

УДК 615

Г. І. Борщевський¹, Т. Г. Ярних², В. Н. Чабаний¹¹ПАТ «Фармак», м. Київ,²Національний фармацевтичний університет, м. Харків

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДІЮЧИХ РЕЧОВИН ЛІПОСОМАЛЬНОГО СПРЕЯ ДЛЯ ЗОВНІШНЬОГО ЗАСТОСУВАННЯ «ЕФІАЛЬ»

Проведено комплексні фізико-хімічні дослідження, які дозволили оптимізувати та апробувати в умовах виробництва два аналітичних методи визначення вмісту інкапсульованих в ліпосоми катіонних пептидів дермального шару шкіри свині в препараті спрей «Ефіаль». Розроблені та впроваджені методики перевірки якості проміжної продукції та специфікації контролю на етапі виробництва спрею «Ефіаль»: включення концентрату білку в суспензію ліпосом (напівпродукт), отримання готової форми (не фасована продукція), фасування (не маркована продукція).

Ключові слова: ліпосоми, пептиди, тонкослойна хроматографія, електрофорез, спектрофотометрія, денситометрія, спрей.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Одне із актуальних завдань сучасного фармацевтичного виробництва лікарських засобів, зокрема ліпосомальних препаратів є забезпечення стандартизації та сертифікації наноматеріалів [7]. На ПАТ «Фармак» розроблено ліпосомальний спрей «Ефіаль» призначений для лікування ран різної етіології [3, 5, 8]. Розробка лікарського нанотехнологічного засобу із включенням діючої речовини – комплексу катіонних пептидів в ліпосоми мало на меті збільшити біодоступність препарату, зменшити можливість побічної дії та вирішити завдання прицільного лікування та загоєння поверхневих ран. Ліпосомний спрей (ліпосомна емульсійна фармацевтична композиція) розроблений із використанням фосфатидилхоліну соєвих бобів. При фармацевтичній розробці поєднували традиційні фармакопейні методи фізико-хімічного дослідження та нові технології для оцінки інкапсульювання (навантаження) ліпосом катіонними пептидами.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ПУБЛІКАЦІЙ

Пряме визначення кількості білку в препараті ліпосомної емульсії не дозволяє отримати коректні дані за рахунок неспецифічних реакцій і оптичного поглинання фосфатидилхоліну в складі штучних мембран. Підходими

методами визначення долі інкапсульованих речовин усередині ліпосомного компартменту та/або адсорбованих на ліпосомах, включених у бішари відносно вільної діючої речовини є проведення процедури розділення (наприклад, гель-хроматографія, ультрацентрифугування, капілярний електрофорез або діаліз) [3, 7]. Останнім часом для цього крім методів ВЕРХ використовують метод капілярного електрофорезу, перевагами якого є висока ефективність розділення, економічність та економне використання реагентів [12]. Метод капілярного електрофорезу наведено в ВР 2009, ЕР 8.0 (2.2.47. Capillary electrophoresis), JP 15, USP 30. Переваги методу капілярного гель-електрофорезу, разом з іншими, – це, зокрема, можливість виконання автоматизованої послідовності серійних аналізів в контрольованих умовах та прецизійна чутливість детекторів.

ВИДІЛЕННЯ НЕ ВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Ліпосомальні лікарські засоби мають витримувати необхідні випробування на діючі і допоміжні речовини, а також і специфічні випробування, зокрема для даної конкретної дозованої форми – ліпосом. Оскільки ліпосоми особливо чутливі до змін технологічного процесу і масштабування, необхідно чітко ідентифікувати й оцінити критичні виробничі параметри (наприклад, масштабування, метод інкапсульюван-

ня, розмір частинок тощо), провести всебічні дослідження можливості змін критичних параметрів на всіх стадіях технологічних процесів.

Спектрофотометрично білки в складі ліпосомних препаратів коректно визначити неможливо через вплив матриці (ліпосомних мембран) та заважаючий вплив оптичного поглинання міцелярних комплексів ліпідів, тому необхідна розробка нових методик контролю кількісного вмісту білків.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Розробка методик контролю якості спрею на основі емульсії ліпосом з комплексом біологічно активних речовин екстракту дермального шару шкіри свині. Оптимізація методики кількісного визначення пептидів в ліпосомній формі препарату.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Методи дослідження

В дослідженні використовували препарат «Ефіаль» (емульсія ліпосом, які навантажені пептидами депротейнізованого дермального шару шкіри свиней) [3, 5, 8]. Ліпосоми отримували ультрацентрифугуванням зразків (6 годин, 21 000 g), центрифуга Eppendorf модель 5810R. Аліквоти осаду перерозчиняли в натрій фосфатному буфері Р, рН 4,0 (в перерахунку 120 мг/мл білку в 1 мл) і для руйнування ліпосом обробляли ультразвуком протягом 20 хв (потужність 100 та 37 kgH). Використовували розведення випробуваного розчину від 80 до 120 % від номінальної концентрації. Для кількісного відносного визначення білків готували розчини порівняння альбуміну бичачого (Cat.№ А7906, Sigma-Aldrich, США) в діапазоні концентрацій від 50 мкг/мл до 500 мкг/мл. Спектрофотометричні вимірювання проводили на спектрофотометрі Shimadzu UV-VIS-2401 PC.

