

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЛХС-1208 МЕТОДАМИ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

И.Д. Гулякин^{1*}, Л.Л. Николаева¹, М.В. Дмитриева¹, О.Л. Орлова¹,
А.П. Полозкова¹, Н.А. Оборотова¹, Е.В. Игнатьева¹,
Н.А. Дмитричева¹, И.В. Ярцева¹, З.С. Шпрах¹

Резюме. Работа посвящена разработке технологии получения лиофилизированной лекарственной формы ЛХС-1208 и созданию методов контроля качества лекарственного препарата. Авторами приведены методики спектрофотометрического анализа и тонкослойной хроматографии.

Ключевые слова: ЛХС-1208, лиофилизированная лекарственная форма, сублимационная сушка, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография.

PREPARATION AND ANALYSIS OF LYOPHILIZED DOSAGE FORM LHS-1208 BY THIN CHROMATOGRAPHY AND A SPECTROPHOTOMETRY

I.D. Gulyakin^{1*}, L.L. Nikolaeva¹, M.V. Dmitrieva¹, O.L. Orlova¹, A.P. Polozkova¹, N.A. Oborotova¹, E.V. Ignatieva¹, N.A. Dmitricheva¹, I.V. Yartseva¹, Z.S. Shprakh¹

Abstract. The work is dedicated to the development of technology for obtaining a freeze-dried dosage form LHS-1208 and the establishment of methods of quality control of the drug. The authors have shown spectrophotometric analysis techniques and flash chromatography.

Keywords: LHS-1208, lyophilized dosage form, freeze drying, spectrophotometry, thin layer chromatography.

ВВЕДЕНИЕ

Создание высокоэффективных оригинальных отечественных противоопухолевых препаратов, избирательно разрушающих опухолевую ткань, является одним из актуальных направлений современной российской науки, решающей задачу снижения смертности населения и увеличения продолжительности жизни. Среди широкого спектра многообещающих групп лекарственных препаратов особый интерес представляют N-гликозиды замещенных индоло[2,3-а]карбазолов и родственные соединения, способные инициировать пути гибели опухолевых клеток путем ингибирования нескольких типов мишеней [1].

В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработана лиофилизированная лекарственная форма (ЛИО-ЛФ) препарата из группы индолокарбазолов ЛХС-1208 «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 9 мг» [2]. Обладая

высокой противоопухолевым эффектом по отношению к опухолям различного гистогенеза, данный лекарственный препарат проявляет сильную ингибирующую активность в отношении киназ – циклинзависимой киназы (Cdk1), протеинкиназы C и тирозинкиназы; второй мишенью является двухцепочечная ДНК и комплекс ДНК с топоизомеразой [3–7].

Цель исследования – обоснование технологии получения ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 и разработка методик качественного и количественного определения действующего вещества в ЛИО-ЛФ методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и спектрофотометрии (СФМ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы

Субстанция ЛХС-1208 (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России); Cremophor ELP (BASF, Германия), Kollisolv

PEG-400 / Lutrol E-400 (BASF, Германия), Kolliphor HS15 (BASF, Германия), Kollidon 17 PF (BASF, Германия), вода очищенная (ФС 42-2619-97), диметилсульфоксид – ДМСО (ч.д.а., «Химмед», Россия), диметилформамид – ДМФА (ч.д.а., «Химмед», Россия), бензол (ч.д.а., «Химмед», Россия), спирт этиловый 95%-й (ФС.2.1.0036.15, «РосБио», Россия).

Приборы и аппаратура

Весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия); весы лабораторные Sartorius LA 1200 S (Sartorius AG, Германия); фильтрационная система Stericup GP Millipore Express Plus (Merck Millipore, США); сублимационная сушка Minifast DO.2 (Edwards, Великобритания); сублимационная сушка Minifast 10 (BOC Edwards Tianli pharmaceutical system, Китай); полуавтомат ПЗР-34-ВИПС-МЕД для укупорки флаконов колпачками К-2-20 и К-3-34 (ООО «Фирма «ВИПС-МЕД», Россия); рН-метр HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Германия); спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия); хроматографические пластинки Sorbfil



Фильтрационная система Stericup GP Millipore Express Plus



Спектрофотометр Agilent Cary 100

УФ-254 («Сорбфил», Россия); кюветы с крышкой для спектрофотометрии и стеклянные хроматографические камеры.

