

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2012

Е. В. Санарова, А. П. Полозкова, И. Г. Меерович, А. В. Ланцова, И. В. Ярцева, О. Л. Орлова, Н. А. Оборотова

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИОСЕНСА В НОВОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

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

Разработана методика спектрофотометрического количественного определения тиосенса в новой лиофилизированной липосомальной лекарственной форме, содержащей лецитин — холестерин — PEG-2000-DSPE в молярном соотношении 1/0,22/0,002 и раствор сахаразы в качестве криопротектора в соотношении лецитин — криопротектор 1/2. Оценено влияние вспомогательных веществ на результаты анализа и соблюдение закона Бугера — Ламберта — Бера.

Ключевые слова: тиосенс, липосомы, спектрофотометрия, закон Бугера — Ламберта — Бера.

В лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО РОНЦ им. Н. Н. Блохина разрабатывается лиофилизированная липосомальная лекарственная форма (ЛЛЛФ) тиосенса. Субстанция тиосенса, синтезированная в ГНЦ “НИОПИК”, по химической структуре является тетра-3-фенилтиофталоцианином гидроксидом алюминия и имеет максимум поглощения света в ближней инфракрасной области спектра — 717 ± 4 нм [1]. Тиосенс является гидрофобным соединением [2], поэтому инкапсуляция его в липосомы не только позволяет вводить препарат внутривенно *in vivo*, но также улучшает фармакокинетический профиль препарата.

В доклинических исследованиях, проведенных в лаборатории разработки лекарственных форм и лаборатории синтетических противоопухолевых веществ, с использованием свежеприготовленной липосомальной лекарственной формы тиосенса выявлено, что сеансы фотодинамической терапии с использованием данного препарата позволяют достичь значительного торможения роста опухолей — для опухоли Эрлиха на 80 % и для лимфолейкоза Р-388 — на 84 % [3]. Полученные данные указывают на то, что исследуемое вещество может применяться в качестве перспективного инфракрасного фотосенсибилизатора при фотодинамической терапии опухолей.

Для стандартизации ЛЛЛФ тиосенса необходима точная методика определения количественного содержания активного вещества, учитывающая специфические особенности анализируемой лекарственной формы. Данное исследование посвящено разработке методики количественного определения тиосенса в составе лекарственной формы методом спектрофотометрии, который является одним из наиболее совершенных методов абсорбционного молекулярного анализа [4].

Экспериментальная часть

Получение лиофилизированной липосомальной лекарственной формы тиосенса

Компоненты лекарственной формы — яичный лецитин E PC S (Lipoid, Германия), холестерин (Sigma, Япония), полиэтиленгликоль-2000-фосфатидилэтаноламин PEG-2000-PE (Lipoid, Германия) — взвешивали на аналитических весах Sartorius LA 1200 S (Sartorius AG, Германия), помещали в стерильную коническую колбу и растворяли в хлороформе (Химмед, Россия). Хлороформный раствор субстанции тиосенса (ФГУП ГНЦ “НИОПИК”) помещали на 5 – 10 мин в ультразвуковую ванну Transsonic (Elma, Англия) до полного растворения, а затем добавляли к раствору липидов. Полученный раствор фильтровали (размер пор фильтра 0,22 мкм) и количественно переносили в круглодонную колбу с последующим отгоном органического растворителя при температуре фазового перехода липидов ($+37 \pm 2$ °C) на роторном испарителе BÜCHI Rotavapor R-200 (BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария). Полученную однородную полупрозрачную липидную пленку сушили под вакуумом, а затем гидратировали определенным количеством деионизированной воды (18 – 20 мл с учетом набухания липидов). Проводили предфильтрацию полученной дисперсии мультислойных везикул на экструдере LIPEX™ (Northern Lipids, Inc.; Lipex Biomembranes, Inc., Канада) через фильтр с размером пор 1,2 мкм, после чего измельчали ее на гомогенизаторе высокого давления Microfluidizer M-110S (Microfluidics, США) в течение 6 – 12 мин в зависимости от объема загрузки. К дисперсии моноламеллярных липосом, полученных после гомогенизации, приливали необходимый объем водного раствора сахаразы (Химмед, Россия) в массовом со-

