



**УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ
СКОПЈЕ**



М-р Олга ПОПОВСКА

**РАЗВОЈ НА ЛИПОЗОМСКИ ФОРМУЛАЦИИ НА
КЕТОКОНАЗОЛОТ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Скопје, 2017



**UNIVERSITY "Ss. CYRIL AND METHODIUS"
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY
SKOPJE**



M.Sc. Olga POPOVSKA

**DEVELOPMENT OF THE KETOCONAZOLE LIPOSOMAL
FORMULATIONS**

DOCTORAL THESIS

SKOPJE, 2017

Членови на комисија:

проф. д-р Александра Бужаровска, претседател
Технолошко-металуршки факултет, Скопје
Универзитет „Св. Кирил и методиј“, Скопје

проф. д-р Весна Рафајловска, ментор
Технолошко-металуршки факултет, Скопје
Универзитет „Св. Кирил и методиј“, Скопје

проф. д-р Кристина Младеновска, член,
Фармацевтски факултет, Скопје
Универзитет „Св. Кирил и методиј“, Скопје

проф. д-р Весна Димова, член,
Технолошко-металуршки факултет, Скопје
Универзитет „Св. Кирил и методиј“, Скопје

проф. д-р Емилија Јаневиќ-Ивановска, член,
Факултет за медицински науки
Универзитет „Гоце Делчев“, Штип

Дата на одбрана:

Област во која се стекнува докторатот: Фармацевтска технологија

РАЗВОЈ НА ЛИПОЗОМСКИ ФОРМУЛАЦИИ НА КЕТОКОНАЗОЛОТ

АПСТРАКТ

Кетоконазолот е имидазолан антимикотичен лек кој се користи во лекувањето на голем број кожни заболувања, најчесто предизвикани од габични инфекции. Ограничувањата во користењето на кетоконазолот се поради несаканите ефекти, вклучувајќи иритација на кожата, хепатотоксичност и нефротоксичност.

Целите на истражувањето во оваа докторска дисертација беа насочени кон развојот на липозомските формулации на кетоконазолот како и оценувањето на физичките својства: ефикасност на инкапсулирање, морфолошки изглед, ζ -потенцијалот, електрична спроводливост и нивната стабилност во текот на еден месец чувани на 4 °C и 25 °C.

Во ова истражување липозомите на кетоконазолот беа подготвени со тенко-филмен хидратационен, ултразвучен и инјекционен метод. Кетоконазол, холестерол и L- α -фосфатидилхолин во масени односи 3,3:1:3,3 *w/w/w* и 6,67:1:3,33 *w/w/w* беа користени за подготовка на мултиламеларните и малите униламеларни везикули, односно во подготовката на големите униламеларни везикули, соодветно. Смесата беше растворена или во растително масло или во метанол. Највисоката вредност за инкапсулираност на кетоконазолот утврдена во големите униламеларни везикули изнесува 70,83%. Максималните вредности за инкапсулираност на кетоконазол во мултиламеларните и малите униламеларни везикули беа 93,77% и 90,03%, соодветно. Вредностите на ζ -потенцијалот за добиените мултиламеларни, мали и големи униламеларни везикулни липозоми, користејќи кетоконазол, холестерол и L- α -фосфатидилхолин во масени односи 3,3:1:3,3 *w/w/w* на кетоконазолот беа утврдени: - 27,23, - 27,50 и - 30,21 mV, соодветно. Најстабилни се липозомите чувани на 4 °C во период од една седмица по нивната подготовка.

Клучни зборови: кетоконазол, лецитин, липозоми, растително масло

DEVELOPMENT OF THE KETOCONAZOLE LIPOSOMAL FORMULATIONS

ABSTRACT

Ketoconazole is an imidazole antimicrobial drug used in the treatment of skin diseases, mostly caused by fungal infections. Restrictions of using ketoconazole are due to its side effects, including skin irritation, hepatotoxicity, and nephrotoxicity.

The objectives of this doctoral thesis were aimed to develop ketoconazole liposomes and evaluate their physical properties such as efficiency of encapsulation, morphological appearance, ζ -potential, electric conductivity and stability during one month stored at 4 °C and 25 °C.

Ketoconazole liposomal formulations, using a thin-film hydration, an ultrasonic, and an injection method were determined in this research. Ketoconazole, cholesterol, and L- α -phosphatidylcholine in a weight ratio of 3.3:1:3.3 w/w/w and 6.67:1:3.33 w/w/w were used in the preparation of multilamellar and small unilamellar vesicles or to obtain large unilamellar vesicles, respectively. The mixture was dissolved either in vegetable oil or in methanol. The highest value for the ketoconazole encapsulation efficiency in large unilamellar vesicles was 70.83%. The values for the ketoconazole encapsulation efficiency in multilamellar and small unilamellar vesicles were 93.77% and 90.03%, respectively. The ζ -potential of the obtained multilamellar, small, and large unilamellar ketoconazole vesicles, using ketoconazole, cholesterol, and L- α -phosphatidylcholine in a weight ratio of 3.3:1:3.3 w/w/w were determined - 27.23, - 27.50, and - 30.21 mV, respectively. The most stable liposomes are those kept at 4 °C in a period of one week after preparation.

Keywords: Ketoconazole, lecithin, liposomes, vegetable oil

Список на трудови

Трудови печатени во списанија

1. Popovska O., Kavrakovski Z., Rafajlovska V. A RP-HPLC method for the determination of ketoconazole in pharmaceutical dosage forms, *Curr. Pharm. Anal.* doi: 10.2174/1573412912666160610104703 (2016). (IF = 0.885)
2. Popovska O., Kavrakovski Z., Rafajlovska V. Development and validation of UV spectroscopic method for determination of ketoconazole in pharmaceutical formulations, *Int. J. Pharm.*, **4**:95–101 (2014). (GIF = 0.343)
3. Popovska O., Simonovska J., Kavrakovski Z., Rafajlovska V. An overview: methods for preparation and characterization of liposomes as drug delivery systems, *Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res.*, **3**:182–189 (2013). (UIF = 0.783)
4. Popovska O., Rafajlovska V., Kavrakovski Z. A review: current analytical methods for determination of ketoconazole in pharmaceutical and biological samples, *IJPI's Journal of Analytical Chemistry*, **3**:1–14 (2013).

Трудови презентирани на научни собири со апстракт

1. Popovska O., Simonovska J., Trajkoska-Bojadziska E., Kavrakovski Z., Rafajlovska V. An injection method for preparation of liposomes as ketoconazole carriers. 6th Congress of Pharmacy in Macedonia with international participation, Ohrid, the Republic of Macedonia, 1–5 June, *Maced. Pharm. Bull.*, **62**(suppl.):391–392 (2016).
2. Popovska O., Kavrakovski Z., Rafajlovska V. A HPLC method for determination of ketoconazole in small unilamellar vesicles, 7th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry. National Spectroscopy Conference, Golden Sands Varna, the Republic of Bulgaria, 10–15 September, 2015, 79, Book of Abstracts.
3. Popovska O., Kavrakovski Z., Rafajlovska V. Development and validation of a reversed-phased HPLC method for the determination of ketoconazole in pharmaceutical formulations. 7th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry. National Spectroscopy Conference, Golden Sands Varna, the Republic of Bulgaria, 10–15 September, 2015, 78, Book of Abstracts.
4. Popovska O., Trajkoska-Bojadziska E., Simonovska J., Kavrakovski Z., Rafajlovska V. Formulation and evaluation of ketoconazole liposomes using injection method. International Eurasia Pharmacy Congress, Erzincan, the Republic of Turkey, 3–7 September, 2015, 65–66, *IJPCR, Conference Proceedings, Book of Abstracts, 2015*, **4** (eISSN: 2278–8700).
5. Popovska O., Kavrakovski Z., Rafajlovska V. Development of UV spectroscopic method for determination of ketoconazole in pharmaceutical formulations. 6th Serbian Congress of Pharmacy with international participations, Belgrade, the Republic of Serbia, 15–19 October, 2014, 212–213, Abstract Book, Publisher: Pharmaceutical Association of Serbia, 2014 (ISBN: 978-86918145-0-2).

СОДРЖИНА

1.	Вовед и цели	1
2.	Литературен преглед	5
2.1.	Кетоконазол	6
2.2.	Липозоми	10
2.2.1.	Физички карактеристики на липозомите	17
2.2.2.	Хемиски карактеристики на липозомите	19
2.2.3.	Липидите во липозомите	20
2.2.3.1.	Фосфолипид	21
2.2.3.2.	Холестерол	22
2.3.	Технологија на липозомите	24
2.3.1.	Тенко-филмен хидратационен метод	24
2.3.2.	Ултразвучен метод	26
2.3.3.	Метод на истиснување низ дизна под притисок	26
2.3.4.	Етер-инјекционен метод	27
2.3.5.	Етанол-инјекционен метод	27
2.3.6.	Детергент методи	28
2.3.7.	Реверзно-фазен метод во испарувањето	28
2.3.8.	Калциум индуциран фузионен метод	29
2.3.9.	Метод на замрзнување и загревање	29
2.3.10.	Метод на хидратација и рехидратација	30
2.3.11.	Метод со хомогенизација под притисок	30
2.3.12.	Екструзионен метод	30
2.3.13.	Микрофлуидизационен метод	31
2.3.14.	Суперкритични флуиди во липозомската технологија	31
2.4.	Примена на липозомите	33
2.4.1.	Липозомите во прехранбената индустрија	33
2.4.2.	Липозомите во козметиката	35
2.4.3.	Липозомите во медицината	36
2.5.	Кетоконазолот инкапсулиран во определени формулации	42
3.	Експериментален дел	45
3.1.	Материјали	46
3.2.	Апаратура	47
3.3.	Спектрофотометриски и високоефикасен течен хроматографски метод ..	48
3.3.1.	Стандардни раствори	48
3.3.2.	Подготовка на примероци	48
3.3.3.	Спектрофотометриски и хроматографски услови	49
3.3.4.	Валидизација на методите	49
3.3.4.1.	Линеарност и опсег	49
3.3.4.2.	Прецизност и повторливост	50
3.3.4.3.	Точност	50
3.3.4.4.	Граница на детекција и граница на квантификација	50
3.3.4.5.	Робустност	51
3.4.	Развој на кетоконазол липозомската формулација	52
3.4.1.	Тенко-филмен хидратационен метод за подготовка на кетоконазол липозомските формулации	52
3.4.2.	Ултразвучен метод за подготовка на кетоконазол липозомските формулации	54
3.4.3.	Инјекционен метод за подготовка на кетоконазол липозомските формулации	55
3.4.4.	Оцена на кетоконазол липозомските формулации	56
3.4.5.	Статистичка анализа	56

4.	Резултати и дискусија	57
4.1.	Развој и валидизација на спектофотометрискиот метод	58
4.2.	Развој и валидизација на <i>HPLC</i> метод	64
4.3.	Липозомски формулации на кетоконазолот	70
4.3.1.	Карактеристики на липозомите добиени со тенко-филмен хидратационен метод	73
4.3.2.	Карактеристики на липозомите добиени со ултразвучен метод	81
4.3.3.	Карактеристики на липозомите добиени со инјекционен метод	84
5.	Заклучок	94
6.	Литература	97

СПИСОК НА КРАТЕНКИ

ANOVA	еднонасочна анализа на варијансата, <i>Analysis of Variance</i>
DAD	детектор со решетки од диоди, <i>Diode Area Detector</i>
EC	електрична спроводливост, <i>Electrical conductivity</i>
EDTA	етилендиаминотетраоцетна киселина, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
GUV	големи (гигантски) униламеларни везикули, <i>Giant Unilamellar Vesicles</i>
HPLC	високоефикасна течна хроматографија, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	Меѓународна конференција за хармонизација, <i>International Conference on Harmonisation</i>
LD₅₀	летална доза, <i>Lethal Dose</i>
LOD	лимит (граница) на детекција, <i>Limit of Detection</i>
LOQ	лимит (граница) на квантификација, <i>Limit of Quantification</i>
LUV	големи униламеларни везикули, <i>Large Unilamellar Vesicles</i>
MLV	мултиламеларни везикули, <i>Multilamellar Vesicles</i>
MVV	мултивезикуларни везикули, <i>Multivesicular Vesicles</i>
NMR	нуклеарна магнетна резонанца, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OLV	средно ламеларни везикули, <i>Oligo Lamellar Vesicles</i>
RP-HPLC	реверзно-фазен метод на високоефикасна течната хроматографија, <i>Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography</i>
RSD	релативна стандардна девијација, <i>Relative Standard Deviation</i>
SD	стандардна девијација, <i>Standard Deviation</i>
SE	стандардна грешка, <i>Standard Error</i>
SUV	мали униламеларни везикули, <i>Small Unilamellar Vesicles</i>
ULV	униламеларни везикули, <i>Unilamellar Vesicles</i>

ИНДЕКС НА СЛИКИ

Слика 2.1.	Стереоизомери на кетоконазолот	6
Слика 2.2	Шематски приказ на формите на кетоконазолот	8
Слика 2.3.	Оневозможена конверзија на ланостеролот во ергостерол во присуство на имидазолниот лек кетоконазол	9
Слика 2.4.	Класификација на липозомите според големината	11
Слика 2.5.	Класификација на липозомите според структурата	11
Слика 2.6.	Шематски приказ на неполярната и поларната група во липозомите	12
Слика 2.7.	Шематски приказ на ослободување на лекот со фузија	13
Слика 2.8.	Шематски приказ на механизмот на имунолипозомите	15
Слика 2.9.	Шематски приказ на ендцитозата	16
Слика 2.10.	Шематски приказ на ефектот на температурата и холестеролот врз фосфолипидниот двоен слој	21
Слика 2.11.	Структурна формула на холестерол	22
Слика 2.12.	Холестерол во липозомите	23
Слика 2.13.	Шематски приказ на подготовка на липозомите со тенко-филмен хидратационен метод	25
Слика 2.14.	Шематски приказ на подготовка на липозомите со ултразвучен метод	26
Слика 2.15.	Шематски приказ на подготовка на липозомите со етанол инјекционен метод	27
Слика 3.1.	Изглед на аналитичка вага (а), рН метар (б), магнетна мешалка (в), вортекс (г), ултразвучна бања (д), ротоевапоратор (ѓ), центрифуга (е), UV-Vis спектрофотометар (ж), високоефикасен течен хроматограф (з) и оптички микроскоп (с)	47
Слика 3.2.	Подготовка на мултиламеларни везикули на кетоконазолот со тенко-филмен хидратационен метод: ротоевапоратор (а), липозомска формулација со метанол (б) и липозомска формулација со смеса на сончогледово и маслиново масло, 1:1 v/v (в)	53
Слика 3.3.	Подготовка на мали униламеларни везикули на кетоконазолот: липозомска формулација со метанол (а), липозомска формулација со смеса на сончогледово и маслиново масло, 1:1 v/v (б) и изглед на ултразвучна бања (в)	54
Слика 3.4.	Подготовка на везикулите на кетоконазолот со инјекционен метод: липозомска формулација со метанол (а), липозомска формулација со смеса на маслиново и сончогледово масло во однос 1:1 v/v (б)	55
Слика 4.1.	УВ-спектар на кетоконазол во метанол	58
Слика 4.2.	УВ-спектри на растворите на кетоконазолот ($5 \cdot 10^{-3}$ – $2,5 \cdot 10^{-1}$ mg·cm ⁻³) во метанол на линерноста, на 244 nm ($5 \cdot 10^{-3}$ – $2,5 \cdot 10^{-2}$ mg·cm ⁻³) и на 296 nm ($5 \cdot 10^{-2}$ – $0,250$ mg·cm ⁻³)	59
Слика 4.3.	УВ-спектри на раствори на таблети (А), крем (Б), шампон 1 (В) и шампон 2 (Г) во метанол	61
Слика 4.4.	HPLC-хроматограм на кетоконазол во мобилна фаза метанол и вода (90:10 v/v) со рН вредност од 4 (а) и 8,9 (б)	64
Слика 4.5.	Хроматограми на раствори на таблети (а), крем (б), шампон 1 (в) и шампон 2 (г) во метанол на 296 nm	67
Слика 4.6.	УВ-спектри на растворот на растворот на кетоконазол (а), кетоконазол инкапсулиран во липозомите користејќи тенко-филмен хидратационен (б), ултразвучен (в) и инјекционен (г) метод на 296 nm	72
Слика 4.7.	Хроматограми на раствори на кетоконазол како стандард (а) и на липозомските формулации добиени со тенко-филмен хидратационен (б), ултразвучен (в) и инјекционен (г) метод	72
Слика 4.8.	Микроскопски изглед на липозомите на кетоконазол подготвените со хлороформ во количество од 5 cm ³ (а) и 10 cm ³ (б), x 40	74
Слика 4.9.	Микроскопски изглед на липозомите на кетоконазолот добиени со тенко-филмен хидратационен метод (а–д согласно примероците од Табелата 4.18), x 40	78
Слика 4.10.	Ефикасност на инкапсулираност на липозомите на кетоконазолот добиени со тенко-филмен хидратационен метод (примерок б од Табелата 4.18), чувани 1 месец на 4 °C и 25 °C	79

Слика 4.11.	Микроскопски изглед на липозомите на кетоконазолот добиени со тенко-филмен хидратационен метод (примерок б од Табелата 4.18), чувани во тек на еден месец на 4 °C (а) и 25 °C (б), x 40	80
Слика 4.12.	Микроскопски изглед на липозомските формулации на кетоконазолот добиени со ултразвучен метод (а–е се согласно примероците од Табелата 4.19), x 40	82
Слика 4.13.	Ефикасност на инкапсулираност на липозомите на кетоконазолот добиени со ултразвучен метод (примерок б од Табелата 4.19), чувани 1 месец на 4 °C и 25 °C	83
Слика 4.14.	Микроскопски изглед на липозомите на кетоконазолот добиени со инјекционен метод (а–д согласно примероците од Табелата 4.20), x 40	85
Слика 4.15.	Ефикасност на инкапсулираност на липозомите на кетоконазолот добиени со инјекционен метод (примерок б од Табелата 4.20), чувани 1 месец на 4 °C и 25 °C	86
Слика 4.16.	Дијаграм на контурните линии за влијанието на количеството на кетоконазолот, холестеролот и фосфолипидот врз ефикасноста на инкапсулирање на липозомите добиени со инјекционен метод	88
Слика 4.17.	Дијаграм на контурните линии за влијанието на количеството на кетоконазолот, холестеролот и фосфолипидот врз ζ -потенцијалот (А) и електричната спроводливост (Б) на липозомите добиени со инјекционен метод	91
Слика 4.18.	Микроскопски изглед на липозомите на кетоконазолот добиени со инјекционен метод (а–ж согласно примероците од Табелата 4.21 и 4.22), x 40	92

ИНДЕКС НА ТАБЕЛИ

Табела 4.1.	Линеарност на кетоконазолот во метанол со УВ-спектрофотометриски метод	59
Табела 4.2.	Параметри на регресионата анализа и валидизација за УВ-спектрофотометриски метод	60
Табела 4.3.	Резултати за прецизност со УВ-спектрофотометриски метод	60
Табела 4.4.	Аналитички приноси на кетоконазолот во комерцијални фармацевтски производи утврдени со УВ-спектрофотометриски метод	62
Табела 4.5.	Аналитички приноси на кетоконазолот во комерцијални фармацевтски производи утврдени со УВ-спектрофотометрискиот метод по методот на стандардна адиција	62
Табела 4.6.	Резултати од робустност за УВ-спектрофотометриски метод	63
Табела 4.7.	Линеарност на <i>HPLC</i> методот	65
Табела 4.8.	Параметри на регресионата анализа и валидизација за <i>HPLC</i> методот	65
Табела 4.9.	Резултати од прецизност со <i>HPLC</i> методот (296 nm)	66
Табела 4.10.	Аналитички приноси со примена на <i>HPLC</i> метод	67
Табела 4.11.	Резултати од аналитичките приноси на кетоконазолот во комерцијални фармацевтски производи со <i>RP-HPLC</i> методот на 296 nm	68
Табела 4.12.	Резултати од робустност за <i>HPLC</i> метод	68
Табела 4.13.	Линеарност на УВ-спектрофотометриски метод на 296 nm	70
Табела 4.14.	Параметри на регресионата анализа и валидизација за УВ-спектрофотометриски метод на 296 nm	71
Табела 4.15.	Прецизност на УВ-спектрофотометриски метод на 296 nm	71
Табела 4.16.	Карактеристики на липозомски формулации на кетоконазол	74
Табела 4.17.	Влијание на бројот на вртежите при центрифугирањето и типот на растителното масло врз ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот во липозомите добиени со тенко-филмен хидратационен метод	76
Табела 4.18.	Влијание на типот на растворувач и хидратационото средство врз ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот во липозомите добиени со тенко-филмен хидратационен метод	77
Табела 4.19.	Влијание на типот на растворувач и хидратационо средство врз ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот во липозомите добиени со ултразвучен метод	81
Табела 4.20.	Влијание на типот на растворувач и хидратационо средство врз ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот во липозомите добиени со инјекционен метод	84
Табела 4.21.	Влијание на количеството на кетоконазол, холестерол и фосфолипид врз ефикасноста на инкапсулирање во липозомите добиени со инјекционен метод	87
Табела 4.22.	Влијание на количеството на кетоконазол, холестерол и фосфолипид врз ζ -потенцијалот и електричната спроводливост во липозомите добиени со инјекционен метод	89

1. ВОВЕД И ЦЕЛИ

Ефективната терапевтска активност се постигнува со пренесување на лекот со определена брзина до целната клетка (Crommelin & Zuidam, 2007). Лековите кои се користат во третманот против некои заболувања како што се ракот и габичните инфекции најчесто се токсични. Нивната токсичност може да се намали со помош на намалениот пренос на лекот до здравите клетки. Тоа се постигнува со користење модални биомембрани како што се липозомите (Dua *et al.*, 2012; Aparajita & Ravikumar, 2014).

Како активна супстанца во лековите, кетоконазолот има голем спектар на дејствувањето и се користи против голем број кожни заболувања, најчесто предизвикани од габични и бактериски инфекции (Staub *et al.*, 2005; Faergemann *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2011). Кетоконазолот најчесто се користи во третманот против *Candida species* (Patel & Patel, 2010; Agrawal & Murti, 2011), *androgenic alopecia* (Perez, 2004), *Cryptococcus neoformans* (Vojič *et al.*, 2005; Falahati *et al.*, 2006), *histoplasmosis*, *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea manuum* и *tinea pedis* (Gupta *et al.*, 2003), *onychomycosis* (Kiran *et al.*, 2010) и *seborrheic dermatitis* (Sanfilippo & English, 2006; Sheer & Chauhan, 2011). Поради антибактериското својство, кетоконазолот често се применува и во заболувања предизвикани од бактерии. Липофилниот карактер на кетоконазолот доведува до негово акумулирање во липидниот дел од клетките (Mhaske & Sahasrabudhe, 2011).

Основните формулации во кои кетоконазолот се сретнува комерцијално се: таблети, крем и шампони. Во достапните фармацевтски производи, кетоконазолот се сретнува во слободна форма, односно како активна супстанца која со формулациите може да се примени во определена терапија (Perez, 2004). Лекувањето со кетоконазол најчесто е со нанесување на лекот на кожата или со орално внесување (Wang & Tang, 2008).

Механизмот на дејството на кетоконазолот е првенствено фунгистатично, со оневозможување на габичниот цитохром P450 ензим ланостерол 14- α -деметилаза, ензим кој го конвертира ланостеролот во ергостерол, потребен за синтеза на габичната клеточна мембрана (Lionakis *et al.*, 2008). Промената на количеството на ергостерол доведува до промена на структурата и функцијата на габичната клетка, се зголемува пропустливоста на клетката и доаѓа до нејзино умирање (Munguia & Daniel, 2008).

Користењето на кетоконазолот е ограничено поради несаканите ефекти на лекот како што се: иритација на кожата, спречување на синтезата на хормоните на пример тестостеронот, непријатност во гастроинтестиналниот тракт, хепатотоксичност и нефротоксичност, како и можност да настане интерференција со истовремено примање на други лекови (Finkelstein *et al.*, 2010; Mhaske & Sahasrabudhe, 2011).

Со цел да се оптимизира преносот на лекот до целните клетки, се доведува до потребата за развој на новите формулации на лекот. Намалувањето на несаканите ефекти на лекот и неговото контролирано и насочено дејствување до целните клетки при локалниот третман доведува и до зголемување на терапевтскиот индекс (Patel *et al.*, 2009). Се наметува потребата за развој на новите формулации со цел да се добие оптималност на самиот лек со намалување на несаканиот ефект како и намалување на можностите за деградација на кетоконазолот (Mhaske & Sahasrabudhe, 2011). Воведувањето на липозомските формулации со инкапсулирањето на лекот овозможува контрола на ослободувањето на кетоконазол, како и намалување на нетолерантноста на антимикотикот во организмот (Aparajita & Ravikumar, 2014). Липозомите овозможуваат инкапсулираниот кетоконазол не само да остане во својата активна состојба подолго време, туку и оневозможување на лекот да дојде до здравите клетки (Patel *et al.*, 2009).

Повеќе методи се опишани за подготовка на липозомите вклучувајќи тенко-филмен хидратационен метод, микроемулзија, метод на истиснувањето низ дизна под притисок, екструзија, примена на ултразвук, реверзно-фазно испарување, етер-инјекционен и етанол-инјекционен метод при што се добиваат липозоми кои се разликуваат по бројот и големината на ламелите (Patel *et al.*, 2009; Sahasrabuddhe *et al.*, 2012).

Подготовката на липозомите на кетоконазолот или со тенко-филмен хидратационен (Patel *et al.*, 2009) или со модифициран етер-инјекционен метод (Sahasrabuddhe *et al.*, 2012) се воведени со цел да се намали токсичноста на имидазолниот антимикотик и истовремено да се зголеми стабилноста на комерцијално достапните фармацевтски форми. Во литературата, во подготовката на кетоконазол мутиламеларните везикули се користени лецитин фосфолипид од зрната на сојата (Sahasrabuddhe *et al.*, 2012) и дихлорометан или хлороформ како растворувачи (Patel *et al.*, 2009).

Цели на докторската дисертација. Целта на оваа докторска дисертација е подготовка на липозомските формулации на кетоконазолот користејќи лецитин (жолчка од јајце). Со воведувањето на растителните масла се очекува да се добијат побезбедни везикули. Растителните масла нема да бидат само извор на фосфолипиди, туку ќе се користат и како растворувачи на кетоконазолот.

Основните цели на истражувањето на оваа докторска дисертација е да се разработи метод за определување на кетоконазолот во определени фармацевтски примероци како што се шампони, креми и таблети како и можноста да се проследи развојот на нови формулации на кетоконазолот во липозоми. Првенствено, истражувањата се насочени кон развој на новите формулации на кетоконазолот како што се липозомските формулации. Оценувањето на липозомите ќе се проследи со влијанието на поминатото време на чувањето на липозомските формулации на кетоконазолот и пропустливоста на липозомите. Потребата за разработка на методот за определување на кетоконазолот во фармацевтски производи, како и утврдување на изборот на најсоодветен метод за подготвување на липозоми и развојот на нови формулации на кетоконазолот се дел од целите на оваа докторска дисертација.

Поаѓајќи од поставените цели, предвидените истражувања се насочени кон:

- Развивање и оптимизирање на аналитички методи како што се: УВ–спектрофотометрија (*Ultraviolet, UV*) и високоефикасна течната хроматографија (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) за квантитативно определување на кетоконазолот во достапни фармацевтски производи.

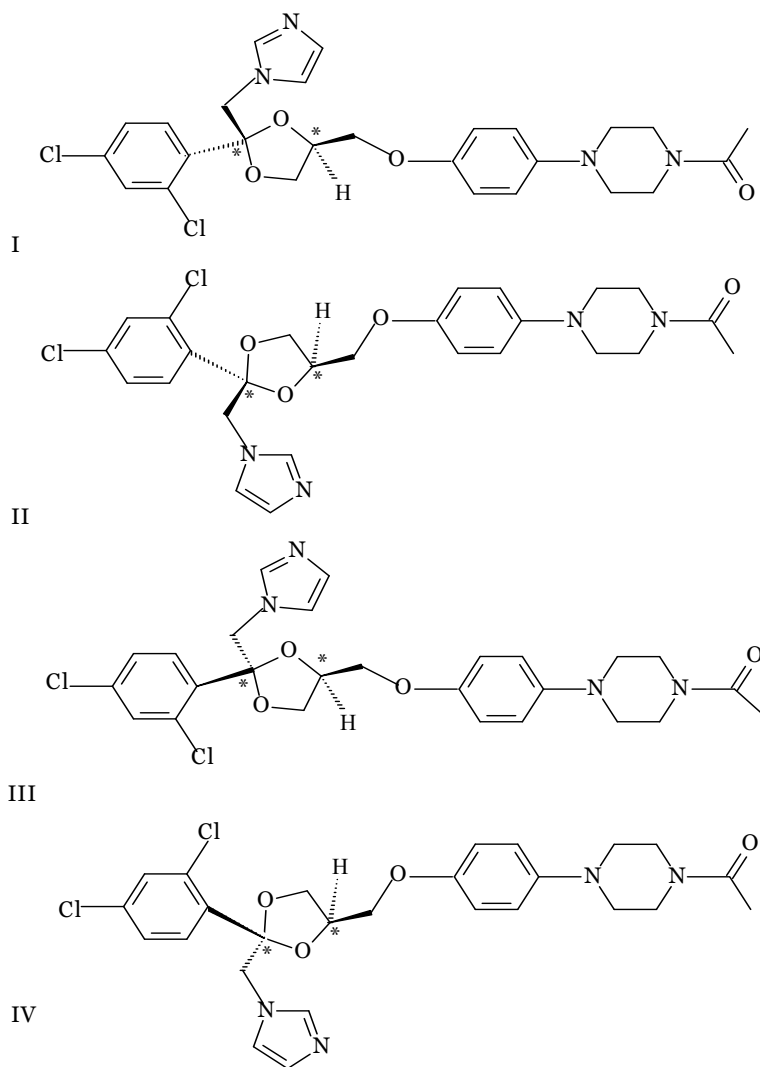
- Во методите за подготовка на липозомите ќе се применат методите: филм-хидратационен метод, метод со инјектирање на растворувачот и ултразвучен метод. Методот на инјектирање со растворувач диетил етер ќе се модифицира поради нерастворливоста на кетоконазолот во диетил етер со растворувач метанол во подготовката на основната липозомска формулација на кетоконазолот, односно во подготовката на останатите формулации ќе биде користено растително масло.

- Следење на параметрите на липозомските формулации како што се оптичките карактеристики и ζ -потенцијалот и на факторите кои влијаат на стабилноста на липозомите како што е промената на температурата. Стабилноста ќе се проследи на различни температури, 4 °C и 25 °C.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ПРЕГЛЕД

2.1. КЕТОКОНАЗОЛ

Кетоконазолот (1-ацетил-4-[4-[[2-(2,4-дихлорофенил)-2-(1*H*-имидазол-1-ил-метил)-1,3-диоксолан-4-ил]метокси]фенил]пиперазин) е имидазолен хирален дериват кој постои во четири стереоизомерни конфигурации како резултат на двата хирални центри во својата структура, претставени на сликата 2.1. (Novotná *et al.*, 2014).



Слика 2.1. Стереоизомери на кетоконазолот

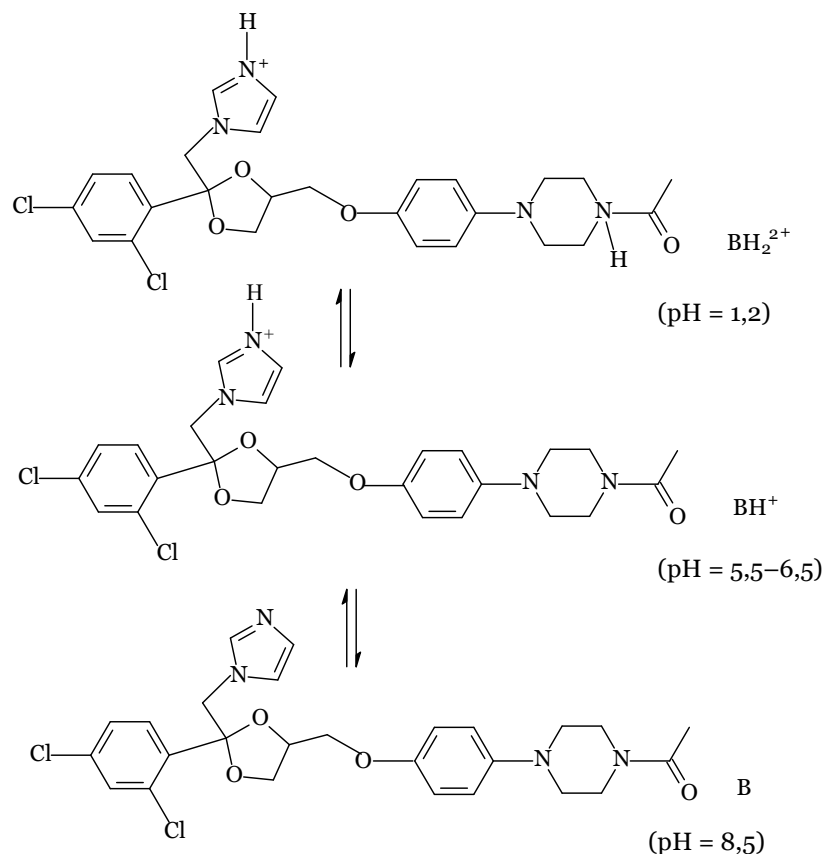
Кетоконазолот, ($C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$, со моларна маса $531,431 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) комерцијално се сретнува во *cis* енантиомерни форми како бела супстанца без мирис (Vojić *et al.*, 2005). Поради липофилен карактер, кетоконазолот се акумулира во липидниот дел од ткивата. Се однесува како слаба база со pK_a вредности 6,51 и 2,94 и не се раствора во

вода и диетил етер, додека во силни бази и киселини, метанол, етанол, дихлорометан, трихлорометан и диметил сулфоксид, кетоконазолот се раствора (Chander Shekar *et al.*, 2010). Под дејство на киселини, бази, топлотни и фотохемиски услови, оксидација и хидролиза, кетоконазолот се разградува на ацетамид и имидазол (Skiba *et al.*, 2000; Morsy *et al.*, 2009; Mhaske & Sahasrabudhe, 2011).

Групата на азолни соединенија кои најмногу се користат во дерматологијата ја сочинуваат имидазоли и триазоли. Во имидазолните соединенија се вклучени кетоконазолот, миконазолот, еконазолот и клотримазолот, додека флуконазолот, вориконазолот и изоконазолот се триазолни соединенија (Ford, 2004; Patel *et al.*, 2011). Во фармацевтската индустрија, кетоконазолот се сретнува во облик на рацемска смеса (50:50) на двата енантиомери во *cis* конфигурација, (2*R*,4*S*)-(+)-кетоконазол и (2*S*,4*R*)-(-)-кетоконазол (Castro-Puyana *et al.*, 2006; Hamdy & Brocks, 2008; Novotná *et al.*, 2014), претставени како структури I и II, соодветно на сликата 2.1.

Смесата рацемат на енантиомерни форми во *cis* конфигурацијата на кетоконазолот покажува дека има поголем потенцијал во терапевтското дејствување за разлика од *trans* формите кои форми се диастереоизомери и не се содржат во самиот деклариран лек (Dilmaghanian *et al.*, 2004; Castro-Puyana *et al.*, 2006). Литературните податоци покажуваат дека (2*R*,4*S*)-(+)-кетоконазол пројавува поголем потенцијал од неговиот енантиомер (2*S*,4*R*)-(-)-кетоконазол за определени *in vitro* анализи како што се примена на тестостеронот и метадононот како супстрати (Hamdy & Brocks, 2008).

Кетоконазолот содржи два азотни атоми, едниот на пиперазинскиот прстен, другиот на имидазолниот кои во услови на кисела средина учествуваат во протолитички реакции (Слика 2.2).



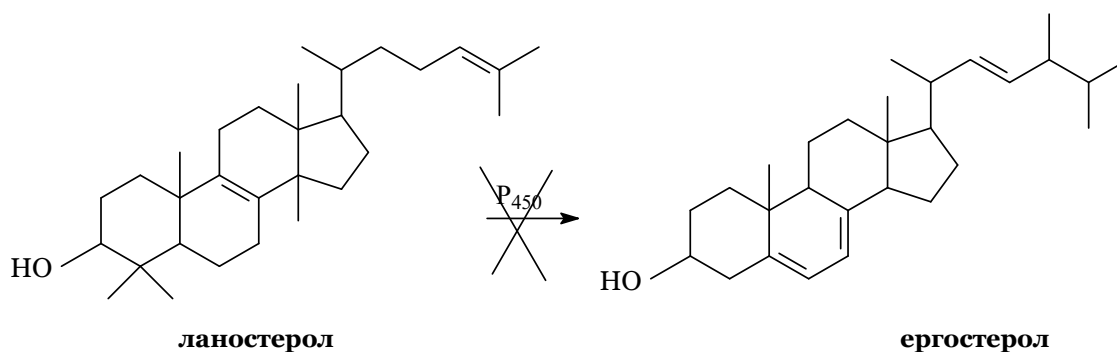
Слика 2.2. Шематски приказ на формите на кетоконазолот

Имидазолниот азотен атом има поголем афинитет кон протонот земајќи ги како основа вредностите за логаритамска константа на киселинската дисоцијација, pK_a на референтите соединенија анилин ($pK_a = 4,6$) и имидазол ($pK_a = 6,9$). Согласно претставеното на сликата 2.2. При рН вредност 5,5–6,5 доминираат BH^+ и B формата на кетоконазолот, во базна средина ($pH = 8,5$) присутна е B формата, додека во кисела средина ($pH = 1,2$) во заситен раствор на кетоконазолот присутна е BH_2^{2+} формата (Vojič *et al.*, 2005).

Кетоконазолот се среќува во повеќе фармацевтски облици како што се: таблети, шампони, креми, гелови, микроемулзии и лосиони. Количеството на кетоконазолот во кремите (Munguia & Daniel, 2008; Sarat Chandran *et al.*, 2011) и шампоните (Velikinac *et al.*, 2004) кои се користат против првут е до 2%, додека во таблетите е до 200 mg (Gupta *et al.*, 2003).

Примената на кетоконазолот во дерматологијата како лек против кожните заболувања е согласно промените што ги причинува врз пропустливоста на клеточната мембрана на габите и количеството на ергостеролот (Falahati *et al.*, 2006; Wang & Tang, 2008). Ергостеролот е потребен за синтеза на габичната клеточна мембрана (De Bruijn *et al.*, 2001; Ford, 2004). Оневозможената конверзија на ланостеролот во ергостерол е

со дејството на кетоконазолот врз цитохромот P450 ензим ланостерол 14- α -деметилага на габата кој го конвертира ланостеролот во ергостерол (Слика 2.3). Со зголемувањето на пропустливост на клетката поради промената на количеството на ергостерол, доаѓа до изумирање на клетката како резултат на структурната и функционална промена на габичната клетка. Формираната врска меѓу азотот од азолниот прстен и железото од хемот на габичниот P450, оневозможува сврзување со кислородот. Ваков тип на ензим се сретнува и во организмот на цицачите, но афинитетот на имидазолните деривати е поголем кон ензимот во габите (Falahati *et al.*, 2006). Ефектот на лековите на база на азолните деривати е фунгистатичен, со што се оневозможува понатамошното растење на габите. Во поголеми концентрации и подолго време на земањето на кетоконазолот како лек, ефектот може да биде и фунгициден (Wilson & LeBlanc, 2000).



Слика 2.3. Оневозможена конверзија на ланостеролот во ергостерол во присуство на имидазолниот лек кетоконазол

Поради несаканите ефекти како што се стомачни проблеми, кожна иритација, попречување на синтезата на стероидите како на пример тестостеронот, хепатотоксичност, нефротоксичност и интерференција со другите лекови (Finkelstein *et al.*, 2010), се намалува примената на кетоконазолот во терапијата (Morsy *et al.*, 2009; Yue-Ming *et al.*, 2003; Lionakis *et al.*, 2008; Shaikh *et al.*, 2010).

