as a carrier to increase the solubility and bioavailability of hydrophobic vitamin D₃. During the study, the composition of a liposomal composition based on sunflower lecithin, olive oil, glycerin and potassium sorbate was optimized. The results obtained indicate the prospects of using the developed liposomal composition as a dietary supplement to increase the level of vitamin D in the body.

Keywords: cholecalciferol, vitamin D₃, liposomes, bioavailability, sunflower lecithin, polydispersity index, zeta potential.

В настоящее время на продовольственном рынке практически отсутствует пищевая продукция, имеющая функциональную направленность в отношении профилактики алиментарно-зависимых заболеваний, таких как сердечно-сосудистые, остеопороз, рахит, хронический гастрит и т. д. Одной из причин таких заболеваний является дефицит витамина D, который играет важную роль в организме человека, а именно помогает иммунитету бороться с инфекциями, уменьшает выраженность воспалительных процессов, участвует в поддержании нормальной работы нервно-мышечной, эндокринной и иммунной систем, препятствует росту раковых клеток. Поэтому одними из наиболее перспективных являются разработки в области производства продуктов с добавленной пищевой ценностью путем включения функциональных ингредиентов, содержащих незаменимые нутриенты, в том числе витамин D.

В Российской Федерации, по данным исследования ИНВИТРО (март 2023 г. — март 2024 г.), у 51 % населения уровень витамина D ниже нормы (норма — более 30 нг/мл), т. е. более чем у половины россиян имеется его дефицит и недостаточность¹⁶.

Исследование НМИЦ эндокринологии, охватившее 445 человек из разных регионов, показало высокую распространенность дефицита витамина D: 27,87 % обследованных имели его недостаточность 25(OH)D, а 56,40 % — дефицит. В общей сложности низкий уровень витамина D выявлен у 84,27 % обследованных. Анализ показал заметную корреляцию между низким уровнем витамина D и возрастом, особенно ярко выраженную у молодых людей (18—25 лет) — в этой возрастной группе дефицит или недостаточность выявлены у 89,81 %. С учетом взвешенных данных, дефицит витамина D наблюдается у 55,96 % обследованных, а дефицит или недостаточность — у 84,01 %. Кроме того, исследование показало статистически значимое преобладание дефицита 25(OH)D у мужчин по сравнению с женщинами¹⁷.

Основная функция витамина D заключается в поддержании достаточной концентрации иона Ca²⁺ и фосфора, необходимой для нормаль-

¹⁶ Нехватка витамина D обнаружена у 51 % россиян. [Электронный ресурс]: https://www.invitro.ru/moscow/about/press_relizes/nehvatka-vitamina-d-obnaruzhena-u-51-rossiyan/

¹⁷ Суплотова Л.А. и др. Дефицит витамина D в России: первые результаты регистрового неинтервенционного исследования частоты дефицита и недостаточности витамина D в различных географических регионах страны // Проблемы эндокринологии. 2021. Т. 67. № 2. С. 84—92.

ного развития костей и связок у детей, стабильного функционирования опорно-двигательного аппарата у взрослых. Исследования последних лет демонстрируют выраженную противораковую активность витамина D¹⁸. Витамин D необходим для профилактики переломов костей и диабета, ранее использовался также для лечения туберкулеза. Он играет ключевую роль в поддержании когнитивных функций (недостаток этого витамина может приводить к снижению внимания и расстройствам памяти), влияет на свертываемость крови, улучшает проводимость нервных волокон, снижает риск атеросклероза и укрепляет иммунитет.

Инкапсулирование витамина D в липосомы позволяет использовать его в функциональных продуктах питания. Липосомальная форма обеспечивает равномерное физиологическое распределение витамина в организме человека и увеличивает его биодоступность в 5—20 раз.

В данной работе в качестве стратегии увеличения потребления витамина D предлагается создание функциональных продуктов с добавлением липосомального витамина D.

В качестве составляющих для разработки липосомальной композиции холекальциферола взяты: холекальциферол, сорбат калия, глицерин, оливковое масло, подсолнечный лецитин.

Анализ просвечивающей электронной микроскопии был проведен с помощью отрицательного окрашивания. Для этого 5 мкл липосомального образца помещали на сетку для ПЭМ, покрытую медью, и оставляли на поверхности сетки на 2 мин. Избыток жидкости удаляли с помощью абсорбирующей салфетки. Окрашивание сетки проводилось с использованием 0,5-процентной фосфорно-вольфрамовой кислоты в течение 20 с, после чего излишки окрашивания удаляли. Для визуализации использовался микроскоп ПЭМ-200 (Россия) при 80 кВ.