Капілярний електрофорез проводили на приладі PA800Plus (Beckman Coulter, США) з PDA-детектором на основі діодної матриці. Електрофорез проводили в термостатованій касеті з немодифікованим кварцевим капіляром (внутрішній діаметр 50 мкм, загальна довжина 57 см) при температурі 25°C, який заповнювали гелевим-буфером (рН = 8,0; 0,2 % SDS) згідно протоколу виробника системи фармацевтичного аналізу PA800Plus. Зразки розчиняли у геле-буфері для зразків (100 мМ Трис-НСl, рН8,0; 0,1% SDS), денатурували перед нанесенням за 100 °С 3 хв. Капілярний електрофорез проводили при значенні ефективної напруги 20 кВ, загальний час аналізу 35 хвилин. Використовували ко-

мерційні набори для аналізу білків в присутності ДСН в поліакриламідному гелі (SDS-MW Analysis Kit, Beckman Coulter, Cat.N # 390953) з маркерами молекулярної ваги, додатково використовували набір кольорових білкових леддерів (Thermo scientific, Spectra multicolor low range protein ladder, Cat.N #26628). Детектування проводили в УФ-частині спектру при 220 нм, та 280 нм. Керування процедурами та умовами аналізу, обробку сигналів детекторів, розрахунки електрофореграм проводили за допомогою комерційного програмного забезпечення 32 Karat, v. 9.0, що встановлене на системі фармацевтичного капілярного аналізу PA800Plus (Beckman Coulter, США).

Для кількісного визначення пептидів дермального шару зразки розчинених ліпосом переносили методом пасивного дот-блоттингу на нітроцелюлозний фільтр, який кількісно абсорбує білки (до 80-100 мкг/см²) у відповідності до протоколів виробника [11]. На листки мембрани наносили по 20 мкл стандартного розчину, підсушували на повітрі при 40 °С, і фіксували в розчині (0,2 % глютарового діальдегіду, 30% метанолу, 0,2 М натрію ацетату) при кімнатній температурі 5 хвилин. Після відмивання фонового забарвлення барвника виконували цифрове фотографування для наступного цифрового сканування. За допомогою програми TotalLab Quant версія 13.01 (TotalLab Ltd, England Sigma #Z704547-1EA) в якості інтегруючого денситометра проводили денситометричне кількісне визначення. Для розрахунків використовували електронні таблиці MS Excel. В дослідженнях використовували наступні сполуки: додецилсульфат натрію, трис-гідрохлориду, бета-меркаптоетанол (Sigma-Aldrich, PN M7154, M6250), метанол, солі натрію фосфорнокислого та інші реактиви кваліфікації HPLC grade (виробництва Sigma-Aldrich), воду очищену, ультра фільтровану на апараті Direct 8 (MilliQ).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Важливим показником є кількісне визначення вмісту діючої лікарської речовини та стабільність цього показника при виробничих процедурах та зберіганні. В таблиці 1 наведені загальні показники готового препарату спрей «Ефіаль».

Таблиця 1

ПОКАЗНИКИ ЯКОСТІ СУСПЕНЗІЇ ЛІПОСОМ

Назва показника	Нормування
Опис	Стабільна емульсія від білого до жовтуватого кольору
рН	От 5,2 до 5,6
Розмір частин, нм	От 50 до 110

Агрегаційну стабільність лізосомальної дисперсії препарату визначали за відносною зміною оптичної густини на довжині хвилі 650 нм після освітлення 10 хвилин центрифугування за 10000 g.

$$\delta = \frac{D_1 - D_2}{D_1}$$

де, D_1 – оптична густина зразків лізосомальної емульсії до центрифугування;

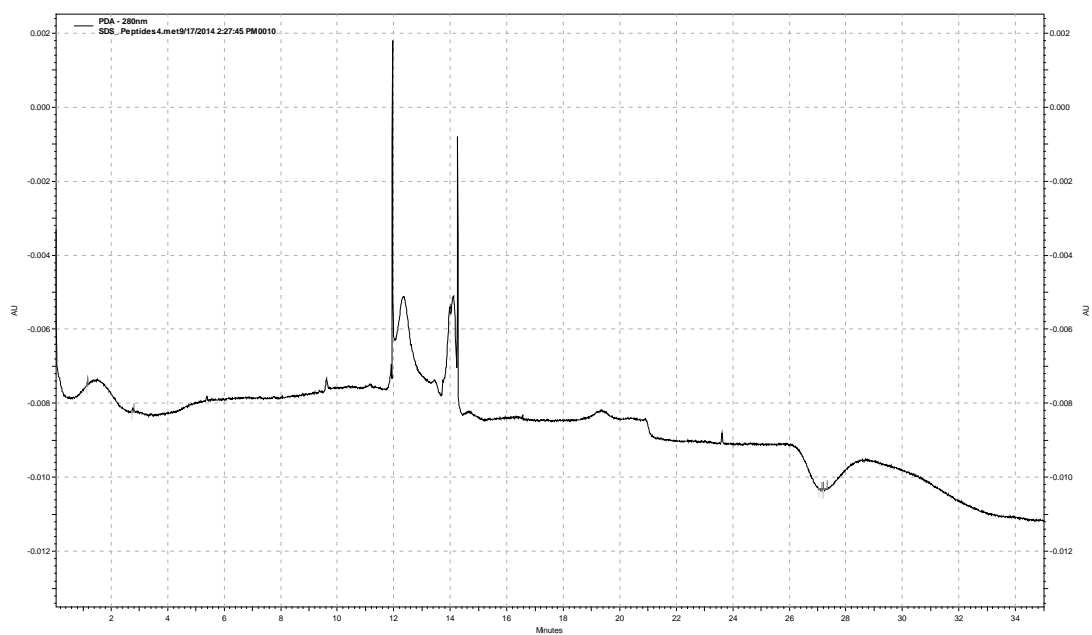
D_2 – оптична густина зразків лізосомальної емульсії після центрифугування.

