

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2012

Е. В. Тазина, Е. В. Игнатьева, А. П. Полозкова, Н. А. Оборотова

КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДОКСОРУБИЦИНА

Учреждение Российской академии медицинских наук Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН (РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН), Москва

Разработаны методики хроматографического и спектрофотометрического анализа компонентов термолипосомальной лекарственной формы доксорубина. Для разделения липидов и доксорубина в термолипосомах методом тонкослойной хроматографии были выбраны системы растворителей хлороформ — метанол — концентрированный аммиак (65:25:4) и хлороформ — метанол — ледяная уксусная кислота — вода (25:15:4:2). Для хроматографического определения сахарозы в лекарственной форме предложена система 1,2-дихлорэтан — безводная уксусная кислота — метанол — вода (10:5:3:2) или изопропиловый спирт — ацетон — эфир — вода (7:7:2:4). Проведена валидация спектрофотометрической методики количественного определения содержания доксорубина в термолипосомах.

Ключевые слова: термолипосомы, доксорубин, липиды, сахароза, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия, валидация.

Антрациклиновый антибиотик доксорубин обладает высокой противоопухолевой и противолейкозной активностью при низкой избирательности действия. Включение цитостатика в липосомы позволяет оптимизировать его противоопухолевый эффект [1].

С целью увеличения селективности действия доксорубина проводятся исследования по созданию термочувствительных липосом [2 – 6], используемых в комбинации с локальной гипертермией (40 – 43 °С). В РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН разработан препарат “Доксорубин термолипосомальный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,7 мг” [7 – 9]. В состав термолипосомального доксорубина помимо действующего вещества входят вспомогательные вещества, наибольшее значение из которых имеют липиды и сахароза. Данная работа посвящена хроматографическому и спектрофотометрическому анализу компонентов термолипосомальной лекарственной формы.

Экспериментальная часть

Материалы: доксорубин гидрохлорид ФСП 42-0240-2570-02 (ОАО ОНОПБ, Россия); 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC), Lipoid GmbH (Германия); 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), Lipoid GmbH (Германия); 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (DSPE-PEG-2000) аммониевая соль (Avanti Polar Lipids, Inc., США); холестерин

(Avanti Polar Lipids, Inc., США); α -токоферола ацетат (витамин E) раствор для приема внутрь в масле 10 % (Марбиофарм, Россия); аммоний сернокислый (х.ч.), ЗАО Мосреактив (Россия); NEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота), AppliChem GmbH (Германия); сахароза (имп.), Химмед (Россия); натрия гидроокись (ч.д.а.), Lachema, Chemapol (Чехия); 1-нафтол (ч.), Реахим (Россия); йод кристаллический (ч.д.а.), Химмед (Россия); хлороформ (трихлорметан) стабилизированный (х.ч.), Химмед (Россия); ацетон (ч.), Реахим (Россия); 1,2-дихлорэтан (х.ч.), ЗАО Мосреактив (Россия); уксусная кислота ледяная (х.ч.), ЗАО Мосреактив (Россия); серная кислота (х.ч.), ЗАО Мосреактив (Россия); изопропиловый спирт (ч.), ЗАО Экос-1 (Россия); метанол (LAB-SCAN, Ирландия); аммиак водный, концентрированный (ч.д.а.), ООО Сигма Тек (Россия); спирт этиловый 95 %, ФС 42-3072-94; вода очищенная деионизированная, ФС 42-2619-98.

Хроматографические пластинки “Sorbfil” 10 × 10 см (Россия), марка – ПТСХ-АФ-А, аналитические (ТУ 26-11-17-89), подложка – алюминиевая фольга. Хроматографические пластинки “Silicagel 60 F 254” 10 × 20 см (Merck KGaA, Германия), подложка – стекло.

Поликарбонатные мембранные фильтры Nuclepore (Whatman, Великобритания) диаметром 19 мм и 25 мм, с размером пор 200 нм. Нейлоновые мембранные фильтры N66 диаметром 25 мм с размером пор

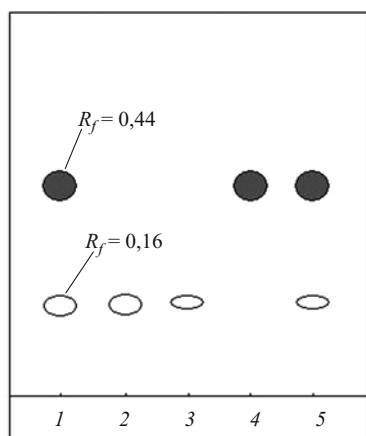


Рис. 1. ТСХ Докс-ТЛ на пластинке “Silicagel 60 F 254” в системе хлороформ — метанол — аммиак (65:25:4): 1 — образец Докс-ТЛ; 2 — СОВС-2 (52 мкг); 3 — СОВС-3 (6 мкг); 4 — СОВС-1 (7 мкг); 5 — СОВС-1 (7 мкг) + СОВС-3 (6 мкг).