Размер частиц и дзета-потенциал липосом измеряли с помощью лазерного анализатора размеров частиц широкого спектра действия «Winner2008». Распределение образцов по размерам получали путем измерения рассеянного света ($\theta = 173^\circ$) частицами (динамическое рассеяние света), освещенными лазерным лучом. Дзета-потенциал определяли методом электрофоретического рассеивания света, основанным на эффекте Доплера¹⁹. Значения заряда дзета-потенциала получали

¹⁸ Кролевец А.А., Мячикова Н.И., Шкондин Е.А. Влияние природы оболочки на размер наноструктурированного витамина D и его использование в качестве наноингредиента в функциональных продуктах питания // *Пища. Экология. Качество. Труды XIII Международной научно-практической конференции*. Т. 2. Красноярск: Красноярский гос. аграрный ун-т, 2016. С. 126—131.

¹⁹ Ринкевичюс Б.С. Лазерная доплеровская анемометрия. М.: «Русайнс», 2019. 160 с.

в ходе трех повторных измерений, каждое из которых состояло как минимум из десяти отдельных циклов.

Целью разработки является создание липосомальной композиции витамина D_3 с использованием липосом из лецитина подсолнечника, а также обеспечение системы доставки витамина D_3 , улучшающей его биодоступность, путем введения липосомальной формулы перорально для всасывания в систему кровообращения.

Витамин D_3 по своей природе особенно гидрофобен, его трудно эффективно транспортировать к клеткам организма. Изменение состава и суточной дозы пищевой добавки оказывает незначительное влияние на транспортировку и распределение витамина D_3 и его производных по всему организму. Но изменения в составе витаминов могут оказать значительное влияние на пищеварение и последующие механизмы всасывания²⁰, поскольку биополимерная матрица, содержащаяся в слизи, состоит из муцинов, которые ингибируют пищеварение с последующим всасыванием частиц, содержащих гидрофобные вещества. Частицы размером менее 300—500 нм могут достигать только эпителиальных клеток²¹. Способность к эндоцитозу, т. е. захвату внеклеточного материала путем образования мембранных везикул, присуща лишь компетентным клеткам с определенной функциональной специализацией. Это обусловлено избирательной способностью таких клеток поглощать частицы строго определенного размера и состава, включая высокогидрофобные молекулы²².

Особенности витамина D_3 , такие как гидрофобность, биополимерная матрица, состоящая из муцинов, компетентные клетки, способные принимать внеклеточные ДНК из окружающей среды, дают основание для разработки эффективной рецептуры гидрофобного витамина D_3 в виде липосом. Липосомы широко используются в качестве носителей для предотвращения деградации и увеличения срока годности активных компонентов. Помимо этого, в то время как низкая растворимость витамина D_3 препятствует его равномерному физиологическому распределению, липосомальный витамин D_3 может дополнительно улучшать профиль растворимости и регулировать высвобождение активных соединений.

Основываясь на зарубежном исследовании²³, мы разработали рецептуру липосомального витамина D_3 с разным соотношением воды

²⁰ *Corthésy B., Bioley G.* Lipid-based particles: versatile delivery systems for mucosal vaccination against infection // *Front Immunol.* 2018. № 9. P. 431—451.

²¹ *Cone R.A.* Barrier properties of mucus // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009. V. 2. № 61. P. 75—85.

²² *Gupta R., Behera C., Paudwal G. et al.* Recent advances in formulation strategies for efficient delivery of vitamin D // *AAPS PharmSciTech.* 2019. V. 1. № 20. P. 11—23.

²³ *Jeung J.J.* Vitamin C delivery system and liposomal composition thereof. The

и глицерина (45:45, 55:55, 55:45, 45:55 по объему) для достижения высокой стабильности и однородности. Путем сравнения полученных образцов, имеющих различное соотношение воды и глицерина, было определено, что в качестве оптимального следует использовать соотношение 45:55. Для нахождения оптимизированного соотношения воды и глицерина при создании липосом учитывались несколько факторов, связанных с их физико-химическими свойствами и требованиями к стабильности, растворимости и биодоступности активных веществ. Для оценки качества полученных липосом определяли такие физико-химические характеристики, как размер липосом и дзета-потенциал. В условиях, когда объем глицерина больше, чем объем воды, липосомы были сформированы после гомогенизации: порядок смешивания соответствующих ингредиентов также оказывает существенное влияние на однородность липосомального продукта.

Далее была разработана технология получения липосомального витамина D₃.