Вимірювання показали відсутність змін оптичної густини зразків лізосомальної емульсії, що свідчить про агрегаційну стабільність препарату.

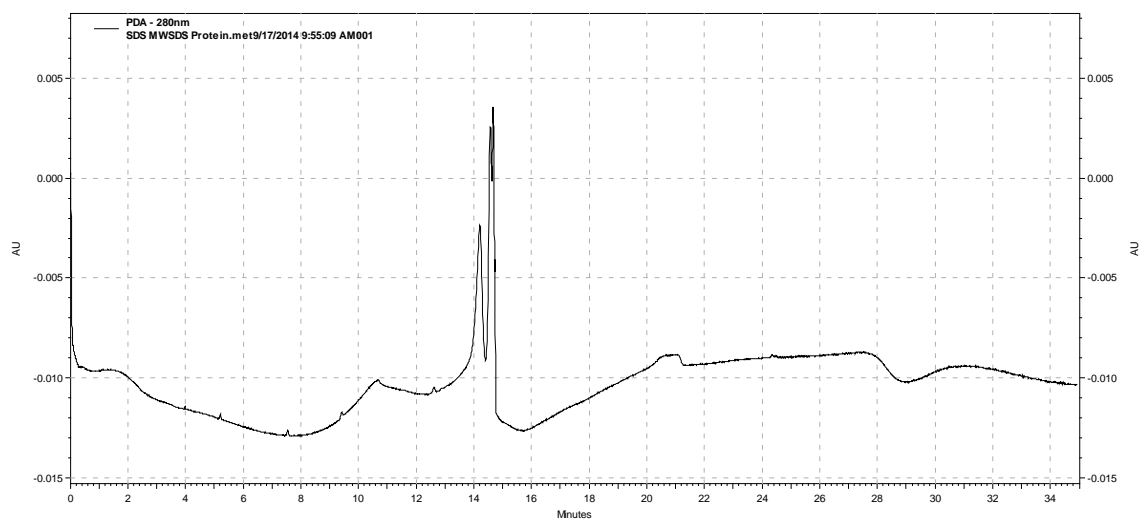
Нами проведено визначення кількісного вмісту пептидів методом капілярного SDS-електрофорезу в поліакриламідному гелі препарату «Ефіаль». Існуючі методики аналізу білків оптимізували за елетрофоретичними параметрами, ідентифікацію піків на електрофореграмах виконували методом зовнішніх стандартів. Найкраще поглинання в УФ-діапазоні при 220 нм. За спектром в межах піку ідентифікували певні класи сполук за їх спектральними властивостями хромофорів біополімерів за максимумах на 280 та 254 нм. Виходячи з можливостей системи для фармацевтичного капілярного електрофорезу проводили дослідження визначення якісного складу ліпосомного препарату. На рис. 1 наведено типову хроматограму розподілу компонентів складної суміші поліпептидів та ліпідів після пробопідготовки зразків препарату (денатурації в присутності 1 % ДСН). Іонний детергент додецилсульфат натрію руйнує ліпосомні бішари бульбашок, відповідно вміст ліпосом виходить назовні. Теоретично очікували, що на електрофореграмах повинні бути детектовані дві окремі ділянки комплексів ДСН з білками і окремо з фосфадитилхоліном. Розділення вздовж капіляру з використанням діодно-матричного детектування дозволили визначити інтенсивність поглинання піків складових речовин препарату спрею «Ефіаль». Детекцію виконували на різних довжинах хвиль (220, 250, 254 та 280 нм), записували спектри і порівнювали ефективність поглинання аналітів і попередньо забарвлених комерційних стандартів білків визначеної молекулярної маси. Як видно, на типовій електрофореграмі зразку препарату спрею «Ефіаль» (рис. 1) пептидна фракція виявляється у вигляді плоского піку з розподілом білкових ланцюгів від 5 до 12 кД. На рисунку 2 наведено типову порівняльну електрофореграму розподілу речовин на довжині хвилі 280 нм в зразку ліпосом з катіонними поліпептидами та в зразку

плацебо – ліпосом без білків. На профілі розподілу домінує характерний пік структур розчину плацебо (ліпосомна емульсія без навантаження катіонними пептидами), що виходить на 14,5-15 хв. відповідає розподілу в гелі комплексів іонного детергенту ДСН з мікроміцелярними структурам фосфадитилхоліну. Для вибору аналітичної довжини детектування порівнювали інтенсивність оптичного поглинання на різних хвилях детекції. Аналіз даних капілярного електрофорезу, що наведені на рис. 2 показує, що власне оптичне поглинання на довжині хвилі 280 нм в зоні розподілу піків катіонних пептидів в кілька разів менше, ніж на довжині хвилі 220 нм. Це можливо пояснюється меншою кількістю хромофорів (амінокислот з ароматичними циклами – тирозин, триптофан) в складі катіонних пептидів дермального шару шкіри свині. Також прослідковуються типові для умов капілярного електрофорезу при нанесення ліпосомної форми препарату значні коливання нульової лінії під час електрофорезу. Тому оптимальними умовами диференціальної детекції катіонних пептидів методом капілярного електрофорезу була обрана детекція на довжині хвилі 220 нм.