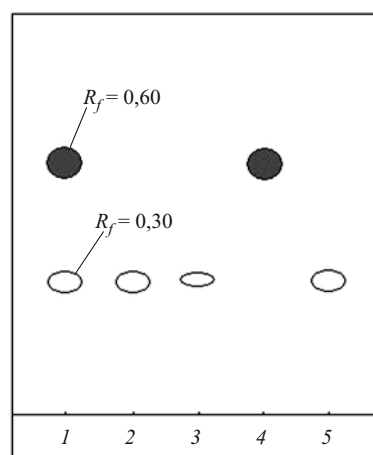


Рис. 2. ТСХ Докс-ТЛ на пластинке “Sorbfil” в системе хлороформ — метанол — ледяная уксусная кислота — вода (25:15:4:2): 1 — образец Докс-ТЛ; 2 — СОВС-2 (52 мкг); 3 — СОВС-3 (6 мкг); 4 — СОВС-1 (7 мкг); 5 — СОВС-2 (52 мкг) + СОВС-3 (6 мкг).

0,22 мкм и 0,45 мкм (Pall Corporation, США; ООО Палл Евразия, Россия).

Упаковочный материал. Для упаковки термолипосомальной дисперсии использовали флаконы из трубки стеклянной для лекарственных средств из нейтрального стекла ФО-1-20-НС-1 по ТУ 64-2-10-87, вместимостью 20 мл, закупоренные пробками из рези-

ны 52-599/3, 52-599/1 или 52-599/2 по ТУ 38.006108–95 под обкатку алюминиевыми колпачками по ОСТ 64-009–86.

Оборудование. Роторный испаритель BÜCHI Rotavapor R-200 и водяная баня BÜCHI Heating Bath B-490 (BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария); мини-экструдер Avanti Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., США); установка LIPEX™ для фильтрации под давлением (Northern Lipids, Inc.; Lipex Biomembranes, Inc., Канада); спектрофотометр СФ-46 (ЛОМО, Россия); спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия); рН-метр HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Германия); весы Sartorius LA 1200 S (Sartorius AG, Германия); сублимационная сушка Minifast DO.2 (Edwards, Великобритания).

Таблица 1
Статистическая обработка результатов количественного определения содержания Докс в ТЛ для подтверждения воспроизводимости и правильности спектрофотометрической методики

Опыт	Образец	Оптическая плотность (D) образца	Содержание Докс во флаконе, мг	Метрологические характеристики*
1	1	0,663	0,746	$\bar{x} = 0,754$ $S^2 = 5,15 \cdot 10^{-5}$ $S = 7,18 \cdot 10^{-3}$ $S_{\bar{x}} = 2,07 \cdot 10^{-3}$ $S_r = 9,52 \cdot 10^{-3}$ $v = 0,95 \%$ $\Delta\bar{x} = 0,005$ $\bar{\varepsilon} = 0,66 \%$
	2	0,663	0,746	
	3	0,673	0,757	
	4	0,675	0,759	
	5	0,677	0,762	
	6	0,674	0,758	
	7	0,662	0,745	
	8	0,664	0,747	
	9	0,676	0,761	
	10	0,674	0,758	
	11	0,662	0,745	
	12	0,676	0,761	
2	1	0,691	0,760	$\bar{x} = 0,760$ $S^2 = 4,50 \cdot 10^{-5}$ $S = 6,71 \cdot 10^{-3}$ $S_{\bar{x}} = 1,94 \cdot 10^{-3}$ $S_r = 8,83 \cdot 10^{-3}$ $v = 0,88 \%$ $\Delta\bar{x} = 0,004$ $\bar{\varepsilon} = 0,53 \%$
	2	0,699	0,769	
	3	0,683	0,751	
	4	0,693	0,762	
	5	0,684	0,752	
	6	0,698	0,767	
	7	0,692	0,761	
	8	0,682	0,750	
	9	0,695	0,764	
	10	0,690	0,759	
	11	0,685	0,753	
	12	0,698	0,767	