Гидрофильный раствор сорбата калия и воды готовили при комнатной температуре (25 °C): 0,134 г сорбата калия растворили в 45 мл очищенной воды. Перемешивая, добавляли к водному раствору 55 мл глицерина. Далее раствор вылили в контейнер блендера и тщательно перемешивали на высокой скорости (3000 об/мин.). Затем 1,25 мг витамина D₃ растворили в 0,3 мл оливкового масла и добавили в смесь. Все перемешивали в блендере также на скорости 3000 об/мин. в течение 30 мин. Далее добавили 1,66 г подсолнечного лецитина (≥ 40 % фосфатидилхолина) с последующим перемешиванием для получения инкапсулированного витамина D₃ (Рис. 1).

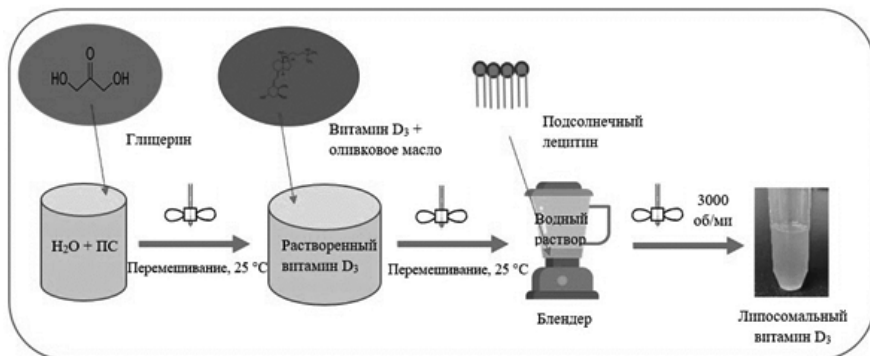


Рис. 1. Схема получения липосомального витамина D₃.

Таким образом, были подобраны биологически активные компоненты для создания липосомального витамина D₃: полисорбат калия (для увеличения стабильности липосом при длительном хранении), глицерин (для увеличения стабильности липосом к коагуляции и осаждению), оливковое масло (для растворения витамина D₃) и подсолнечный лецитин (в качестве фосфолипида, т. е. оболочки липосом). Полученная пищевая добавка является однородной и стабильной благодаря оптимальному соотношению воды и глицерина (45:55) и тому, что в процессе ее получения не использовались вредные химические вещества и растворители.

Определение размера, дзета-потенциала и индекса полидисперсности липосом.

Стабильность липосом зависит от некоторых факторов, рассмотренных в ходе данного исследования.

Для характеристики и оценки стабильности липосомального компонента, как правило, используют три основных показателя — размер везикул, индекс полидисперсности (polydispersity index, PDI) и дзета(ζ)-потенциал.

Общепризнано, что размер липосом оказывает значительное влияние на всасывание их клетками организма. Крупные липосомы обычно захватываются фагоцитами, клетками иммунной системы, которые защищают организм путем поглощения вредных чужеродных частиц, а также мертвых или погибающих клеток. Небольшие частицы быстро выводятся почками. Липосомы же среднего размера (от 100 до 200 нм) более способны проникать в клетки²⁴.

Липосомы, или липидные везикулы, подразделяются на пять основных типов: многослойные везикулы (МЛВ), маленькие однослойные везикулы (МОВ), большие однослойные везикулы (БОВ), мультивезикулярные везикулы (МВВ) и гигантские однослойные везикулы (ГОВ)²⁵. Размер липидных везикул, их распределение по размерам и количество бислоев определяют эффективность инкапсуляции витамина, его биотрансформацию, биораспределение и выведение из организма²⁶.

Для определения размера липосом мы применяли метод просвечивающей электронной микроскопии с использованием микроскопа

²⁴ Chen J. et al. Development of novel lipid-based formulations for water-soluble vitamin C versus fat-soluble vitamin D₃ // Bioengineering. 2022. V. 9. № 12. P. 819.

²⁵ Stein H. et al. Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations // Frontiers in physiology. 2017. V. 8. P. 63.

²⁶ Tretiakova D.S., Vodovozova E.L. Liposomes as adjuvants and vaccine delivery systems // Biochemistry (Moscow). Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2022. V. 16. № 1. С. 1—20.

ПЭМ-200. Результаты ПЭМ-томографии (Рис. 2) показывают, что липосомы имеют сферическую форму. Для определения оптимального размера частиц липосом было использовано программное обеспечение Image J²⁷: как и ожидалось, для липосомального витамина D₃ их размер должен составлять около 100 нм. Изображения липосом с витамином D₃ указывают на то, что это однослойные везикулы, средний размер которых составляет около 100 нм.

Таким образом, данные просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) свидетельствует о том, что разработанный метод приводит к получению преимущественно однослойных липосом размером около 100 нм, хорошо всасываемых клетками организма.

