

РОЗРОБЛЕННЯ ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ІНКАПСУЛЯЦІЇ ЦИТОХРОМУ С У ЛІПОСОМАХ

Ключові слова: ліпосоми, наночастинки, інкапсуляція, валідація, цитохром С, фосфоліпіди, високоефективна рідинна хроматографія

Перспективним напрямом створення високоефективних лікарських засобів є терапевтичні системи спрямованої дії. Основою таких систем є наночастинки різної структури, що забезпечують спрямованість дії та збільшення біодоступності препаратів. Особливе місце в сучасних системах доставки ліків займають ліпосомальні наночастинки, що мають низку безсумнівних переваг порівняно з наночастинками іншої природи.

Активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ) може бути вміщено у внутрішню порожнину ліпосом або безпосередньо в їхній ліпідний бішар. Ліпосоми нетоксичні, піддаються легкій біодеградації в організмі, за певних умов здатні до взаємодії з клітинними мембранами, що призводить до доставлення їхнього вмісту всередину клітини. Речовина, яку вміщено в ліпосоми, захищена від впливу ферментів, що збільшує ефективність дії препаратів, нестійких у фізіологічних умовах. Однією з головних переваг ліпосомальних форм лікарських препаратів є пролонговане вивільнення з них лікарської речовини. Оскільки розмір ліпосом перевищує діаметр пор в капілярах, обсяг розподілу ліпосом обмежується компартаментом введення, що знижує токсичність препарату і дає змогу здійснювати пасивне націлювання ліпосом у патологічну зону організму, а також збільшує терапевтичний ефект за рахунок поліпшення фармакокінетики та біорозподілу [1].

Одним із показників якості ліпосомальних препаратів є кількісне визначення АФІ та його домішок; кількісне визначення ліпідів та їхніх домішок; розмір ліпосом; визначення ступеня інкапсуляції (включення) АФІ в ліпосоми. Останні два показники визначають фармакокінетику ліпосомальних форм лікарських субстанцій, що визначає їхню ефективність порівняно з вільною формою АФІ. Визначення ступеня інкапсуляції АФІ в ліпосомах використовують як для контролю критичних технологічних стадій виробництва ліпосомальних препаратів, так і для контролю готової лікарської форми та оцінювання стабільності ліпосом [2, 3].

Цитохром С знайшов широке застосування у кардіології та офтальмології, в терапії різних станів, пов'язаних із гіпоксією. Його призначають при декомпенсації серцевої діяльності, ішемічній хворобі серця, дистрофії та помутніння рогівки, кератитах, дихальній недостатності (астматичні стани, хронічна пневмонія), інтоксикації з пригніченням окиснювальних процесів, а так само асфіксії новонароджених, надаючи антигіпоксичну та трофічну дію, стимулюючи процеси регенерації та являючись каталізатором клітинного дихання. Механізм дії препарату пов'язаний із наявністю в простетичній групі заліза та його здатністю

переходити з окисненої форми у відновлену. В результаті прискорюються ендogenousні окиснювально-відновлювальні реакції та обмінні процеси в тканинах, поліпшується утилізація кисню та знижується гіпоксія тканин за різних патологічних станів [4]. Відзначаючи високий ефект екзогенного цитохрому С на процеси енергоутворення, пригнічені в умовах гіпоксії, не можна разом з тим не відзначити його швидке виведення з організму, що істотно знижує ефективність препарату. Це, в свою чергу, вказує на необхідність розроблення лікарських форм цитохрому С пролонгованої дії.

Створення ліпосомальної форми цитохрому С дасть змогу знизити його виведення з тканин організму і підвищити ефективність екзогенного АФІ. Наявність ліпідного компонента в ліпосомах зумовлює його ліпофільність, що полегшує проникнення ліпосом через ліпідні ділянки біомембран, а також сприяє утриманню його в уражених ділянках [5]. Наприклад, ліпосомальна форма цитохрому С сприяє проникненню цитохрому С у тканини кришталика ока і може підвищити ефективність використання цитохрому С в офтальмології [6].

На підставі раніше запропонованої платформи одержання ліпосомальних препаратів розроблено технологію та визначено склад ліпосомальної форми цитохрому С. Препарат містить 90–95% інкапсульованого цитохрому С. Розмір наночастинок 120–170 нм. Встановлено стабільність ліофілізованого препарату під час зберігання. Проведено доклінічні дослідження – визначення безпеки і специфічної активності на моделі проникаючої травми рогівки, що дає підставу рекомендувати препарат для відповідних клінічних випробувань.

