

Забезпечення контролю якості та стандартизації ліпосомальних засобів

*Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ*

Якість лікарських препаратів закладається на етапі фармацевтичної розробки, для якої встановлено загальний методологічний підхід і спеціальні підходи відносно різних лікарських форм, у тому числі ліпосомальних лікарських засобів, та зберігається протягом усього їхнього життєвого циклу.

Ліпосоми – це мікровезикули, які складаються з одного або декількох бішарів, розділених водними прошарками, утворених амфіфільними молекулами фосфоліпідів, які оточують водний центр. У ліпосомальних засобах, як правило, водорозчинні лікарські речовини заключені в водне середовище ліпосоми, а ліпофільні – в ліпідний шар ліпосоми. Вивільнення лікарських речовин з ліпосом модифікується за рахунок спеціальних добавок, таких як холестерин та поліетилеңгліколь. Ліпосомальні засоби є термодинамічними мікроемульсіями, у яких фази представлені ліпідами, водою, поверхнево-активними речовинами, та комплексом лікарська речовина – ліпід. Ці характеристики ліпосомальних засобів обумовлюють специфічність підходів до контролю їхньої якості.

Для забезпечення якості ліпосомальних засобів та відтворюваності якісних та кількісних характеристик у межах серії необхідно контролювати їхню відповідність за різноманітними фізико-хімічними показниками. Дані щодо параметрів контролю якості та вимог до них відображені в різних нормативних документах на ліпосомальні засоби.

Проте підбір методів контролю якості ліпосомальних продуктів ускладнений структурою міцел, оскільки ліпідна везикула сформована за рахунок компонентів різного походження для досягнення бажаної ламелярності та розміру ліпосом. Екстракція лікар-

ських речовин з ліпосом повинна бути повною і селективною для встановлення їхнього кількісного вмісту. Перешкоджають швидкому та ефективному аналізу ліпосом короткий термін придатності ліпосомальних засобів (короткий термін фазової стабільності).

Слід відзначити необхідність аналізу як окремо діючої речовини та ліпосоми, так і ліпосомальної структури в цілому, з включеною в неї молекулою, оскільки ліпосомальний продукт є активним фармацевтичним інгредієнтом.

Тому методи контролю якості ліпосомальних засобів можна розділити на дві групи – це методи контролю ліпосомальних компонентів (активних інгредієнтів, ліпідних компонентів) і оцінка фізичних властивостей інтактних ліпосом як системи доставки лікарського засобу.

Для підтвердження відтворюваності характеристик ліпосом при виробництві необхідно перевірити всі вхідні матеріали на відповідність сертифікатам виробника (для активної молекули й для ліпідів). Випробування необхідно проводити як при зберіганні матеріалів, так і перед безпосереднім використанням. Фізичні характеристики ліпосомальних засобів дуже чутливі до найменших змін у процесі виробництва, зокрема, коливань тиску, температури, параметрів ліофілізації та ін. На процес стерилізаційної фільтрації можуть специфічно впливати фізична та хімічна складність ліпосомальних везикул, оскільки вони можуть взаємодіяти з матрицею фільтра. Таким чином, слід доводити за допомогою валідаційних процедур відсутність впливу тих чи інших технологічних процедур на параметри якості кінцевого продукту.

У таблиці наведені основні показники якості ліпосомальних засобів, які

мають бути оцінені протягом різних фаз розвитку ліпосом, від наукового обґрунтування до комерційного продукту та достатньо повно можуть охарактеризувати якість ліпосомальних засобів. Основні параметри стандартизації ліпосомальних засобів надано в таблиці 1.

Деякі показники якості, що застосовані до ліпосомальних засобів, мають свої особливості. Для визначення колоїдної та термічної стабільності ліпосом визначають наявність розшарування або випадання осаду в розчинах ліпосомальних засобів після центрифугування або термостатування зразків відповідно.