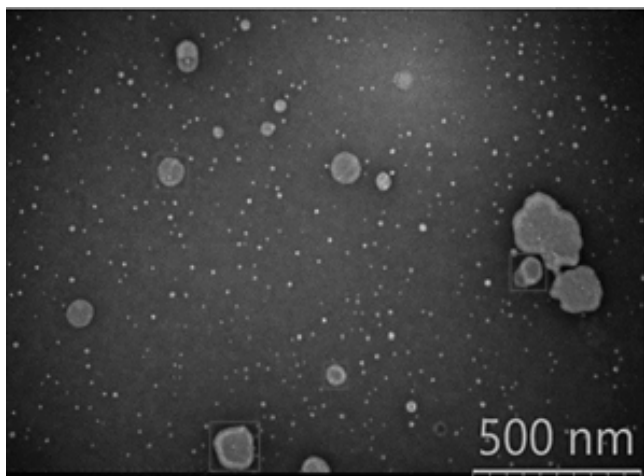


Рис. 2. Изображение, полученное с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ): липосомальный витамин D₃ со средним диаметром около 100 нм. Образцы однослойных везикул обозначены квадратной рамкой.

После определения размера частиц были изучены такие показатели, как индекс полидисперсности, т. е. ширина распределения частиц по размерам, и дзета-потенциал как важный показатель индикатора поверхностного заряда частиц.

²⁷ Сакиева З.В., Арутюнов С.Д., Муслов С.А. Исследование размерной точности образцов из оттисковых материалов с помощью программного обеспечения imageJ // Актуальные вопросы медицины в современных условиях. Сб. трудов Международной научно-практической конференции. СПб., 2015. С. 158—160.

Поверхностный заряд частиц в коллоидной системе характеризуется дзета-потенциалом (ζ). Этот параметр критически важен для стабильности дисперсной системы, определяя характер межчастичных взаимодействий — отталкивание или притяжение. Согласно теории Дерягина, Ландау, Фервея, Овербека (ДЛФО), устойчивость коллоидных систем определяется балансом электростатического отталкивания, обусловленного двойным электрическим слоем, и Ван-дер-Ваальсовой силы притяжения. Достаточно высокий энергетический барьер, создаваемый силами отталкивания, препятствует сближению частиц, их агрегации и образованию крупных конгломератов. Преодоление этого барьера Ван-дер-Ваальсовой силой приводит к слипанию частиц, что крайне нежелательно, например, в липосомальных системах доставки лекарственных веществ. Поэтому контроль дзета-потенциала является важным этапом в разработке стабильных липосомальных композиций²⁸.

Измеряли дзета-потенциал с помощью лазерного анализатора размеров частиц широкого спектра действия «Winner2008» (Китай). Использовали метод электрофоретического рассеивания света, основанный на эффекте Допплера. Электрофоретическое рассеяние света (также известное как лазерный доплеровский электрофорез и рассеяние света при фазовом анализе) основано на динамическом рассеянии света. Сдвиг частоты или фазы падающего лазерного луча зависит от подвижности дисперсных частиц. При динамическом рассеянии света броуновское движение вызывает перемещение частиц. При электрофоретическом рассеянии света эту функцию выполняет колеблющееся электрическое поле. Коллоидную систему передавали через кювету с двумя электродами, на которые подавалось постоянное напряжение. Под воздействием электрического поля частицы начинают двигаться, и скорость их перемещения зависит от их размера, формы и заряда. Затем на частицы падает лазерный луч, и рассеянный свет под углом регистрируется детектором. Измерение угла рассеяния света позволяет определить дзета-потенциал частиц. В результате исследования для липосомального витамина D₃ было получено отрицательное значение ζ (-4,0 мВ), что указывает на более сильное отталкивание частиц.

Таким образом, отсутствует движущая сила, с которой частицы могли бы связываться, что приводило бы к образованию более стабильной и диспергированной липосомы без коагуляции.

²⁸ Дмитриева М.В. и др. Характеристика и оценка стабильности липосомальных препаратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 3. С. 36—44.

Индекс полидисперсности (PDI) характеризует ширину распределения частиц по размерам в дисперсной системе. В большинстве макромолекулярных и нанодисперсных систем частицы имеют различные размеры, поэтому для адекватного описания их свойств необходимо учитывать полидисперсность. Использование монодисперсных моделей может искажать характеристики и выводы о свойствах частиц в таких системах. Подобно размеру частиц, индекс полидисперсности зависит от состава липосомальной композиции. В частности, увеличение концентрации активного компонента или твердых липидов может приводить к росту PDI.