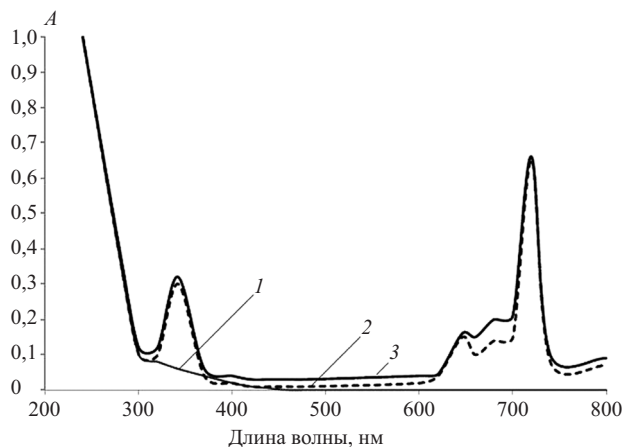


Рис. 1. Спектры поглощения: 1 — пустых липосом; 2 — субстанции тиосенса (PCO); 3 — ЛЛЛФ тиосенса.

отношении лецитин — криопротектор 1/2. Для удаления не включившегося препарата и стерилизации проводили фильтрацию последовательно через фильтры с размером пор 0,45 и 0,22 мкм. Так как в водной дисперсии липосомы не стабильны и проявляют тенденцию к слиянию и увеличению размеров для получения лекарственной формы с необходимым сроком хранения, проводили лиофильную сушку на установке “Edwards Minifast DO.2” (Ergo Electronic S.p. A., Италия).

Методика количественного определения тиосенса в ЛЛЛФ

Во флакон с лиофилизатом добавляли 10 мл хлороформа, количественно переносили в мерную колбу объемом 25 мл и доводили хлороформом до метки, тщательно перемешивали и давали отстояться в темном месте в течение 10 – 15 мин. Затем 5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и при осторожном перемешивании доводили спиртом этиловым 95 % до метки, оставляли на 30 – 40 мин в темном месте. Определяли максимум оптической плотности раствора образца в диапазоне длин волн от 713 до 721 нм (шаг измерения не более 1 нм) в кюветках с толщиной оптического слоя 10 мм относительно раствора сравнения. Параллельно проводили определение оптической плотности рабочего стандартного образца (PCO) субстанции тиосенса относительно раствора сравнения. Количество тиосенса в мг/флакон (X) рассчитывают по формуле:

$$X = D_1 \cdot a_0 \cdot V_1 / D_0 \cdot V_0, \quad (1)$$

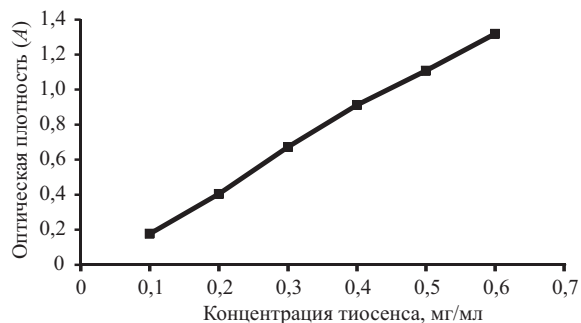


Рис. 2. Соблюдение закона Бугера — Ламберта — Бера для спиртово-хлороформного раствора ЛЛЛФ тиосенса.

где D_1 и D_0 — оптические плотности растворов образца ЛЛЛФ тиосенса и PCO соответственно; a_0 — навеска PCO тиосенса, мг; V_1 и V_0 — разведение образца ЛЛЛФ тиосенса и PCO.

Приготовление PCO тиосенса. Точную навеску субстанции тиосенса (1,50 мг) растворяли в 10 мл хлороформа, выдерживали раствор в течение 15 – 20 мин в ультразвуковой ванне, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки хлороформом. Отбирали 5 мл хлороформного раствора в колбу объемом 100 мл, а затем доводили до метки 95 % этиловым спиртом. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление раствора сравнения. Отмеряли 5,0 мл хлороформа и помещали в колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки спиртом этиловым 95 %.

