Правила для авторов

ISSN 0367-3057

ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ЖУРНАЛ

5·2008

УДК 615.277.3:615.456

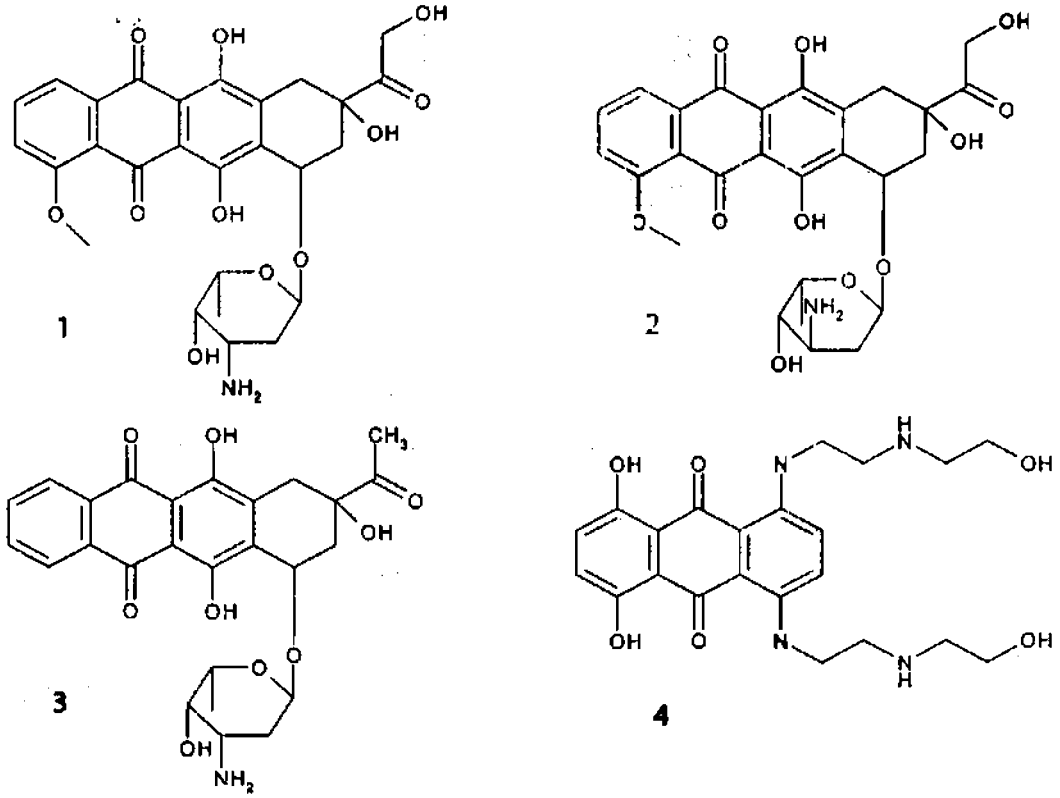
*А.В.СТАДНІЧЕНКО, Ю.М.КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ, д-р фармац. наук, проф., С.М.КОВАЛЕНКО, д-р хім. наук, проф.**

Національний фармацевтичний університет

ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ІНКАПСУЛЯЦІЇ У ЛІПОСОМАХ З АНТРАЦИКЛІНОВИМИ АНТИБІОТИКАМИ, ОТРИМАНИМИ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ «ХІМІЧНОГО ГРАДІЄНТА»

Ключові слова: ліпосоми, антрациклінові антибіотики, інкапсуляція, метод «хімічного градієнта»

Антибіотики антрациклінового ряду є сучасними ефективними засобами боротьби з онкологічними захворюваннями [4, 5].



Антибіотики антрациклінового ряду:
1 – доксорубіцин; *2* – епірубіцин; *3* – ідарубіцин; *4* – мітоксантрон

Одним з недоліків антрациклінових антибіотиків є висока токсичність, зокрема кардіотоксичність, яка перешкоджає використанню їх терапевтичних властивостей у повному обсязі. Створення ліпосомальних форм цитостатичних антибіотиків є одним з перспективних напрямів сучасної фармації і так само одним із способів зниження токсичності. Ліпосоми з цитостатичними антибіотиками, що введені внутрішньовенно і циркулюють у кров'яному руслі, накопичуються в тілі пухлини внаслідок вищої (порівняно із здоровими тканинами) її проникності [3]. Однією з необхідних умов успішної терапії ліпосомальними формами цитостатиків є стабільність ліпосом у розчині протягом заданого часу без вивільнення діючої речовини.