Имидазолните деривати кои се 1-супституирани најчесто се користат во терапијата против габичните инфекции (Ford, 2004; Patel & Patel, 2010). Поради овие фактори, против габичните инфекции се дава приоритет на други лекови од новата генерација како што се флуконазол, итраконазол, вориконазол и амфотерицин Б (Ford, 2004; Devi & Mahadevan, 2011).

Со цел да се зголеми стабилност на кетоконазолот во својата активна форма и истовремено да се намали неговата токсичност, потребно е воведување и развој на нови формулации на кетоконазолот. Новите формулации на лекот треба да ги надминат сите недостатоци на претходните и да бидат еколошки подобни.

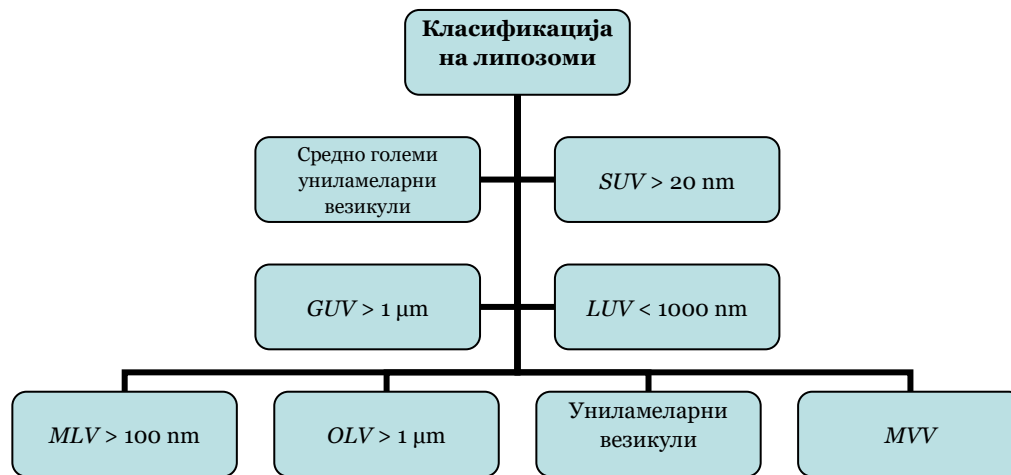
2.2. ЛИПОЗОМИ

Зборот липозом потекнува од грчките зборови „lipos“ означувајќи маст и „soma“ што означува тело. Липозомите се модални фосфолипидни биомембрани кои се составени од еден или повеќе слоеви, опкружени со водно јадро во својата внатрешност (Gómez Henz & Fernández Romero, 2006; Patel & Panda, 2012).

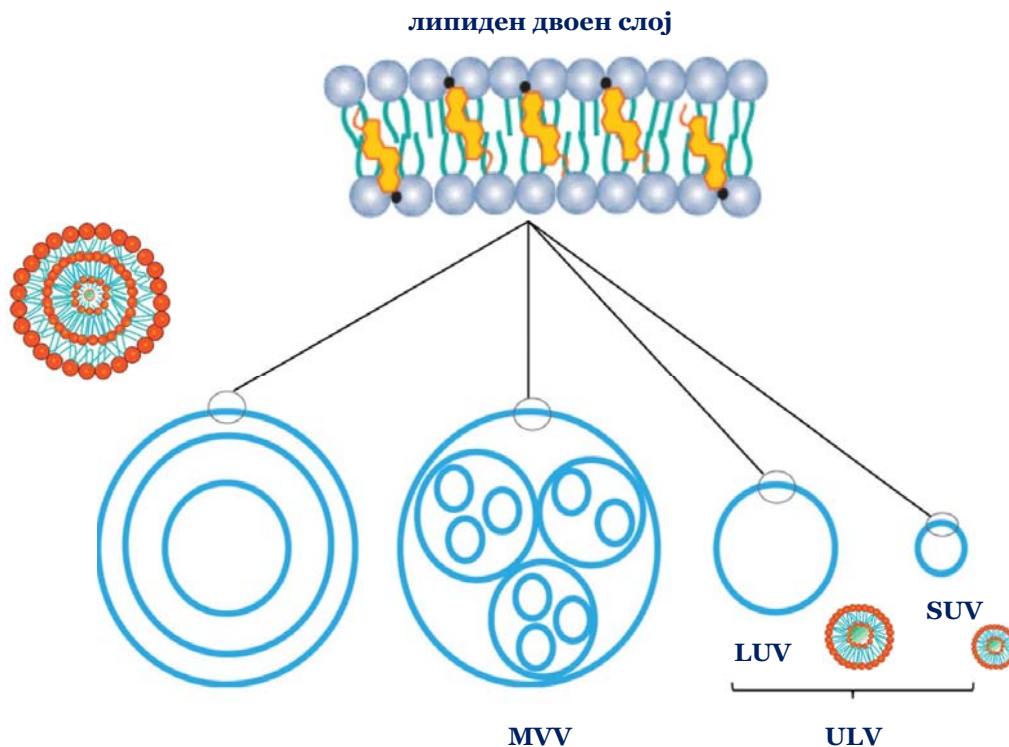
Липозомите се воведени од Bangham и соработниците со цел да се анализираат биолошките мембрани (Kumar *et al.*, 2012; Karn *et al.*, 2013). Тие формулации подоцна стануваат значајни во повеќе научни дисциплини како што се биофизиката, хемијата и во фармацијата за преносување на лековите. Липозомите се наречени „интелигентни“ формулации со специфична и точно определена цел и дејство, со што се постигнува селективно делување и контролирано ослободување на супстанците во клетките (Pandey, 2012; Shirsand *et al.*, 2012; Sipai *et al.*, 2012). Самите липозоми можат да се користат како во лекувањето на иритацијата на кожата, така и во козметичките производи (Betz *et al.*, 2005). Поради тоа што липозомите имаат специфични физичко-хемиски карактеристики, ги заштитуваат супстанците кои лесно се деградираат и ја подобруваат ефикасноста на адитивите во храната (Kheadr *et al.*, 2000; Mozafari *et al.*, 2008). Хемиските и топлотните фактори, како и рН вредноста влијаат врз супстанците кои се инкапсулирани во липозомската формулација (Mozafari *et al.*, 2008). Во својот состав липозомите содржат супстанции кои се од природно потекло, се нетоксични, биодеградабилни и не стапуваат во реакција со имунолошкиот систем (Sipai *et al.*, 2012; Sirisha *et al.*, 2012).

Според ламеларноста и големината, липозомите можат да се класифицираат како униламеларни везикули (*Unilamellar vesicles, ULV*) со големина од 20 до 1000 nm и мултиламеларни везикули (*Multilamellar vesicles, MLV*) од 100 nm до неколку микрометри (Gomez Henz and Fernandez Romero, 2006; Patel & Panda, 2012). Малите униламеларни везикули (*Small unillamellar vesicles, SUV*) се со големина од 20 до 40 nm, средните униламеларни везикули од 40 до 80 nm, и големите униламеларни везикули (*Large unilamellar vesicles, LUV*) од 100 до 1000 nm. Класификацијата на липозомите според големината е претставена на сликата 2.4а. Мултиламеларните везикули се составени од повеќе двојни слоеви, со што се разликуваат олиголамеларни везикули (2–10 двојни слоеви) и полимултиламеларни везикули кои се составени од повеќе од 10 двојни слоеви. Големината на олиголамералните везикули се движи од 0,1 до 1 μm , додека се сретнуваат и „гигантски“ везикулни формулации со големина поголема од 1 μm . Според положбата на ламелите, везикулите се поделени на мултиламеларни везикули и мултивезикуларни везикули (*Multivesicular vesicles, MVV*) кои се формирани кога помали везикули се во една поголема везикула. Ламеларноста

и големината на липозомската формулација зависат од методот за нивната подготовка (Gaurav & Tejal, 2011). Мултиламеларните везикули (*MLV*) се везикули кои имаат структура слична на кромидот (Gaurav & Tejal, 2011; Dua *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2014). Карактеристично за *MLV* е тоа што повеќе униламеларни везикули се формираат едни во други со намалување на нивната големина и крајно ја имаат структурата на мултиламеларните везикули, концентрични кругови одделени од водата (Слика 2.5).

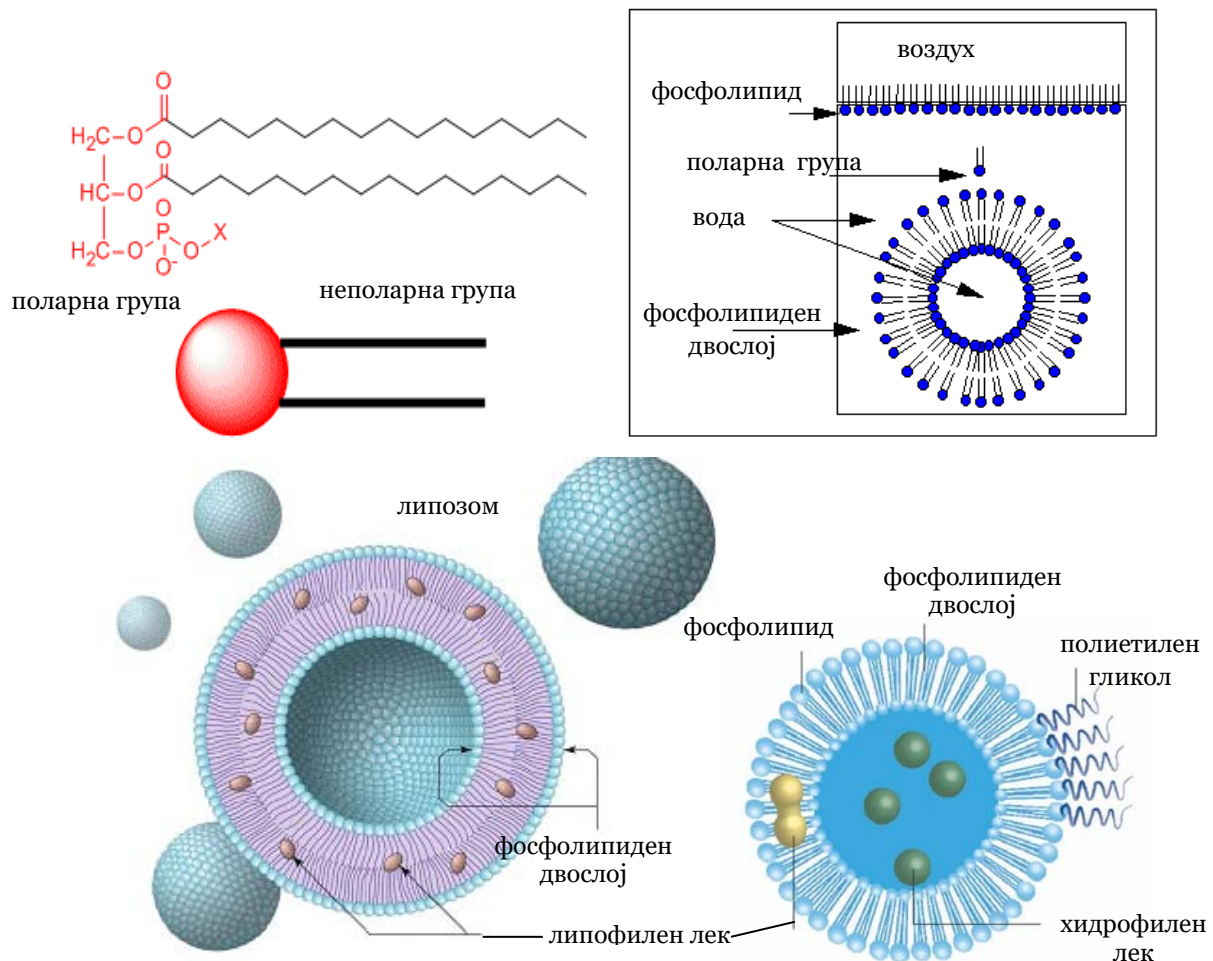


Слика 2.4. Класификација на липозомите според големината (Monteiro *et al.*, 2014)



Слика 2.5. Класификација на липозомите според структурата (Monteiro *et al.*, 2014)

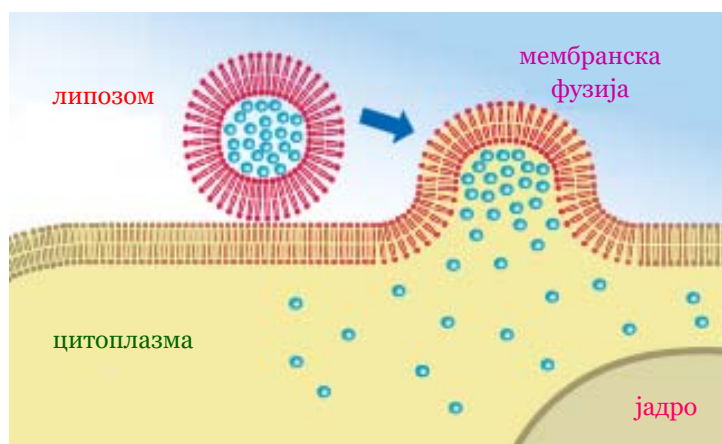
Основните супстанции на липозомите се фосфолипидот и холестеролот, но липозомската формулација може да содржи површински активни супстанции и протеини (Gómez Henz & Fernández Romero, 2006; Anwekar *et al.*, 2011; Patel & Panda, 2012). Липидната компонента од клеточната мембрана во најголем дел е изградена од фосфолипиди кои како со својата структура, така и со физичките и хемиските карактеристики ги определуваат биолошките мембрани со сите нивни карактеристики (Sharma *et al.*, 2010; Sipai *et al.*, 2012; Sirisha *et al.*, 2012). Ковалентната врска меѓу хидрофилната „глава“ со една или две хидрофобни „опашки“ е основната карактеристика во формирањето на липозомите. Присуството на поларен (хидрофилен) и неполарен (липофилен) дел од молекулата на фосфолипидот овозможува во присуство на водата над температурата на транзиција да дојде до формирање на фосфолипиден двослој кој формира сферична везикула (Слика 2.6).



Слика 2.6. Шематски приказ на неполарната и поларната група во липозомите (Web 1, Web 2)

Поларниот дел е составен од функционални групи како што се: карбоксилната, хидроксилната, amino и тиолната група (Agrawal & Murti, 2011). Неполарниот дел го сочинуваат јаглеродородни низи од остатоците на вишите масни киселини. Во присуство на вода, фосфолипидите се групираат така што хидрофилните делови се ориентираат кон водата, а хидрофобните региони спротивно од водата (Kumar *et al.*, 2012). Како резултат на интеракциите и силите на одбивање меѓу фосфолипидите и водата, фосфолипидите се организираат како двојни слоеви (Sharma *et al.*, 2010; Dua *et al.*, 2012). Овие двојни слоеви играат важна улога во процесот на поминувањето на различни молекули низ мембраната. Јоните и многу поларните молекули потешко ќе бидат пропуштени од липидните двојни слоеви (Sharma *et al.*, 2010). Откако еднаш ќе се формираат липозомите меѓу воден и липиден дел, тие имаат можност да инкапсулираат во нив лекови во водниот или во липидниот дел во зависност од липофилноста на самиот лек (Dua *et al.*, 2012). Инкапсулирањето на лековите се одвива така што хидрофилните лекови се инкапсулираат во водното јадро, додека липофилните лекови се инкапсулираат во двојниот слој на липозомот, во липофилниот дел (Alvarez & Rodríguez, 2000; Shivanand *et al.*, 2009; Aparajita & Ravikumar, 2014).

Липозомите имаат способност да „носат“ лекови кои можат да бидат хидрофилни, липофилни и амфипатични, а кои истовремено ги штитат од надворешните штетни влијанија (Gómez Henz & Fernández Romero, 2006; Sharma *et al.*, 2010). При тоа може да се контролира ослободувањето на лекот кој веќе бил внесен во липозомот со промената на температурата, рН или со процесот на фузијата може да дојде до ослободување на лекот до целната клетка (Слика 2.7).



Слика 2.7. Шематски приказ на ослободување на лекот со фузија (Web 3)

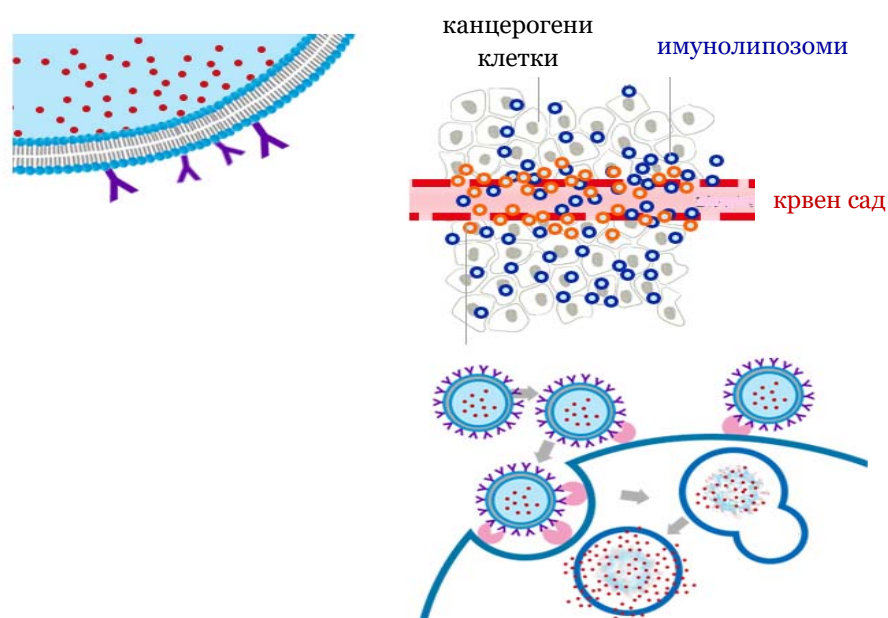
Поради тоа што липозомите се составени од липиди, се слични со биолошките мембрани, не се токсични, се флексибилни со соодветна големина и се

биодеградибилни во организмот (Prazanth *et al.*, 2012). Тие ја менуваат биодистрибуцијата на лекот и го контролираат неговото ослободување (Dua *et al.*, 2012; Manosroi *et al.*, 2012). Липозомите ја даваат единственоста како пренесувачи на вакцини, ензими, хранливи материи и лекови (Gómez Henz & Fernández Romero, 2006). Интеракцијата на липозомите со кожата се овозможува со фузија на липозомите на површината на кожата или со интеракција на липозомите со подлабоките слоеви на кожата (Dua *et al.*, 2012). Со фузијата се овозможува дејствување на активната супстанца во површинските слоеви на кожата додека зголемената пропустливост на активната супстанца во подлабоките слоеви се овозможува со интеракцијата на липозомите со слоевите од кожата (Sarat Chandran *et al.*, 2011; Rasheed *et al.*, 2012; Modi *et al.*, 2013). Во зависност од составот и механизмот на преносот, липозомите се делат на конвенционални липозоми, полиморфни липозоми и липозоми со долго циркулирање (Torchilin *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2010; Sipai *et al.*, 2012).

Групата на полиморфните липозоми ја сочинуваат липозомите осетливи на промена на рН и на температурата, катјонските липозоми, додека постојат и „алтернативни“ липозоми во која група припаѓаат имунолипозомите и липозомите со површинска модификација (Sharma *et al.*, 2010; Dua *et al.*, 2012; Prazanth *et al.*, 2012). Најголем недостаток во користењето на конвенционалните липозоми е брзото отстранување од организмот со мононуклеарниот фагоцитозен систем (Torchilin *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2012). Во литературата се сретнуваат липозоми кои се стабилни на физиолошка вредност на рН, но можат лесно да се дестабилизираат во кисела средина (Lopes *et al.*, 2006; Chandran *et al.*, 2011; Prazanth *et al.*, 2012). Овие липозоми го содржат фосфатидилетаноламинот или негови деривати кои содржат амфипатични соединенија со кисела група како што е карбоксилната група (Crommelin & Zudam, 2007; Chang & Ding *et al.*, 2009; Yeh, 2012). Катјонските липозоми се со позитивен полнеж како резултат на тоа што во својот состав содржат катјонски липиди кои најчесто се користат за пренос на макромолекулите како што се деоксирибонуклеинската киселина (*Deoxyribonucleic acid, DNA*), рибонуклеинската киселина (*Ribonucleic acid, RNA*) и олигонуклеотидите кои имаат негативен полнеж (Reed, 2010; Channarong *et al.*, 2011). Се сретнуваат и липозоми кои се карактеризираат со тоа што е забележана температурата на транзиција околу 37 °C (Achim *et al.*, 2009; Kaur & Kakkar, 2010; Anwekar *et al.*, 2011). Со цел да се надмине проблемот на пократка циркулација на липозомите во организмот, се внесува полиетилен гликол со што се зголемува времето на задржување на липозомите (Gómez Henz & Fernández Romero, 2006; Sipai *et al.*, 2012). Липозомски формулации кои се подготвени на таков начин се од посебна важност при користењето на антиканцерогени лекови (Hwang *et al.*, 2007). Утврдено е дека липозомските формулации кои во својот состав го содржат полиетилен

гликолот не се целосно биодеградабилни (Riché *et al.*, 2004). Развиени се повеќе различни стабилни формулации на аминокиселините: глицин, β -аланин и γ -аминобутанска киселина кои истовремено се стабилни и биодеградабилни (Riché *et al.*, 2004).

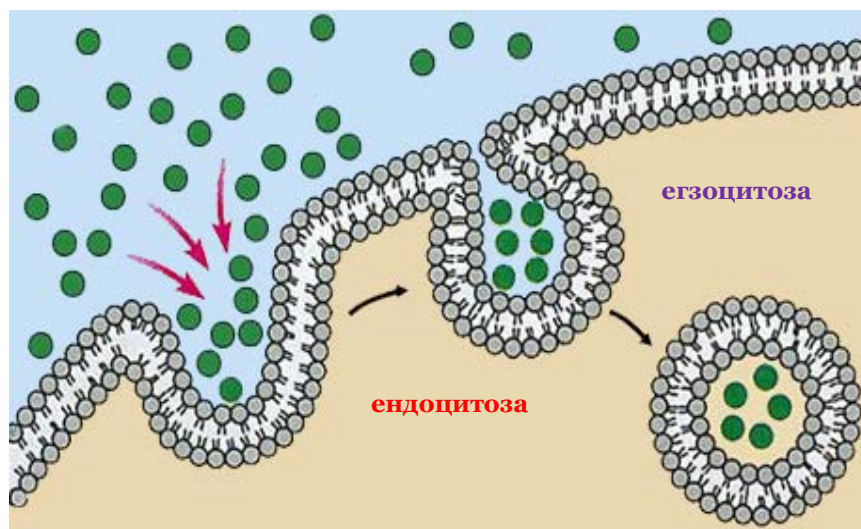
Транспортот на липозомите до самата клетка може да биде со два типа на механизми: активно и пасивно (Gómez Henz & Fernández Romero, 2006; Moghimipour & Handali, 2013), додека самиот транспорт може да се одвива со четири начини (Gaugav & Tejal, 2011). Пасивниот механизам се одвива со определени клетки во имунолошкиот систем и купферовите во црниот дроб што имаат природно својство да ги отстрануваат туѓите тела, меѓу кои и липозомите (Reed, 2010; Prasanth *et al.*, 2012). За разлика од пасивниот механизам, кај активниот механизам се овозможува директно формирање на специфичната интеракција меѓу липозомите и целната клетка (Gómez Henz & Fernández Romero, 2006). Ефикасноста на активниот механизам не се постигнува само со количеството на лекот кој се наоѓа непосредно до клетката, туку количеството на лекот кое како цел ја има определената структурна компонента во клетката (Sipai *et al.*, 2012). Типичен пример за активен механизам се имунолипозомите кои како „носачи“ на лековите доколку се во доволно количество селективно реагираат со клетката (Слика 2.8).



Слика 2.8. Шематски приказ на механизмот на имунолипозомите (Web 4)

Според Gaugav & Tejal (2011) начините на интеракција меѓу липозомот и клетката може да се оствари со ендоцитоза, атсорпција на површината на клетката, фузија со плазмата и со пренос на липидите од липозомската формулација до

клеточната мембрана. Ендоцитозата се постигнува со фагоцитни клетки како што се макрофагите, а сорпцијата со специфични интеракции меѓу липозомот и површинските супстанции на клетката и со електростатка сила (Слика 2.9).



Слика 2.9. Шематски приказ на ендоцитозата (Web 5)

Процесот на фузијата е определен со истовремено ослободување на содржината од липозомската формулација претходено со внесување на липидот во мембранта. Четвртиот начин на интеракцијата на липозомот и клетката е со преминот на липозомската формулација до клеточните мембрани кое е условено со промена на температурата и рН вредноста (Gómez Henz & Fernández Romero, 2006).

Негативните страни во користењето на липозомите се поврзани со нивната нестабилност на подолго време на собна температура, оксидација и хидролиза на фосфолипидот кој е составен дел на липозомите. Од друга страна, стерилноста и краткиот полуживот во циркулаторниот систем, создаваат тешкотии во користењето на липозомите (Gómez Henz & Fernández Romero, 2006). Останатите негативности што ги поседуваат липозомите се поврзани со нивната стабилност, слабата растворливост, појавите на агрегација и фузија и проблеми со нивната несоодветна големина за некои ткива при нивното користење (Moghimiour & Handali, 2013). Изборот на соодветен липозом ќе зависи од физичките и хемиските својства на супстанцата која треба да биде инкапсулирана во формулацијата, количеството на активната супстанца кое ќе биде инкапсулирано, како и внатрешниот волумен на везикулата.

2.2.1. ФИЗИЧКИ КАРАКТЕРИСТИКИ НА ЛИПОЗОМИТЕ

Физичките карактеристики на липозомските формулации се поврзани со изгледот и со стабилноста на липозомите (Sabín *et al.*, 2006; Makhmalzadeh *et al.*, 2011; Sipai *et al.*, 2012). Најчесто контролирани физички карактеристики на липозомските формулации се: големината, дистрибуцијата според големината, морфологијата на честичките, површинскиот потенцијал и рН вредноста, пропустливоста на подготвената формулација следена со текот на времето на различни температури, ламеларноста и бројот и положбата на ламелите како и инкапсулираноста на лекот во формулацијата (El-Nesr *et al.*, 2010; Anwekar *et al.*, 2011; Prazanth *et al.*, 2012). Изгледот на липозомските формулации зависи од големината на честичките и од составот во самата формулација (Prazanth *et al.*, 2012; Ramasamy *et al.*, 2012). Според тоа липозомот може да биде од транспарентен до млечно бел. При утврдување на турбидноста на липозомските формулации доколку се појави синкаста боја, се потврдува дека честичките во примерокот се хомогени (Bhatia *et al.*, 2004; Nidhal & Athmar, 2012; Sirisha *et al.*, 2012).

Големината и дистрибуцијата на честичките се контролира со микроскопски методи базирани на ласерско расејување на светлината, како и со гел пермеабилна хроматографија (Mishra *et al.*, 2007; Sirisha *et al.*, 2012). Исто така се користи методот на фотон корелациона спектроскопија (Gómez Henz & Fernández Romero, 2006; Sirisha *et al.*, 2012). Со користењето на електронскиот микроскоп се овозможува подлабинско оценување на формираната липозомска формулација (Dua *et al.*, 2012). Најчесто за да може да се утврди големината на дистрибуција честичките се користи електронски микроскоп (Hwang *et al.*, 2007; Mirzaee *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2012).

Утврдувањето на ламеларноста на формираните везикули се утврдува спектроскопски, со примена на нуклеарната магнетна резонанца (*Nuclear magnetic resonance*, $^{31}\text{P-NMR}$) или со електронски микроскоп (Yamauchi *et al.*, 2007; Sirisha *et al.*, 2012). Контролирањето на ослободување на лекот од липозомската формулација се утврдува со *in vitro* метод на дифузија на лекот со мембрана (Boltič *et al.*, 2003; Shahi *et al.*, 2013; Shazly, 2013).

Електрофорезата се применува при утврдување на карактеристиките на липозомските формулации: густината и површинскиот полнеж, ригидноста и флуидноста како и дистрибуцијата на фосфолипидите во мембраната (Phayge *et al.*, 2002; Dua *et al.*, 2012). Во самиот процес на оценување на везикулите повеќе својства на липозомските формулации се значајни како што се радиусот на везикулата и дебелината на двојниот електричен слој (Nguyen *et al.*, 2012; Sipai *et al.*, 2012). Површинскиот полнеж на везикулите има влијание на нивната физичка стабилност.

Појавите како што се агрегацијата и фузијата се присутни при нарушување на физичката стабилност, со што супстанцата преминува во слободна форма, намалувајќи го позитивното влијание на липозомите (Pysher & Hayes, 2004). Карактеризацијата на површината на везикулите се утврдува со вредноста на ζ -потенцијалот (Kumar *et al.*, 2010). Утврдено е дека вредноста треба да биде ± 30 mV, а доколку вредноста е помала тогаш има поголема веројатност за појава на агрегација и фузија (Al-Shdefat *et al.*, 2012). Еден од најважните параметри на липозомите е инкапсулираност на супстанцата во формулациите (Reddy & Reddy, 2012). Со инкапсулирањето на лекот во формулациите може да се утврди последователно неговата стабилност, можноста за пропуштање на лекот од формулацијата и да се извршат различни испитувања *in vitro* и *in vivo* (Reddy & Reddy, 2012). Определувањето на инкапсулираноста на супстанцата во липозомите овозможува следење на биолошките и физичките карактеристики на формулацијата во подолг временски период, најчесто два до три месеци на различна температура (Gómez-Hens & Fernández Romero, 2006). За утврдување на ефикасноста на инкапсулирање на супстанцата во добиената формулација се применуваат спектрофотометриски или хроматографски аналитички методи. Високоефикасна течна хроматографија се користи за утврдувањето на инкапсулираноста на лекот во липозомските формулации (Wei *et al.*, 2010; Simonzadeh, 2009). Детекторите кои се користат за хроматографските методи се UV детектори, флуориметриски, тандем метод со масената спектрометрија (Achim *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2010; Malaekheh-Nikouei *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012). Цврсто-фазната екстракција овозможува одделување на липозомските од нелипозомските формулации (Wei *et al.*, 2010). Разделувањето е можно на неполярна колона со што супстанцата која е во слободна состојба се задржува на колоната, додека липозомската формулација се пропушта без при тоа да биде задржана од колоната (Gómez Hens & Fernández Romero, 2006; Wei *et al.*, 2010). Неутралните липозоми во споредба со липозомите кои имаат полнеж, имаат тенденција да се задржат подолго време во циркулаторниот систем (Torchilin *et al.*, 2001). Стабилноста на липозомите зависи од повеќе фактори меѓу кои се физичките како загревање и замрзнување, хемиските како што се хидролизата и оксидацијата и со фазни претворби во текот на чувањето на липозомската формулација (Sirisha *et al.*, 2012). Стабилноста на липозомите во најголем дел ќе зависи од должината на јаглерод-водород врските во липидната молекула (Sipai *et al.*, 2012; Moghimipour & Handali, 2013). Така на пример, липидната организација во липозомските мембрани има голема улога во физичките својства на мембраната како што се: пермеабилноста и еластичноста на мембраната (Sipai *et al.*, 2012; Sirisha *et al.*, 2012). Со следење на стабилноста на липозомите се овозможува следење на липозомските формулации подолг временски период (најчесто 1 до 3 месеци) од нивната подготовка и утврдување

на оправданоста во користењето во терапијата со инкапсулираното количество на лекот во формулацијата. Лиофилизацијата, позната како „суво“ замрзнување се користи со цел да се овозможи отстранување на водата во замрзнатиот примерок со сублимација и намален притисок (El-Nesr *et al.*, 2010). Процесот најчесто се применува на сув производ кој е термолабилен и би се деградирал доколку се примени сушење со метод на загревање (Chang & Yeh, 2012; Sipai *et al.*, 2012). За таа цел се користат криопротектанти, како што се сахарозата, трехалозата и хидроксипропил- β -циклодестринот (Jalali & Afshoon, 2008).

2.2.2. ХЕМИСКИ КАРАКТЕРИСТИКИ НА ЛИПОЗОМИТЕ

Хемиските карактеристики на липозомските формулации се поврзани со утврдување на нивниот состав во однос на количеството на фосфолипид, холестерол и активна супстанца (Simonzadeh, 2009; Mitu *et al.*, 2011; Dayyih *et al.*, 2012). Оксидацијата најчесто се одвива со механизам со радикали кога во составот на липозомите се присутни незаситени групи кои потекнуваат од низите на масните киселини од фосфолипидот (Achim *et al.*, 2009; Dua *et al.*, 2012; Sipai *et al.*, 2012). Методите кои се користат за определување на оксидацијата на липозомите се темелат на спектроскопски и хроматографски методи (Simonzadeh, 2009). Со цел да се спречат реакциите на пероксидација, неопходно е да се направи соодветен избор на фосфолипидите во кој состав се заситени алкил групи и со внесувањето на антиоксиданси: α -токоферолот, коензимот Q (CoQ) и хелатни агенси (Aukunuru *et al.*, 2009; Shaji & Iyer, 2012).

Количеството на фосфолипидите се утврдува со определување на фосфатот во примерокот. Најзастапени методи се *Bartlett*-овиот и *Stewart*-овиот метод (Aukunuru *et al.*, 2009). Со методот на *Bartlett* се овозможува хидролиза со фосфо-молибденска киселина на фосфорот во примерокот до неорганички фосфат. Со спектрофотометриското определување на формираниот син комплекс и се утврдува количеството на фосфолипидот во составот на липозомот (Gibis *et al.*, 2013). Количеството на фосфолипидите се утврдува и со формирањето на комплексот меѓу фосфолипидите и амониум желез(II) тиоцијанат (Aukunuru *et al.*, 2009).

Холестеролот во липозомите се определува спектрофотометриски на 610 nm и 680 nm. Виолетов комплекс се формира како резултат на реакцијата меѓу холестерол, желез(III) перхлорат, етил ацетат и сулфурна киселина (Aukunuru *et al.*, 2009). Од друга страна, реакцијата меѓу холестеролот и свежо подготвениот раствор на анхидрид на оцетна киселина и сулфурна киселина (20:1 v/v) се одвива со растворање на холестеролот во глацијална оцетна киселина (Mulye *et al.*, 2013). За утврдување на

количеството на холестеролот во липозомите се применува високоефикасна течна хроматографија (Simonzadeh, 2009). Определувањето на холестеролот е утврдено и со *HPLC* метод, со користење на 1-амино-4-нитронафтален како внатрешен стандард (Eldem & Arican-Cellat, 2000).

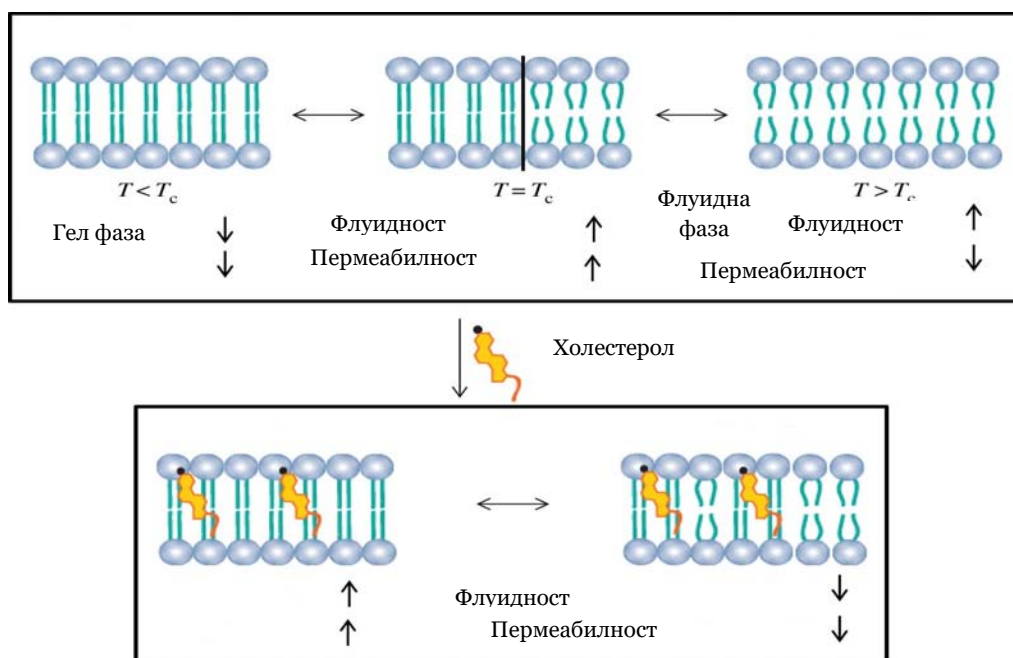
2.2.3. ЛИПИДИТЕ ВО ЛИПОЗОМИТЕ

Изворите на фосфолипидите во липозомите се жолчката од јајцето и зрната од сојата, но и од други растителни масла како што се маслиновото, сончогледовото, ореовото и бадемовото масло (Malisiova *et al.*, 2004; Chunhieng *et al.*, 2008; Nawaz *et al.*, 2013). Составот на маслата зависи од видот на растението, а нивната примена ќе зависи од количествата на масните киселини. Користењето на природните фосфолипиди најчесто се ограничува на фосфатидилглицерол и сфингомилин и на фосфатидилхолинот кој е познат како лецитин, фосфатидилетаноламинот и фосфатидилсеринот. Поради тоа што липидната компонента може да содржи заситени и незаситени алкил групи, се додаваат антиоксиданси и метални хелатори (Chunhieng *et al.*, 2008; Patel & Panda, 2012). Во подготовката на липозомите, се додаваат и супстанции кои го променуваат полнежот на површината и супстанции кои го намалуваат површинскиот напон. Стериламинот се користи како супстанца која има можност да го промени површинскиот полнеж со катјонски полнеж (Aukunuru *et al.*, 2009; Patel & Panda, 2012). Сурфактантите во својот состав содржат хидрофилни и хидрофобни групи и се со амфипатичен карактер (Ramana *et al.*, 2010; Nava *et al.*, 2011). Во подготовката на липозомите се користат различни сурфактанти како што се *Span80*, *Tween80* (Nawaz *et al.*, 2013) и *Triton X-100* (Kumar *et al.*, 2010).

Незаситените масни киселини се повеќе флуидни за разлика од липидите кои содржат заситени масни киселини (Sharma *et al.*, 2010). Така на пример, со користењето на семето од грозјето се подобрува флуидноста поради присуството на незаситените масни киселини (Gibis *et al.*, 2013). Освен од природно потекло, фосфолипидите можат да бидат и лабораториски синтетизирани. Генерално се користат такви фосфолипиди кои можат истовремено да формираат двојни слоеви во водни раствори и се отпорни на промена на рН вредноста во биолошка средина (Alvarez & Rodríguez, 2000; Chang & Yeh, 2012).

Влијанието на температурата игра значајна улога во флуидноста, а со тоа и во пермеабилноста на мембрната во липозомите. Степенот на незаситеност и должината на јаглородната низа ја определуваат температурата на транзиција. При температури над температурата на транзиција, липидите покажуваат поголема флуидност (Monteiro *et al.*, 2014). Влијанието на холестеролот врз пропустливоста и флуидноста е

прикажано на сликата 2.10. При тоа се забележува дека холестеролот ја намалува пермеабилноста во флуидната состојба на двојниот липиден слој.



Слика 2.10. Шематски приказ на ефектот на температурата и холестеролот врз фосфофолипидниот двоен слој (Monteiro *et al.*, 2014)

2.2.3.1. ФОСФОЛИПИД

Според полнежот, фосфолипидите се класифицираат на неутрални, со позитивен и со негативен полнеж (Moghimiour & Handali, 2013). Групата на неутрални фосфолипиди ги опфаќа лецитинот од сојата и од жолчката на јајцето, свингомилинонот, фосфатидилетаноламинот и фосфатидилхолинот. Стериламинот е фосфолипид со позитивен полнеж, додека со негативен полнеж се следните фосфолипиди: дипалмитоил фосфатидилхолин, дистереоил фосфатидил холин, диолеоил фосфатидил холин и диацетил фосфат (Patel & Panda, 2012). Полнежот на липидот кој се користи во подготовка на липозомската формулација го условува површинскиот полнеж на липозомот (Gaugav & Tejal, 2011).