При вдосконаленні та відборі умов електрофоретичного розділення компонентів було показано, що при використанні діодно-матричного детектування на різних довжинах хвиль 220, 250, 256 та 280 нм мінімальні шуми специфічності для білкової фракції виконується саме при детектуванні на довжині хвилі 220 нм. Слід відмітити, що мембрані ліпідні комплекси рослинного походження в умовах електрофорезу з аніонним детергентом ДСН утворюють міцелярні комплекси, що мігрують в поліакриламідному гелі з параметрами умовної молекулярної маси біополімерів від 12 до 15 кДа. Як видно на хроматограмі (рис. 2а) фосфадитилхолін-ДСН міцелярні комплекси мігрують у вигляді окремого піку який майже втричі перевищує за площею кількість катіонних пептидів в складі ліпосом препарату. Пік фосфадитилхолін-ДСН комплексів при інших умовах електрофоретичного розділення за рахунок більшого кількісного відгуку на детекторі може маскувати відносно невеликий за оптичним поглинанням (оптичним відгуком) пік катіонних пептидів і давати завищені кількісні показники вмісту інкапсульованих білків. З іншого боку, власне оптичне поглинання в ультрафіолетовій частині спектру катіонних пептидів залежить від амінокислотного складу, кількості хромофорних груп амінокислот і, відповідно, може істотно відрізнятися за цими показниками від типових маркерних білків, зокрема альбумінів сироватки.

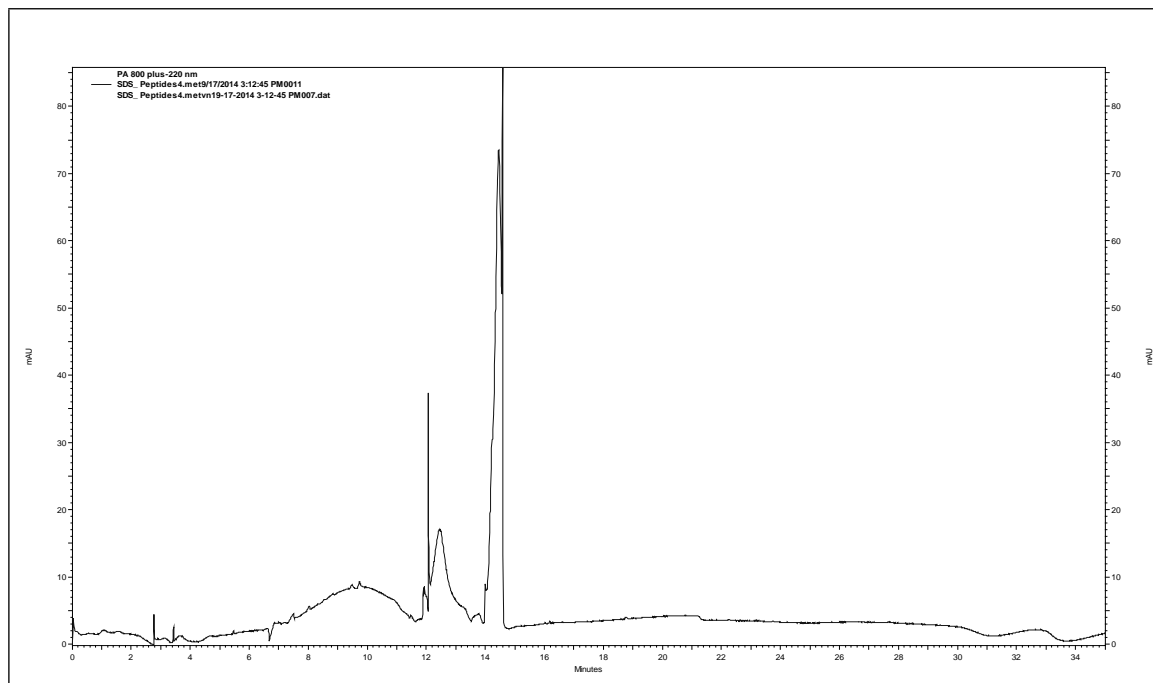


а) Електрофореграма розподілу макромолекул в ПААГ (0,8% ДСН) детекція на довжині хвилі 280 нм зразку ліпосом з інкапсульованими катіонними пептидами дермального шару шкіри свині;