*Автори висловлюють вдячність Інституту тонкої хімічної технології ім. М.В.Ломоносова, м. Москва, за надання зразків та можливість проведення досліджень.

© Колектив авторів, 2008

ліпосомальні композиції, створені за класичним способом, заснованим на гідратації ліпідної плівки водним розчином цитостатика, нездатні до довготривалої стабільності в рідинному стані при зберіганні та регідратації. Стабільність їх обмежена 0,5—1 добою; так само слід урахувати, що при спробі позбавитися від невключеного компонента для підвищення рівня інкапсуляції речовина, що діє, з ліпосом потраплятиме у позаліпосомальний простір, отже, має місце так званий «витік ліпосом».

Позбавитися від цих недоліків можна при використанні технології «хімічного градієнта», при якій водорозчинна речовина, що діє, потрапляючи всередину ліпосоми, зв'язується і не має можливості знов проникати назовні через мембрану при зберіганні. Вивільнення речовини здійснюється тільки після руйнування ліпосоми в ураженому органі у процесі проведення терапії. Один з засобів утримання слабокатіоногенного діючого засобу всередині ліпосом — це технологія «хімічного градієнта». При цьому способі спочатку отримують ліпосоми за допомогою гідратації ліпідної плівки буферним розчином сульфату амонію, отриманий розчин піддають екструзії, отримуючи ліпосоми із заданим розміром. Далі проводять видалення навколишнього буфера за допомогою ультрафільтрації або гельпроникної хроматографії. На цій стадії на поверхні ліпосоми створюється так званий «хімічний градієнт» — усередині ліпосоми буферний розчин сульфату амонію, а зовні — розведений буферний чи ізотонічний розчин. Коли сполука, яка містить аміногрупу (наприклад антрациклінoвий антибіотик), попадає у розчин, вона частково адсорбується на поверхні ліпосоми та проникає у внутрішньоліпосомальний простір, утворюючи при цьому з сульфат-іоном завдяки реакції обміну желеподібну структуру [8, 9], вивільняючи аміак, який залишає ліпосому. Кількість речовини, яка може утримуватися всередині ліпосоми, залежить від кількості сульфат-іона у ліпосомі, градієнта концентрації сульфату амонію, матеріалу ліпосом та часу, упродовж якого проводиться реакція (до ліофілізації або до видалення невключеної діючої речовини).

Ліпосоми, отримані з використанням технології «хімічного градієнта», піддаються стеричній стабілізації полімерами, адсорбованими або хімічно привитими на поверхню ліпосоми, що підвищує їх стабільність у розчині протягом тривалого часу як безпосередньо при виготовленні, так і при регідратації, після ліофілізації, що збільшує термін придатності препарату. У літературі [8, 9] є дані про створення ліпосом, що містять доксорубіцин та епірубіцин із синтетичної сировини методом «хімічного градієнта». Градієнт створювали за допомогою гельпроникної хроматографії.

Дуже важливим при цій технології є контроль ступеня інкапсуляції, який є критерієм тривалості технологічного процесу та показником якості лікарського засобу.

Формулювання цілей статті

Метою даної роботи є створення методики визначення ступеня інкапсуляції антибіотиків антрациклінового ряду при отриманні ліпосом за технологією «хімічного градієнта» у ліофілізованому вигляді після регідратації методики видалення невключеної діючої речовини методом ультрафільтрації.

Об'єкти та методи дослідження

Об'єктами дослідження були вибрані ліпосомальні форми цитостатичних антибіотиків антрациклінового ряду: доксорубіцин, епірубіцин, ідарубіцин та мітоксантрон. Для отримання ліпосом використовували яєчний фосфатидилхолін. Ліпосоми отримували екструзійним методом

Ліпосомальні форми препаратів були виготовлені за технологією «хімічного градієнта» [8, 9] з модифікацією і подальшою ліофілізацією. Ізолювання ліпосом від невключеної речовини проводили методом ультрафільтрації на колонках з верхньою межею відсікання речовини 15 кДа.