Фосфатидилхолин. Фосфатидилхолинот е најзастапениот фосфолипид кој се користи во подготовката на липозомските формулации. Позитивниот полнеж на фосфатидилхолинот се поништува со негативниот полнеж на фосфатот и се добива неутрален фосфолипид кој има хидрофилна „глава“. Значајноста во намалувањето на фузијата и поголемата стабилност на липозомската формулација се постигнува со

заменување на фосфатидилхолинот со негативно или позитивно наелектризиран фосфолипид (Patel & Panda, 2012; Sipai *et al.*, 2012).

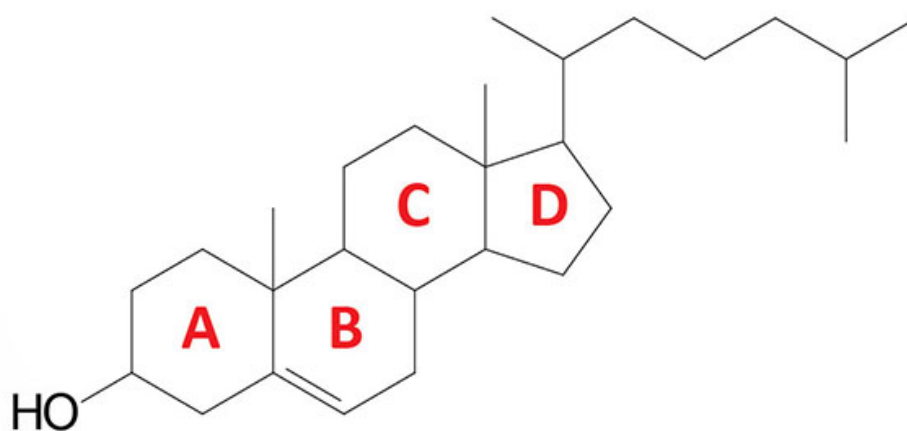
Фосфатидилетаноламин. Амино групата во фосфатидилетаноламинот на ниски вредности на рН се протонира со што се добива неутрална молекула (Sharma *et al.*, 2010; Dua *et al.*, 2012). Присуството на други липиди ја условува стабилноста на липозомите (Sipai *et al.*, 2012).

Фосфатидилсерин. Карбоксилната и аминската група го формираат неутралниот цвистер јон (Sipai *et al.*, 2012). Формулациите кои во својот состав го содржат фосфатидилсеринот, покажуваат поголем афинитет кон калциумот (Patel *et al.*, 2013). Како резултат на тоа фосфатидилсеринот се одделува од останатите липиди од системот (Hautala *et al.*, 2004; Chang & Yeh, 2012).

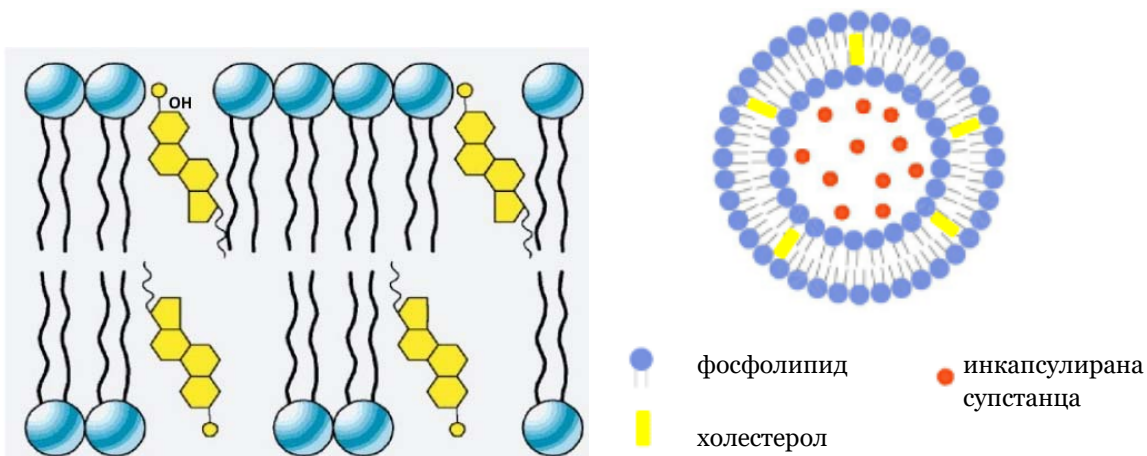
2.2.3.2. ХОЛЕСТЕРОЛ

Холестеролот е стерол кој заедно со останатите липиди како што се фосфолипидите и гликолипидите се сретнува во клеточната мембрана (Moghimiour & Handali, 2013). Во структурата на холестеролот прикажана на сликата 2.11. се застапени групи кои истовремено ја прават супстанцата и хидрофобна и хидрофилна.

Присуството на четирите јаглерод-водородни прстени (А, В, С и D) го зголемува хидрофобниот карактер на супстанцата, додека слабата хидрофилност потекнува од хидроксилната група. Поради својството што самата супстанца како липид не формира двоен слој, потребно е внесување на други фосфолипиди за формирање на липозомските формулации (Hautala *et al.*, 2004).



Слика 2.11. Структурна формула на холестерол (Web 6)



Слика 2.12. Холестерол во липозомите (Monteiro et al., 2014)

Со цел да се оневозможи значителната пропустливост на формираниот липозом, како и зголемување на стабилноста и ригидноста, се внесува количество холестерол при подготовката на липозомската формулација (Bhatia *et al.*, 2004; Chanda *et al.*, 2011; Prazanth *et al.*, 2012; Sipai *et al.*, 2012). При тоа е забележано дека со зголемување на количеството на холестеролот се намалува флуидноста во надворешната сфера (Слика 2.12).

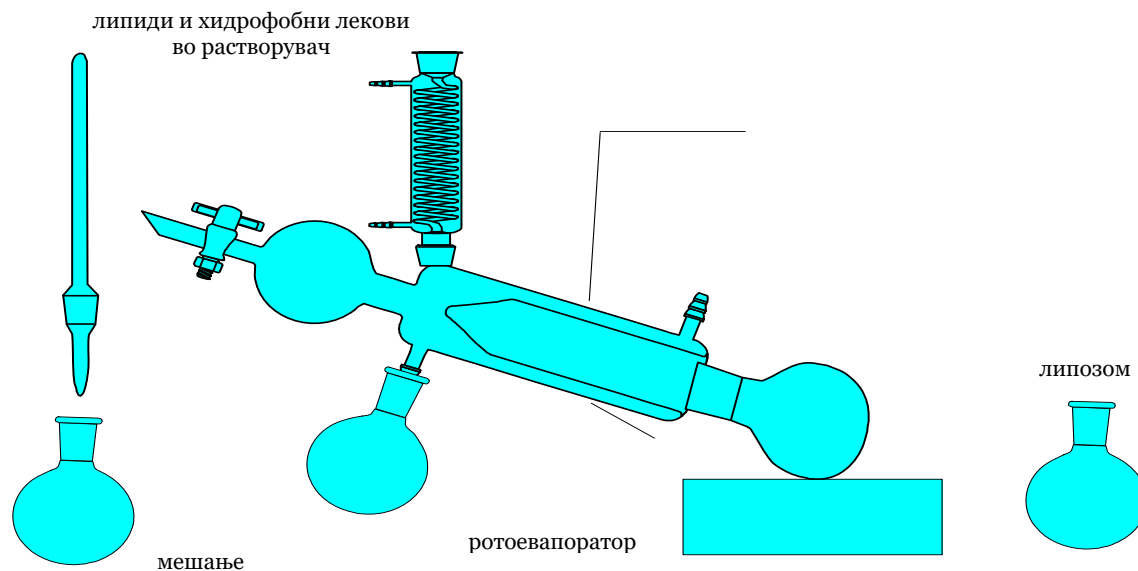
2.3. ТЕХНОЛОГИЈА НА ЛИПОЗОМИТЕ

Технологијата на липозомите вклучува повеќе начини за нивно добивање како што се: тенко-филмен хидратационен, ултразвучен, истиснување низ диза под притисок, етер-инјекционен, етанол-инјекционен, калциум индуциран фузионен, екструзионен, микрофлуидизационен, детергент методи, со замрзнување и загревање, реверзно-фазно испарување, методи со суперкритични флуиди (Boltič *et al.*, 2003; Nathout *et al.*, 2007; Dua *et al.*, 2012). Методи кои се сретнуваат во литературата, а кои се користат во подготовката на липозомските формулации може да се поделат во зависност каков тип везикула се формира при користењето на соодветен метод (Jadhav *et al.*, 2011; Sipai *et al.*, 2012; Aparajita & Ravikumar, 2014). Методите кои се поврзани со промена на органскиот растворувач се значајни во технологијата на подготовката на липозомските формулации, а се сретнуваат како методи на реверзно-фазно испарување, етер-инјекционен и етанол-инјекционен (Sahasrabudde *et al.*, 2012; Ghanbarzadeh *et al.*, 2013; Aparajita & Ravikumar, 2014). Од самиот метод на подготвувањето на липозомите како и од составот на липозомите ќе зависи инкапсулирањето на лекот во липозомските формулации, продирањето во ткивата, дистрибуцијата до клетките, а со тоа и метаболизмот на самиот лек во организмот, неговото отстранување и токсиколошкиот профил (Hwang *et al.*, 2007; Balata *et al.*, 2010; Devi *et al.*, 2011; Moghimipour & Handali, 2013). Во формирањето на липозомите, методите кои се користат најчесто се разликуваат од начинот на кој компонентите се диспергирани во водната средина пред да се формираат двојни слоеви (Da Costa & Moraes, 2003; Jain *et al.*, 2010; Sharama *et al.*, 2012; Divakar *et al.*, 2013).

2.3.1. ТЕНКО-ФИЛМЕН ХИДРАТАЦИОНЕН МЕТОД

Еден од најзастапените методи за добивање на липозомите е тенко-филмниот хидратационен метод, шематски претставен на сликата 2.13. Растворувачот се отстранува од системот најчесто под намален притисок, на ротоевапоратор (Shivhare *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2010; Gaurav & Tejal, 2011; Nidhal & Athmar, 2012). Со отстранувањето на растворувачот од системот, се формира тенок филм по ѕидовите на колбата. Како растворувачи најчесто се користат хлороформ и дихлорометан или смеса на растворувачи како што се хлороформ и метанол (Dua *et al.*, 2012; Divakar *et al.*, 2013). Поради нивното штетно делување на здравјето, тие се заменуваат и се користат *t*-бутил алокохолот и циклохексанот (Sharma *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2013). За целосно отстранување на растворувачот од подготвените липозоми се користи азотот кој се пропушта низ системот. Истовремено се формира инертна

атмосфера и се спречува оксидацијата на липидите. Формираниот тенок липиден филм се хидратира со вода или пуфер. Се користат и 0,9% раствор на натриум хлорид, 5% раствор на декстроза и 10% раствор на сахароза или пуферен раствор (Gaurav & Tejal, 2011; Dua *et al.*, 2012). Хидратацијата се изведува над највисоката транзиционата температура (температура на претворба) на супстанцата во системот (Sharma *et al.*, 2010; Dua *et al.*, 2012).

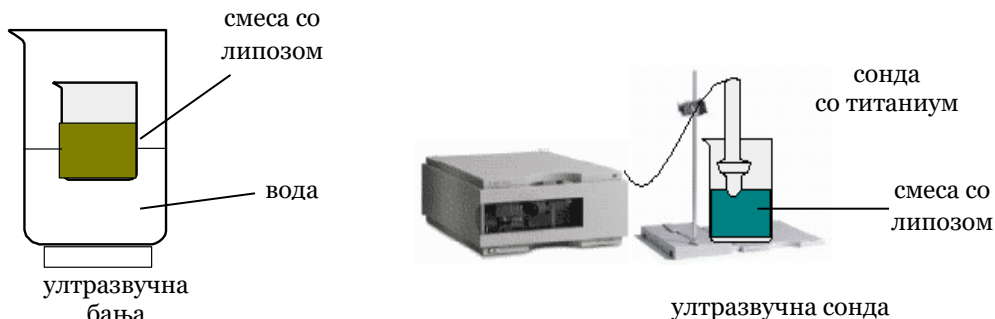


Слика 2.13. Шематски приказ на подготовка на липозомите со тенко-филмен хидратационен метод

Во зависност на липофилноста односно хидрофилноста на лековите кои треба да се внесат во липозомите, се додаваат во органскиот растворувач кој содржи липиди или се во водниот раствор, соодветно. За да се спречи создавањето на комплекси во текот на хидратацијата, се додава натриум хлорид или во текот на подготовката на липозомите се намалува големината на честичките на липозомските формулации (Dua *et al.*, 2012). Најчестите негативни карактеристики на вака добиените липозоми се хетерогеноста на дистрибуцијата на големина на лекот во липозомите (Gaurav & Tejal, 2011). Во литературата се сретнува и контролираното испарување на органскиот растворувач со што со овој метод се овозможува хомогеност на формираните липозомски формулации (Aukunigu *et al.*, 2009). Со оставањето на смесата во текот на 24 h на 4 °C се овозможува спонтано постигнување на определената големина на липозомските честички и нивна хомогенизација (Sipai *et al.*, 2012).

2.3.2. УЛТРАЗВУЧЕН МЕТОД

Со воведување на ултразвукот во подготовката на липозомските формулации, се постигнува намалување на големината на липозомот (Sipai *et al.*, 2012; Moghimipour & Handali, 2013). Во литературата (Sharma *et al.*, 2010; Gaurav & Tejal, 2011; Dua *et al.*, 2012; Kalla *et al.*, 2015) постојат два вида на инструменти кои применуваат ултразвучна енергија, ултразвучни сонди и ултразвучни бањи (Слика 2.14).



Слика 2.14. Шематски приказ на подготовка на липозомите со ултразвучен метод

Поради можноста за растворување на делчиња од сондата во самиот примерок, попрактична за користење на инструмент со ултразвучни бранови, е ултразвучната бања (Sipai *et al.*, 2012). Во случај на појава на мали честички од мултиламеларните везикули кои се остаток од големите липозомски формулации, се отстрануваат со центрифугирање (Lopes *et al.*, 2006; Gaurav & Tejal, 2011; Sipai *et al.*, 2012). Важни фактори при користењето на овој метод е времето на поставеност на примерокот на ултразвучниот инструмент, со што се можни варијации на големината на честичките и нивна дистрибуција со што резултира како можна агрегација на малите униламеларни везикули (Sipai *et al.*, 2012; Moghimipour & Handali, 2013). Најчестите проблеми кои се сретнуваат со овој метод е можноста за деградација на фосфолипидите и супстанците кои треба да бидат внесени во липозомите.

2.3.3. МЕТОД НА ИСТИСНУВАЊЕ НИЗ ДИЗНА ПОД ПРИТИСОК

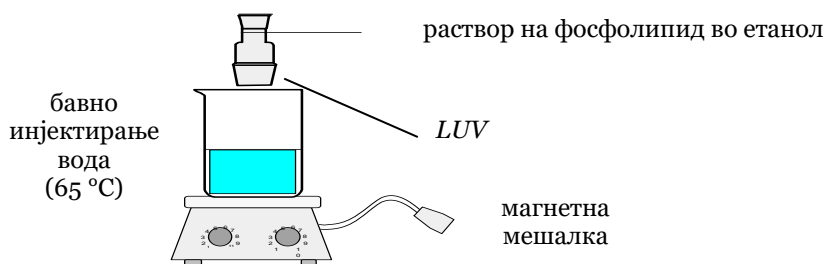
Со методот на истиснување низ дизна под притисок се овозможува екструзија на мултиламеларните везикули на високи притисоци од 200000 psi и ниска температура, 4 °C (Gaurav & Tejal, 2011). Методот дава репродуцибилни резултати кога се работи со супстанции кои не се стабилни (Sipai *et al.*, 2012; Moghimipour & Handali, 2013).

2.3.4. ЕТЕР-ИНЈЕКЦИОНЕН МЕТОД

За етер-инјекциониот метод е од интерес супстанците да се раствораат во етер. При методот на етер инјектирање, растворот од липиди се додава кон диетил етер или кон смеса од диетил етер/метанол и бавно се инјектираат во водниот раствор во кој претходно е растворен лекот кој треба да биде внесен со формирањето на липозомите (Kumar *et al.*, 2010; Nidhal *et al.*, 2012). Температурата на водниот раствор е од 55 до 65 °C (Gaurav & Tejal, 2011; Sipai *et al.*, 2012). Формирањето на липозомските формулации се овозможува со постепено отстранување на диетил етерот од системот (Sipai *et al.*, 2012). Активните супстанции треба да бидат инкапсулирани на висока температура во органските растворувачи доколку не се користи намален притисок. Методот е брз и овозможува формирање на липозомите за помалку од еден час. За отстранување на вишокот на етер и појавата на агрегати во самата формулација се применува филтрација, но истовремено може да се отстранат и некои липиди. Хетерогеноста на добиените липозомски формулации од 70 до 190 nm не секогаш овозможува користење на овој метод (Sipai *et al.*, 2012). Статистички инкапсулираноста на активните супстанции е поголема за разлика од методот во кој се користат ултразвучни бранови (Sharma *et al.*, 2010; Sipai *et al.*, 2012). Недостатокот на методот е во тоа што формираните липозоми се хетерогени (Anwekar *et al.*, 2011).

2.3.5. ЕТАНОЛ-ИНЈЕКЦИОНЕН МЕТОД

Етанол-инјекциониот метод се користи така што липидите растворени во етанол брзо се внесуваат во вода или пуфер (Слика 2.15). Повеќето липиди слабо се раствораат во етанол, со што се добиваат хетерогени липозоми доколку смесата претходно не е добро хомогенизирана (Moghimpour & Handali, 2013; Yin *et al.*, 2014). Поради формирањето на азеотропски смеси меѓу етанолот и водата, тешко може целосно да се отстрани етанолот од системот (Da Costa & Moraes, 2003; Gaurav & Tejal, 2011; Dua *et al.*, 2012).



Слика 2.15. Шематски приказ на подготовка на липозомите со етанол инјекционен метод

2.3.6. ДЕТЕРГЕНТ МЕТОДИ

Детергент методот вклучува хидратација на липидите во раствор на детергент или со отстранување на органскиот растворувач од липидот и детергентот и внесување во водна средина (Sirisha *et al.*, 2012; Moghimipour & Handali, 2013). Детергентот се отстранува со разредување, дијализа и адсорпција, користејќи хроматографски метод (Crommelin & Zuidam, 2007). Како што се отстранува детергентот од мицелите, така се побогати со фосфолипиди со што имаат можност за формирање на липозомите (Sipai *et al.*, 2012). Малото инкапсулирано количество на детергентот во липозомите доведува до негативност на методот, додека хомогеноста на липозомските формулации во однос на нивната големина и репродукцибилноста на методот се предности при добивањето на липозомите со овој метод (Anwekar *et al.*, 2011; Sipai *et al.*, 2012). Наједноставниот метод за отстранување на детергентот е со разредувањето (Sipai *et al.*, 2012; Moghimipour & Handali, 2013). Недостатокот на методот е тоа што инкапсулацијата на хидрофобните лекови е мала, а и при отстранување на детергентот од системот има веројатност да се отстрани и хидрофилниот лек (Sharma *et al.*, 2010; Sipai *et al.*, 2012).

2.3.7. РЕВЕРЗНО-ФАЗЕН МЕТОД ВО ИСПАРУВАЊЕТО

Со методот на реверзно-фазно испарување се формираат капки на вода кои се опкружени со липид во органски растворувач и потоа во порции се додава вода (Da Costa & Moraes, 2003; Moghimipour & Handali, 2013). Ултразвукот се користи при формирањето на емулзијата на вода и масло на системот кој содржи фосфолипиди и органски растворувачи како што се: изопропил етер, смеса на изопропил етер и хлороформ и диетил етер. Органските растворувачи се отстрануваат на ротоевапоратор под вакуум со што се формира вискозен гел (Mirzaee *et al.*, 2009). Остатокот од органскиот растворувач се отстранува со воведување на хроматографијата, дијализата или со центрифугирање (Hathout *et al.*, 2007). Овој метод може да се користи за инкапсулирање мали и големи молекули (Niu *et al.*, 2011). Изложеноста на активните супстанции кои треба да се инкапсулираат кон органски растворувачи и користењето на ултразвукот може да доведе до разградување на супстанците кои се во интерес (Sipai *et al.*, 2012). Предноста на користењето на овој метод е високата вредност за инкапсулираност на лекот во липозомската формулација кој може да достигне и до 65% (Dua *et al.*, 2012). Натриум хлоридот ($0,01 \text{ mol/dm}^3$) се користи како раствор за промена на јонската сила (Moghimipour & Handali, 2013). Недостатокот на методот е

тоа што е потребно време за подготовка на липозомската формулација и самите липозомски формулации се во контакт со органските растворувачи (Moghimpour & Handali, 2013). Методот е несоодветен при инкапсулирањето на лесно деградабилни супстанции (Dua *et al.*, 2012).

2.3.8. КАЛЦИУМ ИНДУЦИРАН ФУЗИОНЕН МЕТОД

Методот кој се користи за подготовка на големите униламеларните везикули од кисели фосфолипиди се нарекува калциум индуциран фузионен метод (Sipai *et al.*, 2012; Mulye *et al.*, 2013). Индуцираната фузија која е резултат на адицијата на калциумот на малите униламеларни везикули доведува до формирање на мутиламеларните структури (Moghimpour & Handali, 2013; Mulye *et al.*, 2013). Со цел да се добијат големи униламеларни везикули се додава етилендиаминтетраоцетна киселина (*Ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA). Една од најголемите предности на методот е можноста за инкапсулирање на макромолекулите (Moghimpour & Handali, 2013). Недостатокот на методот е во тоа што треба да се користат само кисели фосфолипиди, како што е фосфатидилинозитол (Sipai *et al.*, 2012; Moghimpour & Handali, 2013).

2.3.9. МЕТОД НА ЗАМРЗНУВАЊЕ И ЗАГРЕВАЊЕ

Малите униламеларни везикули се подложни под брзо замрзнување и бавно загревање (Traïkia *et al.*, 2000; Gaurav & Tejal, 2011; Sipai *et al.*, 2012). Методот зависи од концентрацијата на фосфолипидите и од јонската сила на средината (Traïkia *et al.*, 2000; Shazly, 2013). Поради тоа што во подготовката на липозомите со овој метод се доведува до нарушување на ламеларната структура на липозомските формулации, се создаваат униламеларни везикули (Gaurav & Tejal, 2011; Sipai *et al.*, 2012). Чекорите на замрзнување и загревање се повторуваат во повеќе циклуси (Shazly, 2013). Липозомите кои се подготвени со тенко-филмен хидратационен метод можат да се формираат и со методот на замрзнувањето и загревањето на липозмите (Moghimpour & Handali, 2013). Методот дава задоволителен ефект во инкапсулирањето на протеините (Sipai *et al.*, 2012; Moghimpour & Handali, 2013). При тоа замрзнувањето може да се одвива на мраз сув етанол (- 80 °C) и во азотна атмосфера (Moghimpour & Handali, 2013).

2.3.10. МЕТОД НА ХИДРАТАЦИЈА И РЕХИДРАТАЦИЈА

Хидратација и рехидратација се воведува со цел да се зголеми ефикасноста на инкапсулирање на лекот во формулацијата до 50% (Perrie *et al.*, 2001; Anwekar *et al.*, 2011). Методот се темели на реорганизирање на структурата на малите липозомски формулации на тој начин што супстанцата што треба да биде инкапсулирана во липозомската формулација се додава кон формулацијата (Chang & Yeh, 2012; Sipai *et al.*, 2012). Методот најчесто се применува за протеини кои лесно можат да се деградираат (Sipai *et al.*, 2012).

2.3.11. МЕТОД СО ХОМОГЕНИЗАЦИЈА ПОД ПРИТИСОК

За методот на хомогенизација под притисок се користи хомогенизатор (Sipai *et al.*, 2012; Moghimipour & Handali, 2013). Поради користењето на високиот притисок, липозомските формулации се прераспределуваат под влијание на различни сили. Добивањето на дијаметарот на липозомската формулација ќе зависи од два главни фактори, влезниот притисок и бројот на циклуси во самиот процес (Sipai *et al.*, 2012).

2.3.12. ЕКСТРУЗИОНЕН МЕТОД

Со повеќекратна екструзија на големите мултиламеларни везикули се добиваат униламеларни везикули (Dua *et al.*, 2012; Sipai *et al.*, 2012). Условот кој е потребен во методот е високиот притисок. Со цел да се добијат униламеларни хомогенизирани везикули се користат филтри со големина на честичките од 30 до 400 nm (Gaurav & Tejal, 2011; Sipai *et al.*, 2012; Moghimipour & Handali, 2013). Методот на екструзијата е проследен со методот на замрзнувањето и загревањето (Traïkia *et al.*, 2000; Shazly, 2013). Методот на замрзнувањето и загревањето во подготовката на липозомските формулации овозможува индуцирање на формирањето на униламеларните везикули (Traïkia *et al.*, 2000). Предноста во методот е тоа што е брз и е истовремено подобен за концентрација на липидите до 400 mg·cm⁻³. Екструзиониот метод се применува и во методот на загревање на липозомите на висока температура (120 °C) во присуство на глицерол (Sipai *et al.*, 2012).

2.3.13. МИКРОФЛУИДИЗАЦИОНЕН МЕТОД

Со микрофлуидизациониот метод се формира емулзија на вода во масло со додавање мали порции вода во поголем волумен од органскиот растворувач во кој се растворени фосфолипидите (Boltič *et al.*, 2003; Dua *et al.*, 2012; Sipai *et al.*, 2012). На допирната површина на двете фази доаѓа до формирање на мали капки со органскиот растворувач, најчесто некој алкохол, додека на долната граница на двете фази се формира единичен слој. Со цел да не дојде до фузија на капките, потребно е липидот да биде постојано во точно определено количество. Во моментот кога се формира двојната емулзија се трансформира емулзијата на водата во масло во липозомска формулација. Големината на везикулите зависи од односот на алкохолот и волуменот на водната фаза. Внатрешниот притисок во микрофлуидизаторот може да достигне до 10000 psi, со што може е причина делумно разградување на фосфолипидите. Методот е репродуцибилен со големина на формираната везикула од 50 nm до 150 nm (Phayre *et al.*, 2002; Boltič *et al.*, 2003; Pysher & Hayes, 2004).

2.3.14. СУПЕРКРИТИЧНИ ФЛУИДИ ВО ЛИПОЗОМСКАТА ТЕХНОЛОГИЈА

Со цел да се намали и со тенденција на целосно отстранување на органските растворувачи во технологијата на липозомите, се воведуваат суперкритичните флуиди како што е јаглеродниот диоксид во подготовката на липозомските формулации (Darani & Mozafari, 2009). Предноста на користењето на јаглеродниот диоксид во технологијата на подготвувањето на липозомските формулации е поради неговата нетоксичност, незапаливост, лесно се отстранува од системот, како и можноста повеќе пати истиот да се користи (Darani & Mozafari, 2009; Zhong & Dai, 2011). Со воведувањето на суперкритичните флуиди во липозомската технологија се очекува зголемен принос на добиената формулација и истовремено да се отстранат органските растворувачи кои се штетни и токсични за животната средина (Cocero *et al.*, 2009). Со самиот метод на користење на суперкритичните флуиди се овозможува контрола со промена на различните параметри како што се температурата и притисокот. Со цел да се зголеми поларноста на флуидот, се воведуваат дополнителни растворувачи како што се метанол, етанол и етил ацетат (Darani & Mozafari, 2009; Karn *et al.*, 2013). Температурата е над температурата на претворба на фосфолипидите кои се во системот. Со посебна пумпа се внесува активната супстанца, претходно растворена во вода. Смесата се меша енергично, а јаглерод диоксидот се отстранува од системот со

што се добива липозом со униформна големина (Zhong & Dai, 2011). Оптималниот број на јаглеродни атоми во низата на фосфолипидот се движи меѓу 16 C-атоми и 18 C-атоми. Утврдено е дека доколку низата содржи помал или поголем број јаглеродни атоми, ќе се создадат несакани ефекти како што се намалување ефикасност на инкапсулирање на лекот во липозомската формулација и намалувањето на осмотскиот одговор на мембраната (Zhong & Dai, 2011). Со модифицираниот метод на суперкритичното реверзно-фазно испарување се овозможува подготвување на липозомската формулација без користење органски растворувач (Darani & Mozafari, 2009; Zhong & Dai, 2011).

2.4. ПРИМЕНА НА ЛИПОЗОМИТЕ

Користењето на липозомските формулации за определени цели како што е храната, фармацијата, медицината и козметиката, од посебно значење е контролирањето на биолошките карактеристики на формулациите (Dua *et al.*, 2012; Sipai *et al.*, 2012). Карактеристиките на липозомите од биолошки аспект вклучуваат изучување на токсичноста кај живите суштества како и подобрување на стерилноста и следење на намалувањето на несаканите ефекти во третманот користејќи лекови инкапсулирани во липозоми (Hathout *et al.*, 2007; Devi *et al.*, 2011). Методите кои се базираат на стерилизацијата вклучуваат загревање, радијација или вклучување на хемиски супстанции (Sipai *et al.*, 2012). Филтрацијата се применува како метод за стерилизација, но е неприкличен за поголемите липозомски формулации, како и тоа дека определени вируси неможат да бидат отстранети од системот со обична филтрација (Sipai *et al.*, 2012; Sirisha *et al.*, 2012). Примената на γ -радијацијата и користењето на хемиски реагенси не секогаш доведува до посакувани резултати во процесот на стерилизацијата.

Примената на липозомите во медицината е со пренос на лековите (Paolicelli *et al.*, 2011; Sirisha *et al.*, 2012). Како микросферични везикули, примената на липозомите е во различни области како што се: прехранбената индустрија, хемијата, фармацевтската индустрија, медицината, биофизиката, аналитичката биохемија, козметиката и текстилната индустрија (Benech *et al.*, 2002; Kheadr *et al.*, 2002; Baptista *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2007). Во биофизиката, липозомите се изучуваат од аспект на површинските промени, додека во хемијата за следење на одделувањето на слоевите (Dua *et al.*, 2012). Во текстилната индустрија липозомите се користат како „носачи“ на боите (Baptista *et al.*, 2004). Нивната примена е забележана и во инкапсулирањето на супстанциите кои се користат како пестициди (Sirisha *et al.*, 2012).

2.4.1. ЛИПОЗОМИТЕ ВО ПРЕХРАНБЕНАТА ИНДУСТРИЈА

Липозомските формулации во прехранбената индустрија се применуваат со цел да ги стабилизираат биоактивните супстанции, да ја променат текстурата на прехранбените производи, да се контролира ослободувањето на супстанциите кои се носители на аромата, како и зголемувањето на биолошката и нутритивната вредност на супстанциите кои се користат во прехранбената индустрија (Mozafari *et al.*, 2008). Витамините се инкапсулирани во липозомските формулации да се зачува нивниот нутритивен квалитет (Mozafari *et al.*, 2008). Со инкапсулирање на биоактивните

супстанции истовремено доаѓа и до нивна заштита во транспортот, хемиските, механичките, топлотните и ензимските промени (Mozafari *et al.*, 2008). Во млечната индустрија липозомски формулации се воведуваат со цел да се подобрат определените својства на производите, како што е стабилноста на пептидите (Benech *et al.*, 2002, Mozafari *et al.*, 2008), како и на супстанцата ниазин *Z* која лесно се деградира, а истовремено може да се јави процесот на деактивацијата и отпорноста кон некои видови на бактерии (Benech *et al.*, 2002).

Додавањето на ензимите кон сирењето доведува до брза протеолиза, како и намалување на приносот (Kheadr *et al.*, 2000; Mozafari *et al.*, 2008). Ензимите кои се инкапсулирани во липозомските формулации и се внесуваат во сирењето доведува до побрзо негово зреење (Kheadr *et al.*, 2002; Mozafari *et al.*, 2012). Инкапсулираните ензими не само што својата активност ја покажуваат *in vivo*, тие ја покажуваат својата активност *in vitro* (Mozafari *et al.*, 2008). Ензимите кои се внесени во липозомските формулации истовремено се заштитени од денатурација и се овозможува нивно контролирано ослободување (Kheadr *et al.*, 2002; Mozafari *et al.*, 2008).

Инкапсулираниот железо(II) сулфат во липозомска формулација е додаден кон пресното млеко (Xia & Xu 2005). Утврдено е дека се зголемило количеството на железни јони во млекото, додека млекото било стабилно една седмица на температура 4 °C по претходно третирање на истото триесет минути на температура 100 °C (Xia & Xu 2005). Со инкапсулирање на β -галактосидазата во липозомска формулација доведува до намалување на хидролизата од лактозата кога се додава кон млекото пред консумирање. Со инкапсулирање на β -галактосидазата се овозможува подобрување на нетолератноста на лактозата со бавна дигестија на истата (Mozafari *et al.*, 2008). Липозомските формулации се воведуваат на повеќе супстанции и со тоа ги подобруваат нивните својства (Ding *et al.*, 2009). Железо(II) глицинат е инкапсулиран во липозомска формулација со реверзно-фазен метод на испарување со што добиените резултати од истражувањето покажуваат дека стабилноста на супстанцата е подобрена во кисела средина, односно со *in vitro* методот на симулирањето на гастроинтестиналниот сок (Ding *et al.*, 2009). Формираната липозомска формулација на железо(II) глицинатот овозможува зголемување на биолошката активност, а истовремено самата супстанца претставува добар извор на железото.

2.4.2. ЛИПОЗОМИТЕ ВО КОЗМЕТИКАТА

Во козметиката, липозомите се користат како растворувачи на тешко растворливите активни супстанции (Sharma & Sharma 2012). Тие наоѓаат примена во козметиката поради можноста за инкапсулирање на голем број на активни супстанции, поради што можат да се користат во комерцијално достапни производи, лосионите и кремите (Sharma & Sharma 2012). Главната улога на липозомите во козметиката е подобрувањето на допирната површина на кремата со кожата и истовремено подобрување во пенетрацијата со што се ослободуваат активните супстанции. При користењето на липозомите се зголемува селективноста во транспортот на супстанците кои се од интерес на самиот производ со зголемување на времето за нивно ослободување од формулацијата, нивната поголема стабилност, намалување на несаканите ефекти и добрата биокompatibilност (Dua *et al.*, 2012). Во козметиката, липозомските формулации најчесто се применуваат во инкапсулирањето на супстанците кои се користат за промена на пигментацијата на кожата, супстанции кои ја одржуваат влажноста на кожата и производи кои се користат за заштита на сончевата светлина (Sharma & Sharma 2012). Хидрохинолот е супстанца која се користи за промена на бојата на пигментацијата (Aparajita & Ravikumar, 2014). Со внесување на супстанцата во липозомската формулација се подобрува стабилноста на фотосензитивната супстанца. Поради блиските структурни карактеристики на липозомите со кожата можно е формирање на локално депо за продолжено ослободување на инкапсулираната супстанца (Müller *et al.*, 2007). Примената на липозомите во козметиката се зголемува поради тоа што нивното користење покажува толерантност на кожата и очите (Malaekheh-Nikouei *et al.*, 2013).

Липозомите кои се направени од жолчка на јајцето или сојата се користат за инкапсулирање на креми со што е утврдено дека постои подобра прифатливост на формулацијата направена од жолчката на јајцето (Betz *et al.*, 2005). Фосфолипидите кои потекнуваат од растенијата се користат во козметиката поради тоа што во нивниот состав се застапени есенцијалните масни киселини како што е линолната кои ја подобруваат функцијата на кожата со што ја зголемуваат нејзината еластичност и истовремено го намалуваат губењето на водата и оневозможуваат кожата да биде сува (Betz *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2007).

2.4.3. ЛИПОЗОМИТЕ ВО МЕДИЦИНАТА

Липозомите како „носачи“ на лекови се користат во инкапсулирањето на голем број на активни супстанции (Pavelič *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2006). Целта на лекот до клетката се овозможува така што кон липозомите се вклучени повеќе лиганди кои овозможуваат препознавање на таквите означени рецептори со што концентрирањето на липидите е најголемо во тие делови. Во најголем дел тоа се остатоци од шеќерни групи, антитела и хормони (Dua *et al.*, 2012). Најмногу лекови кои се инкапсулирани во липозомските формулации се користат во терапијата против маларија, габични инфекции, туморни заболувања, воспалителни процеси, а се инкапсулирани и лекови кои претставуваат антибиотици, стероиди, имуномоделатори, вакцини, ензими и генетски материјал (Lopes *et al.*, 2006; Patel & Panda, 2012). Утврдено е дека промената на рН вредноста влијае на механизмот на преносот на лекот до целната клетка. Во голем дел одржувањето на рН вредноста е неутрална и се овозможува слободен транспорт и премин на лекот во мембраната (Dua *et al.*, 2012). Лековите кои се инкапсулирани во липозомските формулации можат да се пренесат на најразлични начини како што се орално, назално, како и преку вена, мускулите, со инхалација или со нивно нанесување на кожата и очите (Sharma & Sharma 2010). Липозомските формулации можат да се појават во најразлични форми како што се капсули, креми, спрејови, раствори и масти (Sharma & Sharma 2012). Така на пример, присуството на полнеж во липидите за некои фармаколошко активни супстанции не само што ја определува агрегацијата на липозомите, туку ја определува и ефикасноста на инкапсулираност на лекот во липозомите. Односот на лекот и липидот во липозомската формулација, уделот на додаден лек во липозомот и задржувањето на лекот во формулацијата се основните параметри при користењето на липозомите во фармацијата. Во зависност за постигнување на поголема ефикасност на преносот на лекот, липозомите се формираат или како мали униламеларни везикули или како мултиламеларни везикули.

Липозомите во терапијата против тумори заболувања. Најчесто лековите кои се користат во терапијата против рак се соединенија на платината: оксаплатин и цисплатин (Hwang *et al.*, 2007), антрациклини: доксурубицин (Yamauchi *et al.*, 2007; Achim *et al.*, 2009) и даунорубицин, *bis*-триметокски куркумин аналогот (Aukunuru *et al.*, 2009), тамоксифенот (Bhatia *et al.*, 2004), 5-флуороацилот (Da Costa & Мораес, 2003), винбластин сулфатот (Patel *et al.*, 2013) и пентоксифилинот (Shivhare *et al.*, 2009). Тие се внесуваат во липозомските формулации со цел да се намалат несаканите ефекти на самите лекови (Hwang *et al.*, 2007). Методите кои се користат во добивањето на липозомите се најчесто методи кои се базираат на тенко-филмниот

хидратационен метод, метод на екструзија, ултразвук, етанол-инјекционен метод и метод на реверзно-фазно испарување (Da Costa & Moraes, 2003).

Доксуребинот е првиот антрациклиничен антибиотик кој се користи во канцерогената терапија (Achim *et al.*, 2009; Aukunuru *et al.*, 2009). Со добиените лабилни липозомски формулации на високи температури на доксуребицинот со тенко-филмен хидратационен метод и со методот на екструзија, се намалува неговата кардитоксичност. Контролата на добиените липозомски формулации е извршена на тој начин што се анализираани физичките карактеристики со повеќе аналитички методи.

Bis-диметокски куркумин аналогот е антиканцероген внесен во липозомските формулации со тенко-филмниот хидратационен метод се подобрува неговата терапевтска ефикасност (Aukunuru *et al.*, 2009). Следени се повеќе параметри меѓу кои лекот е следен со модели на *in vitro* и *in vivo* на подготвените липозомски формулации (Aukunuru *et al.*, 2009).

Тамоксифенот, лек кој примарно се користи во терапијата на туморните заболувања, во поново време се забележува и неговото користење како лек за кожни заболувања како што е псоријазата (Bhatia *et al.*, 2004).

Лекот 5-флуороацилот е внесен во липозомите со повеќе методи: тенко-филмниот хидратационен метод проследен со екструзија, етанол-инјекционен метод и метод на реверзно-фазно испарување (Da Costa & Moraes, 2003). Добиените липозомски формулации се карактеризирани во однос на физичките параметри како што се големина на формираните честички, инкапсулираност на лекот во липозомите и стабилноста на 4 °C на липозомските формулации во тек на еден месец. Покажано е дека примената на екструзиониот метод овозможува инкапсулираниот лек да дојде подлабоко во слоевите на кожата и при тоа да се овозможи соодветната терапевтска ефикасност (Da Costa & Moraes, 2003; Gómez Henz & Fernández Romero, 2006; Crommelin & Zuidam, 2007).