Определяли индекс полидисперсности аналогично дзета-потенциалу. В результате исследования для липосомального витамина D₃ значение индекса полидисперсности составило 0,53, что свидетельствует о полидисперсном распределении частиц по размерам соответственно.

Такое значение индекса полидисперсности говорит о том, что размер частиц липосом имеет относительно умеренное распределение и они не слишком отличаются друг от друга. Липосомы имеют примерно одинаковый размер, что может быть полезно для обеспечения равномерного распределения активных компонентов или стабильности продукта.

Выводы. Разработанная технология получения липосом характеризуется такими показателями, как размер частиц, дзета-потенциал и индекс полидисперсности. Результаты показали, что липидные везикулы получились однослойными и полидисперсными, средний размер составлял около 100 нм, что обеспечивает хорошую всасываемость клетками организма.

Полученные по разработанной технологии липосомы можно вводить в различные продукты питания, в том числе в эмульсионные соусы для обеспечения биодоступности витамина D₃ в организме человека.

Список литературы

1. Дмитриева М.В. и др. Характеристика и оценка стабильности липосомальных препаратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 3. С. 36—44.
2. Кролевец А.А., Мячикова Н.И., Шкондин Е.А. Влияние природы оболочки на размер наноструктурированного витамина D и его использование в качестве наноингредиента в функциональных продуктах питания // Пища. Экология. Качество. Труды XIII Международной научно-практической конференции. Т. 2. Красноярск: Красноярский гос. аграрный ун-т, 2016. С. 126—131.

3. Нехватка витамина D обнаружена у 51 % россиян. [Электронный ресурс]: https://www.invitro.ru/moscow/about/press_relizes/nehvatka-vitamina-d-obnaruzhena-u-51-rossiyan/ (дата обращения: 21.03.2025).

4. Ринкевичюс Б.С. Лазерная доплеровская анемометрия. М.: «Русайнс», 2019. 160 с.

5. Сакиева З.В., Арутюнов С.Д., Муслов С.А. Исследование размерной точности образцов из оттисковых материалов с помощью программного обеспечения imagej // Актуальные вопросы медицины в современных условиях. Сб. трудов Международной научно-практической конференции. СПб., 2015. С. 158—160.

6. Суплотова Л.А. и др. Дефицит витамина D в России: первые результаты регистрового неинтервенционного исследования частоты дефицита и недостаточности витамина D в различных географических регионах страны // Проблемы эндокринологии. 2021. Т. 67. № 2. С. 84—92.

7. Chen J. et al. Development of novel lipid-based formulations for water-soluble vitamin C versus fat-soluble vitamin D₃ // Bioengineering. 2022. V. 9. № 12. P. 819.

8. Cone R.A. Barrier properties of mucus // Adv. Drug Deliv. Rev. 2009. V. 2. № 61. P. 75—85.

9. Corthésy B., Bioley G. Lipid-based particles: versatile delivery systems for mucosal vaccination against infection // Front Immunol. 2018. № 9. P. 431—451.

10. Gupta R., Behera C., Paudwal G. et al. Recent advances in formulation strategies for efficient delivery of vitamin D // AAPS PharmSciTech. 2019. V. 1. № 20. P. 11—23.

11. Jeung J.J. Vitamin C delivery system and liposomal composition thereof. The patent application № 1518576. USA. 2016.

12. Stein H. et al. Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations // Frontiers in physiology. 2017. V. 8. P. 63.

13. Tretiakova D.S., Vodovozova E.L. Liposomes as adjuvants and vaccine delivery systems // Biochemistry (Moscow). Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2022. V. 16. № 1. P. 1—20.

Сведения об авторах

Восканян Ольга Станиславовна, доктор технических наук, профессор кафедры инновационных технологий продуктов из растительного сырья Московского государственного университета технологий и управления имени К.Г. Разумовского. E-mail: 021602@mail.ru

Шипилова Полина Александровна, магистрант кафедры инновационных технологий продуктов из растительного сырья Московского

государственного университета технологий и управления имени К.Г. Разумовского. E-mail: *polina2187@gmail.com*

Information about the authors

Voskanyan Olga Stanislavovna, Doctor of Technical Science, Professor of the Department of Innovative Technologies of Products from Vegetable Raw Materials, K.G. Razumovsky Moscow State University of Technologies and Management. E-mail: *021602@mail.ru*

Shipilova Polina Alexandrovna, Master's Student of the Department of Innovative Technologies of Products from Vegetable Raw Materials, K.G. Razumovsky Moscow State University of Technologies and Management. E-mail: *polina2187@gmail.com*