* $n = 12, f = 11, P = 95 \%, t(P, f) = 2,20$

Получение лиофилизированных термочувствительных липосом с доксорубицином (Докс-ТЛ). Термолипосомы (ТЛ) получали из DPPC, DSPC, холестерина и DSPE-PEG-2000 в молярном соотношении 9:1:0,2:0,02. Липиды, DSPE-PEG-2000, холестерин растворяли в хлороформе, прибавляли 2 мол. % α -токоферола ацетата и упаривали органический растворитель на роторном испарителе под вакуумом при 31 °С до образования липидной пленки. Пленку сушили при 50 °С под вакуумом, гидратировали 250 мМ раствором аммония серноокислого при 50 °С и постоянном перемешивании. Полученную дисперсию мультиламеллярных везикул экструдировали через поликарбонатные фильтры с размером пор 200 нм с помощью ручного миниэкструдера при нагревании до 50 °С.

Доксорубицин (Докс) загружали в ТЛ с помощью градиента сульфата аммония при 50 °С в течение 1 ч. Массовое соотношение препарат — липиды составляло 0,13:1. Градиент концентрации сульфата аммония формировался при двадцатикратном разбавлении термолипосомальной дисперсии буфером HEPES с криопротектором сахарозой (10 мМ HEPES, содержащий 4 % сахарозы, pH 8,2 – 8,4).

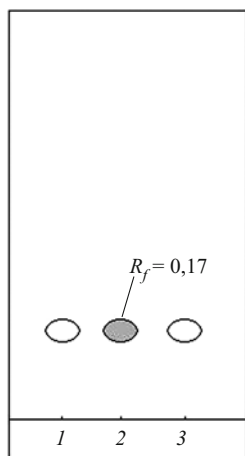


Рис. 3. ТСХ Докс-ТЛ на пластинке “Silicagel 60 F 254” в системе 1,2-дихлорэтан — безводная уксусная кислота — метанол — вода (10:5:3:2): 1 — СОВС-1 (9,5 мкг); 2 — образец 1 (47,5 мкг); 3 — образец 2 (9,5 мкг).

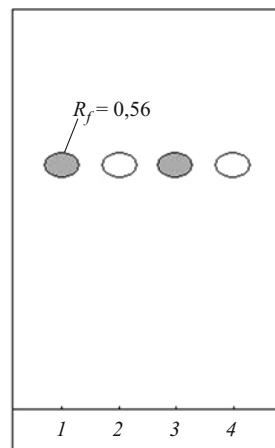


Рис. 4. ТСХ Докс-ТЛ на пластинке “Silicagel 60 F 254” в системе изопропиловый спирт — ацетон — эфир — вода (7:7:2:4): 1 — СОВС-1 (19 мкг); 2 — СОВС-2 (9,5 мкг); 3 — образец 1 (19 мкг); 4 — образец 2 (9,5 мкг).

Свежеприготовленную дисперсию Докс-ТЛ последовательно пропускали через нейлоновые мембранные фильтры фирмы “Pall” диаметром 25 мм, с размером пор 0,45 мкм и 0,22 мкм под давлением, используя установку LIPEX™. Фильтрат собирали в стерильный сборник.

Стерильную дисперсию Докс-ТЛ дозировали по 2 мл во флаконы вместимостью 20 мл и лиофилизировали в установке Minifast DO.2.

Хроматографическое определение Докс и липидов в Докс-ТЛ. Качественный анализ термолипосомального Докс методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) проводили в следующих системах растворителей:

хлороформ — метанол — вода (60:30:5, 65:25:4, 75:25:4 и 80:20:3) [10, 11];

хлороформ — метанол — концентрированный аммиак (60:35:5, 60:40:1 и 65:25:4) [10, 12, 13];

хлороформ — метанол — вода — концентрированный аммиак (90:54:5,5:5,5) [14];

хлороформ — метанол — ледяная уксусная кислота — вода (50:25:8:4, 25:15:4:2, 60:50:1:4, 80:20:14:6 и 90:40:12:2) [10, 11, 14];

хлороформ — ацетон — метанол — ледяная уксусная кислота — вода (6:8:2:2:1) [11].