Винбластин сулфатот е внесен во липозомските формулации со тенко-филмниот хидратационен метод и потоа кон липозомските формулации е применет ултразвук со цел да се намали нивната големина (Patel *et al.*, 2013). При подготовката на липозомските формулации се користени три вида на хидратациони медиуми како што се дестилираната вода, цитратниот пуфер и фосфатниот пуфер, но дестилираната вода е земена како оптимална средина поради тоа што може да дојде до појава на преципитација при користење на пуфери. Со цел да се зголеми стабилноста, се пристапува кон сушење и лиофилизација. Вредноста на ζ -потенцијалот ја потврдува стабилноста на липозомската формулација и неможноста за агрегација на формулациите (Patel *et al.*, 2013).

Липозомската формулација на цисплатинот е добиена со тенко-филмниот хидратационен метод, користејќи ги растворувачите хлороформ и метанол (Hwang *et al.*, 2007). Селастролот инкапсулиран во липозомски формулации е подготвен со повеќе методи како што се етанол-инјекциониот, тенко-филмниот хидратационен и методот со замрзнувањето и загревањето на липозомската формулација (Shivhare *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2011).

Липозомите во антибиотската терапија. Лековите кои се користат во антибиотската терапија и се инкапсулирани во липозомските формулации се мафенид ацетатот, амикациот и клиндамицинот (Makhmalzadeh *et al.*, 2011; Malaekheh-Nikouei *et al.*, 2011; Mirzaee *et al.*, 2009).

Мафенид ацетатот и покрај тоа што примарно се користи во терапијата против инфекции, покажано е и дека има токсиколошко дејство доколку се користи локално (Makhmalzadeh *et al.*, 2011). Со цел да се намали токсиколошкото дејство на лекот, истиот е внесен во липозомските формулации со тенко-филмен хидратационен метод и метод на микроемулзификација (Makhmalzadeh *et al.*, 2011). Со подготвување на липозомите со тенко-филмниот хидратационен метод се користат органски растворувачи хлороформ и метанол. Фосфатидилхолинот и холестеролот (60:40, *w/v%*) се раствораат во смесата на органски растворувачи кои се отстрануваат од системот користејќи ротоевапоратор во тек на 3 часа на 55 °C. Тенкиот липиден филм е формиран и хидратиран над температурата на транзицијата на 65 °C. Со цел да се намали големината на создадените формулации се применува ултразвук на 60 °C во тек од 5 min. Во подготовката на липозомските формулации на мафенид ацетатот со микрофлуидизација се користи истиот сооднос на фосфатидилхолинот и холестерол како и во тенко-филмниот хидратационен метод, но само хлороформот како растворувач. По извршената хомогенизација и формираната емулзија се внесува во водната фаза. Се продолжува со мешање до забележано формирање на липозомски формулации (Makhmalzadeh *et al.*, 2011). Центрифугирањето се користи да се одделат создадените липозомски формулации на мафенид ацетатот од лекот кој е слободен во системот, односно кој не е инкапсулиран во липозомите. Стабилноста на липозомските формулации е потврдена на пониска температура (Makhmalzadeh *et al.*, 2011).

За подготовка на липозомските формулации на амикациот е користен 2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин и холестерол со тенко-филмен хидратационен метод (Mirzaee *et al.*, 2009).

Липозомите во терапијата против паразити. Албендазолот се користи во терапијата против ехинококус, додека за зголемување на неговиот терапевтски индекс, лекот се инкапсулира во липозомска формулација со тенко-

филмен хидратационен метод, користејќи фосфатидилхолин од јајце како фосфолипид и холестерол во подготовката на везикулите (Panwar *et al.*, 2010).

Липозомите користени во имунолошка терапија. Липозомите кои се користат во имунологијата се такролимус (FK-506) и сиролимус (Patel *et al.*, 2010; Ghanbarzadeh *et al.*, 2013).

Такролимусот (FK-506) и сиролимусот се инкапсулирани во липозомските формулации со користење на тенко-филмниот хидратационен метод. Дипалмитоилфосфатидилхолинот, диоилоилфосфатидилетаноламинот и соја фосфатидилхолинот се користени фосфолипиди во подготовката на липозомските формулации на сиролимус и такролимус (FK-506), соодветно. Одделувањето на такролимус (FK-506) од формираните липозомски формулации е постигнато со помош на центрифугален метод при што потоа со користење на оптичкиот микроскоп е потврдено отсуството на слободната активна супстанца (Patel *et al.*, 2010). Липозомската суспензија е поставена на ултразвучната бања и е додадено кон неа етанол со цел да се отстрани неинкапсулираниот лек. Морфолошките испитувања се направени со помош на оптички микроскоп со што е потврдено формирањето на мултиламеларните везикули со тенко-филмниот хидратационен метод. Стабилноста на липозомските формулации е утврдена следејќи повеќе параметри како што се: физичкиот изглед, агрегацијата и фузијата на липозомските формулации во тек од осум недели на различни температури. При тоа е утврдено дека најмногу задржување на лекот во липозомските формулации е на пониски температури (Patel *et al.*, 2010; Ghanbarzadeh *et al.*, 2013).

Нивирапинот како лек се користи во терапијата против имунолошките заболувања, овозможувајќи подобра терапевтска вредност (Ramana *et al.*, 2010). Ацикловирот е инкапсулиран во липозомска формулација со тенко-филмен хидратационен метод кој се користи во имунолошката терапија, во третманот против херпесот (Manjunatha *et al.*, 2009).

Липозомите во офталмологијата. Липозомски формулации на лековите кои се користат во лекувањето на болестите на очите се ацетазоламидот, бримонидин тартратот и пилокарпин нитратот (Nathout *et al.*, 2007; Prabhu *et al.*, 2010; Rathod & Deshpande, 2010) со цел да се подобрат биофармацевтските својства. Според Nathout *et al.* (2007) инкапсулирањето на ацетазоламидот во липозомските формулации овозможува ефикасно локално ослободување на лекот или со промена на температурата или на рН вредноста. Користени се реверзно-фазен метод и тенко-филмен хидратационен метод во подготовката на липозомските формулации. Количеството на инкапсулиран ацетазоламид во липозомите е утврдена спектрофотометриски. Мембранско-дифузниот метод е користен за анализата на *in*

in vitro со што е покажано дека со зголемување на количеството на холестеролот се намалува пропуштањето на ацетазоламидот од липозомските формулации (Nathout *et al.*, 2007). И покрај тоа што подготвените липозоми со реверзо-фазно испарување даваат стабилни липозомски формулации, тие кои се подготвени со тенко-филмен хидратационен метод се со поголема веројатност за инкапсулирање на лекот во модалните мембрани (Nathout *et al.*, 2007). Бримонидин тартратот е инкапсулиран во липозомските формулации со тенко-филмен хидратационен метод, како фосфолипид е користен 1,2-дипалмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин и смеса на растворувачи хлороформ и метанол (2:1 *v/v*). Со моделите *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* утврдено е дека кога лекот е инкапсулиран во липозомските формулации доаѓа до пролонгирано ослободување на истиот со што се овозможува зголемување на терапевтскиот индекс на самиот лек (Nathout *et al.*, 2007). Лекот пилокарпин нитрат е инкапсулиран во липозомски формулации со тенко-филмен хидратационен метод, користејќи хлороформ како растворувач, холестерол, фосфатидилхолин и стериламин во подготовката на формулацијата (Rathod & Deshpande, 2010).

Липозомските формулации како аналгетици. Аналгетиците како што се кеторолак трометамин и нимезулид се инкапсулирани во липозомски формулации со тенко-филмен хидратационен метод и етанол-инјекционен метод, соодветно (Kumar *et al.*, 2010; Nava *et al.*, 2011). Селекоксибот во липозомската формулација е подготвен со калциум индуциран метод со што својствата кои се следени на добиената формулација се со кинетиката на ослободувањето на инкапсулираниот лек со помош на дијализата (Mulye *et al.*, 2013).

Липозомите во антидијабетската терапија. Гликохолатот инкапсулиран во липозомска формулација со методот на реверзно-фазно испарување може да се користи како орален инсулин (Niu *et al.*, 2011). Липозомската формулација на метформин хидрохлоридот е подготвена со тенко-филмен хидратационен метод (Divakar *et al.*, 2013). При тоа е проследена кинетиката на ослободување на лекот од формулацијата, како и инкапсулирањето на лекот со центрифугирање на формулацијата, одделување на неинкапсулираното од инкапсулираното количество на лекот, проследена со метод на спектрофотометрија (Divakar *et al.*, 2013).

Липозомите како анестетици. Бензокаинот е инкапсулиран во липозомска формулација со тенко-филмен хидратационен метод со што морфологијата е утврдена со трансмисионен електронски микроскоп, додека спектроскопски метод е применет за утврдување на инкапулираното количество на лекот во липозомската формулација (Dua *et al.*, 2012).

Липозомските формулации на лековите како вакцини. Липозомските формулации кои се користат како вакцини и во нив се инкапсулирани лековите се

тетанус токсид и дифтерија токсид (Mishra *et al.*, 2007). За подготовката на липозомските формулации на лековите се користени соја фосфатидилхолинот и холестеролот со методот на реверзното-фазно испарување.

Хитозан липозомските формулации на деоксирибонуклеинската киселина за орална употреба како вакцини се подготвени со тенко-филмен хидратационен метод (Channarong *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010), додека со метод на дехидратацијата и рехидратацијата се подготвени везикулите на деоксирибонуклеинската киселина (Perrie *et al.*, 2001).

Липозомските формулации во терапијата против астма. Салбутамолот е лек кој инкапсулиран во липозомска формулација со тенко-филмен хидратационен метод се користи во терапијата против астма (Nidhal & Athmar, 2012).

Липозомите во терапијата против фибринолизата. Транексаминската киселина е хидрофилен лек кој се користи во терапијата против фибринолизата (Manosroi *et al.*, 2002).

Липозомите во хормоналната терапија. Сипротерон ацетатот се користи во хормоналната терапија за локална употреба, додека инкапсулирањето во липозомска формулација е постигнато со тенко-филмен хидратационен метод (Mohammadi-Samani *et al.*, 2009).

Липозомите во антигабичната терапија. Лековите кои се користат во терапијата против кожните заболувања, а кои се предизвикани од габични инфекции се кетоконазолот (Patel *et al.*, 2009), флуконазолот (El-Nesr *et al.*, 2010; Chanda *et al.*, 2011), амфотерицин Б (Eldem & Arican-Cellat, 2000; Devi *et al.*, 2011; Jadhav *et al.*, 2011) и клотримазолот (Kumar *et al.*, 2012a).

Флуконазолот е инкапсулиран во липозомската формулација со тенко-филмниот хидратационен метод, со примена на соја лецитинот и холестеролот (El-Nesr *et al.*, 2010; Chanda *et al.*, 2011). Во липозомската формулација на клотримазолот е користен соја фосфатидилхолинот, холестеролот со тенко-филмен хидратационен метод (Kumar *et al.*, 2012).

Амфотерицинот Б е подготвен со тенко-филмен хидратационен метод при што се следени повеќе параметри како што се морфологијата со оптички микроскоп (Jadhav *et al.*, 2011), модел на *in vitro* со што е проследена кинетиката на ослободување на лекот од липозомската формулација и стабилноста на различни температури од 4 до 25 °C (Devi *et al.*, 2011). Ефективноста на инкапсулираното количество на лекот во липозомската формулација е утврдена со хроматографски метод на течната хроматографија под висок притисок (Jadhav *et al.*, 2011).

2.5. КЕТОКОНАЗОЛОТ ИНКАПСУЛИРАН ВО ОПРЕДЕЛЕНИ ФОРМУЛАЦИИ

Кетоконазолот во терапијата се применува со нанесување на лекот на кожата или со орално внесување на лекот. Со цел да се намали токсиколошкото дејство на кетоконазолот како лек, а и истовремено да се намалат неговите несакани ефекти, истиот е инкапсулиран во повеќе формулации како што се етозоми, ниозоми и липозоми (Najmuddin *et al.*, 2010; Sarat Chandran *et al.*, 2011; Rao Purushotham *et al.*, 2012; Rasheed *et al.*, 2012).

Кетконазолот во етозомите. Етозомите подготвени од фосфолипиди, пропилен гликол, вода и етанол во точно определен сооднос на нивните количества. Подготовката на етозомите е со воведувањето на топол метод (Sarat Chandran *et al.*, 2011; Sheer & Chauhan, 2011) во кој органската фаза се додава кон водата при континуирано мешање и одржување на температурата (40 °C). При тој метод, фосфолипидот е 30% додека кетоконазолот е 2% во подготовката на формулацијата. За следење на големината и обликот на етозомите е користен оптички микроскоп (Sarat Chandran *et al.*, 2011), додека стабилноста на етозомите е следена во тек на осум недели на 4 °C и 30 °C. Проследена е и *in vitro* анализата при која е утврдено дека пермеабилноста на лекот е зголемена во присуство на пропилен гликол и етанол (Sarat Chandran *et al.*, 2011).

Кетоконазолот во ниозомите. Ниозомите фомирани од нејонските сурфактантите (Tween60, Span40, 60) и холестеролот во соодветен сооднос на количествата. Тенко-филмен метод е користен во подготовката на ниозомските формулации на кетоконазолот (Rajnish & Ajay, 2010; Shirsand *et al.*, 2012). При тоа хлороформот е користен како растворувач на сурфактантот, холестеролот и кетоконазолот, а хидратацијата е постигната со користење на фосфатен пуфер (pH = 7,4). Температурата на ротоевапораторот е одржувана во опсег 55–65 °C, додека ултразвучната бања е користена со цел да се намали големината на формираните честички на ниозомската формулација на кетоконазолот. За следење на големината на честичките се користи оптички микроскоп со резолуција 45x или електронскиот микроскоп. Проследена е *in vitro* анализата (Rajnish & Ajay, 2010) утврдувајќи ги и реолошките карактеристики на ниозомските формулации користејќи вискозиметар (Shirshand *et al.*, 2012). Инфрацрвената спектроскопија е воведена со цел да се утврдат карактеристичните ленти на кетоконазолот, нечистотиите и на самата формулација по нејзината подготовка (Shirsand *et al.*, 2012).

Кетоконазолот во наночестичките. Кетоконазолот е инкапсулиран во наночестичките користејќи јонско-желатиран метод и хитозан (Modi *et al.*, 2013) и во

цврстите липидни наночестички од декстран хидрогелот со метод на хомогенизацијата со загревање (Paolicelli *et al.*, 2011). Утврдено е дека кетоконазолот во наночестичките може да се применува и орално, а со следењето на повеќе параметри како што се оптичките, ефикасноста за инкапсулирање на лекот и ζ -потенцијалот, како и стабилноста на формулациите. Реолошките карактеристики на кетоконазолот покажуваат дека добиените формулации лесно можат да дојдат во контакт со кожата (Paolicelli *et al.*, 2011). Инкапсулирањето на кетоконазолот во хидрогелови како што се карбопол 934 и ксантин и следењето на нивната стабилност до една година е анализирано со повеќе аналитички методи меѓу кои применети се и модели на *ex vivo* (Ramasamy *et al.*, 2012).

Кетоконазолот во β -циклодекстриноот. Циклодекстрините се циклични олигосахариди кои се сретнуваат како α -, β - и γ -циклодекстрин. Тие со органските соединенија и создаваат комплекси, а притоа ја подобруваат нивната растворливост (Balata *et al.*, 2010). Растворливоста на кетоконазолот се зголемува со формирање на комплексот меѓу кетоконазолот и β -циклодекстриноот (Najmuddin *et al.*, 2010). Со формирање на комплексот и инкапсулиран во геловите со различни полимери како што е карбопол 940, во различен сооднос е следено за повеќе параметри како што се вискозноста и реолошките својства, дифузија на самиот лек, а со инфрацрвената спектроскопија е овозможено утврдување на функционалните групи на формируваниот комплекс (Najmuddin *et al.*, 2010). Тенко-филмен хидратационен метод е користен во подготовка на формулацијата на кетоконазолот во β -циклодекстриноот со различно количество на лекот (Balata *et al.*, 2010). Кетоконазолот е диспергиран во поливинилпирилодон k-17 при што формулацијата е применета во креми за локална употреба (Balata *et al.*, 2010). Формируваниот комплекс на кетоконазолот и β -циклодекстриноот може да се следи со примена на спектрофлуориметријата (Jalali & Afshoon, 2008) и на спектрофотометријата (Balata *et al.*, 2010).

Кетоконазолот во липозомите. Еден од начините за спречување на кетоконазолот да дојде до здравите клетки е со негово воведување во липозомите (Gómez-Hens & Fernández-Romero, 2006; Crommelin & Zuidam, 2007; Prasanth *et al.*, 2012; Rasheed *et al.*, 2012). Со внесувањето на кетоконазолот во липозомските формулации се очекува зголемување на времето на полуживотот на лекот и истовремено намалување на несаканите ефекти. Инкапсулирањето на кетоконазолот во липозомите е изведена со два вида методи: тенко-филмен хидратационен метод (Patel *et al.*, 2009, Rasheed *et al.*, 2012; Saharsrabuddhe *et al.*, 2012) и етер-инјекциониот метод (Saharsrabuddhe *et al.*, 2012).

Липозомските формулации се подготвени така што како основни супстанции во подготовката на самата формулација се користени соја лецитин и холестерол (Patel *et*

al., 2009). Додаден е α -токоферол ацетат во дихлорометан како органски растворувач (Patel *et al.*, 2009). Тенкиот липиден филм се создава на ротоевапораторот кој потоа се хидратира со дестилирана вода. Со цел да се изврши целосната липидна хидратација, подготвената смеса се остава на 4 °C, 24 h (Patel *et al.*, 2009). Отстранувањето на органскиот растворувач со ротоевапоратор е проблематично бидејќи има можност од негово задржување во мало количество како резидуален дел во самата подготвена липозомска формулација (Patel *et al.*, 2009). Неинкапсулираниот кетоконазол е отстранет со центрифугирање со што се добива супернатант и талог во форма на пелети. Во седиментот се очекува да дојде до инкапсулирано количество на кетоконазолот во формулацијата, додека супернатантот повторно е подложен на центрифугирање со цел да се разделат целосно неинкапсулираниот од инкапсулираниот кетоконазол. Со етер-инјекциониот метод се овозможува бавно инјектирање на органскиот растворувач во водната фаза на температура на вриење на органскиот растворувач. Модифицираниот метод со користење на хлороформ, а не диетил етер е од причина што кетоконазолот не се раствора во етер (Saharsrabuddhe *et al.*, 2012). Подготвените липозомски формулации со етер-инјекциониот метод се формирани така што лецитинот од сојата и холестеролот се мешаат со хлороформот. Кон загреана дестилирана вода (60 °C) е додавано капка по капка од липидната фаза со постојано мешање во тек од два часа, за потоа мешањето да продолжи уште половина час со што се формира липозомската формулација (Saharsrabuddhe *et al.*, 2012). Хидратациониот чекор во подготовката на липозомските формулации е модифициран со воведување на растворот метанол и вода во волуменски однос 1:1 v/v, додека целулозната мембрана се користи во преминот на кетоконазолот во растворот (Rasheed *et al.*, 2012). Големината на липозомските формулации е утврдено со фотон корелациона спектроскопија со што везикулте се потопени во фосфатен пуфер пред користењето на микроскоп (Rasheed *et al.*, 2012). Ламеларноста и обликот на везикулите е утврдена користејќи инвертен флуоресцентен микроскоп (Patel *et al.*, 2009). Утврдување на ефективноста на инкапсулираното количество на кетоконазолот во липозомската формулација е следено спектрофотометриски на бранова должина 222 nm (Patel *et al.*, 2009; Rasheed *et al.*, 2012).

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

3.1. МАТЕРИЈАЛИ

За разработка на спектрофотометриски и *HPLC* метод за определување на кетоназолот во комерцијални фармацевтски производи и тоа: крем, шампони и таблети, како и за подготовка на липозомските формулации на кетоназолот е користен стандард кетоназол кој е добиен како подарок од фармацевтската компанија Реплекфарм ДООЕЛ–Скопје, Р. Македонија. Комерцијалните формулации на кетоназолот произведени во Република Македонија од фармацевтските компании: Алкалоид АД, Р. Македонија (шампон 1 *Ketoconazole Alkaloid*[®]) и Реплекфарм АД, Р. Македонија (таблети *Rekonazol*[®] *Ketoconazole*, шампон 2 *Rekonazol*[®] *Ketoconazole* и крем *Rekonazol*[®] *Ketoconazole*) се купени од локалните фармацевтски аптеки во Скопје.

Растителните масла, сончогледово и маслиново масло, ладно цедени, се купени од локалниот пазар во Скопје.

Од реагенси беа користени метанол со аналитичка чистота и вода со *HPLC* чистота од *Merck* (Германија), пуфери со рН = 4 и рН = 7 од *Fluka* (Швајцарија), натриум карбонат рН = 10 од *Merck* (Германија) и натриум хидроксид (0,01 mol·dm⁻³) од Алкалоид (Р. Македонија). Калиум фосфатен пуфер (0,1 mol·dm⁻³) со рН = 8,9 беше подготвен со калиум хидроген фосфат и калиум дихидроген фосфат снабдени од Алкалоид (Р. Македонија).

За подготовка на липозомските формулации беше користен фосфолипид L- α -фосфатидилхолин (жолчка од јајце) од *Sigma* (Германија) и холестерол од *Calbiochem* (Јапонија). Во хидратациониот чекор освен дестилираната вода, беше користен и раствор на натриум хлорид кој беше снабден од Алкалоид (Р. Македонија). За подготовка на липозомските формулации како алтернативни растворувачи покрај метанолот со аналитичка чистота снабден од *Merck* (Германија), се користени етил ацетат од Алкалоид (Р. Македонија) и хлороформ од *Merck* (Германија).

За оптичките испитувања со метод на имерзионото масло беше користено кедрово масло (*Fluka*, Швајцарија) и смеса на изомери на ксилолот (Алкалоид, Р. Македонија).

3.2. АПАРАТУРА

За квалитативната и квантитативната анализа на формулациите на кетоконазолот беа користени следните инструменти: аналитичка вага (*Mettler Toledo*, Швајцарија) со точност 0,1 mg, рН метар од *Sartorius PB-11* (Германија), магнетна мешалка тип *MM-530* од *Tehnika Železniki* (Словенија), вортекс тип *EV-102* од *Tehnika Železniki* (Словенија), ултразвучна бања тип *Cole-Parmer 8890* (С.А.Д.), ротоевапоратор (*Devarot Elektromedicina*, Словенија), центрифуга од *MRC* (Израел), спектрофотометар *Varian Cary Scan 50* (Швајцарија) со 10 mm кварцна кивета, високоефикасен течен хроматограф *Agilent Technologies 1200 Series* (С.А.Д.) и оптички микроскоп *Konus*, тип *M-100-FL* (Италија), претставени на сликата 3.1. На апаратот *Zeta meter 4.0* (С.А.Д) се утврдени вредностите за ζ -потенцијалот и електричната спроводливост. Високоефикасниот течен хроматограф е опремен со *DAD* детектор *G1315D*, дегазер *G1379B*, бинарна пумпа *G1312A*, термостатирана колона *TCC G1316A*, автоматски земач на пробата *ALS G1329A* и реверзно-фазна колона *RP-18 LiChrospher®100* (150 x 4,6 mm, големина на честичките 5 μ m).



Слика 3.1. Изглед на аналитичка вага (а), рН метар (б), магнетна мешалка (в), вортекс (г), ултразвучна бања (д), ротоевапоратор (ф), центрифуга (е), *UV-Vis* спектрофотометар (ж), високоефикасен течен хроматограф (з) и оптички микроскоп (с)

3.3. СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ И ВИСОКОЕФИКАСЕН ТЕЧЕН ХРОМАТОГРАФСКИ МЕТОД

3.3.1. СТАНДАРДНИ РАСТВОРИ

Основен стандарден раствор на кетоконазол со концентрација $1 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ беше подготвен во метанол. Работните стандардни раствори со концентрација од $5\cdot 10^{-3}$ до $2,5\cdot 10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ за спектрофотометрискиот метод беа подготвени од основниот стандарден раствор, во текот на еден ден и во текот на три последователни дена. За течниот хроматографски метод под висок беа подготвени работни стандардни раствори со концентрација на кетоконазолот во метанол: $5\cdot 10^{-2}$; $1\cdot 10^{-1}$; $1,5\cdot 10^{-1}$; $2\cdot 10^{-1}$ и $2,5\cdot 10^{-1} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$. Основниот раствор на кетоконазол беше свежо подготвен во текот на денот.

3.3.2. ПОДГОТОВКА НА ПРИМЕРОЦИ

Таблети. Десет таблети *Rekonazol® Ketoconazole* се истолчени до прав со цел да се утврди количеството на кетоконазолот во примерокот. Примерок од таблетите ($40 \pm 0,1 \text{ mg}$) беше екстрахиран со 8 cm^3 метанол со мешање на вортекс, на $25 \text{ }^\circ\text{C}$, за време од 30 min . Филтрацијата беше извршена со нуч филтер (G4). Филтратот е собран во 25 cm^3 одмерна тиквичка која беше дополнета до ознаката со метанол.

Шампон. Точно измерен примерок на шампон ($30 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$) беше хомогенизиран со 1 cm^3 метанол во 5 cm^3 одмерна тиквичка. По мешањето на вортекс, 30 min на $25 \text{ }^\circ\text{C}$, одмерната тиквичка беше дополнета до ознаката со метанол.

Крем. Примерокот крем (*Rekonazol® Ketoconazole*) $100 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ беше екстрахиран со метанол со мешање на вортекс на температура од $25 \text{ }^\circ\text{C}$ за време од 30 min . Односот на цврста/течна фаза беше $1:30 \text{ w/v}$. Екстрахираниот примерок се чуваше на $-18 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min и беше филтриран со нуч филтер (G4). Филтратот беше собран во одмерна тиквичка од 10 cm^3 и истата беше дополнета до марката со метанол.

Подготвените примероци беа филтрирани со *Syringe filter PTFE* (25 mm , големина на порите $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, *Sigma-Aldrich*, Германија) и чувани во фрижидер на $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3.3. СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ И ХРОМАТОГРАФСКИ УСЛОВИ

Спектрофотометриските услови во оптимизираниот метод се поставени на бранова должина од 244 nm и 296 nm, на температура од 25 °C. Слелата проба беше метанол или празен липозом (без кетоконазол) во зависност на анализите, кетоконазол комерцијални фармацевтски форми и липозоми, соодветно.

Хроматографските услови за методот на високоефикасната течна хроматографија беа утврдени составот на мобилната фаза, метанол и вода и pH вредноста. Хроматографската анализа беше изведена со изократно елуирање и реверзно-фазна хроматографија, користејќи смеса метанол и вода како поларни растворувачи за мобилна фаза. Мобилната фаза беше филтрирана со естер целуозна мембрана (Sigma–Aldrich, Германија), користејќи вакуум. Оптималниот сооднос на мобилната фаза е метанол и вода (90:10 v/v) на pH = 8,89 и на бранова должина од 230, 244 и 296 nm со изократно елуирање на мобилната фаза. Температурата на колоната беше поставена на 25 °C, работниот притисок на 85 bar, додека инјекциониот волумен на автоматскиот земач на пробите беше поставен на 20 μdm^3 . Со методот на надворешен стандард беше конструирана калибрационата крива во опсегот ($5 \cdot 10^{-2}$; $1 \cdot 10^{-1}$; $1,5 \cdot 10^{-1}$; $2 \cdot 10^{-1}$ и $2,5 \cdot 10^{-1}$ mg·cm⁻³) на концентрациите на работните стандардни раствори на кетоконазолот во метанол. Ретенционото време, t_R на кетоконазолот беше 3,4 min.

3.3.4. ВАЛИДИЗАЦИЈА НА МЕТОДИТЕ

Според препораките и упатствата од Меѓународна конференција за хармонизација, *International Conference on Harmonisation, ICH* (Chan, 2004), спектрофотометрскиот и хроматографскиот метод беа валидизирани во однос на линеарноста и опсегот, прецизноста и точноста, репродуцибилноста, границата на детекција, границата на квантификација и робустноста.

3.3.4.1. ЛИНЕАРНОСТ И ОПСЕГ

Линеарноста на методот беше определена со подготвување на три одделни серии на раствори на кетоконазолот во метанол во опсег од $5 \cdot 10^{-3}$ до $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg·cm⁻³ и од $5 \cdot 10^{-2}$ до $2,5 \cdot 10^{-1}$ mg·cm⁻³ на 244 nm и 296 nm, соодветно. За статистичка обработка на податоците беа користени методите за еднонасочна анализа на варијансата и методот на најмали квадрати. Апсорпционите максимуми на растворите на кетоконазолот во

метанол со концентрации од $1,5 \cdot 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ и $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ беа утврдени на 296 nm и на 244 nm, соодветно. Моларните апсорпциони коефициенти (ϵ) на супстанцата беа пресметани врз основа на експерименталните податоци (Chan, 2004).

3.3.4.2. ПРЕЦИЗНОСТ И ПОВТОРЛИВОСТ

Дневната и меѓудневната прецизност и точност на методот беа пресметани со утврдување и споредување на повторливоста на вредностите на три независно подготвени работни стандардни раствори на кетоконазолот во метанол ($5 \cdot 10^{-3}$; $1 \cdot 10^{-3}$; $1,5 \cdot 10^{-2}$; $2 \cdot 10^{-2}$; $2,5 \cdot 10^{-2}$; $5 \cdot 10^{-2}$; $1 \cdot 10^{-1}$; $1,5 \cdot 10^{-2}$; $2 \cdot 10^{-1}$ и $2,5 \cdot 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) во еден ден за утврдување на дневната прецизност и повторливост и во три последователни дена за утврдување на меѓудневната прецизност и повторливост.

3.3.4.3. ТОЧНОСТ

Точноста беше определена со аналитичките приноси на анализираните фармацевтски производи на кетоконазолот (крем, шампони и таблети). Точноста на методот беше утврдена со додавање точно определено количество на стандардниот кетоконазол со концентрација $1 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ во комерцијалните фармацевтски примероци на кетоконазолот: шампони, крем и таблети на три нивоа, 80, 100 и 120% со методот на стандардната адиција. Аналитичките приноси на анализираните фармацевтски производи на кетоконазолот, крем, шампони и таблети беа утврдени како средна вредност на секој од примероците на фармацевтскиот производ на кетоконазолот.

3.3.4.4. ГРАНИЦА НА ДЕТЕКЦИЈА И ГРАНИЦА НА КВАНТИФИКАЦИЈА

Границите на детекција (*Limit of Detection, LOD*) и квантификација (*Limit of Quantification, LOQ*) за валидизирање на спектрофотометрискиот и хроматографскиот метод беа утврдени со стандардната девијација на одговорот од калибрационата крива како средна вредност од три независно подготвени серии на кетоконазол во метанол во три последователни дена на 244 nm и 296 nm. *LOD* и *LOQ* беа пресметани според формулите $LOD = 3,3\sigma/S$ и $LOQ = 10\sigma/S$, каде S е наклонот на калибрационата крива, а σ е стандардната девијација на одговорот.

За валидизација на хроматографскиот метод, границите на детекција и квантификација беа утврдени и со методот на односот на сигналот и шумот. Со интегрирање на сигналот и шумот беа утврдени границите на детекција и

квантификација кој однос треба да биде три $D = 3N/S$, односно десет $D = 10N/S$, соодветно, каде D е праг на осетливост, S е осетливост и N е шум.

3.3.4.5. РОБУСТНОСТ

Робустноста на предложениот УВ-спектрофотометриски метод е определена со анализата на растворите на фармацевтските производи со кетоконазол и работните стандардни раствори на кетоконазол во метанол на различни бранови должини, ± 3 nm во однос на нултото ниво на 244 nm, односно на 296 nm.

Робустноста кај HPLC методот е утврдена со промена на pH на средината, соодносот на растворувачите метанол и вода во мобилната фаза (80:20 и 90:10 v/v), температурата на колоната (23, 25 и 27 °C), и промена на протокот на мобилната фаза (0,9, 1 и 1,1 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$).

3.4. РАЗВОЈ НА КЕТОКОНАЗОЛ ЛИПОЗОМСКИ ФОРМУЛАЦИИ

Прелиминарните испитувања во развојот на липозомските формулации на кетоконазолот го вклучува изборот на: соодносот на количеството на супстанците, растворувачите, воведувањето на растителни масла како растворувачи на супстанците, бројот на вртежите при центрифугирање, чекорот на хидратација, времето потребно за отстранување на растворувачот на ротоевапораторот, како и времето потребно за хидратација.

Кетоконазол во количество од $20 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ беше растворен во соодветен органски растворувач во 10 cm^3 одмерна тиквичка. Подготовката на примерокот за добивање на липозомска формулација на кетоконазолот беше извршена со следните органски растворувачи: метанол, смеса на метанол и хлороформ, хлороформ и етил ацетат. Кон смесата беше додаден холестерол ($20 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$). Сончогледовото масло беше додадено (5 cm^3) кон смесата на кетоконазолот и холестеролот. Смесата беше мешана интензивно на вортекс, на температура $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min .

Примерок од кетоконазол ($1.1 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$) и холестерол ($3 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$) беа растворени во 5 cm^3 сончогледовото и маслиновото масло, $1:1 \text{ v/v}$. Смесата беше континуирано мешана на ротоевапоратор до испарување на присутниот органски растворувач. Потоа беа додадени 5 cm^3 загреана дестилирана вода ($80 \text{ }^\circ\text{C}$). Примероците беа оставени во фрижидер, во текот на 24 h на $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Везикулите беа подготвени така што $100 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ кетоконазол, $300 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ холестерол и $100 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ фосфолипид беа растворени во 5 cm^3 сончогледово масло. Смесата беше екстрахирана со четири порции метанол (5 cm^3). Пред центрифугирањето, смесата беше замрзната на $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ за време од 15 min . Одделувањето на липозомскиот и нелипозомскиот слој беше изведено со центрифугирање при 4000 и $5000 \text{ vrtежи} \cdot \text{min}^{-1}$, во времетраење од 15 min .

3.4.1. ТЕНКО-ФИЛМЕН ХИДРАТАЦИОНЕН МЕТОД ЗА ПОДГОТОВКА НА КЕТОКОНАЗОЛ ЛИПОЗОМСКИТЕ ФОРМУЛАЦИИ

Методот на формирање липозоми со тенко-филмен хидратационен метод се состои во подготовка на примерокот во органски растворувач кој потоа се отстранува со ротоевапоратор.

Со цел да се отстрани целосно метанолот како органски растворувач, смесата беше поставена на ротоевапораторот ($80 \text{ vртежи} \cdot \text{min}^{-1}$), 10 min , на $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Создадениот тенок липиден филм беше хидратиран во водна фаза со додавање на дестилирана вода или $0,9\% \text{ NaCl}$.

Хидратациониот чекор беше постигнат со додавање вода над гел-течно кристалната транзициона температура (T_c) на липидот. Температурата беше одржувана $65 \text{ }^\circ\text{C}$ во текот на 1 h со континуирано и енергично мешање на смесата, претставено на сликата 3.2а. Смесата беше оставена на $4 \text{ }^\circ\text{C}$ во текот на 24 h . Следниот ден беше определена инкапсулираноста на кетоконазолот во липозомската формулација и оценета морфологијата на везикулата.



Слика 3.2. Подготовка на мултиламеларни везикули на кетоконазолот со тенок-филмен хидратационен метод: ротоевапоратор (а), липозомска формулација со метанол (б) и липозомска формулација со смеса на сончогледово и маслиново масло, $1:1 \text{ v/v}$ (в)

Подготовката на липозомската формулација на кетоконазолот користејќи метанол како растворувач е прикажано на сликата 3.2б. Примерок од $100 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ кетоконазол, $30 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ холестерол и $100 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ фосфолипид се раствора во 5 cm^3 метанол во колба и се хомогенизира на магнетна мешалка на $1000 \text{ vртежи} \cdot \text{min}^{-1}$, во времетраење 30 min . Основната формулација добиена со користење на метанол во подготовката беше поставена на ротоевапоратор со цел да се отстрани растворувач на $55 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min (Слика 3.2б). Колбата беше оставена на $55 \text{ }^\circ\text{C}$ во текот на 30 min со постојано мешање со цел да се формира тенок филм. Дестилирана вода (5 cm^3) или $0,9\% \text{ NaCl}$ (5 cm^3) беа користени за хидратација. Одделувањето на инкапсулираниот од неинкапсулираниот кетоконазол беше направено со центрифугирање на $5000 \text{ vртежи} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min .

Користењето на смеса на сончогледово и маслиново масло во однос $1:1 \text{ v/v}$ во подготовката на везикулите на кетаконазолот е прикажано на слика 3.2в. Примерок од

100 mg \pm 0,1 mg кетоконазол, 30 mg \pm 0,1 mg холестерол и 100 mg \pm 0,1 mg фосфолипид беа растворен во 5 cm³ масло (сончогледово, маслиново или смеса на сончогледовото и маслиновото, Слика 3.2в). Примерокот беше хомогенизиран на магнетна мешалка и во хидратациониот чекор беше додадено дестилирана вода (5 cm³).

3.4.2. УЛТРАЗВУЧЕН МЕТОД ЗА ПОДГОТОВКА НА КЕТОКОНАЗОЛ ЛИПОЗОМСКИТЕ ФОРМУЛАЦИИ

Основната липозомска формулација е подготвена така што примерок од 100 mg \pm 0,1 mg кетоконазол, 30 mg \pm 0,1 mg холестерол и 100 mg \pm 0,1 mg фосфолипид беше растворен во 5 cm³ метанол. Хомогенизацијата на примерокот беше изведена на магнетна мешалка при 1000 вртежи·min⁻¹ (Слика 3.3а). Дестилирана вода (5 cm³) на 80 °C беше додадена кон смесата. Колбата во која беше смесата е поставена на ротоевапоратор (80 вртежи·min⁻¹), 10 min, на 55 °C со цел да се отстрани метанолот од системот. Хидратациониот чекор беше воведен така што кон смесата беше додадена дестилирана вода (5 cm³) и колбата беше оставена 24 h во фрижидер, на 4 °C. Одделувањето на слоевите беше постигнато на центрифуга, 5000 вртежи·min⁻¹, 15 min.



Слика 3.3. Подготовка на мали униламеларни везикули на кетоконазолот: липозомска формулација со метанол (а), липозомска формулација со смеса на сончогледово и маслиново масло, 1:1 v/v (б) и изглед на ултразвучна бања (в)

Подготовката на липозомските формулации без користење на фосфолипид во подготовката е прикажано на слика 3.3б. Формулацијата се состои од растителното масло, 5 cm³ во кое беше растворен примерок 100 mg \pm 0,1 mg кетоконазол, 30 mg \pm 0,1 mg холестерол и 100 mg \pm 0,1 mg. Со цел да се раствори целосно фосфолипидот во маслото, смесата беше постепено загреана на магнетна мешалка на температура од 40 °C, со постојано мешање. Кон хомогенизираната смеса беше додаден 0,9% NaCl,

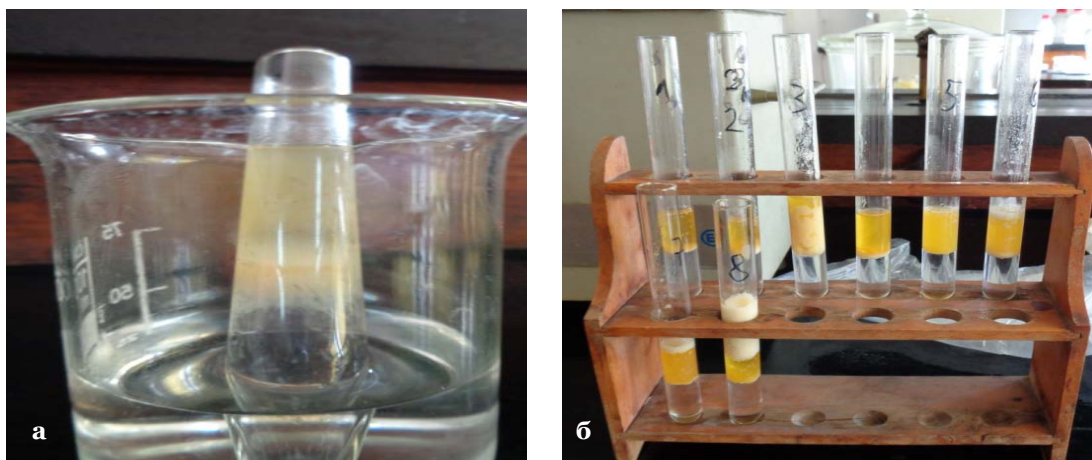
5 cm³ на 80 °C. Подготвени беа и липозомски формулации на кетоконазолот со помало количество на активната супстанца, 1.1 mg ± 0,1 mg и 3 mg ± 0,1 mg холестерол (Слика 3.3б). Метанолот беше заменет со растителните масла како што се сончогледовото и маслиновото масло. Загреан 0,9% NaCl (5 cm³) на 80 °C беше додаден кон смесата со што беше извршена хидратацијата.