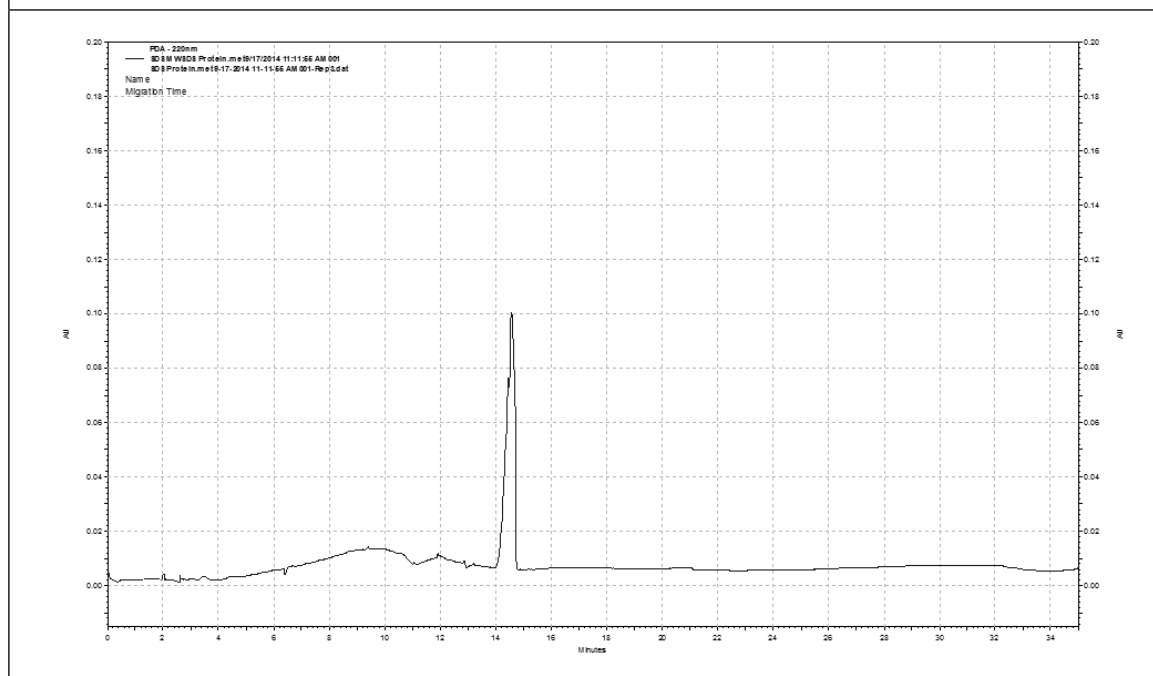


б) Електрофореграма розподілу макромолекул в ПААГ (0,8% ДСН) детекція на довжині хвилі 280 нм, зразок плацебо – препарат «порожніх» ліпосом.

Рис.1. Електрофореграма розподілу макромолекул в ПААГ (0,8% ДСН), детекція на довжині хвилі 280 нм, умови прободіготовки описані в розділі «Методи дослідження»



а) Електрофореграма розподілу макромолекул в ПААГ (0,8% ДСН) зразку ліпосом з інкапсульованими катіонними пептидами термального шару шкіри свині; Умови пробопідготовки описані в розділі «Методи дослідження»



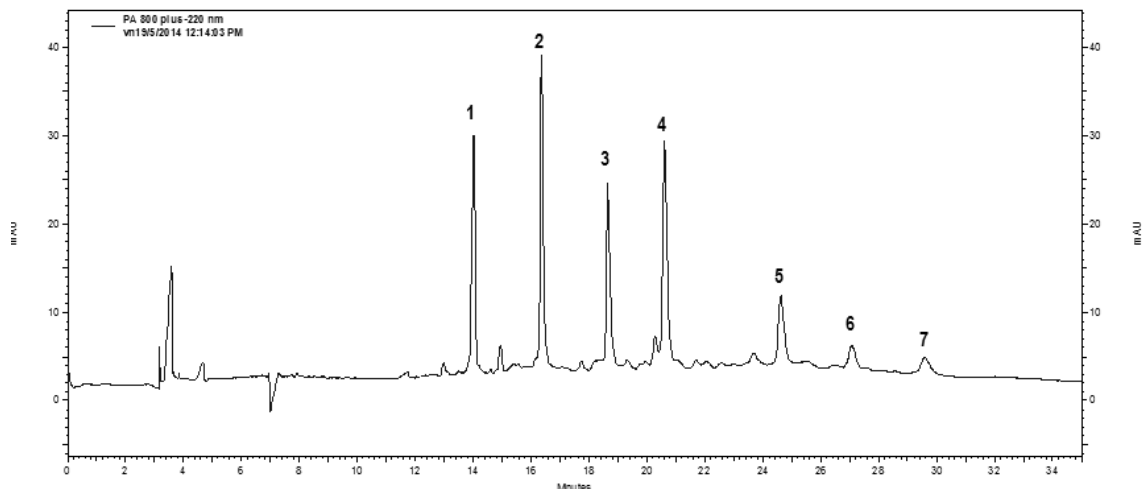
б) Електрофореграма розподілу макромолекул в ПААГ (0,8% ДСН) детекція на довжині хвилі 220 нм.

Рис.2. Типова електрофореграма розподілу макромолекул в ПААГ (0,8% ДСН), детекція на довжині хвилі 220 нм.

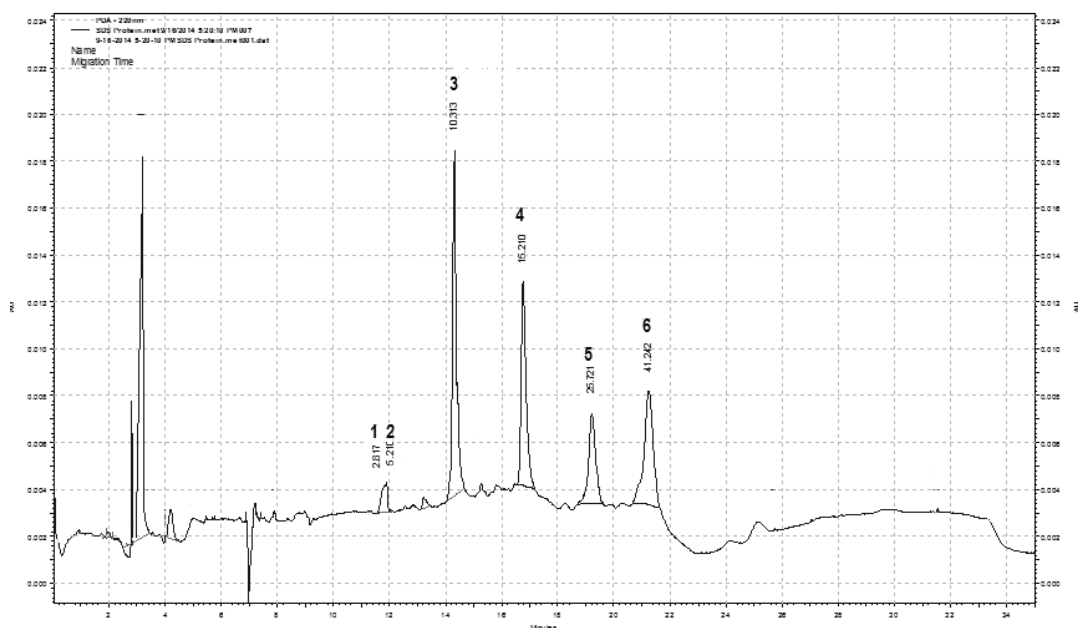
Час міграції відповідно: пептиди — 11–13 хв., фосфатиділхолін (міцелярний комплекс) — 14,5–15 хв. Умови капілярного електрофорезу наведені в розділі «Методи дослідження» (фоновий електроліт ПААГгелевий трис-HCl буфер