На линию старта хроматографической пластинки “Sorbfil” и “Silicagel 60 F 254” наносили по 20 мкл образцов Докс-ТЛ и стандартных образцов веществ-свидетелей (СОВС). Пластины с нанесенными пробами выдерживали на воздухе в течение 5 – 10 мин, затем помещали в камеру, предварительно насыщенную одной из вышеуказанных смесей растворителей в течение 2 – 3 ч, и хроматографировали восходящим способом. Когда расстояние от фронта растворителей до конца пластины составляло примерно 0,5 – 1,0 см, пластину вынимали из камеры, выдерживали на воз-

Таблица 2
Содержание Докс в трех сериях лиофилизированного препарата

№ серии	Образец	Оптическая плотность (D) образца	Содержание Докс, мг	PCO Докс, мг	Оптическая плотность (D) PCO Докс	Метрологические характеристики *
1	1	0,668	0,762	0,720	0,631	$\bar{x} = 0,756$ $S^2 = 3,17 \cdot 10^{-5}$ $S = 5,63 \cdot 10^{-3}$ $R_{\max, n, P} = 0,011$ $L(P, n)S = 0,0205$
	2	0,665	0,759			
	3	0,658	0,751			
	4	0,658	0,751			
2	1	0,653	0,766	0,740	0,631	$\bar{x} = 0,763$ $S^2 = 9,67 \cdot 10^{-6}$ $S = 3,11 \cdot 10^{-3}$ $R_{\max, n, P} = 0,007$ $L(P, n)S = 0,0113$
	2	0,652	0,765			
	3	0,651	0,763			
	4	0,647	0,759			
3	1	0,653	0,777	0,750	0,630	$\bar{x} = 0,772$ $S^2 = 2,27 \cdot 10^{-5}$ $S = 4,76 \cdot 10^{-3}$ $R_{\max, n, P} = 0,010$ $L(P, n)S = 0,0174$
	2	0,651	0,775			
	3	0,646	0,769			
	4	0,644	0,767			

* $n = 4, f = 3, P = 0,95, L(P, n) = 3,65$

Таблица 3
Состав модельных смесей Докс

Компонент	Модельная смесь, мг		
	1	2	3
Доксорубицин Докс	0,639	0,712	0,833
Дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC)		5,20	
Дистеароилфосфатидилхолин (DSPC)		0,62	
Холестерин		0,06	
Дистеароилфосфатидилэтанолламин-ПЭГ-2000 (DSPE-PEG-2000)		0,04	
Аммоний серноокислый		3,30	
Сахароза		76,00	
N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоно-вая кислота (HEPES)		4,52	

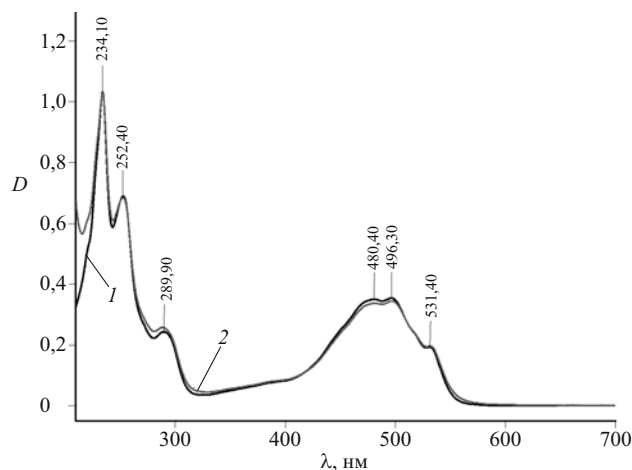


Рис. 5. Спектры поглощения спиртовых растворов лиофилизированных Докс-ТЛ и PCO Докс, измеренные на приборе Cary 100: 1 — PCO Докс; 2 — лиофилизированные Докс-ТЛ.

духе в течение 15 – 20 мин и проявляли парами йода. Пятна липидов идентифицировали по желтой или желто-коричневой окраске, а пятно Докс — по характерной красно-розовой окраске.

Примечания.

1. Приготовление COBC.

COBC-1 – 0,035 % раствор рабочего стандартного образца (PCO) Докс в метаноле: 0,70 мг субстанции Докс (точная навеска) растворяли в 2 мл метанола.

COBC-2 – 0,26 % раствор PCO DPPC в метаноле: 2,60 мг DPPC (точная навеска) растворяли в 1 мл метанола.