Ступінь інкапсуляції активної субстанції визначається як відсоток лікарського засобу, що міститься всередині ліпосом, порівняно з загальною кіль-

кістю лікарського засобу. У переважній більшості випадків визначення ступеня інкапсуляції водорозчинної активної діючої речовини проводять за допомогою гель-проникної хроматографії. На хроматограмах досліджуваних зразків ліпосом, як надмолекулярні структури, виходять у «мертвому» об'ємі, а активна діюча речовина затримується в порах гелю, за рахунок чого досягається розділення сполук.

Співвідношення активний компонент – фосфоліпід або завантаженість ліпосомального засобу характеризує відсоток умісту лікарського засобу порівняно з кількістю використаного ліпиду.

Дослідження ліпідів зазвичай включає аналіз умісту фосфору для визначення сумарного вмісту ліпідів, випробування методом ВЕРХ або ТШХ для

Таблиця 1

Основні параметри стандартизації ліпосомальних засобів

Показник	Метод
Опис, колір, запах	Візуально, за запахом
pH	pH-метрія
Колоїдна стабільність	Візуально (після центрифугування)
Термолабільність	Візуально (після термостатування), термічний аналіз
В'язкість	Віскозиметрія та ін.
Уміст зв'язаної води	Титрування за К. Фішером
Втрата в масі при висушуванні	Ваговий
Важкі метали	ААС, спектрометрія ЯМР, колориметрія та ін.
Осмоляльність	Осмометрія
Кількісний уміст активного інгредієнта	Відповідний метод аналізу
Ступінь інкапсуляції	ВЕРХ, гель-проникна хроматографія, міні-центрифужні стакани
Уміст фосфоліпідів	ВЕРХ, ТШХ (модифікований метод Барлета, Стюарта)
Склад ліпідів	ТШХ, ВЕРХ
Уміст холестеролу	ВЕРХ, ВЕТШХ, ензимометрія
Кількість залишкових розчинників	ГХ, спектрометрія ЯМР
Співвідношення активний компонент – фосфоліпід	Відповідний метод аналізу
Стерильність	USP < 71 >, Ph. Eur 2.6.1
Пірогени/бактеріальні ендотоксини	USP < 85 >, Ph. Eur 2.6.14
МБЧ	USP < 61 >, < 62 >, Ph. Eur 2.6.12, 2.6.13

Примітка. ААС – атомно-абсорбційна спектрометрія; ЯМР – спектроскопія ядерного магнітного резонансу; ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія; ТШХ – тонкошарова хроматографія; ВЕТШХ – високоефективна тонкошарова хроматографія.

аналізу складу індивідуальних ліпідних сполук, їхньої чистоти або наявності домішок.

Як відомо, при потраплянні ліпосом в організм на них руйнівню впливають ліпопротеїди сироватки крові. Для підвищення стабільності до складу ліпосомальних засобів вводять холестерин, якість та кількість якого також необхідно контролювати.

Залишкові розчинники можуть виявлятися при використанні недостатньо висушеної сировини при виробництві ліпосомальних засобів і впливати на стабільність ліпосом викликати побічну дію після застосування ліпосомального лікарського засобу.

Необхідно відзначити також значний вплив якості підготовки води, яка використовується при виробництві ліпосомальних засобів.

Для встановлення стабільності, умов зберігання та дати повторного тестування або терміну придатності проводять стрес-тестування ліпосом, визначаючи профіль деградації (тобто, піддають ліпосомальний засіб впливу високої температури, світла, кисню та змінюють рН середовища). У таблиці 2 наведено основні показники якості, які контролюються при вивченні фізичної та хімічної стабільності ліпосомальних засобів.

Дослідження стабільності ліпосомальних засобів повинні включати мікробіологічну стабільність.