Методика количественного определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ методом СФМ

Оптическую плотность анализируемых растворов измеряли при длине волны 320 ± 2 нм с использованием в качестве раствора сравнения ДМФА. Концентрация исследуемых растворов ЛХС-1208 в ДМФА подобрана таким образом, чтобы оптическая плотность находилась в области значения 0,5 [8]. При этом количественное определение ЛХС-1208 проводили при его концентрации в растворе около 3 мг/мл.

Для приготовления испытуемого раствора содержимое одного флакона растворяли в небольшом количестве ДМФА, переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки ДМФА. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки тем же растворителем. В качестве стандартного образца (СО) использовали раствор субстанции ЛХС-1208 в ДМФА в соответствующей концентрации. Измерение оптической плотности испытуемого раствора проводили па-



Весы лабораторные Sartorius LA 1200 S

параллельно с измерением оптической плотности СО относительно ДМФА в максимуме при длине волны 320 ± 2 нм.

Содержание ЛХС-1208 во флаконе (X, мг) рассчитывали по формуле:

$$X = D_1 \times a_0 \times P / D_0 \times 100,$$

где D и D_0 – соответственно оптические плотности растворов образца ЛИО-ЛФ и СО ЛХС-1208; a_0 – навеска СО ЛХС-1208 в мг; P – содержание ЛХС-1208 в СО в процентах.

Методика определения качественного состава ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 методом ТСХ

Используют хроматографическую пластинку Sorbfil УФ-254 размером 150×100 мм. На нее карандашом наносят линию старта (1 см от нижнего края) и линию финиша (2 см от верхнего края). На линию старта наносят отметки карандашом: 1 – СОВС-1; 2 – СОВС-2; 3 – исследуемый образец. Готовят растворы СОВС-1; СОВС-2; исследуемого образца (при этом отступают от краев пластинки не менее чем на 1 см):

Приготовление СОВС-1: 2 мг субстанции ЛХС-1208 растворяют в 1 мл ДМСО. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление СОВС-2: 133 мг Kollidon 17PF растворяют в 1 мл ДМСО. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора исследуемого образца: содержимое одного флакона растворяют в 9 мл ДМСО. Раствор используют свежеприготовленным.

На линию старта хроматографической пластинки в соответствии с разметкой наносят по 5 мкл растворов СОВС-1 (10 мкг субстанции ЛХС-1208); СОВС-2 (665 мкг Kollidon 17PF); исследуемого образца (10 мкг субстанции ЛХС-1208, 665 мкг Kollidon 17PF) автоматической пипеткой. Пластинку с нанесенными пробами подсушивают на воздухе в течение 30 мин. Предварительно готовят хроматографическую камеру, при этом в нее наливают отмеренные количества растворителей и по бокам размещают полоски фильтровальной бумаги, накрывают стеклом и оставляют насыщаться в течение 1 ч [9].

В насыщенную парами растворителей камеру помещают высушенную пластинку с нанесенными образцами и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом растворителей финиша пластинку вынимают, подсушивают на воздухе до полного исчезновения запаха растворителей, очерчивают видимые пятна карандашом, потом проявляют Kollidon 17PF с помощью раствора Люголя, снова подсушивают на воздухе до полного исчезновения запаха

растворителей, затем с помощью линейки находят середину пятна, замеряют расстояние от старта до середины пятна, а также длину и ширину пятна, отмечают форму пятна.

Проявившиеся пятна в образцах идентифицировали относительно пятен веществ-свидетелей и характеризовали по величине удерживания R_f , рассчитываемой по формуле:

$$R_f = L_B / L_\Phi,$$

где L_B – расстояние от линии старта до центра хроматографической зоны исследуемого вещества, мм; L_Φ – расстояние от линии старта до линии финиша элюента, мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка технологии получения ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 началась с изучения растворимости субстанции ЛХС-1208 с использованием различных солибулизаторов (Cremophor ELP, Kollisol PEG-400/Lutrol E-400, Kolliphor HS15, Kollidon 17 PF). Показано, что полное растворение субстанции без добавления органического растворителя наблюдается только при применении Kollisol PEG-400 / Lutrol E-400, которые пригодны только для местного и перорального применения. Однако при оценке эффективности модельной пероральной ЛФ с Kollisol PEG-400 / Lutrol E-400 не выявлено значимого терапевтического эффекта (ТРО составило 10–20%).