Метою роботи є розроблення та валідація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С у ліпосомах. Валідацію виконано за показниками: специфічності, межа виявлення та робастність [7].

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження були приготовлені ліпосомальні емульсії плацебо та цитохрому С, розчин стандарту цитохрому С.

Одержання ліпосом

Ліпосомальну форму цитохрому С одержували методом гомогенізації емульсії фосфоліпідів із цитохромом [8]. Емульсію плацебо («порожні» ліпосоми) – емульгуючі плівку фосфоліпідів буферним розчином (рН 6,5–6,8).

Одержані емульсії (цитохрому і плацебо) мультиламелярних везикул піддавали екструзії до одержання уніламелярних ліпосом із розміром 100–200 нм. Розмір частинок вимірювали на наносайзері Malvern Zetasizer Nano ZS (Великобританія) методом динамічного світлорозсіювання. Одержану емульсію піддавали фільтрації через фільтр PALL Suppor (США) із розміром пор 0,22 мкм. Нами одержані ліпосоми, що містять 95% включеного цитохрому С із розміром частинок 128 нм. Плацебо з розміром наночастинок 126 нм.

Експериментальна частина

Основними сучасними методиками визначення ступеня інкапсуляції гідрофільних субстанцій є ультрафільтрація, центрифугування, хроматографічне розділення ліпосом від неключеної речовини [9, 10, 11].

На нашу думку, найбільш ефективним методом оцінювання ступеня інкапсуляції гідрофільних субстанцій є метод хроматографічного розділення з використанням обладнання для високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), що дає змогу об'єднати процедуру поділу та кількісного визначення неключеної речовини, що суттєво стандартизує методику і дає можливість автоматизувати процес визначення.

Для розроблення методики визначення ступеня інкапсуляції АФІ використовували методику ВЕРХ на рідинному хроматографі Nexera Shimadzu (Японія), хроматографічну колонку Tricorn (GE Healthcare, Швеція), заповнену сорбентом superose 12. Умови хроматографування: рухома фаза – 4,515 г/л KH_2PO_4 , рН – 6,0 (за допомогою 2 М NaOH); швидкість рухомої фази – 0,5 мл/хв; детектування за довжини хвилі 409 нм; температура колонки 25 °С. Як стандарт активної субстанції використовували цитохром С USP RS.

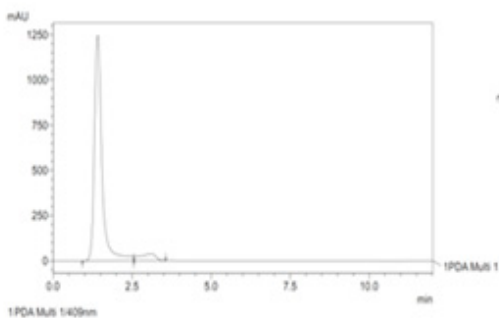
Методика, що валідується, за типом найбільш схожа з методиками граничного визначення домішок, оскільки в описаному способі одержання ліпосом цитохрому С було визначено норму інкапсуляції не менше 90%. Таким чином, граничний вміст не включеного цитохрому С не може перевищувати 10%. Валідацію методики здійснювали відповідно до рекомендацій [7] за показниками специфічності, межа виявлення, а також оцінка робастності.

Результати дослідження та обговорення

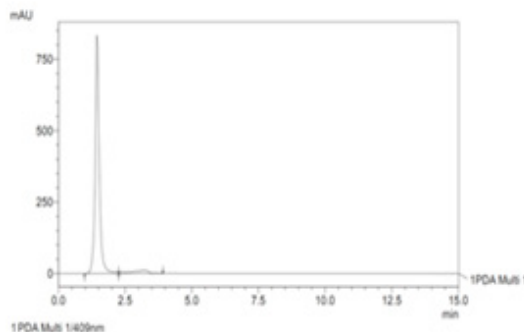
Для аналізу використовували одержані ліпосоми. Зразки хроматографували без розведення. Відсутність стадії пробопідготовки підвищує точність методики і знижує загальний час аналізу.

Специфічність. З метою підтвердження специфічності методики робили порівняння хроматограм плацебо, ліпосом з інкапсульованим цитохромом С і розчину стандарту цитохрому С (рис 1, 2).