В основу методики визначення невключеної речовини була покладена методика з використанням високоефективної гельпроникної хроматографії (ВЕГПХ) [6, 7]. Ліпосоми, що є надмолекулярними структурами, виходять у неутримуваному об'ємі, а невключена речовина утримується в порах гелю, чим і досягається розділення.

Результати дослідження та їх обговорення

Для визначення ступеня інкапсуляції були приготовлені розчини з різною концентрацією активної речовини для побудови калібрувальних графіків у діапазоні концентрацій від 10 до 80 % від номінального вмісту в лікарській формі (1 мг/мл) (табл. 1). Як зразки активних речовин використовували субстанції доксорубіцину, епірубіцину, ідарубіцину та мітоксантрону.

Таблиця 1

Концентрація приготовлених калібрувальних розчинів

Калібрувальні розчини	Концентрація, мг/мл				
Доксорубіцин	0,0998	0,1996	0,3992	0,5988	0,7988
Епірубіцин	0,1018	0,2036	0,4072	0,6108	0,8144
Ідарубіцин	0,0994	0,1988	0,3976	0,5964	0,7952
Метоксантрон	0,0997	0,1994	0,3988	0,5982	0,7988

Отримані розчини хроматографували по 1,0 мкл на рідинному хроматографі Shimadzu LC-10VP із спектрофотометричним детектором, одержуючи по три хроматограми для кожного з розчинів за нижченаведеними умовами:

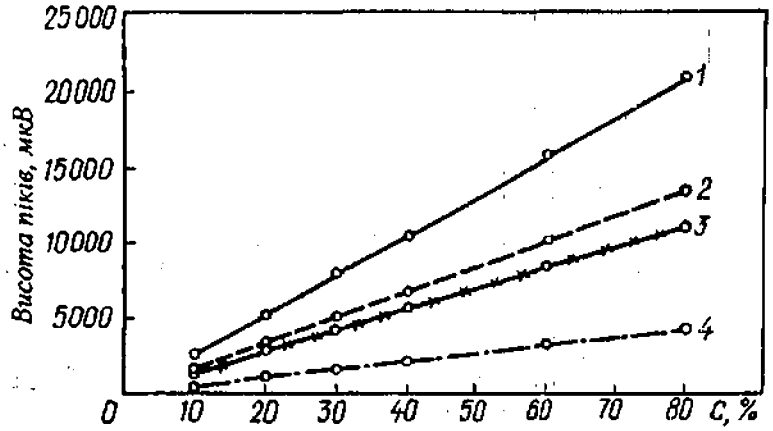


Рис. 1. Калібрувальні графіки розчинів доксорубіцину, епірубіцину, ідарубіцину та мітоксантрону в діапазоні концентрацій від 10 до 80% від номінальної концентрації (1мг/мл):

1 – ідарубіцин, *2* – доксорубіцин, *3* – епірубіцин, *4* – мітоксантрон

• колонка Tricorn High-Performance Column виробництва фірми «Amersham Biosciences», заповнена гелем на основі полідекстрану з діапазоном ексклюзії 500–2000 Да;

• рухома фаза: фосфатний буфер з pH 5,2±0,2;

• детектування за довжиною хвилі 254 нм.

Як аналітичний сигнал використовувалися висоти піків, виражені в мкВ (uV).

Отримані розчини у вибраному діапазоні концентрацій мають лінійну залежність аналітичного сигналу від концентрації (рис. 1). Характеристики лінійності та метрологічні характеристики за отриманими калібрувальними залежностями наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Метрологічні характеристики залежностей для рівнянь виду $Y=B\cdot X+A$ при $P=0,95$

Параметри	Доксорубіцин	Епірубіцин	Ідарубіцин	Мітоксантрон
B	16739,46	13675,78	26075,08	4973,81
S_B	211,81	192,49	340,76	45,43
A	-635,92	-655,21	-1353,96	-271,68
S_A	104,01	96,39	166,62	22,30
RSD0	121,12	112,22	193,98	25,97
r	0,9997	0,9997	0,9997	0,9998