В связи с невозможностью растворения субстанции ЛХС-1208 с использованием только соррастворителей и хорошей растворимости ее в ДМСО определили максимально возможную концентрацию ЛХС-1208 в данном органическом растворителе. Она составила порядка 7%, что позволило вводить в состав ЛФ минимальное количество ДМСО (~5%).

Подобраны составы модельных лекарственных форм ЛХС-1208 с использованием таких солибулизаторов, как Cremophor ELP, Kolliphor HS15, Kollidon 17PF, обеспечивающие концентрацию действующего вещества 0,2–0,3% и стабильные в растворе в течение 1 суток. Однако при исследовании состава, содержащего Kolliphor HS15, на интактных мышах выявлена высокая токсичность данного солибулизатора, что заставило отказаться от его применения.

Изучена стабильность выбранных модельных лекарственных форм ЛХС-1208 с Cremophor ELP и Kollidon 17PF в процессе хранения в холодильнике (температура 4 ± 2 °С) в течение 1 суток. В качестве контрольных точек выбрали время сразу после приготовления, через 1 и 3 ч, через 1 сутки. Оценку стабильности проводили по параметрам: внешний вид раствора, значение pH, содержание ЛХС-1208 в % от теоретического.

При оценке результатов изучения стабильности двух модельных ЛФ оказалось, что ЛФ, содержащая в своем составе Kollidon 17PF, стабильна по указанным выше параметрам в течение 7 суток. В то время как ЛФ, содержащая в качестве солюбилизатора Cremophor ELP, хотя и сохраняет надлежащий внешний вид на протяжении 1 мес. и более, но при этом концентрация действующего вещества в данной ЛФ через 7 суток снижается на 10% от теоретического. Полученные данные указывают на необходимость совершенствования состава ЛФ, содержащей Cremophor ELP (добавление стабилизаторов и т.д.). Модель ЛФ с Kollidon 17PF (содержание ЛХС-1208 3 мг/мл) по физико-химическим параметрам отобрана для проведения дальнейших исследований, для увеличения срока хранения предложено использовать лиофилизацию.

Для замораживания использовали раствор модельной ЛФ ЛХС-1208, которую дозировали по 6 мл во флаконы вместимостью 30 мл, толщина слоя составляет 15 мм. Модели ЛФ ЛХС-1208 замораживали на полке сублимационной установки (начальная температура +20...+22 °С) до температуры -40...-45 °С. При достижении заданной температуры на препарате выдерживали в течение 3 ч, далее включали нагрев до температуры +20...+22 °С.

При оттаивании наблюдалось расслоение замороженной таблетки модельной ЛФ ЛХС-1208. При достижении температуры от -30 °С до -25 °С в нижнем слое таблетки образовывался раствор ярко-желтого цвета. Остальная таблетка размораживалась при температуре от -10 °С до -8 °С (рисунок 1).

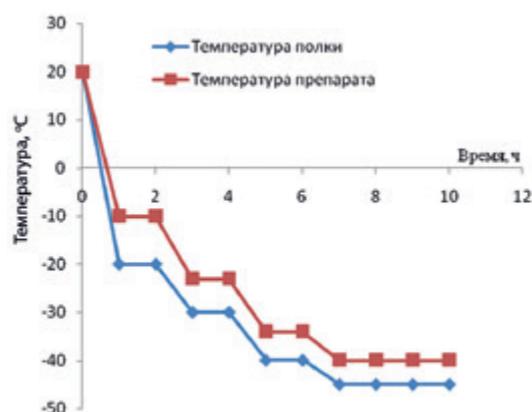


Рисунок 1. Замораживание модельной ЛФ ЛХС-1208

На продолжительность сушки оказывала влияние толщина слоя исходного раствора, а также время и температура досушивания препарата. При интенсификации процесса сушки путем увеличения скорости подъема температуры до +10 °С в час и повышения температуры при досушивании до +27 °С наблюдалось снижение содержания ЛХС-1208 во флаконе ниже до-

пустимых пределов. Снижение интенсивности подогрева до 5 °С в час и увеличение времени досушивания до 13–15 ч при +18...+20 °С также не обеспечивало гарантированного качества продукта. На основании экспериментальных сушек был выбран следующий режим лиофилизации.