Подготвените липозомски формулации на кетоконазол во колби беа поставени на ултразвучна бања на 40 kHz на 25 °C, за време 10 min (Слика 3.3в).

3.4.3. ИНЈЕКЦИОНЕН МЕТОД ЗА ПОДГОТОВКА НА КЕТОКОНАЗОЛ ЛИПОЗОМСКИТЕ ФОРМУЛАЦИИ

Основната липозомска формулација на кетоконазолот беше подготвена така што, примерок 100 mg ± 0,1 mg кетоконазол, 30 mg ± 0,1 mg холестерол и 100 mg ± 0,1 mg фосфолипид беа растворени во 5 cm³ метанол. Загреана беше дестилирана вода на 80 °C. Смесата во органскиот растворувач беше додадена кон 5 cm³ дестилирана вода. При тоа беше забележано формирање на липозомската формулација на кетоконазолот (Слика 3.4.а).

Примерок од 100 mg ± 0,1 mg кетоконазол, 30 mg ± 0,1 mg холестерол и 100 mg ± 0,1 mg фосфолипид беа растворени во 5 cm³ растително масло. Примерокот беше хомогенизиран на магнетната мешалка, а хидратацијата беше изведена со дестилирана вода (Слика 3.4.б). Смесата во органскиот растворувач беше додадена кон 5 cm³ дестилирана вода, загреана на 80 °C.



Слика 3.4. Подготовка на везикулите на кетоконазолот со инјекционен метод: липозомска формулација со метанол (а), липозомска формулација со смеса на маслиново и сончогледово масло во однос 1:1 v/v (б)

3.4.4. ОЦЕНА НА КЕТОКОНАЗОЛ ЛИПОЗОМСКИТЕ ФОРМУЛАЦИИ

Липозомските формулации на кетоконазолот беа оценети во однос на инкапсулираност на кетоконазолот во липозомската формулација, морфолошките карактеристики, ζ -потенцијалот и електричната спроводливост и стабилноста на липозомите.

Ефикасност на инкапсулираност. Инкапсулираноста на кетоконазолот во липозомската формулација се утврди со валидизираните спектрофотометриски и хроматографски метод на 296 nm.

Морфолошките карактеристики. Микроскопски анализи беа изведени на оптички микроскоп *Konus*, тип *M-100-FL* (Италија), 40x со имерзионен метод. Фотографирањето на микроскопските анализи беше направено со дигитална камера *Sony Cyber-shot W series* тип *DSCW830V.CE3* со леќа *ZEISS Vario-Tessar 8x* (Кина).

ζ -потенцијалот и електричната спроводливост. Определувањето на ζ -потенцијалот и електричната спроводливост се утврдени на апаратот *Zeta meter 4.0* (С.А.Д) на 22 °C и 300 V. Липозомите во количество 500 μdm^3 беа разредени со 50 cm^3 дестилирани вода пред анализата.

Стабилност на липозомите. Стабилноста на липозомите на кетоконазолот беше утврдена со чување на липозомските формулации на кетоконазол, во фрижидер и на амбиенталната температура (4 °C и 25 °C) и следење на морфолошките карактеристики на формираните липозоми во тек на еден месец.

3.4.5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

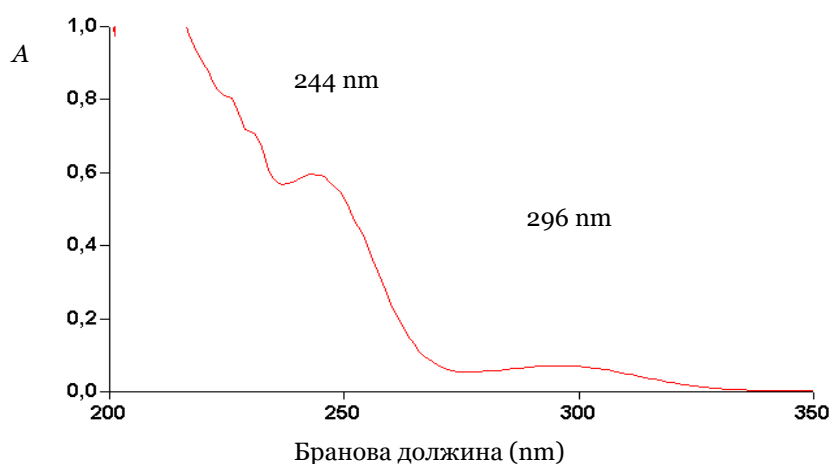
Со цел да се дефинираат значајните разлики меѓу поединечните групи резултати, добиените податоци беа статистички обработени со еднонасочната анализа на варијансата (*Analysis of Variance, ANOVA*) и тестот според *Fisher*, при статистичка сигурност од 95% ($p < 0,05$). Статистичките анализи беа изведени со софтверскиот програм *Statistica (StatSoft, Inc., С.А.Д., version 8.0)*.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. РАЗВОЈ И ВАЛИДИЗАЦИЈА НА СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИОТ МЕТОД

Со цел да се определи инкапсулираноста на имидазолниот антимикотик, кетоконазол во добиените липозомски формулации, беше развиен и валидизиран спектрофотометриски метод.

Во согласност со литературните податоци за растворливоста на кетоконазолот (Velikić *et al.*, 2004) и корелирано со критериумите за еколошка подобност (WHO, 2004), како растворувач беше избран метанолот. На сликата 4.1. е претставен УВ-спектарот на растворот на кетоконазолот во метанол.



Слика 4.1. УВ-спектар на кетоконазол во метанол

Хромофорните групи во кетоконазолот влијаат на неговите спектрални карактеристики (McMurphy, 2004), што резултира во појавување на два апсорпциони максимуми на кетоконазолот растворен во метанол и тоа на 244 nm и 296 nm (Слика 4.1).

Како основни критериуми во валидизирањето на УВ-спектрофотометрискиот метод се земени критериумите кои се однесуваат на линеарноста и опсегот, прецизноста и точноста, репродукцибилноста, границата на детекција, границата на квантификација и робустноста.

Линеарност и опсег за спектрофотометрискиот метод. Поради фотосензитивноста на кетоконазолот и неговата можност за деградација, растворите на активната супстанца кетоконазол беа свежо подготвени во метанол. Опсегот на

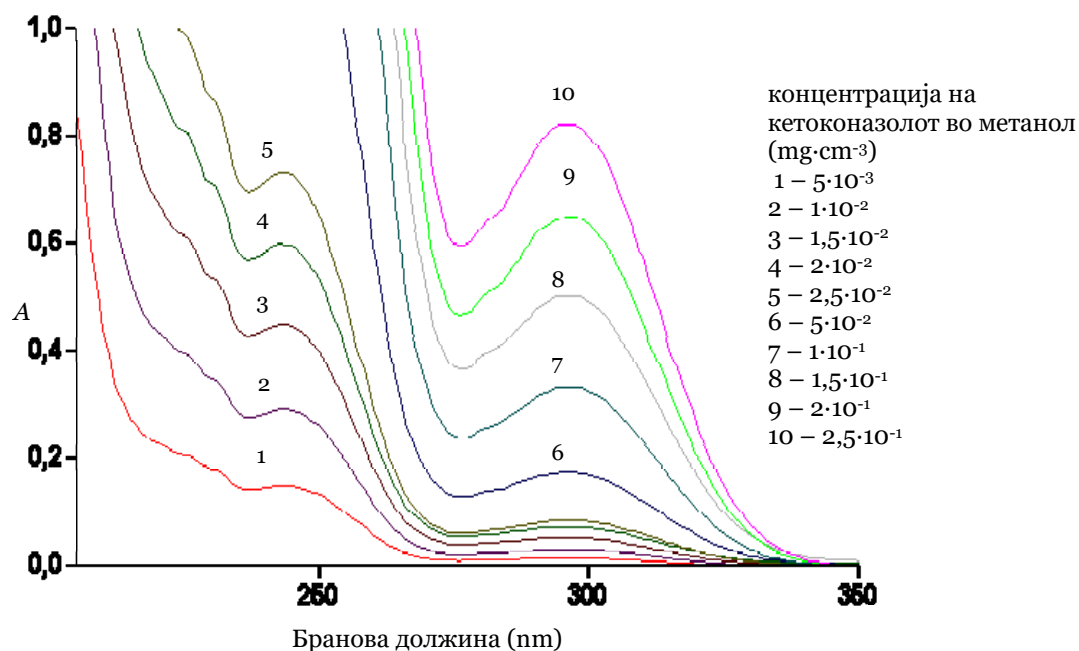
линеарноста со УВ-спектрофотометрискиот метод беше утврден од $5 \cdot 10^{-3}$ до $2,5 \cdot 10^{-2}$ $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ на 244 nm и од $5 \cdot 10^{-2}$ до $2,5 \cdot 10^{-1}$ $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ на 296 nm (Табела 4.1).

Табела 4.1. Линеарност на кетоконазолот во метанол со УВ-спектрофотометриски метод

Бранова должина (nm)						
Концентрација ($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$)	244			296		
	Апсорбанца ¹ \pm SD	RSD (%)	Концентрација ($\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$)	Апсорбанца ¹ \pm SD	RSD (%)	
$5,0 \cdot 10^{-3}$	$0,1511 \pm 6 \cdot 10^{-4}$	0,39	$5,0 \cdot 10^{-2}$	$0,1723 \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	1,11	
$1,0 \cdot 10^{-2}$	$0,3012 \pm 4,9 \cdot 10^{-3}$	0,63	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$0,3416 \pm 4,9 \cdot 10^{-3}$	1,42	
$1,5 \cdot 10^{-2}$	$0,4445 \pm 1,9 \cdot 10^{-3}$	0,43	$1,5 \cdot 10^{-1}$	$0,5062 \pm 6,4 \cdot 10^{-3}$	1,29	
$2,0 \cdot 10^{-2}$	$0,5984 \pm 4,9 \cdot 10^{-3}$	0,84	$2,0 \cdot 10^{-1}$	$0,6658 \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	0,26	
$2,5 \cdot 10^{-2}$	$0,7586 \pm 1,9 \cdot 10^{-3}$	0,23	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$0,8481 \pm 3,7 \cdot 10^{-3}$	0,43	

¹Средна вредност ($n = 3$) \pm стандардна девијација (SD); RSD - релативна стандардна девијација

Спектрите на работните стандардни раствори на кетоконазолот во метанол на 244 nm и на 296 nm се прикажани на сликата 4.2. Утврдените вредности за стандардната девијација (*Standard Deviation, SD*) и за релативната стандардна девијација (*Relative standard deviation, RSD*) се $< 2\%$ (Табела 4.1) се во согласност со Меѓународната конференција за хармонизација (Chan, 2004) со што се потврдува прецизноста во опсегот на линеарноста на методот.



Слика 4.2. УВ-спектри на растворите на кетоконазолот ($5 \cdot 10^{-3}$ – $2,5 \cdot 10^{-1}$ $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) во метанол на линеарноста, на 244 nm ($5 \cdot 10^{-3}$ – $2,5 \cdot 10^{-2}$ $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) и на 296 nm ($5 \cdot 10^{-2}$ – $0,250$ $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$)

Во табелата 4.2 се претставени вредностите за аналитичките податоци валидизирани со еднонасочна анализа на варијансата со $p < 0,05$ сигурност на доверба.

Табела 4.2. Параметри на регресионата анализа и валидизација за УВ-спектрофотометриски метод¹

Параметри на регресиона анализа	Бранова должина (nm)	
	244	296
Наклон (<i>SE</i>) ^a	30,27 (0,35)	3,36 (0,04)
Интервал на доверба на наклон (95%)	29,17; 31,37	3,23; 3,49
Пресек (<i>SE</i>) ^a	- 3,5·10 ⁻³ (5,71·10 ⁻³)	3,9·10 ⁻³ (6,8·10 ⁻³)
Интервал на доверба на отсечок (95%)	- 2,2·10 ⁻³ ; 1,5·10 ⁻²	- 1,8·10 ⁻² ; 2,54·10 ⁻²
Коефициент на корелација (<i>R</i> ²)	0,9995	0,9996
Стандардна грешка	5,56·10 ⁻³	6,23·10 ⁻³
Пресметан <i>F</i> -вредност (критична <i>F</i> -вредност) ^б	16,55 (5,32)	8,32 (5,32)
Параметри за валидизација		
Линеарност (mg·cm ⁻³)	0,005–0,025	0,05–0,25
Граница на детекција (mg·cm ⁻³)	5,97 x 10 ⁻⁴	6,47 x 10 ⁻³
Граница на квантификација (mg·cm ⁻³)	1,81 x 10 ⁻³	19,63 x 10 ⁻³

¹Средна вредност ($n = 3$); ^a*SE* - Стандардна грешка на средната вредност; ^бТеоретска вредност на Fisher (*F*) според ANOVA ($p < 0,05$)

Според утврдените вредности за линеарност на УВ-спектрофотометрискиот метод (Табела 4.1), линеарна зависност е добиена меѓу подготвените раствори на кетоконазолот во метанол. Моларните апсорпциони коефициенти утврдени на 244 nm и 296 nm изнесуваат 15747 L·mol⁻¹·cm⁻¹ и 1795 L·mol⁻¹·cm⁻¹, соодветно (Табела 4.2).

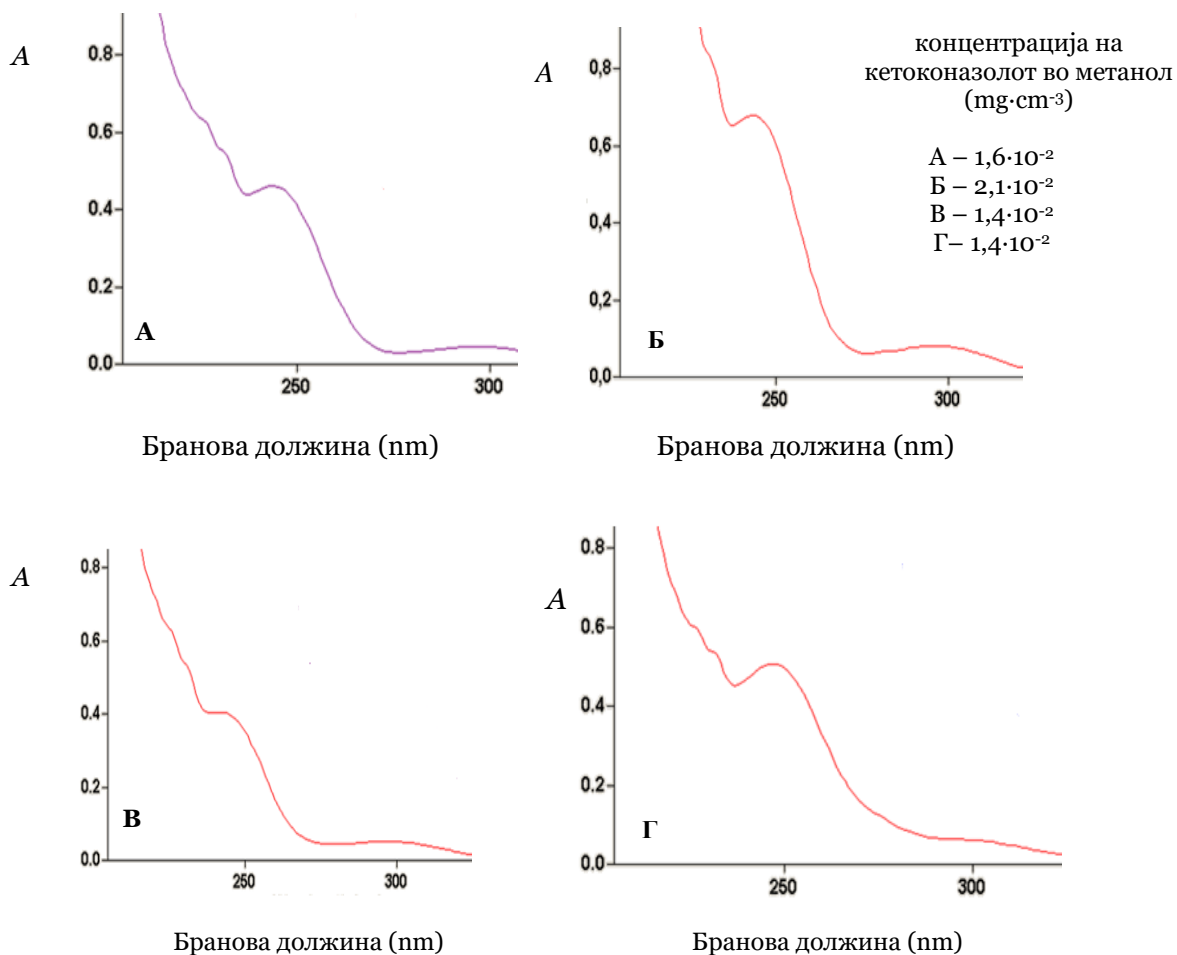
Прецизност за спектрофотометрискиот метод. Резултатите од прецизноста утврдени со УВ-спектрофотометрискиот метод се претставени во табелата 4.3. Утврдените вредности за *RSD* за дневната и меѓудневната прецизност се ниски и се движат во опсег 0,23–2,10%.

Табела 4.3. Резултати за прецизност со УВ-спектрофотометриски метод

Концентрација на кетоконазол во метанол (mg·cm ⁻³)	Дневна ($n = 3$)		Меѓудневна ($n = 3 \times 3$)	
	Утврдена концентрација ¹ ± <i>SD</i> (mg·cm ⁻³)	<i>RSD</i> (%)	Утврдена концентрација ² ± <i>SD</i> (mg·cm ⁻³)	<i>RSD</i> (%)
5,0·10 ⁻³	5,11·10 ⁻³ ± 1 x 10 ⁻⁶	0,38	5,12·10 ⁻³ ± 90 x 10 ⁻⁶	1,80
1,0·10 ⁻²	1,10·10 ⁻² ± 160 x 10 ⁻⁶	1,62	1,1·10 ⁻² ± 160 x 10 ⁻⁶	1,58
1,5·10 ⁻²	1,49·10 ⁻² ± 60 x 10 ⁻⁶	0,43	1,51·10 ⁻² ± 290 x 10 ⁻⁶	1,90
2,0·10 ⁻²	1,90·10 ⁻² ± 160 x 10 ⁻⁶	0,82	1,9·10 ⁻² ± 350 x 10 ⁻⁶	1,73
2,5·10 ⁻²	2,60·10 ⁻² ± 60 x 10 ⁻⁶	0,23	2,5·10 ⁻² ± 520 x 10 ⁻⁶	2,05
5,0·10 ⁻²	5,10·10 ⁻² ± 550 x 10 ⁻⁶	1,11	5,09·10 ⁻² ± 1,07 x 10 ⁻³	2,10
1,0·10 ⁻¹	1,10·10 ⁻¹ ± 4,61 x 10 ⁻³	1,47	1,1·10 ⁻¹ ± 1,01 x 10 ⁻³	0,98
1,5·10 ⁻¹	1,51·10 ⁻¹ ± 1,91 x 10 ⁻³	1,28	1,5·10 ⁻¹ ± 2 x 10 ⁻³	1,31
2,0·10 ⁻¹	1,90·10 ⁻¹ ± 550 x 10 ⁻⁶	0,29	1,9·10 ⁻¹ ± 1,61 x 10 ⁻³	0,83
2,5·10 ⁻¹	2,51·10 ⁻¹ ± 1,1 x 10 ⁻³	0,43	2,51·10 ⁻¹ ± 1,36 x 10 ⁻³	0,52

¹Средна вредност ($n = 3$) ± стандардна девијација (*SD*); ²Средна вредност ($n = 9$) ± стандардна девијација (*SD*); *SD* - стандардна девијација; *RSD* - релативна стандардна девијација

Точност на спектрофотометрискиот метод. На сликата 4.3 се прикажани УВ-спектрите на растворите од фармацевтските производи на кетоназолот во метанол и тоа: таблети (А), крем (Б), шампон 1 (В) и шампон 2 (Г) во линеарен опсег на бранова должина од 244 nm и 296 nm.



Слика 4.3. УВ-спектри на раствори на таблети (А), крем (Б), шампон 1 (В) и шампон 2 (Г) во метанол

Аналитичките приноси на кетоназолот во анализираниите фармацевтски производи се претставени во табелата 4.4 и истите се во согласност со декларираното количество во соодветниот фармацевтски производ. Утврдените аналитички приноси се движат во опсег 93,12–96,86% за таблети, 93,91–98,89% за кремот на кетоназолот, односно од 110,45–112,91% и 101,02–111,61% за шампонот 1 и шампонот 2, соодветно.

Табела 4.4. Аналитички приноси на кетоконазолот во комерцијални фармацевтски производи утврдени со УВ-спектрофотометриски метод

Комерцијален производ	Декларирано количество кетоконазол во производот	Бранова должина (nm)	
		244	296
		Аналитички принос ¹ (%)	
Таблети	200 mg кетоконазол/1 таблета	93,12	96,86
Крем	20 mg кетоконазол/1 g крем	98,89	93,91
Шампон 1	20 mg кетоконазол/1 cm ³ шампон	112,91	110,45
Шампон 2	20 mg кетоконазол/1 g шампон	101,02	111,61

¹Средна вредност ($n = 3$)

Точноста на УВ-спектрофотометрискиот метод е утврдена и со методот на стандардна адиција на три нивоа 80, 100 и 120% (Табела 4.5). При тоа беше утврдено дека аналитичките приноси за комерцијалните фармацевтски производи на кетоконазолот се движат од 90 до 120% во пропишаните вредностите од Меѓународна конференција за хармонизација (ICH, 2005). Репродуцибилноста на методот е потврдена со ниската релативна стандардна девијација која е < 2%.

Табела 4.5. Аналитички приноси на кетоконазолот во комерцијални фармацевтски производи утврдени со УВ-спектрофотометрискиот метод по методот на стандардна адиција

Примерок	Бранова должина (nm)	Ниво на додаден кетоконазол (%)	Аналитички принос ¹ (%)	<i>RSD</i> (%)
Таблети	244	80	101,16	0,41
		100	102,92	0,13
		120	103,64	0,71
	296	80	99,54	1,25
		100	97,42	0,63
		120	99,81	1,33
Крем	244	80	97,19	0,69
		100	93,91	0,23
		120	93,82	0,75
	296	80	93,52	1,07
		100	93,72	0,42
		120	96,01	0,72
Шампон 1	244	80	109,99	1,09
		100	109,91	0,89
		120	111,52	0,21
	296	80	113,11	1,09
		100	112,31	0,24
		120	109,16	1,19
Шампон 2	244	80	105,43	1,57
		100	102,64	0,37
		120	102,65	0,61
	296	80	110,39	1,99
		100	110,32	1,58
		120	109,96	1,68

¹Средна вредност ($n = 3$); *RSD* - релативна стандардна девијација

Граница на детекција и граница на квантификација на спектрофотометрискиот метод. Вредностите утврдени за границите на детекција и квантификација на кетоназолот со развиениот УВ-спектрофотометриски метод кои се претставени во табелата 4.2, изнесуваат $597 \times 10^{-6} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ и $1,81 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ на брановата должина 244 nm и $6,47 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ и $19,63 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ на брановата должина 296 nm, соодветно.

Робустност на спектрофотометрискиот метод. Робустноста на развиениот УВ-спектрофотометриски метод беше оценета со испитување на влијането на брановата должина изменета од нултото ниво (244 и 296 nm) за ± 3 nm. Вредностите за количеството на кетоназолот во стандардните раствори и растворите подготвени од комерцијалните фармацевтски производи, утврдени на 241, 244, 247 nm и на 293, 296, 299 nm, се претставени во табелата 4.6.

Табела 4.6. Резултати од робустност за УВ-спектрофотометриски метод

Параметри	Минимално ниво (-)	Основно ниво (0)		Максимално ниво (+)						
I – 244 nm	293	296		299						
II – 296 nm	241	244		247						
	Работни стандардни раствори	Таблети	Крем	Шампон 1	Шампон 2					
Концентрација на кетоназолот ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$)										
I	$1\cdot 10^{-1}$	$1,6\cdot 10^{-1}$	$2,2\cdot 10^{-1}$	$1,1\cdot 10^{-1}$	$8,4\cdot 10^{-2}$					
II	$1\cdot 10^{-2}$	$1,6\cdot 10^{-2}$	$2,2\cdot 10^{-2}$	$1,1\cdot 10^{-2}$	$1,1\cdot 10^{-2}$					
A – Апсорбанца; АП – Аналитички принос (%)										
	A	A	АП	A	АП					
I	-	0,33	0,49	91,92	0,66	91,21	0,41	109,02	0,31	107,71
	0	0,34	0,49	92,04	0,67	90,34	0,42	107,64	0,32	109,99
	+	0,31	0,48	92,21	0,59	91,87	0,41	105,03	0,33	109,94
II	-	0,29	0,44	91,11	0,67	101,79	0,39	92,98	0,34	99,89
	0	0,31	0,43	93,33	0,69	103,53	0,31	97,52	0,31	95,11
	+	0,28	0,45	91,01	0,61	101,61	0,34	98,99	0,32	94,12

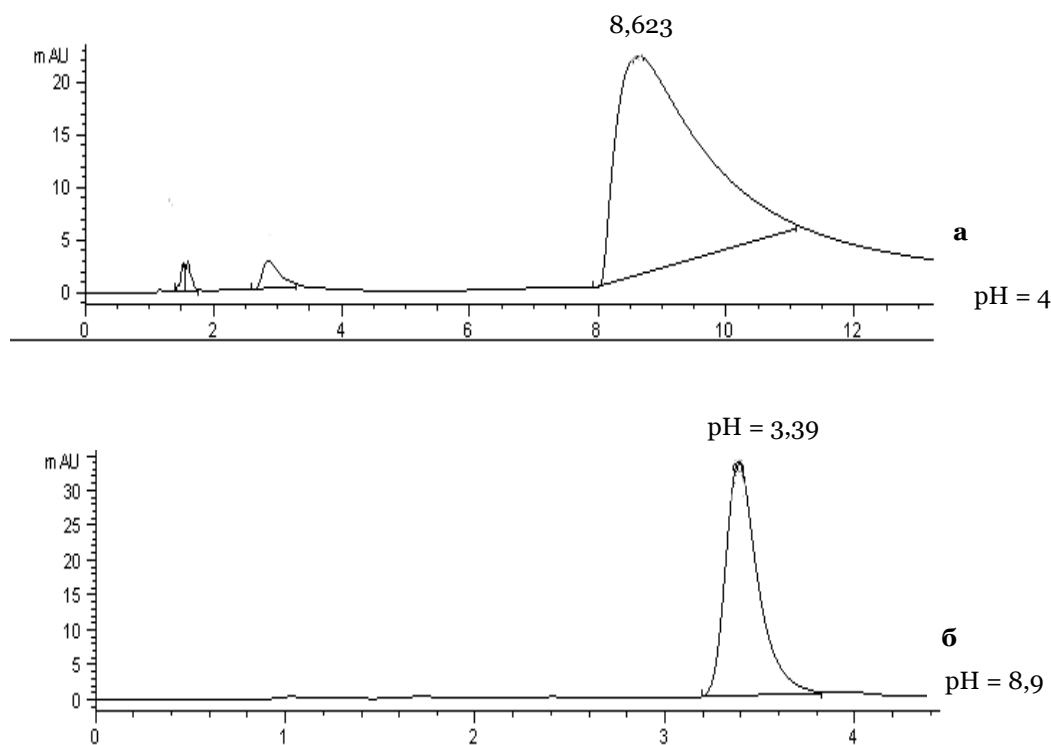
Утврдените вредности за аналитичкиот принос на кетоназолот во анализираните примероци се движеа во граници од 90,34 до 109,99%, односно во пропишаните вредностите од Меѓународна конференција за хармонизација (од 90 до 120%, Chan 2004). При тоа беше потврдена робустноста на развиениот УВ-спектрофотометриски метод. Развиениот и валидизираните УВ-спектрофотометриски метод за директно квантитативно определување на кетоназолот во комерцијалните фармацевтски производи и тоа: во крем, шампони и таблети е едноставен, брз, прецизен, точен и осетлив. И покрај тоа што вредностите за LOD и LOQ утврдени на 244 nm се пониски споредено со истите на 296 nm, согласно поголемиот број на чекори во методот на 244 nm во насока на повисоката вредност за апсорбанцата и потребата за разредување на примерокот, како и поголемото потрошено количество метанол, се препорачува квантификацијата на кетоназолот да се изведува на 296 nm.

4.2. РАЗВОЈ И ВАЛИДИЗАЦИЈА НА HPLC МЕТОД

Во развојот на методот со високоефикасна течна хроматографија како мобилна фаза беше воведен метанолот од аспект на цената на чинење и еколошката придобивка, наспроти ацетонитрилот како најчесто користен растворувач (Jat *et al.*, 2012). Истовремено беше земена предвид растворливоста на кетоконазолот во метанолот, утврдена со спектрофотометрискиот метод (Поглавје 4.1).

Имајќи ја предвид структурата и карактеристиките на кетоконазолот, поларноста на метанолот како мобилна фаза беше изменувана со вода и се утврди најповолен однос на метанол и вода од 90:10 *v/v*.

Влијанието на рН врз елуирањето на кетоконазолот беше утврдено со примена на мобилна фаза со рН вредност од 4 и 8,9. Изгледот на хроматограмите добиени со мобилната фаза во состав метанол и вода од 90:10 *v/v* со рН вредност од 4 и 8,9 е претставен на сликата 4.4.



Слика 4.4. HPLC-хроматограм на кетоконазол во мобилна фаза метанол и вода (90:10 *v/v*) со рН вредност од 4 (а) и 8,9 (б)

Протонирањето во киселата и изразито високата стабилност во базната средина (Vojič *et al.*, 2005), причинува пикот на кетоконазолот елуиран со закиселената мобилна фаза (рН = 4) да е широк (Слика 4.4а), наспроти симетричниот пик добиен на

pH = 8,9 (Слика 4.4б). Ретенционо време утврдено за кетоконазолот со мобилна фаза со 8,89 pH вредност беше 3,4 min.

Линеарноста и опсегот, прецизноста и точноста, репродуцибилноста, границата на детекција, границата на квантификација и робустност на методот се земени како критериуми во валидизирањето на хроматографскиот метод.

Линеарност и опсег за високоефикасен течен хроматографски метод.

Линеарноста на хроматографскиот метод беше определувана на 230, 244 и 296 nm за концентрациски опсег на кетоконазолот во метанол од 0,05 до 0,25 mg·cm⁻³. Вредностите за RSD се помали од 2% и се движат од 0,02 до 0,3 (Табела 4.7).

Табела 4.7. Линеарност на HPLC методот

Концентрација на кетоконазол во метанол (mg·cm ⁻³)	Бранова должина (nm)					
	230		244		296	
	Површина (mAU·s) ¹ ± SD	RSD (%)	Површина (mAU·s) ¹ ± SD	RSD (%)	Површина (mAU·s) ¹ ± SD	RSD (%)
5,0·10 ⁻²	2210 ± 5,8·10 ⁻¹	0,06	1701 ± 5,7·10 ⁻¹	0,03	189 ± 0,54	0,30
1,0·10 ⁻¹	4714 ± 5,9·10 ⁻¹	0,02	3599 ± 5,7·10 ⁻¹	0,02	384 ± 0,36	0,10
1,5·10 ⁻¹	7088 ± 5,6·10 ⁻¹	0,02	5364 ± 5,6·10 ⁻¹	0,04	548 ± 0,57	0,13
2,0·10 ⁻¹	10016 ± 5,5·10 ⁻¹	0,04	7332 ± 5,9·10 ⁻¹	0,02	720 ± 0,58	0,09
2,5·10 ⁻¹	12479 ± 2,9·10 ⁻¹	0,04	8978 ± 5,8·10 ⁻¹	0,03	883 ± 1,16	0,14

¹Средна вредност (n = 3) ± стандардна девијација; SD - стандардна девијација; RSD - релативна стандардна девијација

Во табелата 4.8 вредностите за параметрите добиени со регресионата анализа при валидизацијата на HPLC методот. Линеарноста на методот е потврдена со високата вредност на коефициентот на детерминација (R²), кој изнесува 0,9999, 0,9993 и 0,9995, соодветно, на брановата должина од 230, 244 и 296 nm.

Табела 4.8. Параметри на регресионата анализа и валидизација за HPLC методот¹

Параметри на регресиона анализа	Бранова должина (nm)		
	230	244	296
Наклон (SE) ^a	51692 (952)	36576 (524,28)	3450 (62,04)
Интервал на доверба на наклон (95%)	4866; 5472	34907,49; 38244	3252,55; 3647,45
Пресек (SE) ^a	-455 (158)	-93,4 (86,94)	25,9 (10,29)
Интервал на доверба на отсечок (95%)	-958; 47,05	-370,091; 183,29	-6,84; 58,64
Коефициент на корелацијата (R ²)	0,9999	0,9993	0,9995
Стандардна грешка	150,53	82,89	9,81
Пресметан F – вредност (критична F – вредност) ^б	15,93 (5,98)	29,18 (5,98)	34,25 (5,99)
Параметри за валидизација			
Линеарност (mg·cm ⁻³)	0,05–0,25	0,05–0,25	0,05–0,25
Граница на детекција (mg·cm ⁻³)	9,61 x 10 ⁻³	7,48 x 10 ⁻³	9,383 x 10 ⁻³
Граница на квантификација (mg·cm ⁻³)	29,12 x 10 ⁻³	22,66 x 10 ⁻³	28,43 x 10 ⁻³

¹Средна вредност (n = 3); ^aSE - Стандардна грешка на средната вредност; ^бТеоретска вредност на Fisher (F) според ANOVA со p < 0,05

Во понатамошната фаза, прецизноста, точноста и робусноста на *HPLC* методот беа утврдени на бранова должина од 296 nm, со цел да се споредат аналитичките приноси на кетанолозот во примероците добиени со спектрофотометрискиот метод.

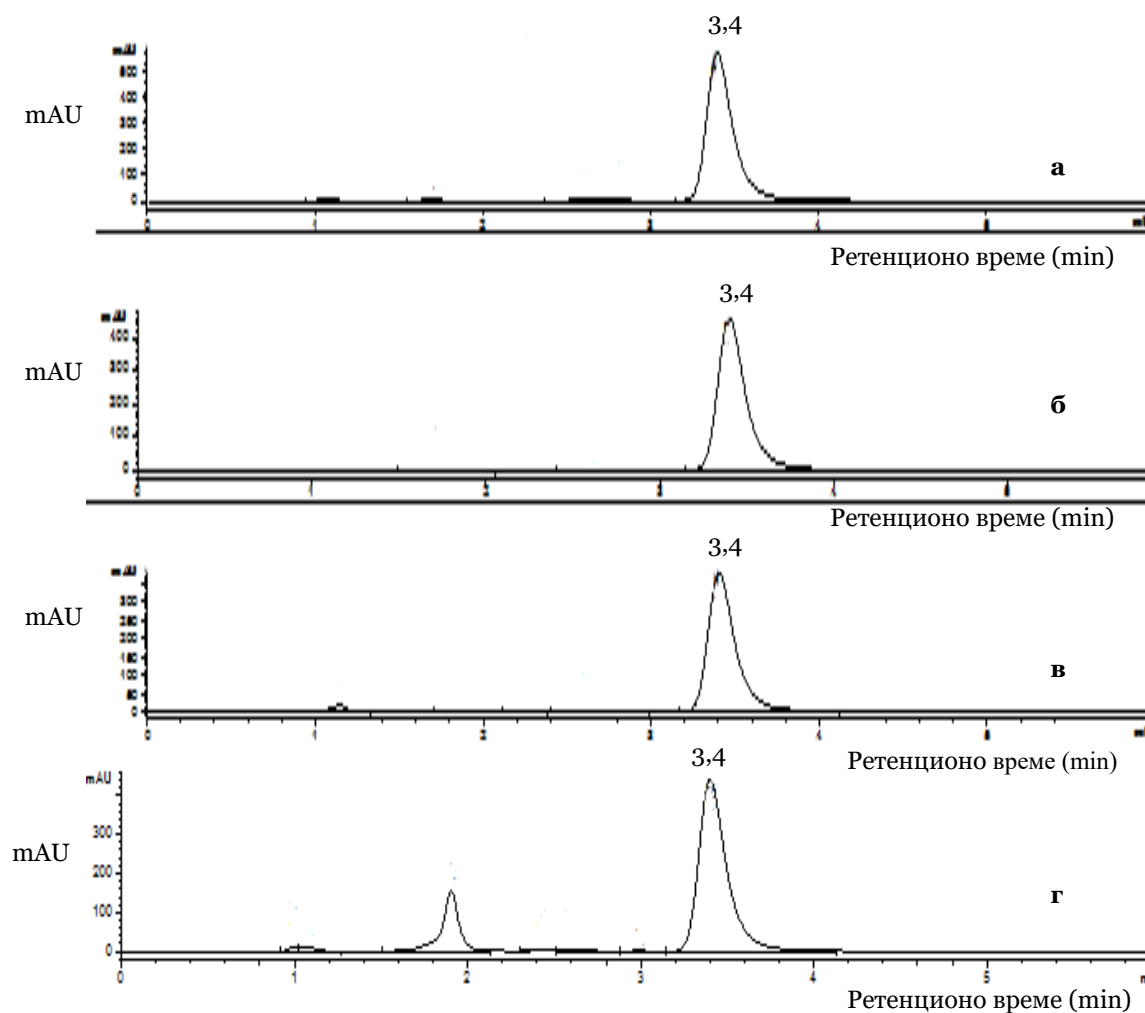
Прецизност на *HPLC* методот. Вредностите утврдени за релативната стандардна девијација, $RSD < 2\%$, истовремено ја потврдуваат репродукцибилноста на развиениот *HPLC* метод. Во опсегот на концентрацијата на кетоконазолот во метанолот од 0,05 до 0,25 mg·cm⁻³, вредностите за RSD добиени при утврдувањето на дневната повторливост се движат од 0,09 до 0,32%, додека за меѓудневната прецизност од 0,11 до 1,73% (Табела 4.9).

Табела 4.9. Резултати од прецизност со *HPLC* методот (296 nm)

Концентрација на кетоконазол во метанол (mg·cm ⁻³)	Дневна (n = 3)		Меѓудневна (n = 3 x 3)	
	Утврдена концентрација ¹ ± SD (mg·cm ⁻³)	RSD (%)	Утврдена концентрација ² ± SD (mg·cm ⁻³)	RSD (%)
5,0·10 ⁻²	4,9·10 ⁻¹ ± 1,60 x 10 ⁻⁶	0,32	4,91·10 ⁻¹ ± 810 x 10 ⁻⁶	1,73
1,0·10 ⁻¹	1,1·10 ⁻¹ ± 100 x 10 ⁻⁶	0,12	1·10 ⁻¹ ± 510 x 10 ⁻⁶	0,50
1,5·10 ⁻¹	1,51·10 ⁻¹ ± 170 x 10 ⁻⁶	0,13	1,51·10 ⁻¹ ± 980 x 10 ⁻⁶	0,66
2,0·10 ⁻¹	2,1·10 ⁻¹ ± 170 x 10 ⁻⁶	0,09	2·10 ⁻¹ ± 200 x 10 ⁻⁶	0,11
2,5·10 ⁻¹	2,4·10 ⁻¹ ± 340 x 10 ⁻⁶	0,11	2,41·10 ⁻¹ ± 520 x 10 ⁻⁶	0,22

¹Средна вредност (n = 3) ± стандардна девијација (SD); ²Средна вредност (n = 9) ± стандардна девијација (SD); SD - стандардна девијација; RSD - релативна стандардна девијација

Точност на *HPLC* методот. На сликата 4.5 се претставени хроматограмите на анализираните примероци од фармацевтските производи на кетоконазолот. Утврденото ретенционо време на кетоконазолот беше 3,4 min. Изгледот на пикот за кетоконазолот во примероците од фармацевтските производи и тоа: таблети, крем и шампон, е идентичен со истиот на растворите подготвени од кетоконазолот како стандард (Слика 4.4б), со што се потврдува дека со соодветната мобилна фаза (метанол и вода) и RP-18 е постигнато селективно раздвојување на кетоконазолот од останатите супстанции присутни во комерцијалните фармацевтски производи.