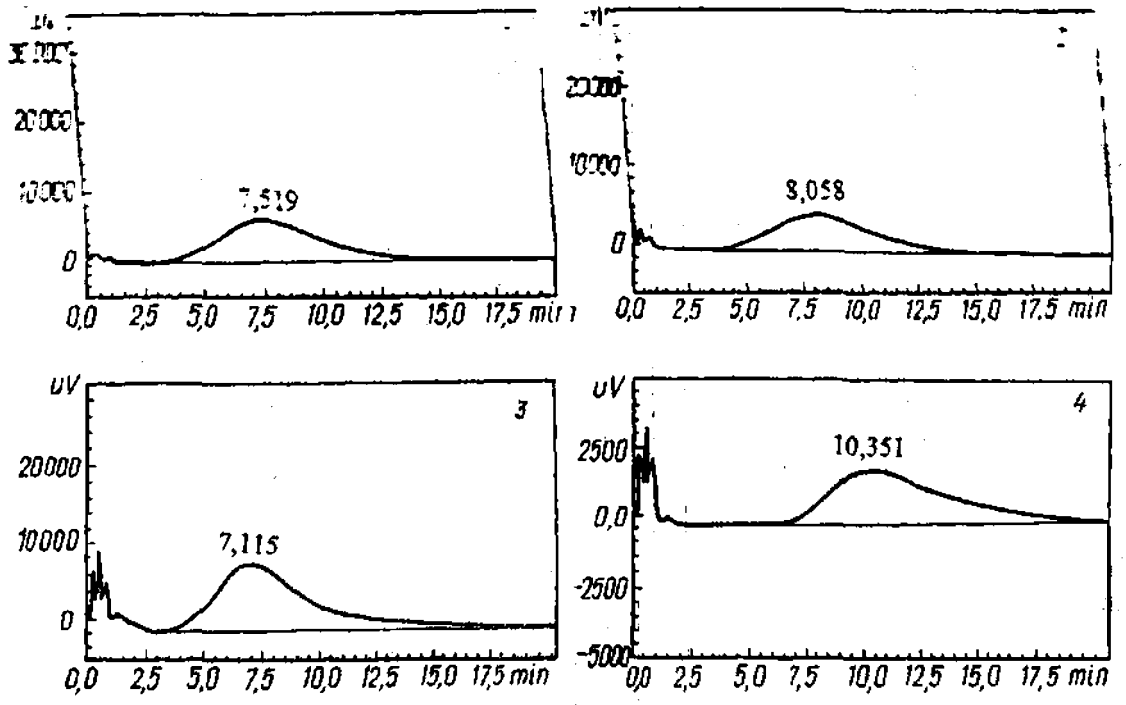


Рис. 2. Приклади хроматограм калібрувальних розчинів:
1 – доксорубіцин; *2* – епірубіцин; *3* – ідарубіцин; *4* – метоксантрон.

На рис. 2 наведені приклади хроматограм калібрувальних розчинів доксорубіцину, епірубіцину, ідарубіцину та мітоксантрону з концентраціями відповідно 0,3992, 0,4072, 0,3976 і 0,3988 мг/мл.

З хроматограм розчинів антрациклінових антибіотиків, отриманих з використанням високоефективної гельпроникної хроматографії (ВЕГПХ), видно, метоксантрон сильніше утримується у порах гелю (має більший час утримування) і матиме краще розділення з ліпосомальною формою. Так само видно (табл. 2, критерій В), що чутливість до доксорубіцину й епірубіцину не має значних відмінностей. Як видно з наведених вище формул антибіотиків антрациклінового ряду, доксорубіцин та епірубіцин мають однакові хромофорні групи. У той же час чутливість до ідарубіцину майже у два рази вище, а до метоксантрону – в 2,5 разу нижче, ніж до епірубіцину.

Для визначення ступеня інкапсуляції проводили визначення невключеної активної речовини в ліпосомальних формах доксорубіцину, епірубіцину, ідарубіцину та мітоксантрону. Ліофілізовані препарати регідратували, додаючи необхідну кількість води очищеної до концентрації активної речовини 1 мг/мл (СО). Отримані випробовувані розчини хроматографували по 1 мкл за тих самих умов, що і калібрувальні розчини, одержуючи по три хроматограми для кожного з розчинів.

Концентрацію невключеної речовини (X_i) обчислювали з отриманих хроматограм за побудованими калібрувальними залежностями. За ступінь інкапсуляції брали відсоток антибіотика, що знаходиться всередині ліпосом, по відношенню до загальної кількості активної речовини у препараті (In_i,%):

$$In_i = \frac{C_0 - X_i}{C_0} \cdot 100$$

Отримані результати наведені в табл. 3 та на рис. 3.