Раствор ЛХС-1208 3 мг/мл стерилизовали фильтрацией через с полиэфирсульфоновые фильтры Millipore, имеющие размер пор 0,22 мкм. Стерильный раствор дозировали по 3 мл во флаконы объемом 20 мл и помещали на полки сублимационной сушки. Кассеты с флаконами помещали на полку сублимационной установки, подключали датчики, установленные во флаконы, закрывали камеру сублимационной установки и начинали замораживание продукта. Замораживание проводили при температуре -40...-45 °С. После достижения заданной температуры препарат выдерживали в течение 2,5–3,5 ч. Контролировали температуру и продолжительность замораживания по регистрирующему устройству.

Далее включали вакуумный насос. После включения вакуумного насоса и выравнивания вакуума выдерживали около 3 ч и начинали нагрев полок. Максимально возможная скорость подъема температуры - 2 °С/ч. Через 1 ч после достижения температуры полки +20 °С включали инъекцию воздуха и доводили остаточное давление в камере до значения 40–50 Па. Температура препарата при досушивании не должна превышать +20 °С. Продолжительность досушивания - от 2 до 3 ч. Общее время сушки препарата во флаконах вместимостью 30 мл составляет 35–48 часов (рисунок 2).

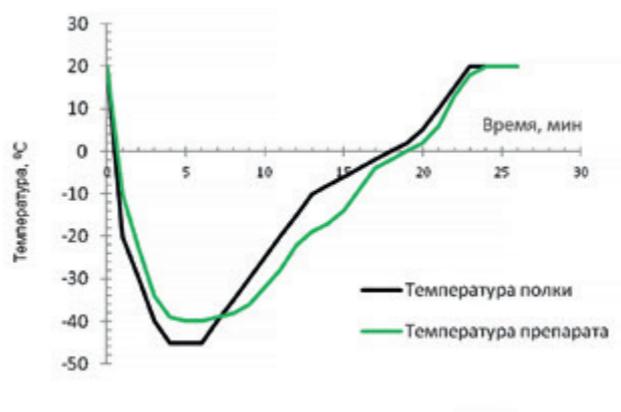


Рисунок 2. График сублимационной сушки ЛИО-ЛФ ЛХС-1208

По окончании сушки вакуум в сублимационной камере гасили чистым, профильтрованным воздухом, который поступает в камеру через систему фильтров. Кассеты с препаратом выгружали из сублимационной камеры, закрывали крышками и передавали на укупорку. Качество готового продукта оценивали по следующим критериям: внешний вид препарата (цвет,

пористость, однородность), растворимость, прозрачность, значение pH, потеря в массе при высушивании, содержание препарата во флаконе.

Разработку методики количественного определения действующего вещества в ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 начали с изучения электронного спектра поглощения (ЭСП). Данная субстанция практически нерастворима в воде, измерения проводили для растворов ЛХС-1208 в ДМФА, которые имеют характерные ЭСП: в области 200–500 нм наблюдаются максимум поглощения при 287 ± 2 нм, плечо при 306 ± 2 ; максимум поглощения при 320 ± 2 нм, плечо при 343 ± 2 нм, слабо интенсивный максимум при 420 нм (рисунок 3). Отношение значений оптической плотности в максимумах D320/D287 составляет $1,42 \pm 0,05$. В максимуме при $\lambda_{max}=320$ нм наблюдается более интенсивное поглощение, поэтому он был выбран в качестве аналитического сигнала. Для снижения систематических и случайных ошибок при определении ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ в методику спектрофотометрического анализа ввели способ расчета по СО. В качестве СО использовали субстанцию ЛХС-1208.