Розмір ліпосом є одним з критичних параметрів, що впливає на активність та розподіл ліпосомальних засобів у організмі. Простим методом встановлення фізичної стабільності ліпосом за їхнім розміром є будь-яка форма мікро-

Таблиця 2

Основні показники стабільності ліпосомальних засобів

Показник	Метод
<i>Стабільність фізична</i>	
Зовнішній вигляд	Візуальний
Розподіл розмірів везикул: - субмікронні	Динамічне та статичне розсіювання світла, мікроскопія, гель-ексклюзійна хроматографія, турбідиметрія
- мікронні	Світлоблокування, світлова мікроскопія, лазерна дифракція, статичне розсіювання світла
Поверхневий електричний потенціал (зета-потенціал)	Використання мембран-зв'язаних електродів/ електрофоретична рухливість
Поверхневий рН	Використання рН-чутливих електродів
Ламелярність	Кріо-електронна мікроскопія, 31 Р ЯМР
Термотропна поведінка фаз, розділення фаз, фазовий перехід	ЯМР, ІЧ, флуоресцентна мікроскопія, раманівська спектроскопія, турбідиметрія
Відсоток вільного активного інгредієнта	Гель-ексклюзійна хроматографія, іонообмінна хроматографія, осадження, центрифугування
<i>Стабільність хімічна</i>	
рН	рН-метрія
Уміст вільних жирних кислот	ВЕРХ
Ступінь гідролізу фосfolіпідів	ВЕРХ, ТШХ
Ступінь окиснення фосfolіпідів (ацильних зв'язків)	ГХ (склад жирних кислот), СФ (кон'юговані дієни, трієни), йодометрія (ліпідні пероксиди)
Окиснений холестерол	ТШХ, ВЕРХ
Розпад антиоксидантів	ТШХ, ВЕРХ
Розпад активного компоненту	Відповідний метод аналізу

скопії. Зміни хімічного характеру в ліпосомальних засобах також призводять до модифікацій розмірів ліпосом, їхньої агрегації.

Показник зета-дисперсності відображає взаємний вплив дисперсності середовища та диспергованої частинки, і є індикатором поверхневого заряду частинок. Цей показник використовується для прогнозування та контролю стійкості колоїдних суспензій або емульсій та має значний вплив на біологічну активність ліпосом.

Ламелярність ліпосом контролюється під час дослідження стабільності, оскільки вона значно впливає на ефективність інкапсуляції та швидкість вивільнення лікарського засобу з ліпосоми, а також долю препарату після клітинного захоплення.

Хімічна стабільність ліпідів включає дослідження продуктів окиснення та гідролізу. Продукти гідролізу фосфоліпідів (жирні кислоти, лізоліпиди та ін.) сприяють збільшенню розмірів та полідисперсності міцел, підвищують проникність бішару, що, у свою чергу, збільшує вивільнення активного інгредієнта та призводить до гелеутворення.

Усі наведені показники мають велике значення не лише при дослідженні стабільності, а й при розробці технології отримання ліпосом.

Як приклад застосування вищевказаних параметрів контролю якості ліпосомальних засобів можна навести деякі показники специфікації на лікарських засіб «Ліпофлавіон, порошок ліофілізований для приготування очних крапель у флаконі № 1», який застосовується в офтальмології як протизапальний засіб, стимулятор регенерації ушкоджених тканин ока, імунокоректор та антиоксидант у хворих на травматичні ураження рогівки, керати різного генезу, при запальних захворюваннях переднього відділу ока, дегенеративних змінах сітківки та зорового нерва.

До складу ліпосомального засобу «Ліпофлавіон» входять ліпосомально-організований яечний фосфатидилхолін, флавоноїд кверцетин та допоміжна речовина (кріо-протектор) лактоза.

До переліку показників якості ліпосомального засобу «Ліпофлавіон», включені ті, що відповідають вимогам ДФУ, які пред'являються до очних засобів, а також специфічні – які характеризують активний інгредієнт (кверцетин) і ліпіди (фосфатидилхолін) (табл. 3).