Для видалення невключеної речовини в ліпосомальному препараті застосували метод ультрафільтрації. Для випробувань було обрано ліпосомальний препарат на основі епірубіцину.

Препарат концентрували в чотири рази на ультрафільтраційних колонках з верхньою межею відсікання речовини 15 кДа (при цьому відбувається позбавлення

Таблиця 3

Концентрації невключеної активної речовини та ступінь інкапсуляції для ліпосомальних форм доксорубіцину, епірубіцину, ідарубіцину та мітоксантрону і метрологічні характеристики отриманих результатів

№	Назва	Хср, мг/мл	Інкапсуляція, %	s	RSD, %	Хср±Δх	ε, %
1	Доксорубіцин	0,766	23,4%	0,0066	0,86	0,766±0,0089	1,16
2	Епірубіцин	0,658	34,2%	0,0017	0,25	0,658±0,0023	0,34
3	Ідарубіцин	0,220	78,0%	0,0025	1,13	0,220±0,0034	1,54
4	Мітоксантрон	0,693	30,7%	0,010	1,44	0,693±0,0136	1,96

Примітки: Хср — середнє значення отриманого результату, мг/мл; s — дисперсія; RSD — відносне стандартне відхилення, %; Хср±Δх — граничне значення довірчого інтервалу середнього результату; ε — відносна невизначеність середнього результату, %.

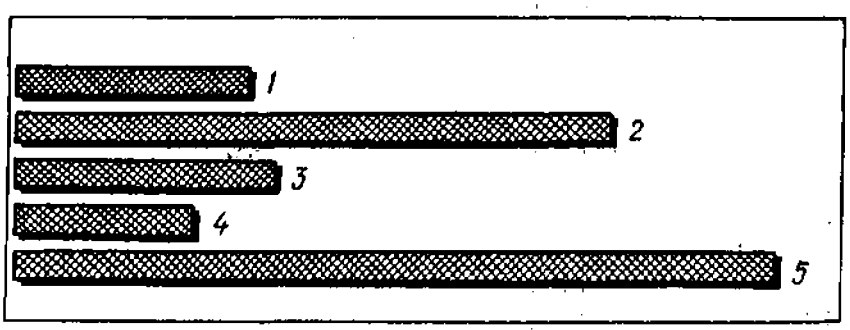


Рис. 3. Ступінь інкапсуляції активних речовин для ліпосомальних форм доксорубіцину, епірубіцину, ідарубіцину та мітоксантрону:
1 — мітоксантрон (In = 30,7 %), *2* — ідарубіцин (In=78,0 %), *3* — епірубіцин (In = 34,2 %), *4* — доксорубіцин (In = 23,4 %), *5* — загальна концентрація активної речовини 100 %

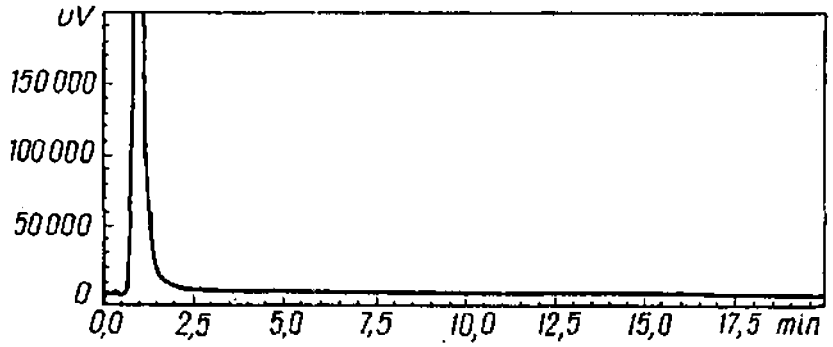


Рис. 4. Хроматограма ліпосомального препарату епірубіцину після видалення невключеної активної речовини ультрафільтрацією

від невключеного епірубіцину), після чого розбавляли буфером у чотири рази. Цикл «концентрування–розведення» проводили тричі з проміжним охолоджуванням розчину. Далі препарат сконцентрували у чотири рази, визначили загальну концентрацію епірубіцину методом спектрофотометрії та ступінь включення хроматографічним методом. Загальна концентрація епірубіцину в препараті становила 1,15 мг/мл. Отримана хроматограма показала повну відсутність невключеної речовини (рис. 4).