Оценка уровня поглощения света растворами тиосенса и вспомогательных веществ

Известно, что электронный спектр поглощения раствора субстанции тиосенса в хлороформе в области от 300 до 800 нм имеет максимумы поглощения при 646 ± 4 нм, 342 ± 3 нм и наиболее интенсивный максимум — при 717 ± 4 нм. Для определения отсутствия поглощения вспомогательных веществ (лецитина, холестерина, PEG-2000-DSPE, сахарозы) на характеристической длине волны тиосенса сравнивали спектры растворов плацебо (“пустые” липосомы с криопротектором), ЛЛЛФ и раствора PCO, тиосенса.

Оценка соблюдения закона Бугера — Ламберта — Бера для тиосенса в составе ЛЛЛФ

Соблюдение закона Бугера — Ламберта — Бера для тиосенса в ЛЛЛФ определяли в диапазоне концентраций от 0,1 до 0,6 мг/мл. С этой целью получали значения оптической плотности для каждой из concentra-

Таблица 1

Результаты количественного определения тиосенса в лиофилизированной ЛЛЛФ

Содержание тиосенса в PCO, мг	1,58				
Оптическая плотность PCO	0,697				
№ образца ЛЛЛФ	1	2	3	4	5
Оптическая плотность раствора ЛЛЛФ	0,651	0,662	0,649	0,658	0,653
Содержание тиосенса в ЛЛЛФ, мг/флакон	1,476	1,501	1,471	1,492	1,480
Метрологические характеристики	$n = 5, f = 4, \bar{x} = 1,484, S^2 = 1,5 \cdot 10^{-4}, S = 1,23 \cdot 10^{-2}, S_x = 5,49 \cdot 10^{-3},$ $P = 95 \%, t_{p, f} = 2,78, \Delta_x \Delta \bar{x} = 0,015, \varepsilon = 1,00 \%$				

Таблица 2
Результаты определения содержания тиосенса в сериях ЛЛЛФ

Серия	№ фла- кона	Оптическая плотность	Содержание тиосенса, мг/флакон	Метрологические характеристики *
01	1	0,617	1,399	$\bar{x} = 1,396, S^2 = 6,33 \cdot 10^{-6},$ $S = 2,52 \cdot 10^{-3}, \Delta\bar{x} = 0,006,$ $\varepsilon = 0,45 \%$
	2	0,615	1,394	
	3	0,616	1,396	
02	1	0,615	1,394	$\bar{x} = 1,398, S^2 = 1,30 \cdot 10^{-5},$ $S = 3,61 \cdot 10^{-3}, \Delta\bar{x} = 0,009,$ $\varepsilon = 0,64 \%$
	2	0,617	1,399	
	3	0,618	1,401	
03	1	0,574	1,301	$\bar{x} = 1,303, S^2 = 8,33 \cdot 10^{-6},$ $S = 2,89 \cdot 10^{-3}, \Delta\bar{x} = 0,007,$ $\varepsilon = 0,55 \%$
	2	0,576	1,306	
	3	0,576	1,306	
04	1	0,651	1,476	$\bar{x} = 1,478, S^2 = 4,00 \cdot 10^{-6},$ $S = 2,00 \cdot 10^{-3}, \Delta\bar{x} = 0,005,$ $\varepsilon = 0,34 \%$
	2	0,653	1,480	
	3	0,652	1,478	

* $n = 3, f = 2, P = 95 \%, t_{p, f} = 4,303.$

ций и строили графики зависимости оптической плотности от концентрации раствора.

Приготовление растворов с концентрацией 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мг/мл из ЛЛЛФ. Использовали 6 флаконов ЛЛЛФ тиосенса серии 02 (концентрация тиосенса 1,4 мг/флакон). В каждый из 6 флаконов прибавляли по 10 мл хлороформа, хлороформные растворы ЛЛЛФ объединяли в мерной колбе и полученный раствор разводили до нужной концентрации.