(pH = 8,0); ввід: 30 мБар 10 с; напруга — 30 кВ, тиск 50 мБар, $\lambda = 220$ нм).

На рис. 3 наведені типові електрофореграми розподілу стандартних маркерних білків, які використовували для калібрування капіляру.



а) Типова електрофореграма розподілу маркерів молекулярної ваги SDS-MW Cat.N# A51970AC (Beckman Coulter, Inc.) (1.-10 кДа; 2.- 20 кДа; 3.- 35 кДа; 4.-50 кДа; 5.-100 кДа; 6.-150 кДа; 7.- 225 кДа).



б) маркери молекулярної ваги (6 кольорових рекомбінантних білків з масами від 2 до 40 кДа [Spectra Multicolor Low range Protein ladders, Cat.N#26628 (Thermo scientific)].

Рис. 3. Типова електрофореграма розподілу макромолекул в ПААГ (0,8% ДСН), детекція на довжині хвилі 220 нм

Аналіз препарату спреї «Ефіаль» методом капілярного електрофорезу показав, що в умовах обробки ліпосом іонним детергентом ДСН пептиди дермального шару шкіри свині розподіляються у вигляді широкої електрофоретичної зони чітко відокремленої від зони міграції міцелярних комплексів фосфатидилхоліну. Цікаво, що на електрофореграмах розподілу макромолекул кислотного екстракту дермального шару шкіри свині не виявлені піки компонентів з характерним для нуклеїнових кислот поглинанням на хвилі 254 нм (дані не наводяться).

На відміну від рутинного електрофорезу в ПААГ блоках пряма реєстрація розподілу макромолекул дозволяє нівелювати фоновий вплив ліпідних компонентів і визначати інкапсульовані катіонні пептиди екстракту дермального шару шкіри без етапу зв'язування з білок специфічними барвниками. Робастність метода для визначення вмісту білків в складі ліпосом препарату спреї «Ефіаль» залежить від ретельного кондиціонування робочого капіляру і відтворення умов виконання капілярного електрофорезу, застосування брендних комерційних стандартизованих наборів сертифікованих виробників. Цей метод ідеально підходить на етапі розробки, але досить дорогий для виконання рутинних аналізів.

Однак для поточного контролю виробництва ліпосомальних препаратів визначення показника інкапсульованих пептидів в ліпосомах спрею «Ефіаль» доцільно виконувати іншими альтернативними методами. Нами була запропонована нескладна денситометрична методика визначення вмісту пептидів, що перенесені на нітроцелюлозні мембрани. Відносну кількість пептидів ковалентно-пришитих до нітроцелюлозної мембрани визначали за інтенсивністю фарбування зон нанесення зразків дезінтегрованих розчинів ліпосом. Попередньо фракцію пептидів, які не інкапсульовані в ліпосомних «бульбашках» та мікроміцели відділяли від сконцентрованих в осаді ліпосом. На нітроцелюлозні мембрани переносили емульсію білків і ліпідів після перерозчинення розчиняли знову у тому ж самому об'ємі фосфатного буфера при рН 4,0, та ультразвукової дезінтеграції. Інкубація мембрани у фіксуючому розчині з 0,5 % глютаровим діальдегідом приводила до утворення ковалентних міжмолекулярних зшивок пептидів з нітроцелюлозним матриксом мембрани. Водночас 40 % спиртовий розчин розчиняв фосфатидилхолін соєвих бобів. Вимірювали відносно оптичне поглинання дот-плям з використанням інтегруючого комп'ютерного денситометра. Отримані дані відповідної оптичної густини плям на мембранах відповідних стандартних розведень і плям роз-

чинів ліпосомної складової препарату «Ефіаль» спреї порівнювали за критеріями:

- Специфічність кількісного забарвлення на зв'язаний з мембраною білок;
- Порогове граничне значення концентрації в стандартних розчинах БСА;
- Порогове граничне значення шуму забарвлення мембрани;
- Пропорційність площі піків на денситограмах мембран від концентрації білку в нанесеному зразку;
- Пропорційність площі піків на денситограмах мембран від площі піку (швидкості дифузії білків різної молекулярної маси і відповідно розміру плям.