Таблица 4

Количественное определение содержания Докс в модельных смесях

Модельная смесь	Образец	Оптическая плотность (D) образца	Найдено Докс в образце, мг	PCO Докс, мг	Оптическая плотность (D) PCO Докс	Метрологические характеристики*
1	1	0,556	0,637	0,695	0,607	$\bar{x} = 0,638$ $S^2 = 1,40 \cdot 10^{-6}$ $S = 1,18 \cdot 10^{-3}$ $S_{\bar{x}} = 4,82 \cdot 10^{-4}$ $t_{\text{расч.}} = 2,08$ $\Delta\bar{x} = 0,001$ $\bar{e} = 0,16 \%$
	2	0,557	0,638			
	3	0,556	0,637			
	4	0,557	0,638			
	5	0,558	0,639			
	6	0,559	0,640			
2	1	0,618	0,713	0,697	0,604	$\bar{x} = 0,711$ $S^2 = 7,60 \cdot 10^{-6}$ $S = 2,76 \cdot 10^{-3}$ $S_{\bar{x}} = 1,13 \cdot 10^{-3}$ $t_{\text{расч.}} = 0,89$ $\Delta\bar{x} = 0,003$ $\bar{e} = 0,42 \%$
	2	0,614	0,709			
	3	0,615	0,710			
	4	0,618	0,713			
	5	0,613	0,707			
	6	0,619	0,714			
3	1	0,722	0,832	0,740	0,642	$\bar{x} = 0,831$ $S^2 = 6,40 \cdot 10^{-6}$ $S = 2,53 \cdot 10^{-3}$ $S_{\bar{x}} = 1,03 \cdot 10^{-3}$ $t_{\text{расч.}} = 1,94$ $\Delta\bar{x} = 0,003$ $\bar{e} = 0,36 \%$
	2	0,723	0,833			
	3	0,718	0,828			
	4	0,720	0,830			
	5	0,724	0,835			
	6	0,720	0,830			

* $n = 6, f = 5, P = 95 \%, t_{\text{табл.}} = 2,57$

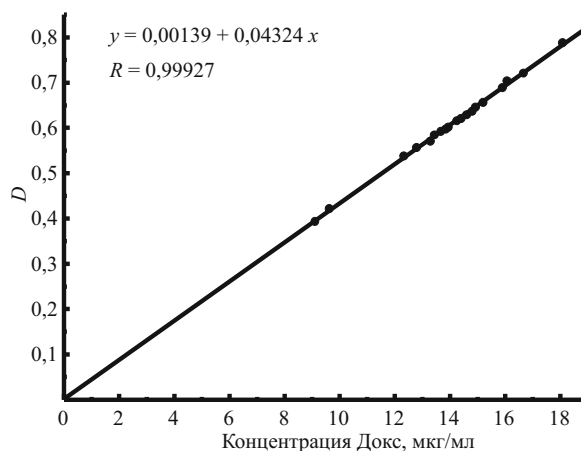


Рис. 6. Линейная зависимость оптической плотности от концентрации Докс в модельной смеси.

COBC-3 – 0,031 % раствор PCO DSPC в метаноле: 1,24 мг DSPC (точная навеска) растворяли в 4 мл метанола.

2. Приготовление образца лиофилизированных Докс-ТЛ. К содержимому флакона с лиофилизированными Докс-ТЛ прибавляли 2 мл метанола и встряхивали флакон в течение 1 мин. Через 1 – 2 ч полученную дисперсию фильтровали через складчатый фильтр.

Использовались свежеприготовленные системы растворителей и образцы.

Хроматографическое определение сахарозы в Докс-ТЛ. Анализ Докс-ТЛ на наличие сахарозы проводили в системах растворителей 1,2-дихлорэтан — безводная уксусная кислота — метанол — вода (10:5:3:2) и изопропиловый спирт — ацетон — эфир — вода (7:7:2:4). На линию старта хроматографической пластинки “Sorbfil” и “Silicagel 60 F 254” наносили по 5 мкл образцов Докс-ТЛ и COBC. Пластины с нанесенными пробами выдерживали на воздухе в течение 20 – 30 мин, затем помещали в камеру, предварительно насыщенную одной из вышеуказанных смесей растворителей в течение 2 ч, и хроматографировали восходящим способом. Когда расстояние от фронта растворителей до конца пластины составляло примерно 0,5 – 1,0 см, пластину вынимали из камеры, выдерживали на воздухе в течение 10 – 20 мин и опрыскивали раствором 1-нафтола в смеси спирта этилового 95 % и серной кислоты. Далее хроматограмму высушивали при температуре $130 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 3 – 5 мин (в случае системы 1,2-дихлорэтан — безводная уксусная кислота — метанол — вода (10:5:3:2)) или при температуре $120 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 2 – 5 мин (в случае системы изопропиловый спирт — ацетон — эфир — вода (7:7:2:4)). Пятна сахарозы идентифицировали по сиреневой или черно-фиолетовой окраске.

Примечания.

1. Приготовление COBC для системы растворителей 1,2-дихлорэтан — безводная уксусная кислота — метанол — вода (10:5:3:2).