Фармакопейні вимоги до контролю якості ліпосомальних засобів

Очевидним є системний підхід до стандартизації лікарських засобів, у тому числі ліпосомальних. Показники якості лікарських засобів, що забезпечують їхню ефективність і безпеку, наведені в реєстраційному досьє та фармакопейі, а не тільки в МКЯ. Так, до Індійської фармакопейі за 2010 рік було включено загальну монографію на ліпосомальні засоби, яка дає їхнє визначення та характеристику.

Загальна стаття дає таке визначення поняттю ліпосомальних засобів: «Ліпосомальні засоби – стерильні дисперсії для ін'єкцій або інфузій на основі фосфоліпідів з/без холестеролу у водному середовищі».

Характеристики ліпосомальних засобів:

- можуть містити антиоксиданти, стабілізатори або буфери;
- прозорі/опалесцентні;
- активний компонент інкапсульований у везикулу або включений у подвійний ліпідний шар.

Методи отримання:

- утворення ліпідної плівки для гідратації, гідратація з агітацією, утворення пухирців (ультразвукова гомогенізація, екструзія та ін.);
- стійкість суспензій, однорідність після струшування.

Дана монографія встановлює також обов'язкові параметри контролю якості: механічні домішки, однорідність вмісту, об'єм, що витягається, стерильність, пірогени, розмір везикул, ламелярність.

Загальна стаття на лікарську форму «Порошки для приготування розчинів для ін'єкцій», зокрема на ліпосомальний амфотерицин В, регламентує вимоги до твердих речовин – стерильність, прозорість, однорідність дисперсії. Ліофілізовані ліпосомальні засоби для парентерального застосування розглядаються

Зразок специфікації на лікарський засіб «Ліпофлавон, порошок ліофілізований для приготування очних крапель у флаконі № 1»

Показник	Вимога специфікації	Метод контролю
Опис	Аморфна маса світло-жовтого кольору з характерним запахом	Візуально, п. МКЯ
Ідентифікація - кверцетин	Максимуми поглинання при 255–259 нм та 373–377 нм; якісна реакція з заліза (III) хлоридом	УФ-спектрометрія, ДФУ 2.2.25 ДФУ 2.3.1
- фосфатидилхолін	Наявність плями жовтого кольору на рівні плями ФСЗ фосфатидилхоліну	ТШХ, ДФУ 2.2.27
Час утворення та стійкість емульсії	Час утворення емульсії не більше ніж 2 хв, стійкість не менше ніж 10 хв	п. МКЯ
pH	4,5–7,2	Потенціометрія, ДФУ 2.2.3
Сторонні домішки	Сума домішок менше ніж 4 %	ТШХ, 2.2.27
Втрата маси при висушуванні	Не більше ніж 5 %	ДФУ 2.2.4
Однорідність маси	18/20 ≤ ± 10 %; 0/20 ≤ ± 20 %	ДФУ 2.9.5
Осмоляльність	300–400 мосмоль/кг	ДФУ 2.2.35
Кількісне визначення - кверцетин	Від 0,67 до 0,83 мг/флакон	УФ-спектрофотометрія, ДФУ 2.2.25
- фосфатидилхолін	Від 24,75 до 30,25 мг/флакон	
Стерильність	Має бути стерильним	ДФУ 2.6.1, метод висівання на чашки

як ліпосомальні порошки для ін'єкції або інфузії.

Нині працює робоча група Комісії ЄФ на базі компанії SwissMedic, яка була сформована ще в 2011 році. До її повноважень входить розробка монографій на комплекси небіологічного походження, у тому числі на ліпосомальні засоби. Тому, крім вже існуючих керівництв FDA і МКЯ на ліпосоми, найближчим часом можна очікувати на окрему монографію і, можливо, декілька статей на окремі ліпосомальні

засоби в таких виданнях – флагманах, як Європейська або Американська фармакопея.

При цьому для реєстрації, виробництва та контролю лікарських засобів відповідно до цих документів необхідні наукові дослідження все більш високого рівня на всіх етапах життєвого циклу продукції, від фармацевтичної розробки та експериментальних досліджень до серійного виробництва і контролю якості готового лікарського засобу.