Згідно вимог нормативної документації МКЯ препарату контролювали вміст пептидів депротейнізованого дермального шару шкіри свині в ліпосомах в межах, що визначені як порогові у порівнянні з відповідним чином відкаліброваними зразками розчинів стандартів білків. Слід відмітити, що у підібраних умовах фіксації, забарвлення та знебарвлення мембран відмивалися ліпіди ліпосом і, водночас, зв'язувалися з нітроцелюлозою білки і низькомолекулярні пептиди. Таким чином, вдалося нівелювати заважаючий вплив фосфатидилхоліну. Оскільки для приготування випробуваного розчину використовували осад ліпосом, при розрахунках кількості пептидів в препараті «Ефіаль» визначали саме пептиди, що були інкапсульовані у ліпосоми, або адсорбовані на ліпосомах, чи включені у бішари ліпідів. При забарвленні мембран різними барвниками (розчином Кумасі) було виявлено найкращу відтворюваність результатів, спостерігалась контрастність забарвлення плям по відношенню до фонового забарвлення чистих ділянок мембрани. На відміну від забарвлення розчином срібла (ДФУ статті 2.2.31 «Електрофорез» ДФУ Доп.1) стійке фонове забарвлення сріблом мембрани не дозволило використовувати цей більш чутливий метод детекції білку. Випробування забарвлення мембран барвником альціановим синім, який специфічно забарлює глікопротеїни, виявилось непридатним ні для модельних розчинів білків, ні для розчину випробуваного препарату «Ефіаль». В окремих дослідженнях порівнювали придатність забарвлення білків Кумасі фарбувальним R250 та G250, аналіз проводили паралельно при кожному кількісному визначенні. Нами експериментально було з'ясовано, що оптимальна концентрація нанесення зразків розчинів білків – 20 мкл, що надійно дозволяє визначити концентрацію білків в стандартних розведеннях в межах від 50-120 мкг/мл. Для порівняння впливу

специфіки зв'язування з мембраною та властивостей забарвлення розчином барвника Кумасі G-250 проводили паралельні дослідження в якості можливого стандарту забарвленого білку – цитохрому С. Було показано, що внаслідок нелінійного непропорційного зв'язування з барвником цей білок не підходить в якості стандарту, дає завищені відносні значення концентрацій.

Низькомолекулярні пептиди ліпосом після фіксації мембран блокувальним розчином глютарового діальдегіду утворюють стабільні контрастні комплекси плям, що не знебарвлюються на тлі мембрани. Забарвлення білків на нітроцелюлозних мембранах дозволяє надійно визначити від 80 до 250 мг/мл білку при нанесенні плямами по 20 мкл. В порівнянні адсорбція барвника в плямах модельних розчинів співрозмірна із відповідними значеннями розчинів зразків препарату «Ефіаль», не перевищує вимог нормативної документації щодо концентрації пептидів, а відхилення від середнього значення окремих вимірювань становить не більше 12,0%.

Для оцінки результатів денситометрії нанесених на мембрану і забарвлених плям досліджених розчинів проводили дослідження розчину з номінальною концентрацією білку відносно БСА (теоретично $C=0,12$ мг/мл), емульсійного розчину ліпосомного осаду з двократною концентрацією (теоретично $C=0,250$ мг/мл) та вдвічі розведеного зразку препарату розчином плацебо («порожні ліпосоми»). В порівнянні значення вмісту білку і відповідні показники відносного значення оптичної густини (адсорбція) барвника в плямах модельних розчинів співрозмірна із теоретично очікуваними значеннями. Відхилення від середнього значення становить не більше 5,0% для відповідних теоретичних значень концентрації пептидів. Визначення концентрації пептидів в препараті «Ефіаль» на основі денситометрії нанесених на нітроцелюлозну мембрану досліджених розчинів наведені в табл. 2.

Серія окремих досліджень методом денситометрії дот-відбитків для визначення вмісту пептидів показало, що запропонований аналітичний метод відповідає прийнятним критеріям точності визначення нижньої межі, в діапазоні концентрацій 100–250 мкг/мл витримуються вимоги до лінійності. Крім того була підтверджена внутрішньолабораторна та міжлабораторна точність згідно загальноприйнятими вимогам.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Порівняння різних методів визначення білків в складі ліпосом показало, що на практиці метод визначення пептидної фракції ліпосом SDS-електрофорезом в капілярах поступається методиці денситометричного визначення відбитків пептидів на нітроцелюлозних мембранах. В умовах виробництва більш підходящий спрощений варіант визначення пептидів ліпосом методом тонкошарової хроматографії дот-перенесених на нітроцелюлозній мембрани зразків препарату з наступною фотометричною денситометрією. За допомогою виконання паралельних експериментальних досліджень двома різними методами (SDS-електрофорез пептидів в капілярі та адсорбційна хроматографія на мембранах) оптимізовано методику визначення та контролювання вмісту пептидів в препараті «Ефіаль», які ускладненні наявністю фосфоліпідів в препараті.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Біобезпечні наночастинки металів в наномедицині та нанобіотехнології / З. Р. Ульберг, Т. Г. Грузіна, С. М. Дибкова [та ін.] // Вісник проблем біології та медицини. — 2010. — Вип. 4. — С. 72–77.
2. Беккер Ю. Хроматографія. Інструментальна аналітика: методи хроматографії и ка-