а Хроматограма плацебо, 409 нм



б Хроматограма ЛС з інкапсульованим цитохромом С, 409 нм



с Хроматограма розчину стандарту цитохрому С, 409 нм

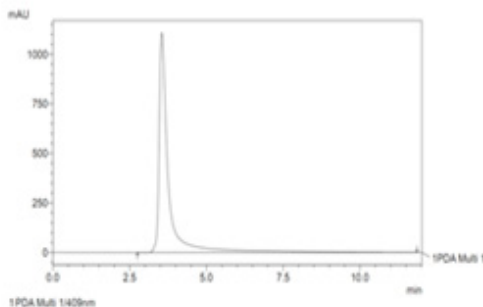
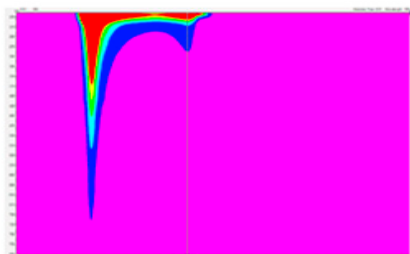
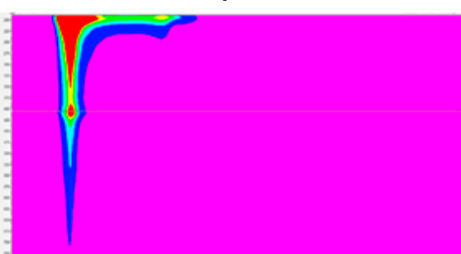


Рис. 1. Хроматограми розчинів плацебо (а), ліпосом з інкапсульованим цитохромом С (б) та розчину стандарту цитохрому С (с), 409 нм

а Хроматограма плацебо, 200 – 800 нм



б Хроматограма ЛС з інкапсульованим цитохромом С, 200 – 800 нм



в Хроматограма розчину стандарту цитохрома С, 200 – 800 нм

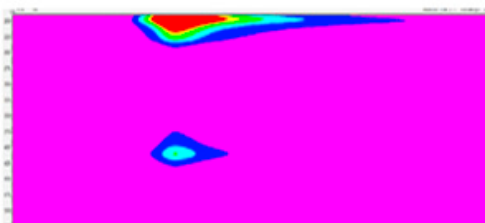


Рис. 2. Хроматограми розчинів плацебо (*а*), ліпосом з інкапсульованим цитохромом С (*б*) та розчину стандарту цитохрому С (*в*), 200–800 нм

Як видно (рис. 1, 2), на хроматограмах плацебо ліпосом відсутні піки з часом утримування піка цитохрому С на хроматограмі розчину стандарту цитохрому С. Так само на хроматограмі плацебо ліпосом відсутні максимуми поглинання в ділянках 400–410 нм і 520–560 нм. Характерні максимуми УФ-спектра поглинання в ділянках 400–410 нм і 520–560 нм спостерігають на хроматограмах розчину стандарту цитохрому С і ліпосом з інкапсульованим цитохромом С.

Таким чином, було підтверджено специфічність методики.

Межа виявлення. Для визначення межі виявлення було проаналізовано 6 розчинів із різною концентрацією цитохрому С в діапазоні від 0,00675 мг/мл (1%) до 0,0675 мг/мл (10%), по 3 паралельних визначення.

Час утримування вільного цитохрому (t_R) – 3,54 хв. Відносне стандартне відхилення 0,05 %.

Було побудовано калібрувальну пряму і розраховано її параметри (рис 3).

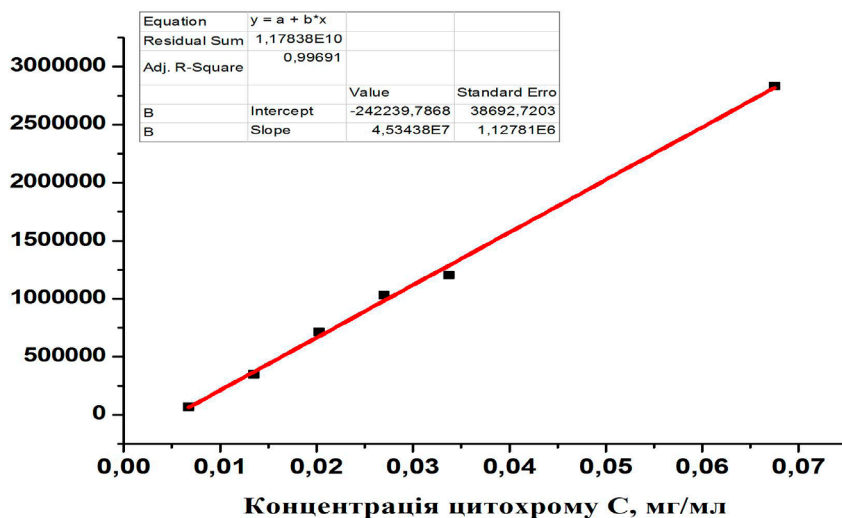


Рис. 3. Параметри калібрувальної прямої

Межу виявлення розраховували за формулою:

$$MB = \frac{3,3 \cdot s}{b} = \frac{3,3 \cdot 38692,7}{45343832,4} = 0,0028 \text{ мг/мл} ,$$