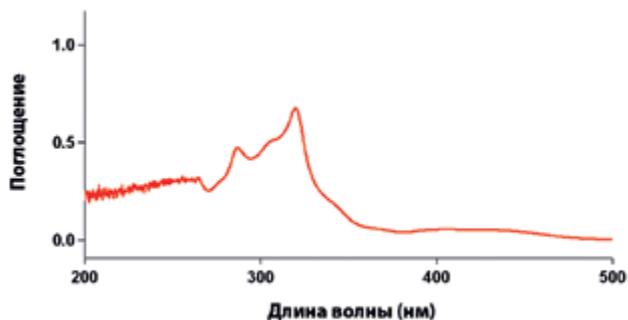


Рисунок 3. Электронный спектр поглощения субстанции ЛХС-1208 (0,0006% раствор в ДМФА)

Рабочей концентрацией раствора ЛХС-1208 выбрали концентрацию 0,006–0,008 мг/мл; при этом величина оптической плотности укладывается в интервал, рекомендуемый ГФ XIII, а максимумы поглощения в растворах субстанции и ЛФ совпадают (рисунок 4).

Поглощение раствора ЛХС-1208 подчиняется закону Бугера – Ламберта – Бера: линейная зависимость значения оптической плотности от концентрации ЛХС-1208 наблюдается в интервале концентраций от 0,003 мг/мл до 0,010 мг/мл. Ошибку метода СФМ оценивали путем проведения анализа 6 флаконов. Статистические характеристики спектрофотометрического определения содержания ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ представлены в таблице 1. Ошибка единичного определения составляет 0,40%, что указывает на возможность точного определения содержания действующего вещества в ЛИО-ЛФ.

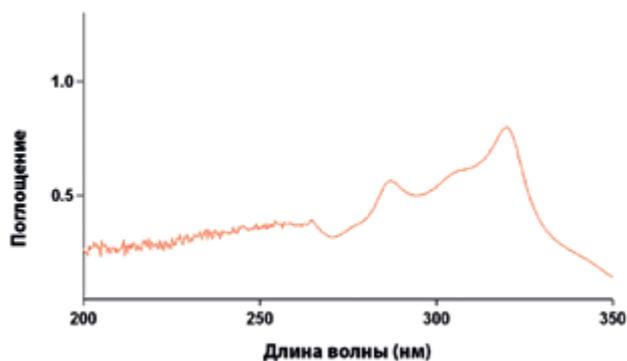


Рисунок 4. Электронный спектр поглощения раствора ЛИО-ЛФ ЛХС-1208

Таблица 1.

Результаты количественного определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ

№ образца ЛИО-ЛФ ЛХС-1208	Оптическая плотность	Содержание ЛХС-1208 в образце ЛИО-ЛФ, мг/флакон
1	0,765	9,30
2	0,761	9,25
3	0,769	9,35
4	0,766	9,31
5	0,763	9,27
6	0,761	9,25
Статистические характеристики	$n=6, f=5, x_{cp}=9,288, S^2=1,28 \times 10^{-3},$ $S=3,58 \times 10^{-2},$ $Sx_{cp}=1,46 \times 10^{-2}, t(P, f)=2,57 (P=95\%),$ $\Delta x=0,0375, \epsilon=0,40\%$	

Качественное определение ЛХС-1208 проводили с использованием ТСХ. В результате проведенных исследований экспериментально была выбрана система бензол / спирт этиловый (1:1) (таблица 2). Присутствие значительного количества Kollidon 17 PF в ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 по сравнению с количеством основного вещества (133 мг и 2 мг соответственно) затрудняет разделение компонентов ЛФ, поэтому для более правильной идентификации активного вещества на пластины в качестве стандартных образцов веществ-свидетелей было предложено наносить пробы растворов в ДМСО субстанции ЛХС-1208 и ЛИО-ЛФ ЛХС-1208. При просмотре хроматограмм в УФ-свете растворов в ДМСО субстанции ЛХС-1208 и ЛИО-ЛФ ЛХС-1208, помимо пятна ЛХС-1208, наблюдалось хорошо очерченное пятно на старте, соответствующее Kollidon 17 PF. Только в двух системах удалось оторвать Kollidon 17 PF от стартовой линии: пропанол-2 / 25% аммиак (36:24) и этиловый спирт / 25% аммиак (50:20) (таблица 2).

Таблица 2.