Раствор А — 0,38 % раствор РСО сахарозы в смеси метанол — вода (3:2): 76,0 мг сахарозы (точная навеска) растворяли в 20 мл смеси метанол — вода (3:2).

СОВС-1 — 0,19 % раствор РСО сахарозы в смеси метанол — вода (3:2): к 2 мл раствора А прибавляли 2 мл смеси метанол — вода (3:2).

2. Приготовление образцов лиофилизированных Докс-ТЛ для системы растворителей 1,2-дихлорэтан — безводная уксусная кислота — метанол — вода (10:5:3:2).

Образец 1 — содержимое флакона с лиофилизированными Докс-ТЛ растворяли в 8 мл смеси метанол — вода (3:2).

Образец 2 — к 1 мл образца 1 прибавляли 4 мл смеси метанол — вода (3:2).

3. Приготовление СОВС для системы растворителей изопропиловый спирт — ацетон — эфир — вода (7:7:2:4).

СОВС-1 — 0,38 % раствор РСО сахарозы в воде: 76,0 мг сахарозы (точная навеска) растворяли в 20 мл деионизированной воды.

СОВС-2 — 0,19 % раствор РСО сахарозы в воде: к 2 мл СОВС-1 прибавляли 2 мл деионизированной воды.

4. Приготовление образцов лиофилизированных Докс-ТЛ для системы растворителей изопропиловый спирт — ацетон — эфир — вода (7:7:2:4).

Образец 1 — содержимое флакона с лиофилизированными Докс-ТЛ растворяли в 20 мл деионизированной воды.

Образец 2 — к 2 мл образца 1 прибавляли 2 мл деионизированной воды.

5. Приготовление раствора 1-нафтола в смеси спирта этилового 95 % и серной кислоты. 0,5 г 1-нафтола растворяли в 50 мл смеси спирта этилового 95 % и серной кислоты (19:1), после чего количественно переносили в колбу объемом 100 мл. Далее раствор доводили до метки смесью спирта этилового 95 % и серной кислоты (19:1).

Системы растворителей и образцы использовали свежеприготовленными.

Количественное определение содержания Докс в ТЛ. Содержание Докс в ТЛ определяли методом спектрофотометрии с использованием РСО Докс при длине волны 252 ± 2 нм. Измерение оптической плотности спиртовых растворов Докс-ТЛ и РСО Докс проводили относительно спирта этилового 95 % с толщиной оптического слоя 10 мм.

Содержание Докс (X , мг) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{DaC}{D_0C_0},$$

где D — оптическая плотность раствора образца; D_0 — оптическая плотность РСО Докс; C — величина разбавления образца; C_0 — величина разбавления РСО Докс; a — навеска РСО Докс, мг.

Примечания.

1. Приготовление РСО Докс. 0,7 мг Докс (точная навеска) помещали в колбу объемом 50 мл, растворяли в 10 мл деионизированной воды и прибавляли спирт этиловый 95 % до метки.

2. Приготовление раствора Докс-ТЛ: содержимое флакона с лиофилизированными Докс-ТЛ растворяли в 10 мл деионизированной воды, встряхивали полученную дисперсию в течение 2 мин, затем количественно переносили в колбу объемом 50 мл и прибавляли спирт этиловый 95 % до метки.

Растворы использовали свежеприготовленными.

Результаты и их обсуждение

Хроматографическое определение Докс и липидов в Докс-ТЛ

Задачей данного исследования являлся выбор оптимальной системы растворителей для хроматографического разделения липидов (DPPC, DSPC) и Докс в термолипосомальной лекарственной форме.

В изученных системах растворителей липиды имели близкие значения R_f и при хроматографировании Докс-ТЛ определялись 1 пятном. Наиболее четкое разделение липидов и Докс в составе лекарственной формы наблюдали в системах растворителей хлороформ — метанол — концентрированный аммиак (65:25:4) и хлороформ — метанол — ледяная уксусная кислота — вода (25:15:4:2). Предел обнаружения липидов в указанных системах составил 1,0 мкг. Предел обнаружения Докс в системе хлороформ — метанол — концентрированный аммиак (65:25:4) составил 1,0 мкг, а в системе хлороформ — метанол — ледяная уксусная кислота — вода (25:15:4:2) — 0,5 мкг. Холестерин и DSPE-PEG-2000 содержались в термолипосомальной лекарственной форме в очень маленьких количествах, и поэтому на хроматограммах не обнаруживались. Сахароза при проявлении парами йода также не давала никаких пятен на пластинках. Наименее удачной оказалась хроматографическая система хлороформ — метанол — вода, в которой липиды и Докс в составе лекарственной формы не разделялись.