Таблиця 2

Показники вмісту пептидів препарату

№ п/п	Найменування показника	Вимоги згідно МКЯ	Результати аналізу		
			$X_{(i)} - X_i(n)$	X_i %; RSD_{X_i}	Критерій прийнятності
1	Вміст пептидів ліпосом препарату «Ефіаль спрей»	Не менше 0,12 мг/мл	0,1519 0,1502 0,1526 0,1559 0,1567 0,1423	$X_c = \pm 10\%$ $RSD = 12,5$	$\Delta X_{\text{макс}} = \pm 10\%$ $RSD_{X_{\text{макс}}} = 12\%$
2	Вміст білку в розчині порівняння БСА	Не менше 0,12 мг/мл	0,1243 0,1322 0,1226 0,1259 0,1265	$X_c = \pm 10\%$ $RSD = 10,5$	$\Delta X_{\text{макс}} = \pm 10\%$ $RSD_{X_{\text{макс}}} = 12\%$

- пиллярного електрофореза : учебник / Ю. Бёкер — М. : Техносфера, 2009. — 473 с.
3. Борщевский Г. И. Физико-химическое обоснование способа получения многокомпонентного липосомального препарата / Г. И. Борщевский, Т. Г. Ярных // Вісник Фармації. — № 3 (75). — 2013. — С. 5-7.
 4. Дикий І. Л. Обґрунтування деяких конструктивних, технологічних та фармакологічних характеристик ліпосом та ліпосомальних лікарських форм / І. Л. Дикий, Л. С. Стрельников, І. М. Перцев // Фарм. вісник. — 2003. — № 1-2.
 5. Патент № 101235, Україна А 61 К 9/127, А 61 К 31/56, А 61 Р 17/06. Спосіб отримання фармацевтичної композиції ранозагоючої та регенеруючої дії на основі пептидів дермального шару шкіри свіней / Ф. І. Жебровська, Г. В. Костюк, Г. І. Борщевський, М. І. Борщевська, В. В. Бігуняк, № а 201107335; заявл 10.06.2011; опубл. 11.03.2013, Бюл. № 5.
 6. Прискока А. О. Нанотехнології у розробці систем доставки лікарських засобів / А. О. Прискока, І. С. Чекман // Український медичний часопис, — 2010. — Т. 75. — № 1. — С. 14-18.
 7. Ранозагоювальна дія препарату «Ефіаль» / Г. І. Борщевський, Н. Є. Лісничук, К. С. Волков, М. І. Борщевська /// Фарм. часопис. — 2013. — № 3. — с. 29-34.
 8. Стандартизация липосомальных лекарственных средств / Г. И. Борщевский, Е. К. Товмасын, Ю. М. Краснопольский, А. И. Гризодуб // Фармаком. — 2013. — № 2. 3 С. 5-11.
 9. Чекман І. С. Фармакологічні та фармацевтичні основи нанопрепаратів / І. С. Чекман // Лікарська справа. — 2010. — № 1-2. — С. 3-9.
 10. Шахмаев А. А. Липосомальные наночастицы как носители лекарственных препаратов / А. А. Шахмаев, И. В. Волчик, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец // Фармаком. — 2011. — № 3. — С. 88-95.
 11. Bio-Rad, Bulletin N 2895, Rev. B. // Protein blotting Guide, 2011, 10-1378, P. 1-85.
 12. Cutaneous Defense Mechanisms by Antimicrobial Peptides / M. H. Braff, A. Bardan, V. Nizet, R. L. Gallo // J. Invest. Dermatol. — 2005. — Vol. 125, — N. 1. — P. 9-13.
 13. Dermatological and transdermal formulations / [Ed. — Kenneth A. Walters]. — New York — London. — 2007. — 565 p.
 14. Pharmaceutical Analysis System. SDS-MW Analysis. // Application Guide PN A51970AD PA 800 plus. — 2014, — N. 1. — P. 1-34.

УДК 615

Г. И. Борщевский, Т. Г. Ярних, В. Н. Чабаный

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ЛИПОСОМАЛЬНОГО СПРЕЯ ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ «ЭФИАЛЬ»

Проведены комплексные физико-химические исследования, которые позволили оптимизировать и апробировать в условиях производства два аналитических метода определения количественного содержания инкапсулированных в липосомы катионных пептидов дермального слоя шкуры свиней в препарате спрей «Эфиаль». Разработаны и внедрены методики проверки качества промежуточной продукции и спецификации контроля на этапе производства спрея «Эфиаль»: включение концентрата белка в суспензию липосом (полупродукт), получение готовой формы (не фасованная продукция), фасовка (не маркированная продукция).

Ключевые слова: липосомы, пептиды, тонкослойная хроматография, электрофорез, спектрофотометрия, денситометрия, спрей.

UDC 615

G. I. Borschevsky, T. G. Yarnykh, V. N. Chabany

DEVELOPMENT OF TECHNIQUE FOR ASSAY OF ACTIVE SUBSTANCES IN "EFIAL" LIPOSOMAL SPRAY FOR EXTERNAL USE

The comprehensive physical-chemical studies have been conducted, which allowed the optimization and testing of the two analytical methods for assay of liposome-encapsulated cationic peptides of porcine derma in Efial spray under production conditions. The following techniques for in-process quality control and specifications for in-process control during manufacture of Efial spray have been developed and implemented: inclusion of protein concentrate into liposomal suspension (semi-product), obtaining of final dosage form (bulk product), filling (unlabeled product).

Key words: liposomes, peptides, thin layer chromatography, electrophoresis, spectrophotometry, densitometry, spray.

Адреса для листування:

04080, Україна, м. Київ, вул. Фрунзе, 63

ПАТ «Фармак»

E-mail: info@farmak.ua

Надійшла до редакції:

10.10.2014