де s – стандартне відхилення сигналу, $s = 38692,7$;

b – тангенс кута нахилу калібрувальної прямої, $b = 45343832,4$.

Таким чином, межа виявлення вільного цитохрому С в препараті становить 0,0028 мг/мл (0,4%)

Робасність. Для перевірки стійкості методики ВЕРХ було досліджено вплив зміни температури колонки і варіації швидкості рухомої фази.

Як критичний параметр оцінювали зміну величини часу утримування t_R . Результати наведено в табл. 1 та 2.

Т а б л и ц я 1

Зміна температури колонки

Назва речовини	Час утримування (t_R), хв				
	25 °С	27 °С	30 °С	33 °С	35 °С
Цитохром С	3,64	3,63	3,62	3,62	3,63

Т а б л и ц я 2

Варіації швидкості рухомої фази

Назва речовини	Час утримування (t_R), хв		
	0,9 мл/хв	1,0 мл/хв	1,1 мл/хв.
Цитохром С	4,02	3,62	3,30

Дані, що їх подано в табл. 1 та 2, свідчать про те, що незначні зміни швидкості рухомої фази і температури колонки незначно впливають на одержувані хроматографічні дані.

Результати дослідження валідаційних параметрів наведено в табл. 3.

Т а б л и ц я 3

Валідаційні параметри

Параметр	Результат
Вміст вільного цитохрому С, %	Вміст вільного цитохрому С не має перевищувати 10%
Специфічність	Методика специфічна
Межа виявлення, мг/мл	0,0028 мг/мл (0,4 %)
Робасність	Методика стійка

Методика може бути використана у разі контролю якості готової ліпосомальної форми цитохрому С, а так само в контрольних точках під час технологічного процесу.

В и с н о в к и

1. Розроблено методику, що дає змогу визначати ступінь інкапсуляції цитохрому С в ліпосомальному препараті та здійснювати ідентифікацію складу ліпосомальних наночастинок цитохрому С.

2. Методика валідована за показниками «специфічність», «межа виявлення» та «робасність» відповідно до рекомендованих критеріїв.

Список використаної літератури

1. *Грегориадис Г., Аллисон А.* Липосомы в биологических системах. – М.: Медицина, 1983. – 384 с.
2. Liposome drug products. Chemistry, manufacturing, and controls; Human pharmacokinetics and bio-availability; and labeling documentation. Guidance for industry. U.S. Department of health and human services food and drug administration center for drug evaluation and research (CDER). FDA 2015 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070570.pdf>
3. *Борщевский Г. И., Товмасын Е. К., Краснополяский Ю. М., Гризодуб А. И.* Стандартизация липосомальных лекарственных средств // Фармаком. – 2013. – № 2. – С. 5–12.
4. *Сернов Л. Н., Береговых В. В., Давидов Е. Р., Гацура В. В.* Биотехнологический цитохром С (Химия, Фармакология). – М., 1997. – 240 с.
5. *Крицкова И. М., Алексеева Н. Н.* Цитохром С – фосфолипидный комплекс (получение и изучение в эксперименте) / Цитохром С и его клиническое применение: Сб. науч. тр. Ленингр. НИИ гематологии и переливания крови (Редкол.: Е. А. Селиванов (отв. ред.) и др.). – Л.: НИИ гематологии и переливания крови, 1990. – С. 74–76.
6. *Jing Zhanga, Peipei Guana, Tianyi Wangb, Di Changa, Tongying Jianga and Siling Wang.* Freeze-dried liposomes as potential carriers for ocular administration of cytochrome c against selenite cataract formation // J. Pharmacy Pharmacol. – 2009. – V. 61. – P. 1171–1178.
7. ICH Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). 2005 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
8. Патент № 022183. Евразийское патентное ведомство. Способ получения липосомальной формы цитохрома С / *Шоболов Д. В., Краснополяский Ю. М., Ульянов А. М., Натыкан А. А., Тарасов В. В., Балабаньян В. Ю., Швец В. И., Кацай А. Г.* – Заявл. 2012. 12. 24; Опубл. 2015. 11. 30.
9. *Betageri G. V., Jenkins S. A., Parsons D. L.* Liposomes Drug Delivery systems. – Lancaster – Basel: Technomic, 1993. – 247 p.
10. *Torchilin V. P., Weissing V.* Liposomes. – Oxford: University Press, 2003. – 394 p.
11. *Lundahl P., Zeng C. M., Hagglund C. L. et al.* Chromatographic approaches to liposomes, proteoliposomes and biomembrane vesicles // J. Chromatogr. B. – 1999. – V. 722. – P. 103–120.