Виходячи з літературних даних [1, 2], була обчислена межа кількісного визначення (МКВ) невключеного епірубіцину за даними, наведеними в таблиці 2, і формулою

$$МКВ = \frac{10 * \delta}{S};$$

де δ — стандартне відхилення А для епірубіцину у таблиці 2;

S — тангенс кута нахилу калібрувальної прямої.

Межа кількісного визначення становила 0,038 мг/мл. Якщо взяти до уваги загальну концентрацію антибіотика в отриманих ліпосомах, а так само МКВ, то ступінь інкапсуляції у даному випадку становить 96,7 %.

Подальше спостереження за препаратом, який зберігався при температурі 6 ^{0}С. вели упродовж 14 днів, при цьому він залишався прозорим без ознак розшарування. невключеної активної речовини протягом зберігання виявлено не було.

Висновки

1. Розроблена методика визначення ступеня інкапсуляції активної речовини в ліпосомах з доксорубіцином, епірубіцином, ідарубіцином та мітаксантроном.

створених за методом «хімічного градієнта». Визначений ступінь інкапсуляції становить відповідно 23,4, 34,2, 78,0 та 30,7 %. Відносна невизначеність середнього результату становила менше 2 %.

2. На прикладі ліпосомальної форми епірубіцину розроблена методика видалення невключеної речовини з ліпосомального препарату методом ультрафільтрації. Проведено видалення невключеної речовини у препараті епірубіцину, при цьому ступінь інкапсуляції кінцевого продукту становив 96,7 %.

3. Препарат, отриманий після видалення невключеної речовини, залишався стабільним у період спостереження (14 днів).

1. Державна фармакопея України. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
2. Державна фармакопея України. – Х.: РІРЕГ, 2001. – Доп. 1. – 2004. – 520 с.
3. *Дудниченко А.С., Краснопольский Ю.М., Швец В.И.* Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике. – Х.: Ракаравелла, 2001. – 143с.
4. *Кулик Г.И., Пономарёва О.В., Король В.И. и др.* // Онкология. – 2004. – Т. 6. – № 3.
5. *Кулик Г.И., Чихун В.Ф.* Цитостатическая терапия злокачественных новообразований. Зб. наук. праць за ред. *Г.И.Соляник.* – К., 2000. – 293 с.
6. *Стадниченко А.В., Краснопольский Ю.М.* // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 64–69.
7. *Betageri G.V., Jenkins S.A., Parsons D.L.* // Lancaster. – Basel: Technomic, 1993. – 435 p.
8. *Haran G., Cohen R., Bar K.K.* // Biochemica et Biophisica Acta. – 1993. – Vol. 1151. – 201–215 p.
9. *Torchilin V.P., Weissing V.* Liposomes practical approach. – Oxford: University press, 2003. – 396 p.

Надійшла до редакції 18.07.2008.

А.В.Стадниченко, Ю.М.Краснопольский, С.М.Коваленко

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ИНКАПСУЛЯЦИИ В ЛИПОСОМАХ С АНТРАЦИКЛИНОВЫМИ АНТИБИОТИКАМИ, ПОЛУЧЕННЫМИ ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДА «ХИМИЧЕСКОГО ГРАДИЕНТА»

Ключевые слова: липосомы, антрациклиновые антибиотики, инкапсуляция, метод «химического градиента»

Проведенные исследования позволили разработать методику по определению степени инкапсуляции водорастворимых антибиотиков при производстве липосом. Были определены метрологические характеристики. Разработанная методика может быть использована для контроля в процессе производства липосом методом «химического градиента».

A.V.Stadnichenko, Y.M.Krasnopolskiy, S.M.Kovalenko

DETERMINATION OF ENCAPSULATIONS DEGREE IN LIPOSOMES, WITH ANTRACICLINIC ANTIBIOTICS, PRODUCED BY «CHEMICAL GRADIENT» METHOD

Key words: liposomes, antraciclinic antibiotics, incapsulations, «chemical gradient» method

SUMMARY

Methods development for measurement of the encapsulations degree was carry out. Metrological characteristics were determined. Development method may be used for control in production of liposomes, by «chemical gradient» methods.