Слика 4.5. Хроматограми на раствори на таблети (а), крем (б), шампон 1 (в) и шампон 2 (г) во метанол на 296 nm

Аналитичките приноси за кетоконазолот во примероците од фармацевтските производи утврдени со *HPLC* методот се 95,86% за таблети, 102,79 за крем, 95,42% и 105,22% за шампон 1 и шампонот 2, соодветно (Табела 4.10). Истите се во согласност со вредностите пропишани од Меѓународна конференција за хармонизација (ICH, 2005), 90–120% со што е потврдена точноста на методот.

Табела 4.10. Аналитички приноси¹ со примена на *HPLC* метод

Комерцијален производ	Декларирано количество кетоконазол во производот	Бранова должина (nm)
		296
		Аналитички принос ¹
Таблети	200 mg кетоконазол/1 таблета	95,86
Крем	20 mg кетоконазол/1 g крем	102,79
Шампон 1	20 mg кетоконазол/1 cm ³ шампон	95,42
Шампон 2	20 mg кетоконазол/1 g шампон	105,22

¹Средна вредност ($n = 3$)

Во табела 4.11 се претставени аналитички приноси на фармацевтските производи на кетоконазолот утврдени со методот на стандардна адиција на 296 nm.

Табела 4.11. Резултати од аналитичките приноси на кетоконазолот во комерцијални фармацевтски производи со *RP-HPLC* методот на 296 nm

Примерок	Ниво на додаден кетоконазол (%)	Аналитички принос ¹ (%)	RSD (%)
Таблети	0	96,11	1,03
	80	108,61	0,51
	100	109,67	0,50
	120	111,69	0,49
Крем	0	96,85	1,11
	80	102,21	0,19
	100	99,71	0,21
	120	99,31	1,15
Шампон 1	0	98,12	0,10
	80	101,42	0,35
	100	99,61	0,11
	120	101,33	0,06
Шампон 2	0	98,41	0,44
	80	102,64	0,14
	100	106,57	0,06
	120	108,34	0,32

¹Средна вредност ($n = 3$); RSD - релативна стандардна девијација

Со методот на стандардната адиција се утврдени аналитичките приноси на производите со кетоконазолот во опсег од 96,11 до 108,34% и се во согласност со пропишаните вредности (90–120%; ICH, 2005).

Граница на детекција и граница на квантификација на *HPLC* методот. Вредностите за границата на детекција и границата на квантификација на развиениот *RP-HPLC* метод се $9,61 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ и $29,12 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ на 230 nm, $7,48 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ и $22,66 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ на 244 nm и $9,38 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ и $28,43 \times 10^{-3} \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ на 296 nm, соодветно (Табела 4.8).

Робустност за *HPLC* методот. Вредностите на работните услови за утврдување на робустноста на методот се претставени во табелата 4.12.

Табела 4.12. Резултати од робустност за *HPLC* метод

Примерок	Температура на колоната (°C)	Проток на мобилната фаза ($\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$)	Аналитички принос ¹ на 296 nm (%)	RSD (%)
Таблети	25	1,0	96,98	0,19
	25	0,9	95,49	0,47
	23	0,9	95,60	0,24
Крем	25	1,0	101,88	0,11
	25	0,9	97,61	0,52
	23	0,9	99,53	0,46
Шампон 1	25	1,0	95,54	0,48
	25	0,9	97,61	0,51
	23	0,9	96,82	0,14
Шампон 2	25	1,0	104,37	0,22
	25	0,9	102,21	0,41
	23	0,9	103,56	0,33

¹Средна вредност ($n = 3$); RSD - релативна стандардна девијација

Количеството на пробата и рН на мобилната фаза изнесуваа 20 μdm^3 и 8,89, соодветно. Робустноста беше испитана при температура на колоната од 23 °C и 25 °C и проток на мобилната фаза од 0,9 и 1 $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$.

Протоколот и соодносот на мобилната фаза се значајни за добивање на пикови кои не се завлечени, додека испитувањата покажаа дека температурата на колоната од 25 до 30 °C и промената на рН вредноста на средината од 7,5 до 8,9 битно не влијае на ретенционото време на кетоконазолот кое е утврдено на 3,4 min. При температура на колоната од 27 °C и проток на мобилната фаза од 1,1 $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, аналитичките приноси за примероците од таблетите, кремот, шампон 1 и шампон 2 беа 77,55%, 84,69%, 77,39% и 85,43%. Најоптималниот протоколот на мобилната фаза беше 1 $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ (Табела 4.12).

Развиениот и валидизиран хроматографски метод е брз, едноставен и репродуцибилен кој може да се применува во определувањето на кетоконазолот во фармацевтските производи. Со примена на мобилната фаза составена од метанол и вода со корегирана рН вредност (8,89), кетоконазолот останува стабилен во својата молекулска форма. Во литературата, определувањето на кетоконазолот во шампоните (Staub *et al.*, 2005) и таблетите (Velikinac *et al.*, 2004) се изведува во кисела средина која причинува негово протонирање и формирање на имидазол и ацетамид како деградациони супстанции (Darani & Mozafari, 2009). Користењето на метанолот во развиениот и валидизиран метод, претставува еколошка придобивка во споредба со ацетонитрилот како најчесто користена мобилна фаза (Jat *et al.*, 2012).

4.3. ЛИПОЗОМСКИ ФОРМУЛАЦИИ НА КЕТОКОНАЗОЛОТ

Со цел да се подготват и развијат липозомските формулации од кетоназол, со примена на тенко-филмен хидратационен, ултразвучен и инјекционен метод, прелиминарните испитувања беше утврдена растворливоста на кетоконазолот и холестеролот во различни растворувачи како што се метанол, хлороформ и етил ацетат. Истовремено, валидизираните спектрофотометриски метод (Поглавје 4.1) и хроматографскиот метод (Поглавје 4.2) беа проверени во насока на утврдување на влијанието на составните компоненти на липозомите, холестер и фосфолипид, врз репродукцибилноста на вредностите за инкапсулираното количество на кетоконазолот во липозомските везикули.

Кетоконазолот, холестеролот и фосфолипидот се раствораат во хлороформ и метанол и делумно во етил ацетат. Во понатамошното истражување, во корелација со средна летална доза (*Lethal Dose, LD₅₀*) метанолот е избран како најподобен растворувач за подготовка на липозомите од кетоконазол (Ogbuehi *et al.*, 2015).

Спектроскопските карактеристики, односно, апсорпционите максимуми (λ_m) на холестеролот и фосфолипидот во метанол, се утврдени на 235 nm и 240 nm, соодветно. Согласно блиските апсорпциони максимуми на холестеролот и фосфолипидот, споредено со апсорпционите максимуми на кетоконазолот на 230 nm и 244 nm и можноста за интерферирање, брановата должина од 296 nm беше користена во утврдувањето на количеството на инкапсулиран кетоконазол во липозомите.

Во спектрофотометрискиот метод на бранова должина од 296 nm, со проверување на параметрите од валидизацијата, како што се линеарност и прецизност се овозможи потврдување на примената на методот за квантификација на кетоконазолот во липозомите. Вредностите за апсорбанцата на кетоконазол во метанол во концентрациски опсег од 0,05 до 0,25 mg·cm⁻³ се претставени во табелата 4.13. Утврдените вредности за *RSD* се во граница од 0,28 до 1,43%.

Табела 4.13. Линеарност на УВ-спектрофотометриски метод на 296 nm

Концентрација на кетоконазол во метанол (mg·cm ³)	Апсорбанца ¹ ± <i>SD</i>	<i>RSD</i> (%)
5,0·10 ⁻²	0,1721 ± 1,90	1,07
1,0·10 ⁻¹	0,3419 ± 4,90	1,43
1,5·10 ⁻¹	0,5063 ± 6,30	1,27
2,0·10 ⁻¹	0,6657 ± 1,90	0,28
2,5·10 ⁻¹	0,8482 ± 3,80	0,44

¹Средна вредност ($n = 3$) ± стандардна девијација; (*SD*) - стандардна девијација;
RSD - релативна стандардна девијација

Во табелата 4.14 се прикажани податоците за параметрите од регресионата анализа и валидизацијата на спектрофотометрискиот метод на 296 nm, утврдени со примена на статистичката пресметка според ANOVA.

Вредноста за коефициент на корелација ($R^2 = 0,9996$) и пресметаната вредност на параметарот од Fisher тестот поголема од критичната вредност ($17,88 > 5,32$), потврдуваат дека избраниот спектрофотометрискиот метод за квантификација на кетоконазолот е линеарен (Табела 4.14).

Табела 4.14. Параметри на регресионата анализа и валидизација за УВ-спектрофотометриски метод¹ на 296 nm

Регресиона анализа	
Наклон (SE)^a	0,00335 ($4,03 \times 10^{-5}$)
Интервал на доверба на наклон (95%)	0,00322; 0,00348
Пресек (SE)^a	0,00404 (0,00669)
Интервал на доверба на пресек (95%)	-0,01724; 0,02532
Коефициент на корелација (R^2)	0,9996
Стандардна грешка	$6,38 \times 10^{-3}$
Пресметан F-вредност (критична F-вредност)⁶	17,8784 (5,3177)

¹Средна вредност ($n = 3$); ^aSE - стандардна грешка; ^bТеоретска вредност на Fisher (F) според ANOVA ($p < 0,05$)

Вредностите на експериментално утврденото количество на кетоконазолот во метанол добиени при оценување на прецизноста на методот, дневна и меѓудневна прецизност, се претставени во табелата 4.15. Вредностите за RSD се во граница од 0,07 до 1,43% и се помали од 2%, како што е пропишано од Меѓународната конференција за хармонизација (ICH, 2005).

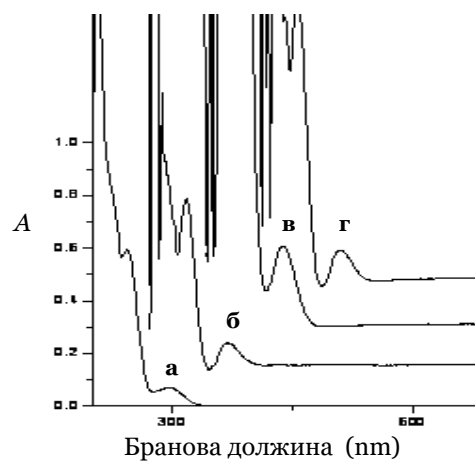
Табела 4.15. Прецизност на УВ-спектрофотометриски метод на 296 nm

Концентрација на кетоконазол во метанол (mg·cm³)	Дневна прецизност ($n = 3$)		Меѓудневна прецизност ($n = 3 \times 3$)	
	Експериментална концентрација¹ ± SD (mg·cm³)	RSD (%)	Експериментална концентрација² ± SD (mg·cm³)	RSD (%)
$5,0 \cdot 10^{-2}$	50,41 ± 1,86	1,07	50,73 ± 3,59	0,07
$1,0 \cdot 10^{-1}$	101,11 ± 4,91	1,43	101,32 ± 3,57	0,98
$1,5 \cdot 10^{-1}$	150,19 ± 6,42	1,27	151,23 ± 6,69	0,31
$2,0 \cdot 10^{-1}$	197,01 ± 1,86	0,28	97,01 ± 9,41	0,42
$2,5 \cdot 10^{-1}$	252,18 ± 3,71	0,44	252,81 ± 4,57	0,54

¹Средна вредност ($n = 3$) ± стандардна девијација (SD); ²Средна вредност ($n = 9$) ± стандардна девијација (SD); SD - стандардна девијација; RSD - релативна стандардна девијација

Согласно утврдените вредности на параметрите за валидизацијата на методот и тоа: линеарност и прецизност, спектрофотометрискиот метод на бранова должина од 296 nm е репродуцибилен.

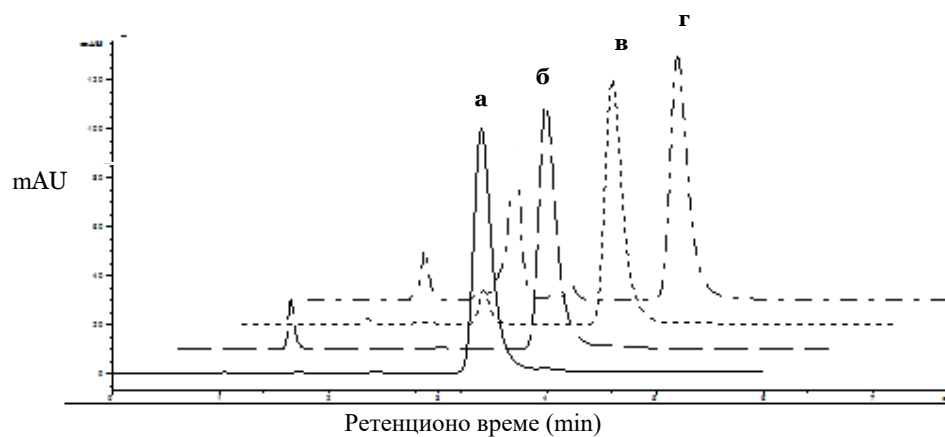
На сликата 4.6 се прикажани УВ-спектрите на растворите во метанол на кетоназолот како стандард и на липозомските формулации подготвени со примена на методот на тенко-филмна хидратација, и на ултразвучниот и инјекциониот метод.



Слика 4.6. УВ-спектри на растворот на кетоназол (а), кетоназол инкапсулиран во липозомите користејќи тенко-филмен хидратационен (б), ултразвучен (в) и инјекционен (г) метод на 296 nm

Апсорциониот максимум на кетоназолот во метанол (Слика 4.6 а) и во липозомите (Слика 4.6 б,в,г) е утврден на 296 nm, со што се потврдува дека другите супстанции вклучени во липозомските формулации не влијаат врз квантификацијата на инкапсулираниот кетоназол.

Хроматограмите на растворите во метанол на кетоназолот како стандард и на липозомските формулации добиени со методот на тенко-филмна хидратација, и на ултразвучниот и инјекциониот метод, се претставени на сликата 4.7.



Слика 4.7. Хроматограми на раствори на кетоназол како стандард (а) и на липозомските формулации добиени со тенко-филмен хидратационен (б), ултразвучен (в) и инјекционен (г) метод

Од добиените хроматограми се утврдува дека пиковите за кетоконазолот како стандард и кетоконазолот инкапсулиран во липозомските везикули се симетрични, и времето на елуирање на кетоконазолот со мобилната фаза составена од метанол и вода (90:10 v/v, pH = 8,89) е 3,4 min (Слика 4.7).

Вредностите за инкапсулираното количество на кетоконазолот утврдени со примена на ортогоналниот хроматографски метод се во согласност со вредностите утврдени со УВ-спектрофотометриски метод.

За развиените и валидизирани аналитички методи е задоволен параметарот робустност, со што истите може да се применуваат во оценувањето на ефикасноста за инкапсулирањето на кетоконазолот во липозомските везикули.

4.3.1. КАРАКТЕРИСТИКИ НА ЛИПОЗОМИТЕ ДОБИЕНИ СО ТЕНКО-ФИЛМЕН ХИДРАТАЦИОНЕН МЕТОД

Во подготовката на липозомската формулација, најнапред се испитуваше влијанието на типот на растворувачот и неговото количество, врз квалитативните карактеристики на липозомите кои беа оценети со утврдувањето на изгледот на липозомите, како и на нивната стабилност определена со мерење на површинскиот напон односно ζ -потенцијалот.

Транзиционата температура или температурата на претворба како параметар за промената во структурата на липидната мембрана од гел во флуидна состојба, односно ориентирање на јаглородните низи од строго определена во рандом состојба, беше избрана над сите транзициони температури во системот, односно 80 °C. Со цел хидратацијата да се одвива во период од 1 h, а при тоа да не се наруши липозомската формулација, температурата беше оптимизирана на 65 °C, согласно Sulkowski *et al.* (2005).

Во табелата 4.16 се претставени вредностите за ζ -потенцијалот и електричната спроводливост на липозомите од кетоконазол подготвени со растворувачите: хлороформ, етил ацетат и метанол и сончогледово масло како извор на фосфолипид. (Табела 4.16).

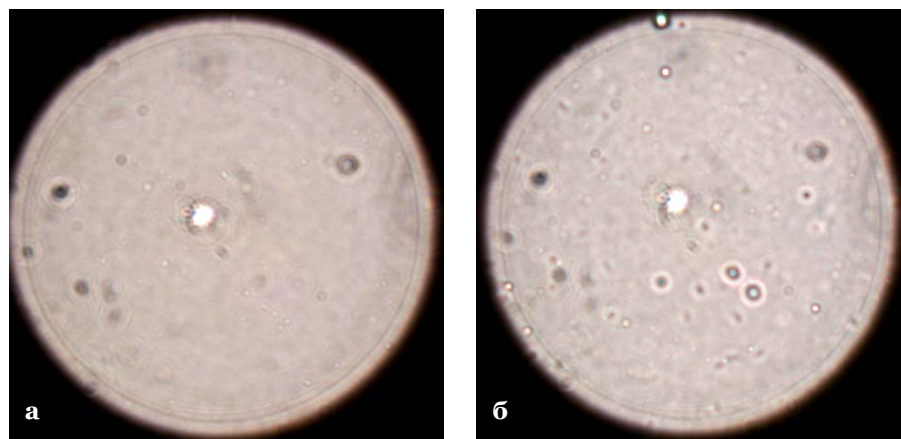
Табела 4.16. Карактеристики на липозомски формулации на кетоконазол

Примерок	КТ (mg)	СМ (mg)	ХЛ (mg)	Растворувач (cm ³)	ζ-потенцијал (mV)	ЕС (μS·cm ⁻¹)
а	20	517	20	10*	- 28,36	9,35
б	20	501	20	10*	- 24,06	9,02
в	20	513	20	10**	- 18,03	9,75
г	21,7	327	21,1	10***	- 23,71	13,45
д	20	200	20	10***	- 19,92	14,53
ѓ	20	516,3	20	5*	- 30,95	8,95
е	20	501	20	3,5* + 3,5***	- 23,01	12,05
ж	/	513,7	20	10***	- 14,26	18,00

КТ - кетоконазол; ХЛ - холестерол; СМ - сончогледово масло; *Хлороформ, **Етил ацетат; ***Метанол; ЕС - електрична спроводливост

Липозомите подготвени со тенко-филмниот хидратационен метод и хлороформ како растворувач, се карактеризираат со најголема вредност за ζ-потенцијалот од - 28,36 mV (Табела 4.16, примерок а). Најниска вредност за ζ-потенцијалот (- 18,03 mV) е утврдена во липозомите за кои е користен етил ацетатот (Табела 4.16, примерок в). За липозомите во кои е применет метанолот е измерена вредност за ζ-потенцијалот од - 23,71 mV (Табела 4.16, примерок г). Колоидниот систем е стабилен при вредност за ζ-потенцијалот од ± 30 mV (Al-Shdefat *et al.*, 2012). И покрај тоа, што со користењето на хлороформот е измерена вредност за ζ-потенцијалот од - 30,95 mV, во понатамошното истражување за подготовката на липозомите е користен метанолот, согласно карактеристиките на растворувачите и нивното влијание врз здравјето на човекот и животната средина (WHO, 2004).

Со намалување на количеството на хлороформ од 10 cm³ на 5 cm³, се зголемува ζ-потенцијалот (Табела 4.16, примерок а,ѓ), и истовремено се добиваат мултиламеларни липозоми со униформна структура, претставени на сликата 4.8.



Слика 4.8. Микроскопски изглед на липозомите на кетоконазол подготвените со хлороформ во количество од 5 cm³ (а) и 10 cm³ (б), x 40

Влијанието на количеството на сончогледовото масло врз вредноста на ζ -потенцијалот како мерка за стабилноста на липозомските везикули, е позитивно, потврдено со утврдените вредности за ζ -потенцијалот на примероците од липозомите подготвени со хлороформ (Табела 4.16, примерок а,б) и метанол (Табела 4.16, примерок г,д), со што се овозможува користењето на растителните масла како извор на фосфолипид (Nawaz *et al.*, 2013).

За липозомот во кој не е инкорпориран кетоконазол означен како „празен липозом“ најниска е вредноста за ζ -потенцијалот (- 14,26 mV, Табела 4.16, примерок ж), поради отсуство на супстанца за пренесување на количеството електричество (Ostolska & Wiśniewska, 2014).

Врз ефикасноста на инкапсулирањето на кетоконазолот, во следната фаза од развојот на липозомите се оценуваше влијанието на изворот на фосфолипидот обезбеден од фосфолипид L- α -фосфатидилхолин, и од сончогледовото и маслиновото масло, како и влијанието на бројот на вртежите применети во постапката на центрифугирањето.

При користење на маслото се формираат три фази, од кои липозомите се распределени меѓу горната маслена и долната водна фаза. Поради отстранувањето на метанолот во подготовката, се добива липозомска горна и водна долна фаза. Физичкиот изглед на добиените липозомски формулации на кетоконазолот беше млечно бел. Добиените липозоми се со „млечно бело“ обојување, со изразит сјај за формулациите со растителни масла, и побледа нијанса на „млечно бела“ боја за липозомите во кои е вклучен метанолот.

Во табелата 4.17 се претставени вредностите за инкапсулираното количество на кетоконазол во липозомите добиени со тенко-филмниот метод со примена на чист фосфолипид (100 mg), холестерол (30 mg), сончогледово масло (9100 mg), смеса од сончогледово (4550 mg) и маслиново масло (4620 mg), и метанол (5 cm³), со промена на бројот на вртежите при центрифугирањето од 4000 вртежи·min⁻¹ до 9000 вртежи·min⁻¹.

Со користење на холестерол, чист фосфолипид, смеса од сончогледово и маслиново масло и метанол како растворувач, со зголемување на бројот на вртежите од 4000 на 5000 вртежи·min⁻¹, се зголемува ефикасноста на инкапсулирање од 65,11% на 85,82%. Со изведба на центрифугирањето при двојно поголема брзина, 9000 вртежи·min⁻¹, утврдено е намалување во ефикасноста на инкапсулирањето за 50,84%, споредено со 5000 вртежи·min⁻¹ (Табела 4.17).

Табела 4.17. Влијание на бројот на вртежите при центрифугирањето и типот на растителното масло врз ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот во липозомите добиени со тенко-филмен хидратационен метод

КТ (mg)	ХЛ (mg)	ФЛ (mg)	МЛ (mg)	Метанол (cm ³)	БРЦ (вртежи·min ⁻¹)	ЕЕ ³ ± SD (%)
100	30	100	9170 ¹	5	4000	65,11 ± 0,18
100	30	100	9170 ¹	5	5000	85,82 ± 0,04
100	30	100	9170 ¹	5	9000	43,63 ± 0,85
100	30	100	9100 ²	5	5000	66,08 ± 0,11
1100	30	100	9170 ¹	5	5000	73,35 ± 0,41
1100	30	100	9100 ²	5	5000	45,37 ± 0,54

КТ - кетоконазол; ХЛ - холестерол; ФЛ - фосфолипид; МЛ – масло; ¹Сончогледово и маслиново масло (1:1 v/v); ²Сончогледово масло; БРЦ - брзина на центрифугирање; ЕЕ - ефикасност на инкапсулирање; ³Средна вредност (n = 3) ± стандардна девијација (SD); SD - стандардна девијација

При повисоки брзини на центрифугирање се нарушува липозомската структура и се одделува кетоконазолот во супернатантот, со што се намалува и ефикасноста на инкапсулирање. Негативното влијание на зголемувањето на бројот на вртежите врз структурата на липозомските везикули и степенот на инкапсулирањето е потврдено и во литературата (Crommelin & Zuidam, 2007).

Во тенко-филмниот хидратационен метод, ефикасноста на инкапсулирањето беше оценувана со промена на изворот на фосфолипидот од растителните масла, при 5000 вртежи·min⁻¹. Со воведување на сончогледовото масло во липозомската формулација, утврдената ефикасност на инкапсулирање изнесува 66,08%, и е помала за 23% споредено со истата, утврдена со користење на смеса од сончогледово и маслиново масло (Табела 4.17). Способноста за инкапсулирањето на активните супстанции е во корелација со структурните карактеристики и застапеноста на фосфолипидот во растителните масла (Alvarez & Rodríguez, 2000). Во липозомската формулација, со зголемување на количеството на кетоконазолот од 100 на 1100 mg, се намалува ефикасноста на инкапсулирањето за околу 11% и 21%, при користење на смеса од сончогледово и маслиново масло, и сончогледово масло, соодветно (Табела 4.17). Da Costa & Moraes (2003) утврдуваат намалување на ефикасноста на инкапсулирање согласно помалото количество на фосфолипид, односно недостаток на доволен број активни места на кои ќе се инкапсулира активната супстанца. Во насока за надминување на резидуалното присуство на растворувачите во липозомите (Dua *et al.*, 2012), потпомогнато од растворливоста на кетоконазолот во растителните масла, истите беа воведени во понатамошните истражувања. Истовремено, испитувано беше влијанието на типот на хидратационото средство.

Вредностите за ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот утврдени при следниве работни параметри, и тоа: 5000 вртежи·min⁻¹, 5 cm³ метанол, 5 cm³ смеса од сончогледово и маслиново масло во однос 1:1 v/v (4550 mg сончогледово масло и 4620 mg маслиново масло), и вода или 0,9% NaCl, се претставени во табелата 4.18.

Табела 4.18. Влијание на типот на растворувач и хидратационото средство врз ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот во липозомите добиени со тенко-филмен хидратационен метод

Примерок	КТ:ХЛ:ФЛ (mg)	Растворувач	Хидратационо средство	БРЦ (вртежи·min ⁻¹)	ЕЕ ¹ ± SD (%)
а	100:30:100	Метанол (5 cm ³)	H ₂ O (5 cm ³)	5000	74,11 ± 0,63
б	100:30:100	МЛ (5 cm ³)	H ₂ O (5 cm ³)	5000	91,21 ± 0,94
в	100:30:100	МЛ (5 cm ³)	H ₂ O (5 cm ³)	4000	88,31 ± 0,19
г	100:30:100	МЛ (5 cm ³)	0,9 % NaCl (5 cm ³)	5000	82,21 ± 0,52
д	1,1:3:0	МЛ (5 cm ³)	H ₂ O (5 cm ³)	5000	93,77 ± 0,54

КТ - кетоконазол; ХЛ - холестерол; ФЛ - фосфолипид; МЛ - сончогледово и маслиново масло (1:1 v/v); БРЦ - брзина на центрифугирање; ЕЕ - ефикасност на инкапсулирање; ¹Средна вредност (n = 3) ± стандардна девијација (SD); SD - стандардна девијација

Со тенко-филмниот хидратационен метод и примена на метанол како растворувач се добиени липозоми со степен на инкапсулираност на кетоконазолот од 74,11% (Табела 4.18), и ζ-потенцијал и електричната спроводливост од - 27,43 mV и 7,44 μS·cm⁻¹, соодветно. И покрај тоа што Sahasrabuddhe *et al.* (2012) утврдуваат вредност за инкапсулираност на кетоконазолот од 89% со користење на хлороформ, воведувањето на метанолот е значајно од аспект на неговите карактеристиките и на влијанието врз човекот и околината (WHO, 2004). Во подготовката на липозомските везикули на кетоконазолот, соја лецитионот беше користен од страна на Patel *et al.* (2009) и Sahasrabuddhe *et al.* (2012).

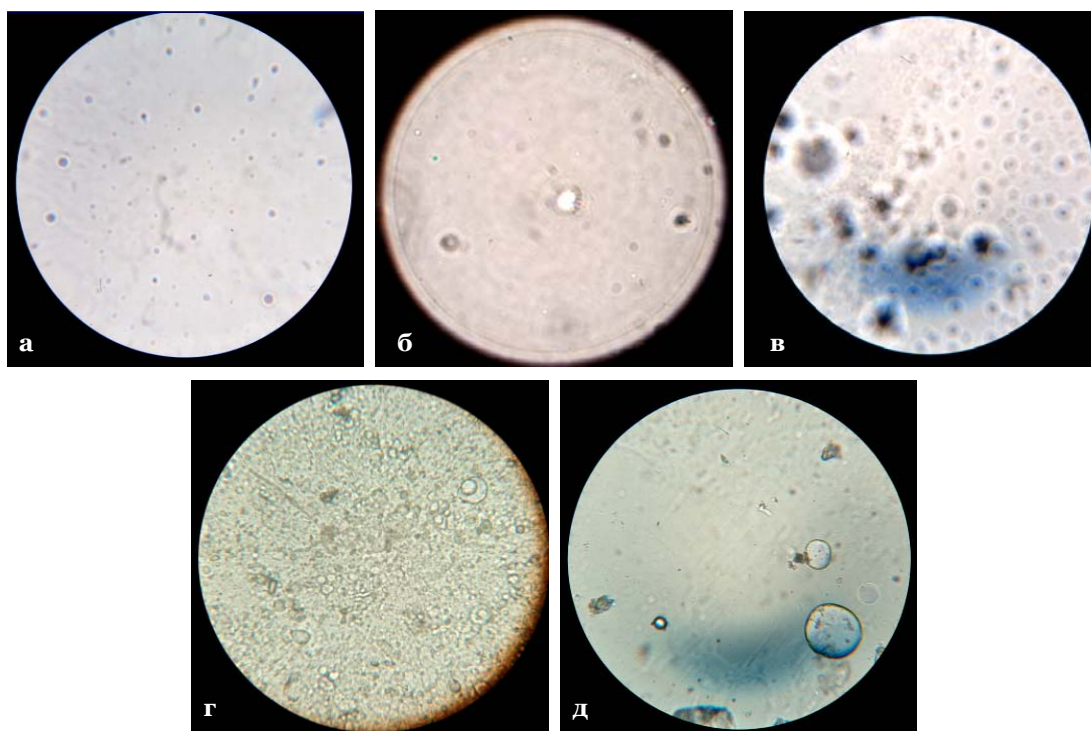
Со воведување на маслото како растворувач во подготовката на липозомите се постигнува 17,1% повисока вредност за инкапсулираност на кетоконазол во споредба со метанолот (Табела 4.18, примерок а,б). Вредности од - 27,54 mV и 8,38 μS·cm⁻¹, соодветно, за ζ-потенцијалот и електричната спроводливост се утврдени за формулацијата со растително масло, означена како примерок б.

Со зголемување на брзината на центрифугирање од 4000 вртежи·min⁻¹ на 5000 вртежи·min⁻¹, поголемо количество на кетоконазол беше инкапсулирано (Табела 4.18, примерок б,в).

Согласно вредностите за количеството на инкапсулиран кетоконазол во липозомите добиени со тенко-филмниот хидратационен метод беше утврдено влијанието на типот на средството применето во постапката на хидратација, вода и раствор на натриум хлорид (Табела 4.18). Иако, натриум хлоридот е вклучен во системот со цел промена на јонската сила и подобро одделување на инкапсулираниот од неинкапсулираниот кетоконазол, утврдените вредности за ефикасност на инкапсулирање се пониски (82,21%) споредено со водата како хидратационо средство (91,21%). Неповолното влијание на натриум хлоридот врз степенот на инкапсулирањето се должи на јонскиот карактер и неможноста за целосно растворање

во липидот (Ivanova *et al.*, 2013). При користење на масло во отсуство на чист фосфолипид се добива највисока вредност за ефикасност за инкапсулираност од 93,77%, но сепак разделувањето на слоевите беше отежнато поради можноста за формирање на емулзија.

Морфолошкиот изглед на липозомите на кетоконазолот добиени со тенко-филмниот хидратационен метод е претставен на сликата 4.9. Подготвените липозомски формулации на кетоконазолот се мутиламеларни што е во согласност со мутиламеларната структура на липозомските везикули добиени од Patel *et al.* (2009) и Sahasrabuddhe *et al.* (2012) со примена на тенко-филмниот метод.



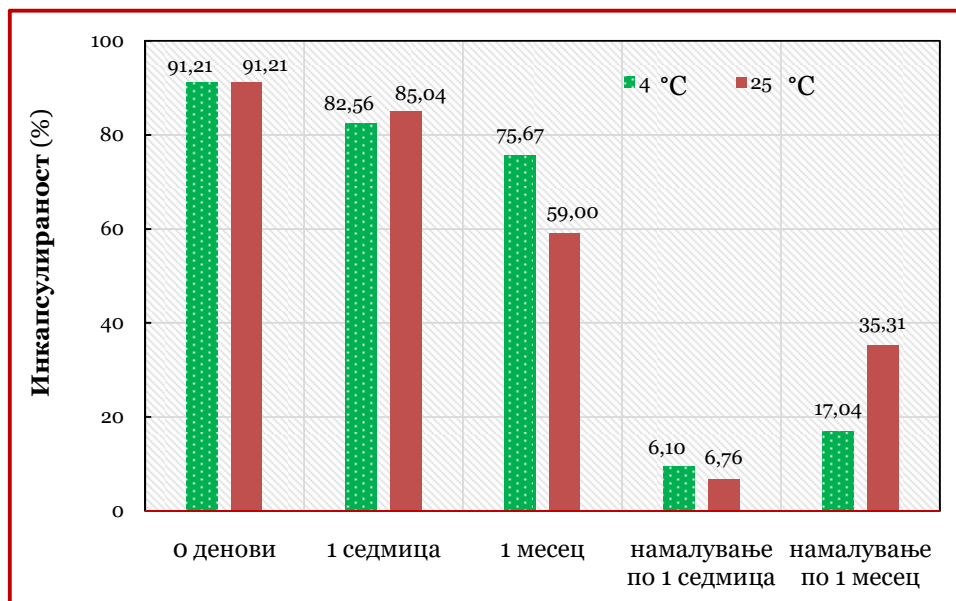
Слика 4.9. Микроскопски изглед на липозомите на кетоконазолот добиени со тенко-филмен хидратационен метод (а–д согласно примероците од Табелата 4.18), x 40

Со користење на метанол како растворувач, добиени се липозоми со сферичен облик и карактеристична мутиламеларна структура (Слика 4.9 а). Со воведувањето на растителните масла во формулацијата, при центрифугирање на $5000 \text{ vртежи} \cdot \text{min}^{-1}$, липозомите се мутиламеларни и се издиференцирани, наспроти агрегираните липозоми добиени при $4000 \text{ vртежи} \cdot \text{min}^{-1}$ (Слика 4.9 б,в). Можноста за агрегација на липозомите како резултат на непотполното одделување на слоевите е потврдено и од Crommelin & Zuidam (2007). Липозомите во кои како средство за хидратација е употребен раствор од натриум хлорид се сферични, но отсуствува карактеристичната

мултиламераност (Слика 4.9 г). Изоставувањето на чистиот фосфолипид од формулациите придонесува за нецелосно сепарирање на липозомската фаза од системот, добиени липозоми не се со карактеристична сферичност и мултиламеларност (Слика 4.9 д), со што се потврдува неговата значајност во липозомската технологија.

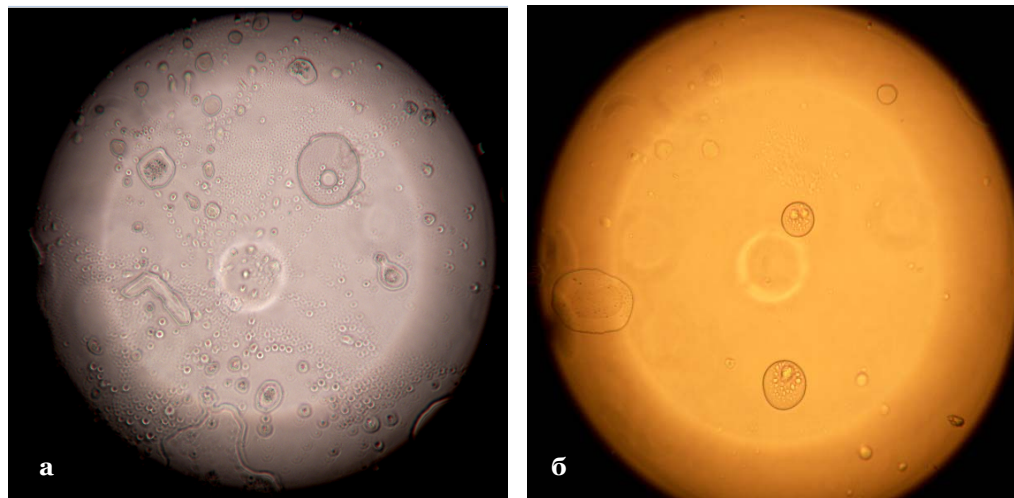
Согласно ефикасноста на инкапсулираност на кетоконазолот во липозомите и нивниот микроскопскиот изглед, за најподобна избрана беше формулацијата во која е вклучено растителното масло како растворувач и водата за хидратација, и се применети 5000 вртежи·min⁻¹ во постапката на центрифугирање (Табела 4.18 б). Стабилноста на оваа формулација оценувана беше со утврдување на ефикасноста на инкапсулирање и изгледот, во период од 1 месец на температура на чување, 4 °C и 25 °C.

Вредностите за степенот на инкапсулираност на кетоконазолот утврдени при следење на стабилноста на липозомските везикули добиени со тенко-филмниот хидратационен метод, означени како примерок б во табелата 4.18 се претставени на сликата 4.10. Со текот на времето од 1 месец, ефикасноста за инкапсулираното количество на кетоконазолот во липозомите изразено во однос на почетното количество се намалува за 17,04% и 35,31% при чување на 4 °C и 25 °C, соодветно. Степенот на ефикасноста на инкапсулираност поинтензивно се намалува на температура од 25 °C при што е утврдена вредност од 59% во текот на еден месец во споредба со 75,67% на 4 °C.



Слика 4.10. Ефикасност на инкапсулираност на липозомите на кетоконазолот добиени со тенко-филмен хидратационен метод (примерок б од Табелата 4.18), чувани 1 месец на 4 °C и 25 °C

На сликата 4.11 е претставен изгледот на липозомите чија стабилност беше оценувана за време од 1 месец, на температура од 4 °C и 25 °C.



Слика 4.11. Микроскопски изглед на липозомите на кетоконазолот добиени со тенко-филмен хидратационен метод (примерок б од Табелата 4.18), чувани во тек на еден месец на 4 °C (а) и 25 °C (б), x 40

Во липозомите чувани на 4 °C не се забележани значајни промени во изгледот (Слика 4.11 а), наспроти истите на кои стабилноста беше оценувана на 25 °C во кои бојата од млечно бела се промени во жолта (Слика 4.11 б). Повисоката температура (25 °C) придонесува за промени во структурата на везикулата, проследено со појава на агрегација или фузија, како и нестабилност на фосфолипидот, што е потврдено и од Chanda *et al.* (2011).

Тенко-филмниот хидратационен метод успешно може да се примени во инкапсулирањето на кетоконазолот во липозомите. Воведувањето на растителните масла е оправдано од аспект за надминување на проблемите причинети од резидуите на органските растворувачи во подготвените липозоми, со истовремено нивно искористување како извор на фосфолипид покрај L- α -фосфатидилхолинот.

4.3.2. КАРАКТЕРИСТИКИ НА ЛИПОЗОМИТЕ ДОБИЕНИ СО УЛТРАЗВУЧЕН МЕТОД

Сознанијата добиени при развојот на тенко-филмниот хидратационен метод во однос на можноста за воведување на растителните масла во липозомските формулации како извор на фосфолипид, и истовремено како растворувач на кетоконазолот, беа применети во добивањето на липозомите со ултразвучниот метод.

Ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот во липозомите добиени со ултразвучниот метод се претставени во табелата 4.19.