Эффективность подвижной фазы при ТСХ-анализе ЛХО-ЛФ ЛХС-1208 на хроматографических пластинках Sorbfil

Состав подвижной фазы, соотношение в мл	Время анализа, мин	Значение R _f			
		СОВС-1	СОВС-2	ЛФ ЛХС-1208	
				ЛХС-1208	Kollidon 17 PF
Бензол/этанол (30:30)	30	0,66	0	0,63	0
Бензол/ацетон (30:30)	40	–	0	–	0
Ацетон/этилацетат/ вода (40:16:4)	35	0,53	0	0,525	0
Хлороформ/этанол/ ЛУК (40:20:6)	105	0,75	–	0,73	–
Пропанол-2 / 25% аммиак (36:24)	180	0,74	0,63	0,68 (одно пятно)	
Пропанол-2 / 25% аммиак (50:5)	160	–	0	–	0
Пропанол-2 / 25% аммиак / ацетон (20:10:30)	105	0,58	–	0,59	–
Этилацетат / этанол / 25% аммиак (51:6:9)	50	0,36	0	0,35	0
Хлороформ/метанол (50:10)	90	0,77	0	0,76	0
Этанол / 25% аммиак (50:20)	290	–	0,69	–	0,69
Этанол	200	0,79	0	0,78	0
Н-гексан/бутанол (35:35)	180	0,33	0	0,32	0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработаны методики качественного ТСХ-анализа и количественного спектрофотометрического определения ЛХС-1208 в ЛХО-ЛФ, также обоснована технология ее получения. В результате серии экспериментов выбран оптимальный температурный режим лиофилизации разработанного состава (модель ЛФ с Kollidon 17PF в качестве солиubilизатора, содержание ЛХС-1208 3 мг/мл), который не требует предварительного замораживания, а также определен наиболее приемлемый объем заполнения флаконов – 3 мл. Подобрана система растворителей для определения действующего вещества – бензол / спирт этиловый (1:1).

При изучении абсорбционных характеристик ЛХС-1208 выявлено, что спектр поглощения раствора ЛХО-ЛФ ЛХС-1208 идентичен спектру поглощения субстанции ЛХС-1208 по положению максимумов и форме кривой. Установлено, что вспомогательные вещества,

входящие в состав ЛХО-ЛФ, и ДМФА, используемый в качестве раствора сравнения, практически не поглощают излучение в области максимумов поглощения ЛХС-1208. В качестве рабочей длины волны для анализа ЛХС-1208 в ЛХО-ЛФ выбрана полоса поглощения средней интенсивности с максимумом 320 нм.

Поглощение раствора ЛХС-1208 подчиняется закону Бугера – Ламберта – Бера: линейная зависимость значения оптической плотности от концентрации ЛХС-1208 наблюдается в интервале концентраций от 0,003 мг/мл до 0,010 мг/мл. Ошибка спектрофотометрического определения концентрации ЛХС-1208 в ЛХО-ЛФ составила 0,40%.

ЛИТЕРАТУРА

1. М.П. Киселева, З.С. Смирнова, Л.М. Борисова и др. Поиск новых противоопухолевых соединений среди производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов // Российский онкологический журнал. 2015. № 1. С. 33–37.
2. А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, Н.А. Оборотова и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазола ЛХС-1208 // Российский биотерапевтический журнал. 2014. Т. 13. № 3. С. 25–32.
3. З.С. Смирнова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева и др. Противоопухолевая активность соединения ЛХС-1208 (N-гликозилированные производные индоло[2,3-а]карбазола) // Российский биотерапевтический журнал 2010. № 1. С. 80.
4. З.С. Смирнова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева и др. Противоопухолевая эффективность прототипа лекарственной формы соединения ЛХС-1208 для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. 2012. № 2. С. 49.
5. З.С. Смирнова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного индолокарбазола ЛХС-1208 // Российский биотерапевтический журнал. 2014. № 1. С. 129.
6. М.П. Киселева, З.С. Шпрах, Л.М. Борисова и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение I // Российский биотерапевтический журнал. 2015. № 2. С. 71–77.
7. М.П. Киселева, З.С. Шпрах, Л.М. Борисова и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение II // Российский биотерапевтический журнал. 2015. № 3. С. 41–47.
8. ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях // Государственная фармакопея, XIII изд.
9. ОФС.1.2.1.2.0003.15 Тонкослойная хроматография // Государственная фармакопея, XIII изд.