Надійшла до редакції 12 жовтня 2016 року.

А. Г. Кацай¹, В. В. Прохоров¹, А. С. Григорьева², Ю. М. Краснополяский³

¹ *ООО «Наномедтех», г. Киев*

² *ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», г. Киев*

³ *Харьковский политехнический университет «Харьковский политехнический институт»*

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ИНКАПСУЛЯЦИИ ЦИТОХРОМА С В ЛИПОСОМАХ

Ключевые слова: липосомы, наночастицы, инкапсуляция, валидация, цитохром С, фосфолипиды, высокоэффективная жидкостная хроматография

АННОТАЦІЯ

Перспективним направленням створення високоєфективних лікарських препаратів являються терапевтичні системи направленої дії. Основою таких систем являються наночастиці різної структури, які здатні забезпечувати нацеленість дії та збільшення біодоступності препаратів. Особливе місце в сучасних системах доставки лікарств займають липосомальні наночастиці, які мають ряд непереможних переваг у порівнянні з наночастицями іншого типу. Розробка специфічних методів контролю нанорозмірних систем направленої дії є актуальною задачею фармації.

Ціль роботи – розробка та валидація методики визначення ступеня інкапсуляції цитохрому С в липосомі.

Об'єкт дослідження – отримана липосомальна форма цитохрому С, емульсія плацебо липосом та розв'язок цитохрому С. Використали метод високоєфективної жидкостної хроматографії. Дослід-

вания проводили со всеми требованиями и рекомендациями ICH, FDA для разработки методов контроля липосомальных препаратов.

Разработана ВЭЖХ-методика, позволяющая определять степень инкапсуляции цитохрома С в липосомальном препарате, а также проводить идентификацию состава липосомальных наночастиц цитохрома С. ВЭЖХ-методика валидирована по показателям «специфичность», «предел обнаружения» и «робастность» в соответствии с рекомендованными критериями. Методику можно использовать в контроле качества готовой липосомальной формы цитохрома С, а также в контрольных точках во время технологического процесса.

*O. G. Katsai*¹, *V. V. Prokhorov*¹, *G. S. Grigorieva*², *Yu. M. Krasnopolsky*³

¹ LLC «Nanomedtech», Kyiv

² State Institution «Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv

³ National Technical University «Kharkiv Polytechnic Institute»

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR DETERMINATION OF ENCAPSULATION EFFICIENCY OF CYTOCHROME C IN LIPOSOMES

Key words: liposomes, nanoparticle, encapsulation efficiency, validation, cytochrome C, phospholipids, HPLC

ABSTRACT

A strategic pathway in creating high-potent medical products is with targeted therapeutic systems that are based on nanoparticles of various structure. Such particles are capable of providing a targeted effect and an increase in bioavailability of the medical products. A special place among modern targeted drug delivery systems is held by liposomal nanoparticles which have apparent advantages over nanoparticles of another type. The problem number one for pharmacy lies in developing specific methods of control of nanosize drug delivery systems.

This research is dedicated to the development and validation of a technique for determining encapsulation efficiency of cytochrome C in liposomes.

The subject of research comprised the obtained liposomal form of cytochrome C, placebo emulsion, and cytochrome C solution. The research was conducted in compliance with the ICH and FDA requirements and recommendations in relation to the development of HPLC methods of control of liposomal preparations.

A method has been developed to enable the determination of encapsulation efficiency of cytochrome C in liposomal preparations and to allow for identifying the composition of liposomal nanoparticles of cytochrome C. This HPLC method has been validated in terms of specificity, limit of detection, and robustness in compliance with the recommended criteria. The technique may find its application in quality control of liposomal form of cytochrome C and in control points manufacturing process.

Електронна адреса для листування з авторами: alexkat-1@yandex.ru