Табела 4.19. Влијание на типот на растворувач и хидратационо средство врз ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот во липозомите добиени со ултразвучен метод

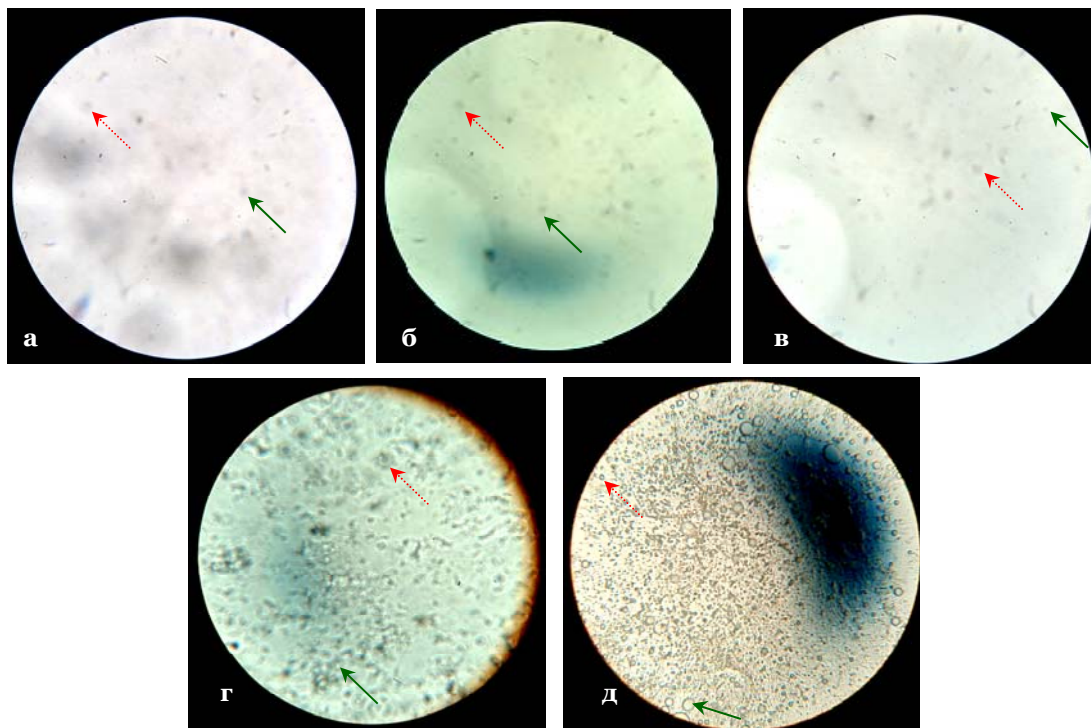
Примерок	КТ:ХЛ:ФЛ (mg)	Растворувач	Хидратационо средство	БРЦ (вртежи·min ⁻¹)	ЕЕ ¹ ± SD (%)
а	100:30:100	Метанол (5 cm ³)	H ₂ O (5 cm ³)	5000	82,26 ± 0,52
б	100:30:100	МЛ (5 cm ³)	H ₂ O (5 cm ³)	5000	87,06 ± 0,97
в	100:30:100	МЛ (5 cm ³)	H ₂ O (5 cm ³)	4000	40,01 ± 0,78
г	100:30:100	МЛ (5 cm ³)	0,9 % NaCl (5 cm ³)	5000	71,83 ± 0,62
д	1,1:3:0	МЛ (5 cm ³)	H ₂ O (5 cm ³)	5000	90,03 ± 0,64

КТ - кетоконазол; ХЛ - холестерол; ФЛ - фосфолипид; МЛ - сончогледово и маслиново масло (1:1 v/v); БРЦ - брзина на центрифугирање; ЕЕ - ефикасност на инкапсулирање; ¹Средна вредност (n = 3) ± стандардна девијација (SD); SD - стандардна девијација

Во споредба со метанолот (Табела 4.19, примерок а), во формулациите во кои е вклучено растителното масло е постигната поголема ефикасност за инкапсулирање на кетоконазолот (Табела 4.19, примерок б). Центрифугирањето при повисока брзина е поволно врз степенот на инкапсулирањето. На 5000 вртежи·min⁻¹, утврдената вредност на инкапсулираниот кетоконазол изнесува 87,06%, додека на 4000 вртежи·min⁻¹ двојно се намалува (Табела 4.19, примерок в). Утврдените вредности за ζ-потенцијалот беа - 27,27 mV и - 27,63 mV, соодветно за примерокот а и б (Табела 4.19), ја потврдуваат стабилноста на липозомските формулации на кетоконазолот. Стабилноста на липозомската формулација (примерок б) е потврдена и со пониската вредност за електричната спроводливост (8,34 μS·cm⁻¹) во споредба со формулацијата во која е користен метанолот (примерок а) која се карактеризира со вредност од 9,84 μS·cm⁻¹.

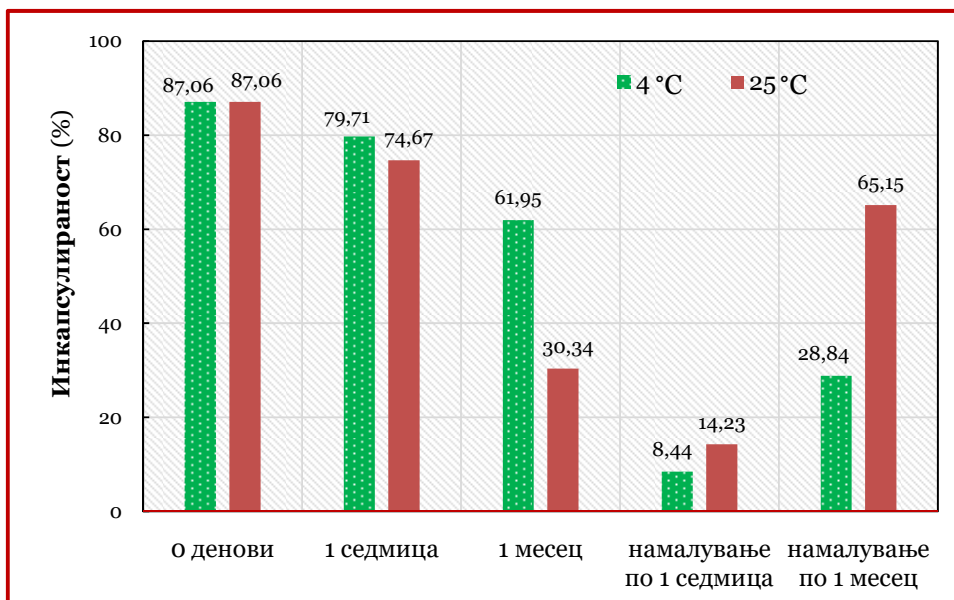
Ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот со натриум хлоридот е 71,83%, и е за 15,23% пониска од истата утврдена со водата применета во процесот на хидратација. Со формулацијата без присуство на фосфолипид се добиваат липозоми со ефикасност на инкапсулирање на кетоконазолот од 90,03% (Табела 4.19, примерок д). Улогата на растителното масло како растворувач, и истовремено како извор на фосфолипид е значајна во случај на инкапсулирање помало количество кетоконазол.

На сликата 4.12 е претставен изгледот на липозомските везикули добиени методот на ултразвук. Во споредба со тенко-филмниот метод, согласно делувањето на ултразвукот се намалува дијаметарот и ламеларноста на липозомите, и во основа се добиваат мали по големина униламеларни липозоми. Во системи во кои е применет ултразвучниот метод, постигнувањето на нецелосна униламеларност и присуството на мултиламеларни липозоми е потврдено и од Gaugav & Tejal (2011).



Слика 4.12. Микроскопски изглед на липозомските формулации на кетоконазолот добиени со ултразвучен метод (а–е се согласно примероците од Табелата 4.19), x 40
→ униламеларен липозом,→ мултиламеларен липозом,

На липозомската формулација означена како примерок б во табелата 4.19, оценувана е стабилноста во текот на еден месец, на 4 °C и 25 °C. Вредностите за ефикасноста на инкапсулираност се претставени на сликата 4.13.



Слика 4.13. Ефикасност на инкапсулираност на липозомите на кетоконазолот добиени со ултразвучен метод (примерок б од Табелата 4.19), чувани 1 месец на 4 °C и 25 °C

Со чување на липозомите на 4 °C и 25 °C за време од една седмица, утврдена е ефикасност на инкапсулираност од 79,71% и 74,67%, соодветно. Со зголемување на времето на чување до 1 месец, ефикасноста на инкапсулирање интензивно се намалува во липозомите кои беа чувани на 25 °C, при што количеството на кетоконазолот е 34,85% од почетното количество (Слика 4.13).

Ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот во липозомите добиени со ултразвучниот метод е помала во споредба со тенко-филмниот метод. И покрај тоа што количеството на инкапсулираната активна супстанца е помало, можноста за нејзиното ослободување од липозомот и интеракцијата со целната клетка е поголемо што е во корелација со помалите димензии на липозомските везикули (Sharma *et al.*, 2010). Од друга страна пак, примената на ултразвучните бранови доведува до нарушување на липозомската структура, при што истовремено се утврдува присуство и на мали униламеларни и мултиламеларни липозоми. Липозомските везикули добиени со ултразвучниот метод се понестабилни во споредба со истите од тенко-филмниот метод.

4.3.3. КАРАКТЕРИСТИКИ НА ЛИПОЗОМИТЕ ДОБИЕНИ СО ИНЈЕКЦИОНЕН МЕТОД

Инкапсулирањето на кетоназолот со инјекциониот метод беше изведено со метанол наспроти етерот и етанолот кои во литературата се претставени како најчесто користени растворувачи (Anwekar *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2014). Истовремено, во постапката за добивање на липозомите со кетоназол, испитувана беше и можноста за воведување на маслото како растворувач.

Во табелата 4.20 претставени се вредностите за степенот на инкапсулирање на кетоназолот во липозомите со примена на инјекциониот метод, со метанол и масло како растворувач, и вода и натриум хлорид како хидратационо средство. Со метанолот се постигнува највисока ефикасност на инкапсулирање на кетоназолот од 45,41%. За оваа липозомска формулација (примерок а) утврдени се вредности за ζ -потенцијалот и електричната спроводливост од - 27,32 mV и 8,89 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Во липозомите во кои е воведено маслото (примерок б), утврдени се вредности за ефикасноста на инкапсулирање, ζ -потенцијалот и електричната спроводливост од 43,41%, - 30,41 mV и 9,05 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. И при инјекциониот метод, повисоката брзина при центрифугирањето како постапка за одделување на инкапсулираното од неинкапсулираното количество на кетоназолот, позитивно влијае врз степенот на инкапсулирање. На 4000 вртежи·min⁻¹, ефикасноста на инкапсулирање изнесува 40,11% (примерок в). Натриум хлоридот користен како хидратационо средство доведува за инкапсулирање на помало количество кетоназол (34,24%, примерок г).

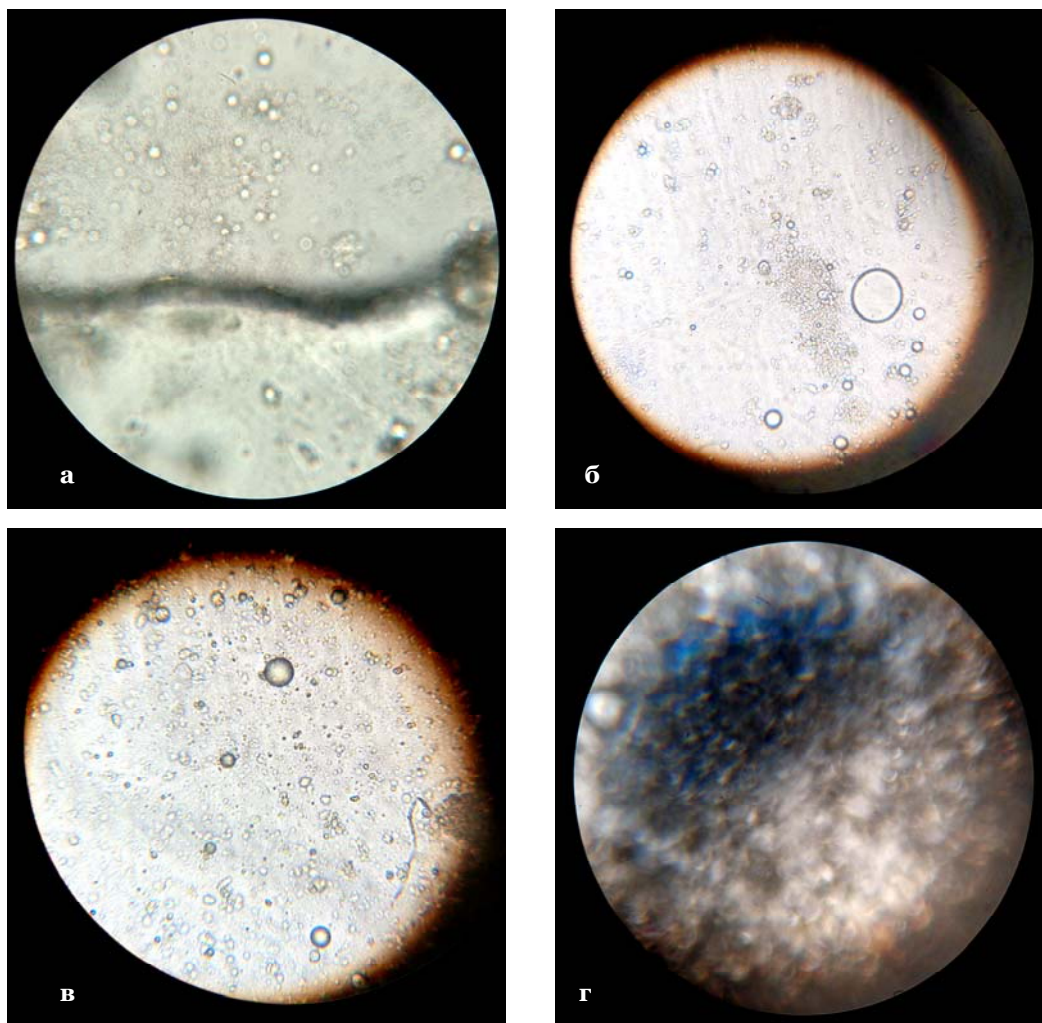
Табела 4.20. Влијание на типот на растворувач и хидратационо средство врз ефикасноста на инкапсулирање на кетоназолот во липозомите добиени со инјекционен метод

Примерок	КТ:ХЛ:ФЛ (mg)	Растворувач	Хидратационо средство	БРЦ (вртежи·min ⁻¹)	ЕЕ ¹ ± SD (%)
а	100:30:100	Метанол (5 cm ³)	H ₂ O (5 cm ³)	5000	45,41 ± 0,73
б	100:30:100	МЛ (5 cm ³)	H ₂ O (5 cm ³)	5000	43,41 ± 0,82
в	100:30:100	МЛ (5 cm ³)	H ₂ O (5 cm ³)	4000	40,11 ± 0,48
г	100:30:100	МЛ (5 cm ³)	0,9% NaCl (5 cm ³)	5000	34,24 ± 0,42

КТ - кетоназол; ХЛ - холестерол; ФЛ - фосфолипид; МЛ - сончогледово и маслиново масло (1:1 v/v); БРЦ - брзина на центрифугирање; ЕЕ - ефикасност на инкапсулирање; ¹Средна вредност (n = 3) ± стандардна девијација (SD); SD - стандардна девијација

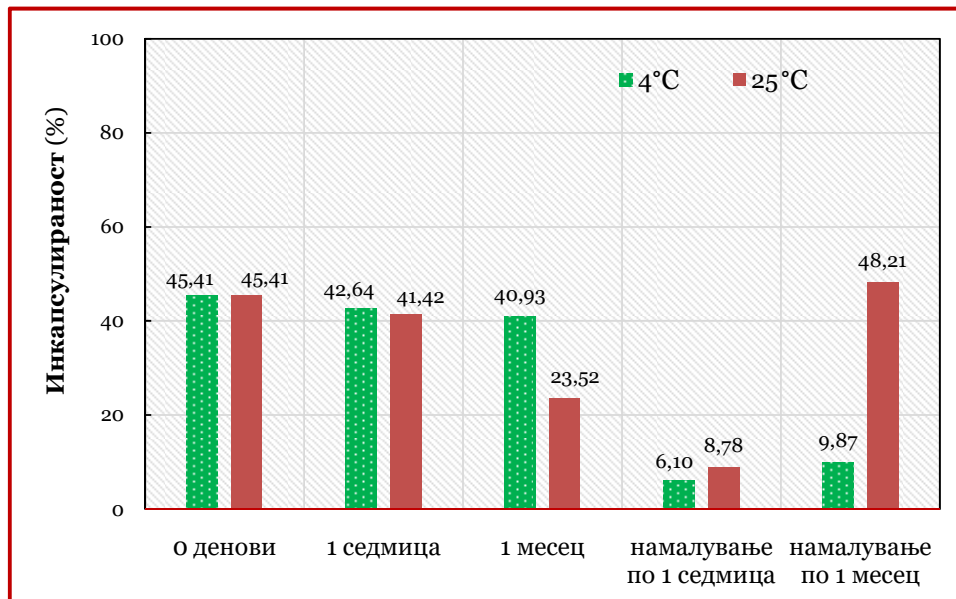
Изгледот на примероците од липозоми согласно табелата 4.20 е претставен на сликата 4.14. Со метанолот се добиваат униламеларни и мутиламеларни везикули, додека со маслото униламеларни хомогено распределени липозоми (Слика 4.14 а,б).

Разликите во микроскопскиот изглед на липозомите добиени при $4000 \text{ vrtежи} \cdot \text{min}^{-1}$ и $5000 \text{ vrtежи} \cdot \text{min}^{-1}$ со маслото како растворувач се незначајни (Слика 4.14 б,в). Со натриум хлоридот се добиваат неиздиференцирани везикуларни структури (Слика 4.14 г).



Слика 4.14. Микроскопски изглед на липозомите на кетоназолот добиени со инјекционен метод (а–д согласно примероците од Табелата 4.20), $\times 40$

Липозомите добиени со инјекциониот метод за кои е користено смеса од сончогледово и маслиново масло, вода и $5000 \text{ vrtежи} \cdot \text{min}^{-1}$ се применети при центрифугирањето (Табела 4.20, примерок б), оценувани беа и со следење на стабилноста на $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ и $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ во период од 30 денови. Вредностите за ефикасноста на инкапсулирањето утврдени при следење на стабилноста се претставени на сликата 4.15.



Слика 4.15. Ефикасност на инкапсулираност на липозомите на кетоконазолот добиени со инјекционен метод (примерок б од Табелата 4.20), чувани 1 месец на 4 °C и 25 °C

Во липозомите чувани на температура од 4 °C и 25 °C, по една седмица, утврдена е ефикасност на инкапсулирање од 42,64% и 41,42%, соодветно. Споредено со почетното инкапсулирано количество (0 денови), разликата во намалувањето по 1 седмица и 1 месец, на температура од 4 °C, изнесува 3,77%. Инкапсулираното количество на кетоконазолот интензивно се намалува со чувањето на липозомите на 25 °C во периодот од 1 месец, и изнесува 23,52% (Слика 4.15).

Ниските вредности за ефикасноста на инкапсулираност утврдени во липозомите добиени со инјекциониот метод (Табела 4.20) ја наметнаа потребата за испитување на влијанието на количеството на кетоконазолот, холестеролот и фосфолипидот врз карактеристиките на липозомите.

Во табелата 4.21 се претставени вредностите утврдени за ефикасноста на инкапсулираност на кетоконазолот во липозомите добиени со примена на инјекциониот метод со смеса од сончогледово и маслиново масло како растворувач и изведба на центрифугирањето при 5000 вртежи·min⁻¹.

Табела 4.21. Влијание на количеството на кетоконазол, холестерол и фосфолипид врз ефикасноста на инкапсулирање во липозомите добиени со инјекционен метод

Формулација	КТ (mg)	ХЛ (mg)	ФЛ (mg)	Ефикасност на инкапсулирање		
				Х _{сп.} (%)	SD (%)	RSD (%)
F ₁	50	30	100	46,67	0,58	1,23
F ₂	50	60	100	70,01	0,10	1,42
F ₃	50	30	200	50,37	0,56	0,94
F ₄	50	60	200	51,50	0,46	1,48
F ₅	200	30	100	70,33	0,81	1,14
F ₆	200	60	100	28,13	0,42	1,48
F ₇	200	30	200	53,63	0,55	1,01
F ₈	200	60	200	54,43	0,51	0,94

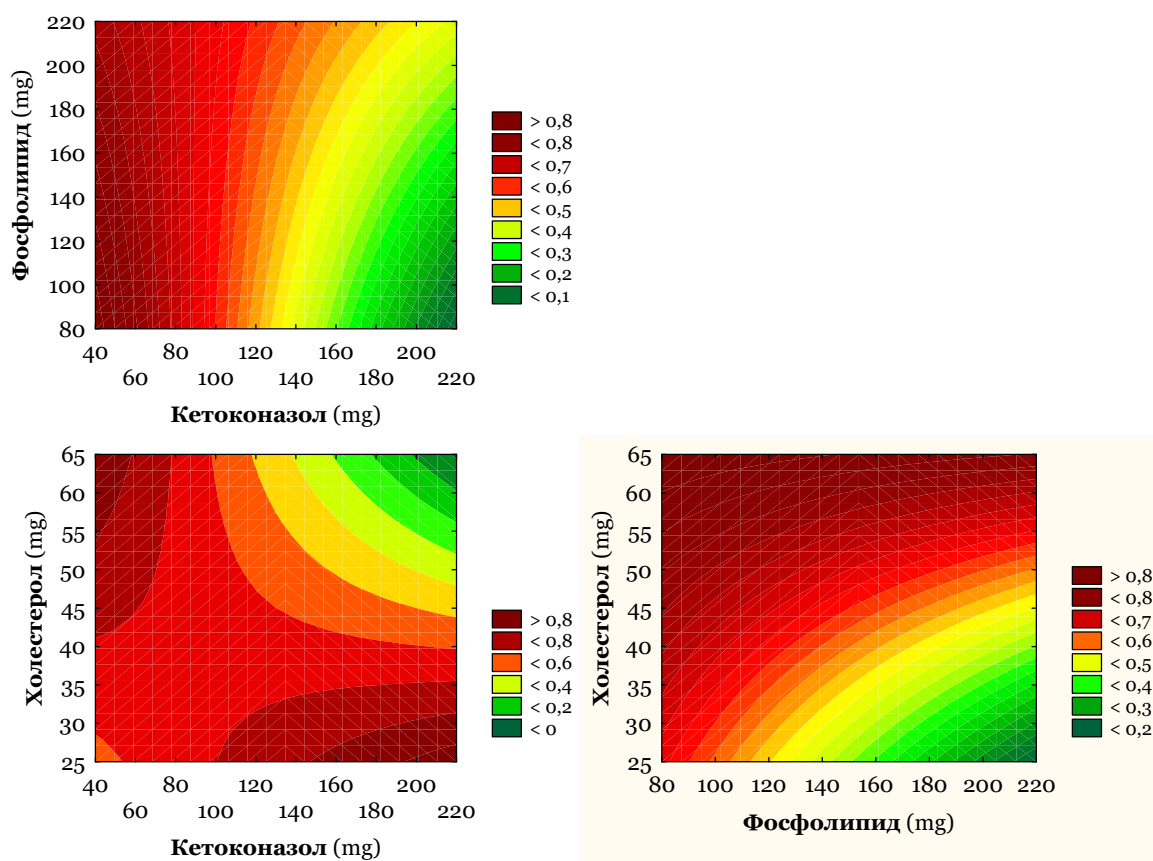
КТ - кетоконазол; ХЛ - холестерол; ФЛ - фосфолипид; Х_{сп.} (средна вредност, n = 3), SD – стандардна девијација; RSD – релативна стандардна девијација,

Во формулација F₁ за која се користени 50 mg кетоконазол, 30 mg холестерол и 100 mg фосфолипид, утврдена е ефикасност на инкапсулираност од 46,67%. Со зголемување на холестеролот на 60 mg (формулација F₂), ефикасноста на инкапсулираност на кетоконазолот се зголемува за 50,01% во однос на формулацијата F₁. При двојно количество на фосфолипидот (200 mg), кетоконазол (50 mg) и холестерол (30 mg), формулација F₃, утврдената вредност за ефикасноста на инкапсулираност изнесува 50,37%, и истата е повисока за 3,7% од F₁, и пониска за 19,64% од F₂. Вредностите за ефикасноста на инкапсулираност во формулацијата F₃ и F₄ изнесуваат 50,37% и 51,50%, со што се потврдува дека влијанието на зголеменото количество холестерол (60 mg) при 200 mg фосфолипид е незначајно. Со употреба на 200 mg кетоконазол и 100 mg фосфолипид, со зголемување на холестеролот од 30 mg на 60 mg, формулација F₅ и F₆, инкапсулираното количество на кетоконазолот во липозомите се намалува за 60%. Споредбата на вредностите за ефикасноста на инкапсулирање на кетоконазолот за формулацијата F₃, F₄ со F₇ и F₈, потврдува дека влијанието на холестеролот е незначајно и при 200 mg кетоконазол (Табела 4.21).

Намалувањето на ефикасноста на инкапсулирање на активната супстанца при вклучување на поголемо количество холестерол во формулацијата е потврдено во литературата (Justo & Moraes, 2005; Ortan *et al.*, 2009; Begum *et al.*, 2012). Исто така, Ortan *et al.* (2009) утврдуваат незначително мали разлики во вредностите на ефикасноста на инкапсулираност со примена на повисоко количество на фосфолипид. Вклучен во липозомската формулација во поголемо количество, холестеролот се инкорпорира во двојниот липиден слој на везикулата, со што ја зголемува флуидноста на мембраната кое резултира во зголемување на распределбата на водната фаза во липозомската везикула, и со тоа се намалува ефикасноста на инкапсулирање на хидрофобната активна супстанца (Ramana *et al.*, 2010). Ова влијание на холестеролот се

објаснува и со двата феномена, и тоа: 1) молекулите на липофилната супстанца која треба да се инкапсулира се натпреваруваат со холестеролот за липофилниот простор во двојниот липиден слој, и/или 2) холестеролот ја намалува пропустливоста на двојниот слој и со тоа можноста за инкапсулирање на активната супстанца (Sherry *et al.*, 2015). Механизмот за формирање на липозомите со етанол инјекциониот метод објаснет од Lasic покажува дека за време на дифузијата на етанолот во водната фаза, фосфолипидот растворен во органската фаза агрегира на граничната површина меѓу водната и органската фаза, и формира интермедиерни структури наречени двослојни фосфолипидни фрагменти Lasic (1988). Зголемувањето на количеството на липидната супстанца во органската фаза придонесува за зголемување на количеството на двослојните фосфолипидни фрагменти, со што се намалува растојанието меѓу нив и се интензивира формирањето на поголемите везикули согласно коалесценцијата (Yang *et al.*, 2012).

На сликата 4.16 се претставени контурните линии за вредностите на ефикасноста на инкапсулирање утврдени во липозомите при следење на влијанието на количеството на кетоназолот, холестеролот и фосфолипидот.



Слика 4.16. Дијаграм на контурните линии за влијанието на количеството на кетоназолот, холестеролот и фосфолипидот врз ефикасноста на инкапсулирање на липозомите добиени со инјекционен метод

Во согласност со вредностите за ефикасноста на инкапсулираност претставени со контурните графици на сликата 4.16, поддржано со заклучоците дадени во литературата (Sherry *et al.*, 2015), се препорачува инкапсулирањето на кетоконазолот со инјекциониот метод со користење на смеса од сончогледово и маслиново масло како растворувач да се изведува при помало количество на фосфолипид. Зголемувањето на количеството на холестеролот позитивно влијае врз ефикасноста на инкапсулирањето при пониско количество кетоконазол вклучено во формуацијата, и обратно, при поголемо количество кетоконазол, зголемувањето на холестеролот придонесува за драстично намалување на инкапсулираното количество кетоконазол во липозомите.

Вредностите за ζ -потенцијалот и електричната спроводливост утврдени во липозомите добиени со инјекциониот метод со смеса од сончогледово и маслиново масло како растворувач и изведба на центрифугирањето при 5000 вртежи·min⁻¹ се претставени во табелата 4.22.

Табела 4.22. Влијание на количеството на кетоконазол, холестерол и фосфолипид врз ζ -потенцијалот и електричната спроводливост во липозомите добиени со инјекционен метод

Формулација	КТ (mg)	ХЛ (mg)	ФЛ (mg)	ζ -потенцијал			Електрична спроводливост		
				X_{cp} (mV)	<i>SD</i> (mV)	<i>RSD</i> (%)	X_{cp} ($\mu S \cdot cm^{-1}$)	<i>SD</i> ($\mu S \cdot cm^{-1}$)	<i>RSD</i> (%)
F ₁	50	30	100	-18,11	0,03	0,14	9,66	0,01	0,12
F ₂	50	60	100	-8,79	0,12	0,61	9,48	0,07	0,81
F ₃	50	30	200	-20,67	0,10	0,48	13,51	0,06	0,42
F ₄	50	60	200	-24,62	0,48	1,95	9,04	0,03	0,34
F ₅	200	30	100	-30,22	0,23	0,75	9,08	0,02	0,23
F ₆	200	60	100	-24,63	0,48	1,96	9,35	0,05	0,53
F ₇	200	30	200	-18,48	0,41	2,09	9,75	0,03	0,31
F ₈	200	60	200	-28,59	0,19	0,68	9,35	0,05	0,54

КТ - кетоконазол; ХЛ - холестерол; ФЛ - фосфолипид; ; X_{cp} (средна вредност, $n = 3$);
SD - стандардна девијација; *RSD* - релативна стандардна девијација

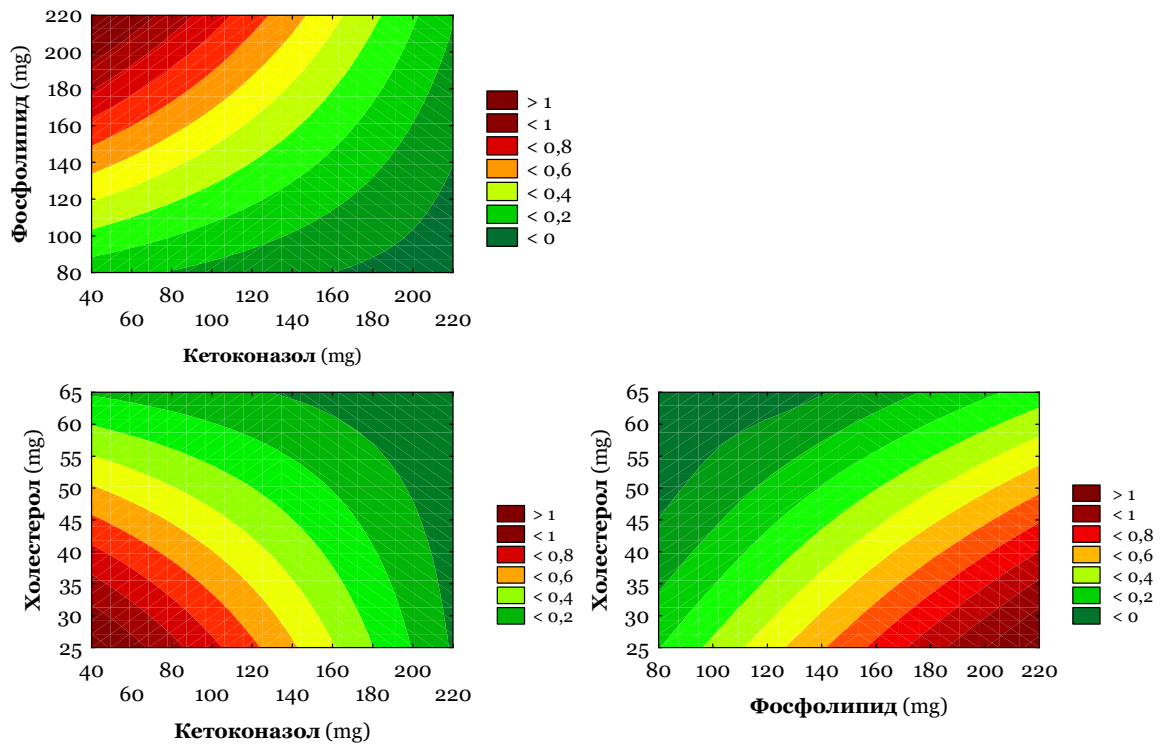
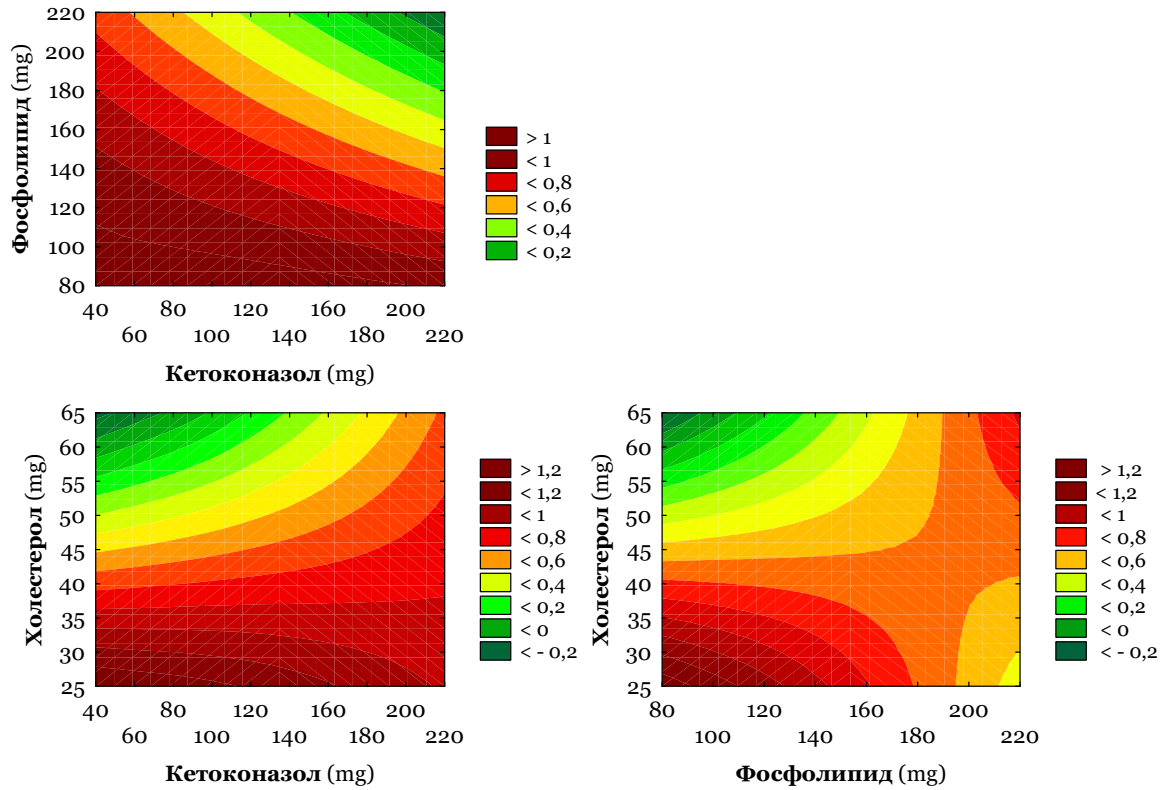
Од вредностите претставени во табелата 4.22 се утврдува дека липозомите добиени при 200 mg кетоконазол, 30 mg холестерол и 100 mg фосфолипид (формулацијата F₅) се карактеризираат со највисока вредност за ζ -потенцијалот од - 30,22 mV. При 60 mg холестерол, 200 mg фосфолипид и 200 mg кетоконазол (формулација F₈) се добиваат липозоми чија вредност за ζ -потенцијалот изнесува - 28,59 mV. Споредено со F₅, во липозомите означени како F₇ (200 mg кетоконазол, 30 mg холестерол и 200 mg фосфолипид) и F₆ (200 mg кетоконазол, 60 mg холестерол и 100 mg фосфолипид) е утврдено намалување од 11,74 mV и 5,59 mV, соодветно. Намалувањето го укажува негативното влијание на зголеменото количество

фосфолипид и холестерол врз ζ -потенцијалот, што не е карактеристично при вклучување на помало количество кетоконазол (50 mg) во липозомската формулација. Позитивното влијание на фосфолипидот и холестеролот е потврдено со споредувањето на вредностите за ζ -потенцијалот на F_1 со F_3 , и F_2 со F_4 и утврденото зголемување од 2,56 mV и 5,83 mV, соодветно. Разликата во вредностите за ζ -потенцијалот од 0,68 mV утврдена меѓу F_1 и F_2 , при 50 mg кетоконазол и 100 mg фосфолипид укажува дека влијанието на холестеролот е незначајно. Малите разлики во вредностите за електричната спроводливост укажуваат дека влијанието на количеството на кетоконазолот, холестеролот и фосфолипидот е незначајно врз оваа оценувана карактеристика на липозомите.

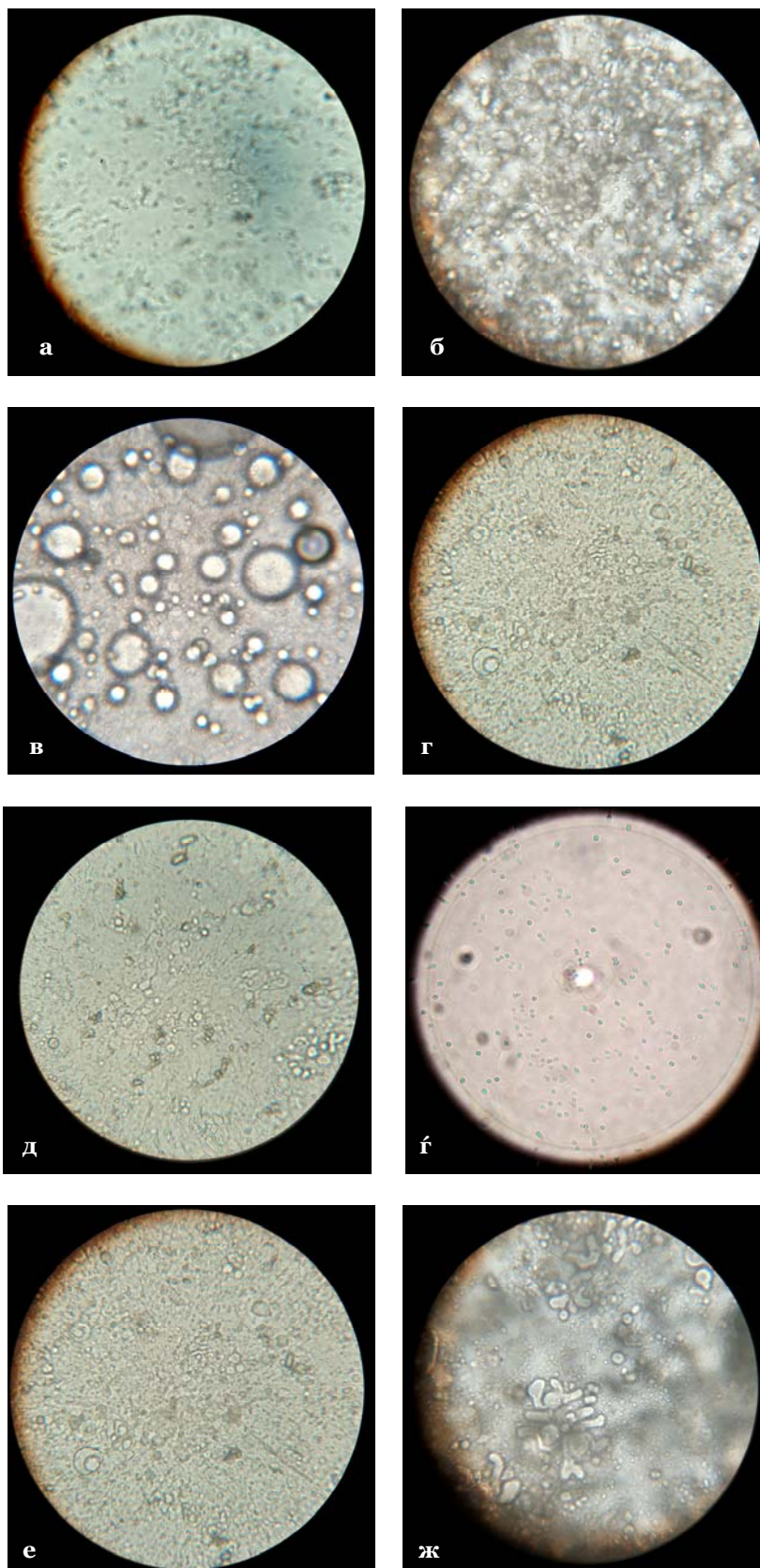
Негативното влијание на зголеменото количество на фосфолипид и холестерол врз ζ -потенцијалот е потврдено од Soema *et al.* (2015) и Surianarayanan *et al.* (2016). Вклучувањето на катјонските липиди го зголемуваат ζ -потенцијалот, додека амфотерните го намалуваат Soema *et al.* (2015). Незначајното влијание на фосфолипидот и холестеролот врз електричната спроводливост е потврдено од Surianarayanan *et al.* (2016).