Хроматографическое определение Докс-ТЛ в системах хлороформ — метанол — концентрированный аммиак (65:25:4) и хлороформ — метанол — ледяная уксусная кислота — вода (25:15:4:2) показано на рис. 1, 2.

Хроматографическое определение сахарозы в Докс-ТЛ

Хроматографическое определение сахарозы в Докс-ТЛ на пластинке “Silicagel 60 F 254” в системах растворителей 1,2-дихлорэтан — безводная уксусная кислота — метанол — вода (10:5:3:2) и изопропиловый спирт — ацетон — эфир — вода (7:7:2:4) представлено на рис. 3 — 4.

Как видно из рис. 3, 4, в данных системах растворителей пятна Докс-ТЛ по форме и окраске соответствовали пятнам СОВС. Докс не мешал хроматографическому определению сахарозы в лекарственной форме. Предел обнаружения сахарозы в системе 1,2-дихлорэтан — безводная уксусная кислота — метанол —

вода (10:5:3:2) составил около 0,5 мкг, а в системе изо-пропиловый спирт — ацетон — эфир — вода (7:7:2:4) — около 0,9 мкг.

Спектрофотометрическое определение Докс в ТЛ

Присутствие Докс в лекарственной форме также подтверждалось электронным спектром поглощения в УФ- и видимой области. Спиртовой раствор препарата, приготовленный по описанной выше методике, имел характеристические максимумы поглощения при длинах волн: 232 ± 2 нм, 252 ± 2 нм, 288 ± 2 нм, 480 ± 2 нм, 498 ± 2 нм, 530 ± 2 нм (рис. 5). Для количественного определения Докс в ТЛ в качестве аналитической выбрали длину волны, на которой пик Докс был наиболее выраженным и узким, то есть 252 ± 2 нм.

Для валидации методики количественного определения содержания Докс в ТЛ использовали следующие характеристики: правильность, повторяемость (сходимость), воспроизводимость, специфичность (селективность) и линейность.

При оценке воспроизводимости и правильности методики в 2 опытах, проведенных в разное время на разных спектрофотометрах, было проанализировано по 12 одинаковых образцов одной и той же серии Докс-ТЛ. Результаты анализа и их статистическая обработка представлены в табл. 1.

Для установления того, значимо или незначимо (статистически) расхождение между двумя дисперсиями (табл. 1), использовали F -критерий (критерий Фишера). Рассчитанное значение $F_{\text{расч.}} = 1,14$ сравнивали с табличной величиной $F_{\text{табл.}} = 4,46$ при доверительной вероятности $P = 0,99$ и числах степеней свободы $f_1 = 11$ и $f_2 = 11$. Поскольку $F_{\text{расч.}} = 1,14 < F_{\text{табл.}} = 4,46$, то дисперсии однородны (различие между ними статистически незначимо). Следовательно, методика количественного определения содержания Докс в ТЛ воспроизводима, а результаты 2 опытов различаются незначительно.

Правильность подтверждали, используя t -критерий Стьюдента. Полученное значение $t_{\text{расч.}} = 2,12$ сравнивали с табличной величиной $t_{\text{табл.}} = 2,82$ при доверительной вероятности $P = 0,99$ и числе степеней свободы $f = 22$. Поскольку $t_{\text{расч.}} = 2,12 < t_{\text{табл.}} = 2,82$, то расхождение между средними статистически незначимо. Результаты обоих опытов следует рассматривать как одну выборочную совокупность. Поэтому можно сделать вывод о том, что методика количественного определения содержания Докс в ТЛ дает правильные результаты и не содержит систематической ошибки.

При оценке сходимости результатов количественного определения содержания Докс в ТЛ анализировали 3 серии лиофилизированного препарата по 4 флакона в каждой серии (табл. 2). Расчеты проводили с использованием фактора $L(P, n)$, вычисленного по Пирсону. Из данных табл. 2 видно, что в 3 исследованных сериях препарата допустимое расхождение результатов параллельных определений $R_{\text{max}, n, p}$ получилось меньше, чем произведение $L(P, n)S$, следовательно, результаты

количественного определения содержания Докс в ТЛ можно считать сходящимися.

Для подтверждения специфичности методики готовили 3 модельные смеси с разными концентрациями Докс (табл. 3). Результаты анализа представлены в табл. 4.