Результаты и их обсуждение

Спектрофотометрическое количественное определение тиосенса в ЛЛЛФ имеет ряд особенностей: необходимость выдерживания растворов в темном месте в течение определенного промежутка времени и определение величины оптической плотности в диапазоне длин волн от 713 до 721 нм, которые связаны с липосомальной структурой и склонностью к окислению фосфолипидов, входящих в состав липосомального бислоя.

Для определения специфичности методики получения спектры субстанции тиосенса, ЛЛЛФ и пустых липосом (рис. 1). Ранее доказано, что спирто-хлороформный раствор сравнения не поглощает в области 300 – 800 нм. На спектре субстанции тиосенса видно, что наибольший максимум поглощения расположен в

области 720 ± 4 нм. При сравнении спектров пустых липосом и ЛЛЛФ тиосенса обнаружено, что липосомальные липиды и криопротектор незначительно (оптическая плотность — А равна 0,005) поглощают на характеристической длине волны субстанции и их поглощение не нужно учитывать при расчетах количественного содержания тиосенса в ЛЛЛФ. Это свидетельствует о специфичности методики качественного и количественного обнаружения тиосенса в ЛЛЛФ методом спектрофотометрии.

Возможность применения аналитической методики также определяется соблюдением закона Бугера — Ламберта — Бера. Для оценки возможности применения спектрофотометрического определения тиосенса в ЛЛФ строили график зависимости оптической плотности от концентрации для растворов лиофилизата. Установлено, что зависимость концентрации тиосенса в спирто-хлороформном растворе ЛЛЛФ от оптической плотности подчиняется закону Бугера — Ламберта — Бера в области значений концентраций 0,1 – 0,6 мг/мл (рис. 2).

Количественное спектрофотометрическое определение тиосенса в образцах ЛЛЛФ (табл. 1) показало наличие средней ошибки анализа на уровне 1 %, что свидетельствует о достаточно высокой точности данной методики. Анализ содержания тиосенса в 4 сериях ЛЛЛФ (табл. 2) указывает на воспроизводимую технологию получения данного препарата — все серии содержали не менее 1,3 мг/флакон, средняя ошибка определения не превышала 1 %.

Работа выполнена в рамках научно-технической программы “Разработка и практическое освоение в здравоохранении новых методов и средств профилактики, диагностики и лечения онкологических, инфекционных и других опасных заболеваний” при финансовой поддержке Правительства г. Москвы.

ЛИТЕРАТУРА

1. I. G. Meerovich, Z. S. Smirnova, N. A. Oborotova, et al., *Bul. Biol. Med.*, **139**(4), 427 – 430 (2005).
2. Л. Г. Гатинская, Н. А. Дмитричева, Е. В. Игнатъева и др., *Рос. биотер. ж.*, **1**, 33 – 34 (2006).
3. З. С. Смирнова, И. Г. Меерович, Е. А. Лукьянец и др., *Рос. биотер. ж.*, **1**, 54 – 60 (2004).
4. В. Г. Беликов, *Рос. хим. ж.*, **4**, 52 – 56 (2002).

Поступила 19.09.11

QUANTITATIVE DETERMINATION OF TIOSENS IN NEW LIPOSOMAL DRUG FORM

E. V. Sanarova, A. P. Polozkova, I. G. Meerovich, A. V. Lantsova, I. V. Yartseva, O. L. Orlova, and N. A. Oborotova

Blokhin State Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478, Russia

We have developed a procedure for the spectrophotometric quantification of tiосens in a new lyophilized liposomal drug form containing lecithin, cholesterol, and PEG-2000-DSPE at a molar ratio of 1/0.22/0.002, as well as sucrose solution (cryoprotectant) at a lecithin/cryoprotectant mass ratio of 1/2. The influence of components on the results of analysis and validity of the Bouguer – Lambert – Beer law has been evaluated.

Key words: Tiосens, liposomes, spectrophotometry, Bouguer – Lambert – Beer law