Контурните линии за вредностите на ζ -потенцијалот и електричната спроводливост кои беа утврдени во липозомите подготвени со примена на инјекциониот метод се претставени на сликата 4.17.

На сликата 4.18 е претставен микроскопскиот изглед на липозомите добиени со инјекциониот метод со промена на количеството на кетоконазол (50 mg и 200 mg), холестерол (30 mg и 60 mg) и фосфолипид (100 mg и 200 mg).



Слика 4.17. Дијаграм на контурните линии за влијанието на количеството на кетоконазолот, холестеролот и фосфолипидот врз ζ -потенцијалот (А) и електричната спроводливост (Б) на липозомите добиени со инјекционен метод



Слика 4.18. Микроскопски изглед на липозомите на кетоназолот добиени со инјекционен метод (а–ж согласно примероците од Табелата 4.21 и 4.22), x 40

Во споредба со тенко-филмниот хидратационен и ултразвучниот метод, со инјекциониот метод беа добиени значително поголеми липозомски везикули на кетоконазолот (Слика 4.18). Зголемувањето на количеството на фосфолипидот дејствува позитивно во насока на добивање добро дефинирани сферични везикули при 50 mg кетоконазол, што е карактеристично за формулацијата F₂ и F₄. Добро издиференцирани везикули се добиваат и со формулацијата F₅ составена од 200 mg кетоконазол, 30 mg холестерол и 100 mg фосфолипид. За разлика од F₅, со формулацијата F₆ во која количеството на фосфолипидот е двојно зголемено (200 mg) се добиваат помали сферични везикули. Негативното влијание на холестеролот врз изгледот и стабилноста на формираните везикули е изразено при поголемо количество на инкапсулиран кетоконазол. Со формулациите составени од 200 mg кетоконазол, 60 mg холестерол, 100 mg и 200 mg фосфолипид, соодветно, за F₇ и F₈, добиените липозоми се со неправилна сферичност со тенденција за нивно слепување, коалесценција и потполна дестабилизација. Влијанието на супстанците користени во подготовката на липозомите со инјекциониот метод е исто како за ефикасноста на инкапсулираност (Табела 4.21), така и за микроскопскиот изглед (Слика 4.18). Погоре дискутираните ефекти на супстанците кои се составен дел на кетоконазол липозомските везикули се презентирани и од Yang *et al.* (2012) и Sabeti *et al.* (2014).

Со добро дефинирани сферични везикули и високи вредностите за ефикасноста на инкапсулираност и ζ-потенцијалот се карактеризира формулацијата составена од 200 mg кетоконазол, 30 mg холестерол и 100 mg фосфолипид.

Во согласност со дијаграмите на контурните линии, задоволителни вредности за ефикасноста на инкапсулираност, како и за ζ-потенцијалот и електричната спроводливост на липозомите добиени со инјекциониот метод, се добиваат со 125 mg кетоконазол, 45 mg холестерол и 100 mg фосфолипид.

5. ЗАКЛУЧОК

Согласно добиените резултати од истражувањата изведени по зададените цели во докторската дисертација, се заклучува следново:

- Развиените и валидизирани УВ-спектрофотометриски и високоефикасен течен хроматографски метод за директно квантитативно определување на кетоконазол во комерцијалните фармацевтски производи и тоа: во крем, шампони и таблети, се едноставни, брзи, прецизни и точни. На избраните бранови должини, 244 nm и 296 nm, се утврдени ниски вредности за *LOD* и *LOQ*, со што се потврдува осетливоста на методите. Користењето на метанолот и водата како мобилна фаза овозможува подобрување на условите за заштита на животната средина.

- Оценувањето на ефикасноста за инкапсулирањето на кетоконазолот во липозомските везикули беше овозможено со развиените и валидизирани аналитички методи.

- Кетоконазолот е успешно инкапсулиран во липозомите подготвени со тенко-филмниот хидратационен, ултразвучниот и инјекциониот метод. Со користењето на метанолот како растворувач во добивањето на кетоконазол липозомските везикули се овозможи отстранување на штетните и токсични растворувачи. Воведувањето на растителните масла е оправдано и поддржано согласно нивното својство на растворувач на кетоконазолот, како и извор на фосфолипиди.

- Тенко-филмниот хидратационен метод овозможува формирање на мултиламеларните везикули кои се релативно постабилни во однос на подготвените мали и големи униламеларни липозоми со инкапсулиран кетоконазол со примена на ултразвучниот и инјекциониот метод. Со ултразвукот се формираат мали униламеларни везикули, но истовремено се доведува до нивно нарушување и можност за формирање на мултиламеларните везикули. Липозомските везикули добиени со инјекциониот метод се најголеми.

- Највисоки вредности за ефикасност на инкапсулирање на кетоконазолот се утврдени во липозомите подготвени со тенко-филмниот хидратационен метод, а најниски со инјекциониот метод. Влијанието на количеството на фосфолипидот врз изгледот, стабилноста и ефикасноста на инкапсулирање е позитивно при помало количество на кетоконазол и холестерол.

- Стабилноста на липозомите оценувана во текот на еден месец на 4 °C и 25 °C е најголема за липозомите за чие добивање е применет тенко-филмниот хидратационен метод. Поголема стабилност е утврдена кај примероците липозоми кои се чувани во фрижидер.

- Придобивките од оваа докторска дисертација се значајни за фармацевтската технологија и козметологијата, како и за хемијата, со цел подобрување и оценување на терапевтската ефикасност на лекот, во технологијата за производството на новите формулации за кетоназолот, како и во методите за определување на кетоназолот во фармацевтските примероци кои се сензитивни и брзи, овозможувајќи добивање на точни и прецизни резултати.

- Со инкапсулирањето во липозомите, се очекува подобрување на терапевтскиот индекс на кетоназол, намалување на неговата токсичност и зголемување на ефектот во лекувањето на голем број кожни заболувања. Идните насоки би се движеле во утврдување на *in vitro* и *in vivo* моделите на ослободување на кетоназол од липозомите, утврдување на квантномеханички пресметувања на енантиомерите на кетоназолот со помош на семиемпириски метод, како и можноста за нивно одделување и инкапсулирање во липозомски везикули само на енантиомерот кој е најефективен во третманот на кожните заболувања и е од особена значајност.

6. ЛИТЕРАТУРА

- Achim M., Precup C., Gonganău-Nițu D., Barbu-Tudoran L., Porfire A.S., Scurtu R., Ciuce C. Thermosensitive liposomes containing doxorubicin. Preparation and *in vitro* evaluation, *Farmacia*, **57**:703–710 (2009).
- Agrawal T.K., Murti Y. Synthesis and bioevaluation of ketoconazole thiosemicarbazone analogues, *IJPSR*, **2**:3156–3160 (2011).
- Al-Shdefat R, Yassin A.E.B., Anwer K., Alsarra I. Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded chitosan microparticles, *Dig. J. Nanomater. Bios.*, **7**:1139–1147 (2012).
- Alvarez A.M.R., Rodríguez M.L.G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations, *Grasas Aceites*, **51**:74–96 (2000).
- Anwekar H., Patel S., Singhai A.K. Liposome-as drug carriers, *Int. J. of Pharm. & Life Sci.*, **2**:945–951 (2011).
- Aparajita V., Ravikumar P. Liposomes as carries in skin ageing, *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, **6**:1–7 (2014).
- Aukunuru J., Joginapally S., Gaddam N., Burra M., Bonepally C.R., Prabhakar K. Preparation, characterization and evaluation of hepatoprotective activity of an intravenous liposomal formulation of *bis*-demethoxy curcumin analogue (BDMCA), *Int. J. Drug Dev. & Res.*, **1**:37–46 (2009).
- Balata G., Mahdi M., Bakera R.A. Improvement of solubility and dissolution properties of ketoconazole by solid dispersions and inclusion complexes, *AJPS*, **5**:1–12 (2010).
- Baptista A.L.F., Countinho P.J.G., Real Oliveira M.E.C.D., Rocha Gomes J.I.N. Lipid interaction with textile fibres in dyeing conditions, *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **123**:88–93 (2004).
- Begum M.Y., Abbulu K., Sudhakar M., Aneesa. Celecoxib – encapsulated liposomes of long alkyl chain lipids: formulation, characterization and *in vitro* performance, *Der Pharmacia Sinica*, **3**:117–125 (2012).
- Benech R.O., Kheadr E.E., Laridi R., Lacroix C., Fliss I. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nizin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture, *Appl. Environ. Microb.*, **68**:3683–3690 (2002).
- Betz G., Aeppli A., Menshutina N., Leuenberger H. *In vivo* comparison of various liposome formulations for cosmetic application, *Int. J. Pharm.*, **296**:44–54 (2005).
- Bhatia A., Kumar R., Katare O.P. Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and *in vitro* evaluation, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **7**:252–259 (2004).
- Bolčić Z., Petkovska M., Obradović B., Nedović V., Bugarski B. *In vitro* evaluation of the controlled release of antibiotics from liposomes, *Chem. Ind.*, **57**:589–595 (2003).
- Castro-Puyana M., García-Ruiz C., Cifuentes A., Crego A.L., Marina M.L. Identification and quantitation of *cis*-ketoconazole impurity by capillary zone electrophoresis–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1114**:170–177 (2006).
- Chan C.C. Potency method validation. In: Chan C.C., Lee Y.C., Lam H., Zhang X.M. (eds.). Analytical method validation and instrument performance verification, New Jersey; John Wiley & Sons, Inc., 2004, pp. 11–26.
- Chanda H., Das P., Chakraborty R., Ghosh A. Development and evaluation of liposomes of fluconazole, *J. Pharm. Biomed. Sci.*, **5**:1–9 (2011).
- Chander Shekar B., Shireesh Kiran R., Nagendra Babu B. Preparation and evaluation of gastro retentive floating tablets of ketoconazole, *IJPRD*, **2**:174–184 (2010).

- Chang H.I., Yeh M.K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy *Int. J. Nanomedicine*, **7**:49–60 (2012).
- Channarong S., Chaicumpa W, Sinchaipanid N., Mitrevaj A. Development and evaluation of chitosan-coated liposomes for oral DNA vaccine: the improvement of Peyer's patch targeting using a polyplex-loaded liposomes, *AAPS, PharmSciTech.*, **12**:192–200 (2011).
- Chunhieng T., Hafidi A., Pioch D., Brochier J., Montet D. Detailed study of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil micro-compounds: phospholipids, tocopherols and sterols, *J. Braz. Chem. Soc.*, **19**:1374–1380 (2008).
- Cocero M.J., Martín Á., Mattea F., Varona S. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: fundamentals and applications, *J. Supercrit. Fluid*, **47**:546–555 (2009).
- Crommelin D.J.A., Zuidam N.J. Hydrolysis of phospholipids in liposomes and stability-indicating analytical techniques. In: Gregoriadis G. (ed.) Liposome technology Volume I liposome preparation and related techniques, New York; Informa Healthcare USA, Inc., 2007, pp. 285–295.
- Da Costa C.A.M., Moraes Â.M. Encapsulation of 5-fluorouracil in liposomes for topical administration, *Maringá*, **25**:53–61 (2003).
- Darani K.K., Mozafari M.R. Supercritical fluids technology in bioprocess industries: a review, *J. Biochem. Tech.*, **2**:144–152 (2009).
- Dayyih W.A., Al saadi N., Hamad M., Mallah E., Matalka K., Arafat T. Development and validation of hplc method for some azoles in pharmaceutical preparation, *IJPSR*, **3**:3686–3692 (2012).
- De Bruijn P., Kehrer D.F.S., Verweij J., Sparreboom A. Liquid chromatographic determination of ketoconazole, a potent inhibitor of CYP3A4-mediated metabolism, *J. Chromatogr. B*, **753**:395–400 (2001).
- Devi M., Kumar M.S., Mahadevan N. Amphotericin-B loaded vesicular systems for the treatment of topical fungal infection, *IJRAPR*, **4**:37–46 (2011).
- Ding B., Xia S., Hayat K., Zhang X. Preparation and pH stability of ferrous glycinate liposomes, *J. Agric. Food Chem.*, **57**:2938–2944 (2009).
- Divakar P., Kumar D.P., Praveen C., Sowmya C., Suryaprakash Reddy C. Formulation and *in vitro* evaluation of liposomes containing metformin hydrochloride, *IJRPBS*, **4**:479–485 (2013).
- Dua J.S., Rana A.C., Bhandari A.K. Liposome: methods of preparation and applications, *IJPSR*, **3**:14–20 (2012).
- Eldem T., Arican-Cellat N. High-performance liquid chromatographic determination of amphotericin B in a liposomal pharmaceutical product and validation of the assay, *J. Chromatogr. Sci.*, **38**:338–344 (2000).
- El-Nesr O.H., Yahiya S.A., El-Gazayerly O.N. Effect of formulation design and freeze-drying on properties of fluconazole multilamellar liposomes, *SPJ*, **18**:217–224 (2010).
- Faergemann J., Ausma J., Borgers M. *In vitro* activity of R126638 and ketoconazole against *Malassezia* species, *Acta Derm. Venereol.*, **86**:312–315 (2006).
- Falahati M., Shabani M., Rodaki M.M.A., Jahaniani F., Porshang Bagheri K., Ebrahimi S.A. Interaction between ketoconazole, amphotericin B and terbinafin and three diazenumdiolates in concomitant uses against some fungal species, *DARU*, **14**:87–92 (2006).

- Finkelstein Y., Aks S.E., Hutson J.R., Juurlink D.N., Nguyen P., Dubnov-Raz G., Pollak U., Koren G., Bentur Y. Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug, *Clin. Toxicol. Phila.*, **48**:407–414 (2010).
- Ford M.M. Antifungals and their use in veterinary ophthalmology, *Vet. Clin. Small Anim.*, **34**:669–691 (2004).
- Gaurav R., Tejal S. Liposomal drug delivery system: an overview, *IJPBA*, **2**:575–1580 (2011).
- Ghanbarzadeh S., Valizadeh H., Zakeri-Milani P. Application of response surface methodology in development of sirolimus liposomes prepared by thin film hydration technique, *BioImpacts*, **3**:75–81 (2013).
- Gibis M., Rahn N., Weiss J. Physical and oxidative stability of uncoated and chitosan-coated liposomes containing grape seed extract, *Pharmaceutics*, **5**:421–433 (2013).
- Gómez Henz A., Fernández Romero J.M. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems, *Trends Anal. Chem.*, **25**:167–178 (2006).
- Gupta A.K., Chaudhry M., Elewski B. Tinea corporis, tinea cruris, tinea nigra, and piedra, *Dermatol. Clin.*, **21**:395–400 (2003).
- Hamdy D.A., Brocks D.R. A stereospecific high-performance liquid chromatographic assay for the determination of ketoconazole enantiomers in rat plasma, *Biomed. Chromatogr.*, **22**:542–547 (2008).
- Hathout R.M., Mansour S., Mortada N.D., Guinedi A.S. Liposomes as an ocular delivery system for acetazolamide: *in vitro* and *in vivo* studies, *AAPS PharmSciTech.*, **8**:E1–E12 (2007).
- Hautala J.T., Wiedmer S.K., Riekkola M.L. Anionic liposomes in capillary electrophoresis: effect of calcium on 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine/phosphatidylserine-coating in silica capillaries, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**:1769–1776 (2004).
- Hwang T.L., Lee W.R., Hua S.C., Fang J.Y. Cisplatin encapsulated in phosphatidylethanolamine liposomes enhances the *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* intratumor drug accumulation against melanomas, *J. Dermatol. Sci.*, **46**:11–20 (2007).
- International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonized Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Current Step 4 version, Parent Guideline dated 27 October 1994. Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005 (2005).
- Ivanova P., Chalova V., Koleva L., Pishtiyski I. Amino acid composition and solubility of proteins isolated from sunflower meal produced in Bulgaria, *IFRJ*, **20**:2995–3000 (2013).
- Jadhav M.P., Nagarsenker M.S., Gaikwad R.V., Samad A., Kshirsagar N.A. Formulation and evaluation of long circulating liposomal amphotericin B: a scinti-kinetic study using ^{99m}Tc in BALB/C mice, *Indian J. Pharm. Sci.*, **73**:57–64 (2011).
- Jain A., Gautam S.P., Gupta Y., Khambete H., Jain S. Development and characterization of ketoconazole emulgel for topical drug delivery, *Der Pharma Sinica* **1**:221–231 (2010).
- Jalali F., Afshoon A. Spectrofluorimetric study and detection of ketoconazole in the presence of β -cyclodextrin, *J. Fluoresc.*, **18**:219–225 (2008).
- Jat R.K., Sharma S., Chhipa R.C., Singh R., Alam I. Development and validation of reverse-phase HPLC method for estimation of ketoconazole in bulk drug, *Pharmacophore*, **3**:123–129 (2012).

- Justo O.R., Moraes A.M. Kenamycin incorporation in lipid vesicles prepared by ethanol injection designed for tuberculosis treatment, *J. Pharm. Pharmacol.*, **57**:23–30 (2005).
- Kalla R., Sumarno S., Mahfud M. Non-catalytic and γ -Al₂O₃ catalyst – based degradation of glycerol by sonication method, *BCREC* **10**:304–312 (2015).
- Karn P.R., Cho W., Park H.J., Park J.S., Hwang S.J. Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid method: comparison with the modified conventional Bangham method, *Int. J. Nanomedicine*, **8**:365–377 (2013).
- Kaur I.P., Kakkar S. Topical delivery of antifungal agents, *Expert. Opin. Drug Deliv.* **7**:1303–1327 (2010).
- Kheadr E.E., Vuilleumard J.C., El Deeb S.A. Accelerated cheddar cheese ripening with encapsulated proteinases, *Int. J. Food Sci. Tech.*, **35**:483–495 (2000).
- Kheadr E.E., Vuilleumard J.C., El-Deeb S.A. Acceleration of cheddar cheese lipolysis by using liposome-entrapped lipases, *J. Food Sci.*, **67**:485–492 (2002).
- Kiran R.S., Shekar B.C., Vishnu P., Prasad M.V.V. Ungual drug delivery system of ketoconazole nail lacquer, *Int. J. Appl. Pharm.*, **2**:17–19 (2010).
- Kumar A., Badde S., Kamble R., Pokharkar V.B. Development and characterization of liposomal drug delivery system for nimesulide, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2**(Suppl. 4):87–89 (2010).
- Kumar K.P.S., Bhowmik D., Deb L. Recent trends in liposomes used as novel drug delivery system, *Pharma Innovation*, **1**:29–38 (2012).
- Kumar R., Rana A.C., Bala R., Seth N. Formulation and evaluation of elastic liposomes of clotrimazole, *Int. J. Drug Dev. & Res.*, **4**:348–355 (2012a).
- Lasic D.D. The mechanism of vesicle formation, *Biochem. J.*, **256**: 1–11 (1988).
- Lionakis M.S., Samonis G., Kontoyiannis D.P. Endocrine and metabolic manifestations of invasive fungal infections and systemic antifungal treatment, *Mayo Clin. Proc.*, **83**:1046–1060 (2008).
- Lopes de Araújo S.C., Giuberti dos Santos C., Rocha T.G.R., Ferreira dos Santos D., Leite E.A., Oliveira M.C., Liposomes as carriers of anticancer drugs, *Intech*, doi: 10.5772/55290, 2013.
- Lopes L.B., Scarpa M.V., Pereira N.L., De Oliveira L.C., Oliveira A.G. Interaction of sodium diclofenac with freeze-dried soya phosphatidylcholine and unilamellar liposomes, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **42**:497–504 (2006).
- Makhmalzadeh B.S., Azh Z., Azarpanah A. Preparation and evaluation of mafenide acetate liposomal formulation as eschar delivery system, *Int. J. Drug Dev. & Res.*, **3**:129-140 (2011).
- Malaekheh-Nikouei B, Golmohammadzadeh S., Hosseini M., Nassirli H. Preparation and characterization of liposomes encapsulated with clindamycin and tretinoin, *IJCP*, **6**:1–4 (2011).
- Malaekheh-Nikouei B., Golmohammadzadeh S., Salmani-Chamanabad S., Mosallaei N., Jamialahmadi K. Preparation, characterization, and moisturizing effect of liposomes containing glucosamine and *N*-acetyl glucosamine, *J. Cosmet. Dermatol.*, **12**:96–102 (2013).
- Malisiova F., Hatziantoniou S., Dimas K., Kletstas D., Demetzos C. Liposomal formulations from phospholipids of Greek almond oil. Properties and biological activity, *Z. Naturforsch. C*, **59**:330–334 (2004).

- Manjunatha N., Naidu G.P., Suttrave V., Patel K., Samanta M.K. Preparation and evaluation of liposomes of an antiviral drug, *IJNDD*, **1**:25–31 (2009).
- Manosroi A., Podjanasoonthon K., Manosroi J. Development of novel topical tranexamic acid liposome formulations, *Int. J. Pharm.*, **235**:61–70 (2002).
- McMurry, J. Organic chemistry, 6th ed., Thomson Brooks/Cole: Belmont (2004).
- Mhaske R.A., Sahasrabudhe S. Identification of major degradation products of ketoconazole, *Sci. Pharm.*, **79**:817–836 (2011).
- Mirzaee M., Owlia P., Mehrabi M.R. Comparison of the bactericidal activity of amikacin in free and liposomal formulation against gram-negative and gram-positive bacteria, *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, **4**:1–7 (2009).
- Mishra N., Gupta P.N., Mahor S., Khatri K., Goyal A.K., Vyas S.P. Liposomes as adjuvant for combination vaccines, *Indian J. Exp. Biol.*, **45**:237–241 (2007).
- Mitu M.A., Lupuliasa D., Dinu-Pîrvu C.E., Rădulescu F.Ş., Miron D.S., Vlaia L. Ketoconazole in topical pharmaceutical formulations. The influence of the receptor media on the in vitro diffusion kinetics, *Farmacia*, **59**:358–366 (2011).
- Modi J., Joshi G., Sawant K. Chitosan based mucoadhesive nanoparticles of ketoconazole for bioavailability enhancement: formulation, optimization, *in vitro* and *ex vivo* evaluation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **39**:540–547 (2013).
- Moghimpour E., Handali S. Liposomes as drug delivery systems: properties and applications, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, **4**:169–185 (2013).
- Mohammadi-Samani S., Montaseri H., Jamshidnejad M. Preparation and evaluation of cyproterone acetate liposome for topical drug delivery, *IJPS*, **5**:199–204 (2009).
- Monteiro N., Martins A., Reis R.L., Neves N.M. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine, *J. R. Soc. Interface*, **11**:20140459 (2014).
- Morsy M.A., Sultan S.M., Dafalla H. Electron paramagnetic resonance method for the quantitative assay of ketoconazole in pharmaceutical preparations, *Anal. Chem.*, **81**:6991–6995 (2009).
- Mozafari M.R., Johnson C., Hatziantoniou S., Demetzos C. Nanoliposomes and their application in food nanotechnology, *J. Liposome Res.*, **18**:321–327 (2008).
- Müller R.H., Peterson R.D., Hommoss A., Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**:522–530 (2007).
- Mulye C., Mishra R., Suseem S.R. Formulation and evaluation of liposome mediated drug delivery, *UJP*, **2**:156–160 (2013).
- Munguia R., Daniel S.J. Ototopical antifungals and otomycosis: a review, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, **72**:453–459 (2008).
- Najmuddin M., Mohsin A.A., Khan T., Patel V., Shelar S. Formulation and evaluation of solid dispersion incorporated gel of ketoconazole, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, **1**:406–412 (2010).
- Nava G, Piñón E, Mendoza L., Mendoza N., Quintanar D., Ganem A. Formulation and *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* evaluation of elastic liposomes for transdermal delivery of ketorolac tromethamine, *Pharmaceutics*, **3**:954–970 (2011).
- Nawaz A., Jan S.U., Khan N.R., Hussain A., Khan G.M. Formulation and *in vitro* evaluation of clotrimazole gel containing almond oil and Tween80 as penetration enhancer for topical application, *Pak. J. Pharm. Sci.*, **26**:617–622 (2013).

- Nguyen T.T.T.N., Østergaard J., Stürup S., Gammelgaard B. Investigation of a liposomal oxaliplatin drug formulation by capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry (CE-ICP-MS), *Anal. Bioanal. Chem.*, **402**:2131–2139 (2012).
- Nidhal K.M., Athmar D.H. Preparation and evaluation of salbutamol liposomal suspension using chloroform film method, *MMJ*, **11**:39–44 (2012).
- Niu M., Lu Y., Hovgaard L., Wu W. Liposomes containing glycocholate as potential oral insulin delivery systems: preparation, *in vitro* characterization, and improved protection against enzymatic degradation, *Int. J. Nanomedicine*, **6**:1115–1166 (2011).
- Novotná A., Korhonova M., Bartonkova I., Soshilov A.A., Denison M.S., Bogdanova K., Kolar M., Bednar P., Dvorak Z. Enantiospecific effects of ketoconazole on aryl hydrocarbon receptor, *PLoS One*, **9**:e101832 doi: 10.1371/journal.pone.0101832. eCollection 2014.
- Ogbuehi I.H., Ebong O.O., Obianime A.W. Oral acute toxicity (LD50) study of different solvent extracts of *Abrus precatorius* Linn leaves in wistar rats, *Euro. J. Exp. Bio*, **5**: 18–25 (2015).
- Ortan A., Câmpeanu Gh., Dinu-Pîrvu C., Popescu L. Studies concerning the entrapment of *Anethum graveolens* essential oil in liposomes, *Rom. Biotech. Lett.*, **14**:4411–4417 (2009).
- Ostolska I., Wiśniewska M. Application of the zeta potential measurements to explanation of colloidal Cr₂O₃ stability mechanism in the presence of the ionic polyamino acids, *Colloid Polym. Sci.*, **292**:2453–2464 (2014).
- Pandey R.S. Formulation of benzocaine loaded PG-liposomes for enhanced skin delivery, *AJPMS*, **2**:78–82 (2012).
- Panwar P., Pandey B., Lakhera P.C., Singh K.P. Preparation, characterization, and *in vitro* release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes, *Int. J. Nanomedicine*, **5**:101–108 (2010).
- Paolicelli P., Corrente F., Serricchio D., Cerreto F., Cesa S., Tita B., Vitali F., D'Auria F.D., Simonetti G., Casadei M.A. The system SLN-dextran hydrogel: An application for the topical delivery of ketoconazole, *J. Chem. Pharm. Res.*, **3**:410–421 (2011).
- Patel G.M., Patel A.P. A novel effervescent bioadhesive vaginal tablet of ketoconazole: formulation and *in-vitro* evaluation, *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, **2**:656–667 (2010).
- Patel H., Patel H., Patel N., Gupta A. Preparation and characterization of calcium phosphate coated vinblastine sulfate liposomes, *IJPRBS*, **2**:263–280 (2013).
- Patel M.H., Patel A.M., Patel S.M., Ninama G.L., Patel K.R., Lavingia B.C. Antifungal susceptibility testing to determine MIC of amphotericin B, fluconazole and ketoconazole against ocular fungal infection, *NJCM*, **2**:302–305 (2011).
- Patel N., Panda S. Liposome drug delivery system: a critic review, *JPSBR*, **2**:169–175 (2012).
- Patel R.P., Patel H., Baria A.H. Formulation and evaluation of liposomes of ketoconazole, *IJDDT*, **1**:16–23 (2009).
- Patel S.S., Patel M.S., Salampure S., Vishwanath B., Patel N.M. Development and evaluation of liposomes for topical delivery of tacrolimus (Fk-506), *J. Sci. Res.*, **2**:585–596 (2010).
- Pavelič Ž., Škalko-Basnet N., Jalšenjak I. Liposomal gel with chloramphenicol: characterization and *in vitro* release, *Acta Pharm.*, **54**:319–330 (2004).
- Perez H. Ketoconazole as an adjunct to finasteride in the treatment of androgenetic alopecia in men, *Med. Hypotheses*, **62**:112–115 (2004).

- Perrie Y., Frederik P.M., Gregoriadis G. Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition, *Vaccine*, **19**:3301–3310 (2001).
- Phayre A.N., Vanegas Farfano H.M., Hayes M.A. Effects of pH gradients on liposomal charge states examined by capillary electrophoresis, *Langmuir*, **18**:6499–6503 (2002).
- Prabhu P., Kumar N., Dhondge G., Vijaynarayana K., Koland M., Harish N.M., Narayana C.R. Preparation and evaluation of liposomes of brimonidine tartrate as an ocular drug delivery system, *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, **1**:502–508 (2010).
- Prazanth V.V., Maharshi S., Sam T.M. Liposomes: an overview, *IJPI's Journal of Pharmaceutics and Cosmetology*, **2**:67–74 (2012).
- Pysker M.D., Hayes M.A. Examination of the electrophoretic behavior of liposomes, *Langmuir*, **20**:4369–4375 (2004).
- Rajnish A., Ajay S. Release studies of ketoprofen niosome formulation, *J. Chem. Pharm. Res.*, **2**:79–82 (2010).
- Ramana L.N., Sethuraman S., Ranga U., Krishnan U.M. Development of a liposomal nanodelivery system for nevirapine, *J. Biomed. Sci.*, **17**:1–9 (2010).
- Ramasamy T., Khandasami U.S., Ruttala H., Shanmugam S. Development of solid lipid nanoparticles enriched hydrogels for topical delivery of anti-fungal agent, *Macromol. Res.*, **12**:682–692 (2012).
- Rao Purushotham K., Venkateshwarlu P., Shashikala P., Sagare P., Saran S.V., Ravindranath A., Ashok Kumar C., Anand C., Jayanthi C. Ketoconazole derma sticks for topical application, *Int. J. Res. Chem. Environ.*, **2**:255–259 (2012).
- Rasheed S.H., Tirumoorthy N., Girhepunje K. Formulation and evaluation of liposomal carriers of ketoconazole, *WJPPS*, **1**:280–289 (2012).
- Rathod S., Deshpande S.G. Design and evaluation of liposomal formulation of pilocarpine nitrate, *Indian J. Pharm. Sci.*, **72**:155–160 (2010).
- Reddy K.H., Reddy M.M. *In-vitro* formulation and evaluation of cefixime liposome formulation, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, **2**:198–207 (2012).
- Reed J.R. The use of liposomes in the study of drug metabolism: a method to incorporate the enzymes of the cytochrome P450 monooxygenase system into phospholipid, bilayer vesicles. In: Weissig V. (ed.). *Liposomes; methods and protocols; volume 2: Biological membrane models*, New York, Dordrecht, Heidelberg, London; Humana Press, Springer, 2010, pp. 11–20.
- Riché E.L., Erickson B.W., Cho M.J. Novel long-circulating liposomes containing peptide library-lipid conjugates: synthesis and *in vivo* behavior, *J. Drug Target.*, **12**:355–361 (2004).
- Sabín J., Prieto G., Ruso J.M., Hidalgo-Álvarez R., Sarmiento F. Size and stability of liposomes: a possible role of hydration and osmotic forces, *Eur. Phys. J. E*, **20**:401–408 (2006).
- Sahasrabuddhe S.H., Bajpai N., Bais S., Ganesan S. Ketoconazole: liposomal drug delivery system—a boon for cosmetic industry, *IJAPS*, **3**:109–116 (2012).
- Sanfilippo A., English J.C. An overview of medicated shampoos used in dandruff treatment, *P&T*, **31**:396–400 (2006).
- Sarat Chandran C., Shirwaikar A., Devi A.S., Dominic A. Development and evaluations of ethosomal formulation containing ketoconazole, *AJBPR*, **1**:2231–2560 (2011).

- Shahi S., Sonwane U., Zadbuke N., Tadwee I. Design and development of diphenhydramine hydrochloride topical liposomal drug delivery system *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **5**:534–542 (2013).
- Shaikh A.A., Syed N.S., Rafique M., Asif A.R. Morphometric study of ketoconazole treated liver in albino rats, *Pak. J. Pharmacol.*, **27**:11–17 (2010).
- Shaji J., Iyer S. Preparation, optimization and *in-vivo* hepatoprotective evaluation of quercetin liposomes, *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, **4**:24–32 (2012).
- Sharma B., Sharma A. Future prospect of nanotechnology in development of anti-ageing formulations, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **4**:57–66 (2012).
- Sharma S., Mishra L., Grover I., Gupta A., Kaur K. Liposomes: vesicular system an overview, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **2**:11–17 (2010).
- Shazly G.A. Propranolol liposomes: formulation, characterization, and *in vitro* release, *JOBM*, **5**:17–25 (2013).
- Sheer A., Chauhan M. Ethosomes as vesicular carrier for enhanced transdermal delivery of ketoconazole – Formulation and evaluation, *IJPI's Journal of Pharmaceutics and Cosmetology*, **1**:1–14 (2011).
- Sherry M., Charcosset C., Fessi H., Greige-Gerges. Essential oils encapsulated in liposomes: a review, *J Liposome Res.* DOI: 10.3109/08982104.2013.819888 (2013).
- Shirsand S.B., Para M.S., Nagendrakumar D., Kanani K.M., Keerthy D. Formulation and evaluation of ketoconazole niosomal gel drug delivery system, *Int. J. Pharma. Investig.*, **2**:201–207 (2012).
- Shivanand P., Devmurari V., Munish G., Pandey D. Formulation, optimization and in-vitro evaluation of ketoconazole cream, *Der Pharmacia Lettre* **1**:18–24 (2009).
- Shivhare U.D., Ambulkar D.U., Mathur V.B., Bhusari K.P., Godbole M.D. Formulation and evaluation of pentoxifylline liposome formulation *Dig. J. Nanomater. Bios.*, **4**:857–862 (2009).
- Simonzadeh N. An isocratic HPLC method for the simultaneous determination of cholesterol, cardiolipin, and DOPC in lyophilized lipids and liposomal formulations, *J. Chromatogr. Sci.*, **47**:304–308 (2009).
- Sipai A.B.M., Vandana Y, Mamatha Y., and Prasanth V.V. Liposomes: an overview, *JPSI*, **1**:13–21 (2012).
- Sirisha V.N.L., BhavaniHarika I., Sruthi B., Namrata M., Kirankumar P., Kiran Kumar Rao Y., Pranavi K., Sindhura S., Vamsi Krishna N., UmaMaheshwaraRao O. Liposomes-the potential drug carriers, *JP*, **2**:26–38 (2012).
- Skiba M., Skiba-Lahiani M., Marchais H., Duclos R., Arnaud P. Stability assessment of ketoconazole in aqueous formulations, *Int. J. Pharm.*, **198**:1–6 (2000).
- Soema P.C., Willems G.J., Jiskoot W., Amorij J.P., Kersten G.F. Prediction the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **94**:427–435 (2015).
- Song J., Shi F., Zhang Z., Zhu F., Xue J., Tan X., Zhang L., Jia X. Formulation and evaluation of celastrol-loaded liposomes, *Molecules*, **16**:7880–7892 (2011).
- Staub I., Schapoval E.E.S., Bergold A.M. Microbiological assay of ketoconazole in shampoo, *Int. J. Pharm.*, **292**:195–199 (2005).

- Staub I., Schapoval E.E.S., Bergold A.M. Microbiological assay of ketoconazole in shampoo, *Int. J. Pharm.*, **292**:195–199 (2005).
- Sabeti B., Noordine M.I.B., Javar H.A., Davoudi E.T., Kadivar A. Characterization of diclofenac liposomes formulated with palm oil fractions, *Trop. J. Pharm. Res.*, **13**:185–190 (2014).
- Sułkowski, W.W., Pentak, D., Korus, W., Sulowska, A. Effect of temperature on liposome structures studied using ERP spectroscopy, *Spectroscopy*, **19**:37–42 (2005).
- Surianarayanan R., Shivakumar H.G., Vegesna N.S.K.V., Srivastava A. Effect of sample concentration on the characterization of liposomes using dynamic light scattering technique, *Pharm. Methods*, **7**:70–74 (2016).
- Torchilin V.P., Levchenko T.S., Whiteman K.R., Yaroslavov A.A., Tsatsakis A.M., Rizos A.K., Michailova E.V., Shtilman M.I. Amphiphilic poly-*N*-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification, *Biomaterials*, **22**:3035–3044 (2001).
- Torres I.M.S., Bento E.B., Da Cunha Almeida L., Martins de Sá L.Z.C., Lima E.M. Preparation, characterization and *in vitro* antimicrobial activity of liposomal ceftazidime and cefepime against *Pseudomonas Aeruginosa* strains, *Braz. J. Microbiol.*, **43**:984–992 (2012).
- Traïkia M., Warschawski D.E., Recouvreux M., Cartaud J., Devaux P.F. Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and ³¹P-nuclear magnetic resonance, *Eur. Biophys. J.*, **29**:184–195 (2000).
- Yang K., Delaney J.T., Ulrich S., Schubert U.S., Fahr A. Fasthigh – through put screening of temoporfin-loaded liposomal formulations prepared by ethanol injection method, *J Liposome Res.*, **22**:31–41 (2012).
- Velikinac I., Čudina O., Jankovič I., Agbaba D., Vladimirov S. Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for quantitative determination of ketoconazole in drug formulations, *Farmaco*, **59**:419–424 (2004).
- Vojič M.P., Popović G.V., Sladič D.M., Pfenđt L.B. Protolytic equilibria in homogeneous and heterogeneous systems of ketoconazole and its direct spectrophotometric determination in tablets, *J. Serb. Chem. Soc.*, **70**:67–78 (2005).
- Wang L., Tang X. A novel ketoconazole bioadhesive effervescent tablet for vaginal delivery: design, *in vitro* and ‘*in vivo*’ evaluation, *Int. J. Pharm.*, **350**:181–187 (2008).
- Web1. https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/Chem%20and%20Society/IMF_Solutions/olIMF_solutions.htm (20.11.2016).
- Web2. https://en.uit.no/forskning/forskningsgrupper/sub?sub_id=344032&p_document_id=338459 (20.11.2016).
- Web 3. <http://ibidi.com/xtproducts/en/Cells-Reagents/Fuse-It-Membrane-Fusion/Fuse-It-P> (23.11.2016).
- Web 4. <http://www.tlcbio.com/en-global/Page/immunoliposome-targetdelivery> (23.11.2016).
- Web 5. http://mss.svarog.si/biologija/MSS/index.php?page_id=10960 (23.11.2016).
- Web 6. <http://themedicalbiochemistrypage.org/cholesterol.php> (21.11.2016).
- Wei G.L., Xiao S.H., Gu Y., Si D.Y. Validated HPLC assay of liposome-encapsulated and non-liposomal doxorubicin in plasma and its application to pharmacokinetic study, *AJPP*, **10**:229–236 (2010).

- WHO, Library Cataloguing-in-Publication Data. Chloroform. Concise international chemical assessment document, 58, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Germany (2004).
- Wilson V.S., LeBlanc G.A. The contribution of hepatic inactivation of testosterone to the lowering of serum testosterone levels by ketoconazole, *Toxicol. Sci.*, **54**:128–137 (2000).
- Xia S., Xu S. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk, *Food Res. Int.*, **38**:289–296 (2005).
- Yamauchi M., Tsutsumi K., Abe M., Uosaki Y., Nakakura M., Aoki N. Release of drugs from liposomes varies with particle size, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**:963–966 (2007).
- Yin F., Guo S., Gan Y., Zhang X. Preparation of redispersible liposomal dry powder using an ultrasonic spray freeze-drying technique for transdermal delivery of human epithelial growth factor, *Int. J. Nanomedicine*, **4**:1665–1676 (2014).
- Yue-Ming M., Zhang-Qing M., Chang-Qing G., Jian-She Y., Rui-Yuan S. Hepatotoxicity and toxicokinetics of ketoconazole in rabbits, *Acta Pharmacol. Sin.*, **24**:788–782 (2003).
- Zhong J., Dai L.C. Liposomal preparation by supercritical fluids technology, *Afr. J. Biotechnol.*, **10**:16406–16413 (2011).