Так как в 3 исследованных модельных смесях критерий Стьюдента $t_{\text{расч.}}$ меньше $t_{\text{табл.}}$ (табл. 4), то расхождение между средним значением содержания Докс (\bar{x}), найденным экспериментальным путем, и истинным значением (μ) статистически незначимо, следовательно, методика не содержит систематической ошибки и позволяет достоверно определять содержание действующего вещества в присутствии вспомогательных веществ.

В основе спектрофотометрического определения действующего вещества в лекарственной форме лежит существование линейной зависимости между оптической плотностью исследуемых растворов и концентрацией вещества. Для проведения градуировки методики измеряли оптическую плотность модельных смесей с разными концентрациями Докс при длине волны 252 ± 2 нм. Результаты анализа проиллюстрированы на рис. 6.

Задача линейного регрессионного анализа (метода наименьших квадратов) состоит в том, чтобы сумма квадратов отклонений SQ экспериментальных точек вдоль ординаты от проведенной прямой была минимальной. В данном исследовании остаточная сумма квадратов составила $2,27593 \cdot 10^{-4}$.

Как видно из рис. 6, результаты количественного определения Докс в модельных смесях, а также в лекарственной форме описываются линейной зависимостью $y = 0,00139 + 0,04324x$ с коэффициентом корреляции $R = 0,99927$.

Разработанные нами методики хроматографического и спектрофотометрического анализа лекарственной формы включены в проект ФСП на препарат “Доксорубин термоллипосомальный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций по 0,7 мг”.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. С. Дудниченко, *Провизор*, № 6, 18 – 19 (2000).
2. Q. Chen, S. Tong, M. W. Dewhurst, and F. Yuan, *Mol. Cancer Ther.*, **3**(10), 1311 – 1317 (2004).
3. S. Dromi, V. Frenkel, A. Luk, et al., *Clin. Cancer Res.*, **13**(9), 2722 – 2727 (2007).
4. H. D. Han, B. C. Shin, and H. S. Choi, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **62**, 110 – 116 (2006).
5. M. L. Hauck, S. M. LaRue, W. P. Petros, et al., *Clin. Cancer Res.*, **12**(13), 4004 – 4010 (2006).
6. K. Morita, F. Zywiets, K. Kakinuma, et al., *Oncol. Rep.*, **20**(2), 365 – 372 (2008).
7. В. В. Мещерикова, Е. В. Тазина, А. П. Полозкова и др., *Мед. радиол. и радиац. безопасность*, **53**(4), 7 – 12 (2008).
8. Е. В. Тазина, Е. В. Игнатьева, А. П. Полозкова и др., *Хим.-фарм. ж.*, **42**(12), 30 – 35 (2008).
9. Е. В. Тазина, В. В. Мещерикова, Е. В. Игнатьева и др., *Рос. биотер. журн.*, **8**(1), 40 – 47 (2009).
10. Д. К. Шапиро, *Практикум по биологической химии*, Высшая школа, Минск (1976), сс. 175 – 181.

11. Y. Barenholz, S. Amselem, D. Goren, et al., *Med. Res. Rev.*, **13**(4), 449 – 491 (1993).
12. M. Hossann, M. Wiggenhorn, A. Schwerdt, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 2491 – 2499 (2007).
13. L. H. Lindner, M. Hossann, M. Vogeser, et al., *J. Contr. Rel.*, **125**, 112 – 120 (2008).
14. E. M. G. Van Bommel and D. J. A. Crommelin, *Int. J. Pharm.*, **22**, 299 – 310 (1984).

Поступила 16.02.11

IDENTIFICATION AND ASSAY OF THERMOSENSITIVE LIPOSOMES LOADED WITH DOXORUBICIN

E. V. Tazina, E. V. Ignatieva, A. P. Polozkova, N. A. Oborotova

Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Chromatographic and spectrophotometric methods for the qualitative and quantitative analysis of thermosensitive liposomes loaded with doxorubicin have been developed. Lipids and doxorubicin in thermosensitive liposomes have been separated by thin layer chromatography TLC in two systems: (i) chloroform – methanol – ammonia (65 : 25 : 4) and (ii) chloroform – methanol – glacial acetic acid – water (25 : 15 : 4 : 2). The chromatographic determination of sucrose in thermosensitive liposomes has been performed in 1,2-dichloroethane – anhydrous acetic acid – methanol – water (10 : 5 : 3 : 2) or isopropyl alcohol – acetone – ether – water (7 : 7 : 2 : 4) systems. A spectrophotometric assay of doxorubicin in thermosensitive liposomes has been validated.

Key words: Thermosensitive liposomes, doxorubicin, lipids, sucrose, thin layer chromatography, spectrophotometry, validation