

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СРАВНИТЕЛЬНОЙ ФОТОДЕСТРУКЦИИ ХЛОРИНА Е6 И ЕГО ДИМЕТИЛОВОГО ЭФИРА

*Федорук С.Л.¹, Трухачева Т.В.¹, Фроленков К.А.¹, Хейдоров В.П.²
РУП «Белмедпрепараты»¹
УО «Витебский государственный медицинский университет»²*

Актуальность. Фотодинамическая терапия как способ лечения раковых заболеваний основан на усилении цитотоксичности веществ, известных, как фотосенсибилизаторы, под действием излучения оптического диапазона. К числу перспективных фотосенсибилизаторов относятся также и хлорины [1], на основе которых уже созданы и создаются эффективные лекарственные средства, среди которых разработанный на РУП «Белмедпрепараты» (Республика Беларусь) препарат Фотолон. В определенных случаях другие фотосенсибилизаторы на основе хлорина е6 могут проявлять себя не менее эффективно. К одному из таких соединений относится диметиловый эфир хлорина е6, который также был синтезирован на РУП «Белмедпрепараты». Известно, что хлорин е6 является неустойчивым соединением и влияние на его устойчивость различных факторов было изучено ранее [2], что нельзя сказать о его диметиловом эфире.

Цель: изучение процессов фотодеструкции красного оптического диапазона хлорина е6 и его диметилового эфира.

Материал и методы. В качестве объектов исследования использовали субстанцию диметилового эфира хлорина е6 (ДМЭ Хе6), полученную на РУП «Белмедпрепараты» (Республика Беларусь), а также субстанцию хлорина е6. С целью сравнительного исследования стандартного образца хлорина е6 и ДМЭ Хе6 образцы растворяли в метаноле с конечной концентрацией фотосенсибилизатора 50 мкг/мл и фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Анализ содержания примесей в образцах хлорина е6 проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе с фотодиодной матрицей фирмы Waters. Процесс разделения осуществлялся на колонке Waters XTerra RP-18 150x4.6 мм при градиентном элюировании подвижных фаз А (0,1% раствор трифторуксусной кислоты в воде) и В (0,1% раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле). Анализ проводился при длине волны 407 нм, объем вводимой пробы – 20 мкл, температура колонки – комнатная. При анализе образцов ДМЭ Хе6 использовали хроматографическую колонку размерами 100x4.0 мм с монолитной неподвижной эндкепированной фазой Chromolith RP-18 (Merck, Германия). Градиентное элюирование проводили при 25±1°C, включающими 0,08% раствор трифторуксусной кислоты - подвижная фаза А (ПФ А) и ацетонитрил для градиентной хроматографии - подвижная фаза В (ПФ В).

Для валидации методик определялись такие параметры, как избирательность, линейность, точность (сходимость, внутрилабораторная воспроизводимость), правильность, а также предел количественного определения.

Для изучения фотодеструкции под воздействием красного света использовался полупроводниковый лазер PLM-660-0.5 с мощностью 130 мВт. Сфокусированное лазерное пятно имело диаметр 1 см [2]. Расчет содержания примесей производился методом внутренней нормализации. При фотодеструкции под воздействием излучения красного диапазона рассматривались интервалы времени в 5, 10 и 20 минут.

Результаты и обсуждение. В результате проведенной валидации были получены результаты соответствующие критериям приемлемости. Так, при определении избирательности методик было установлено разрешение пика основного вещества с другими пиками не менее 1,5. При исследовании линейности в методике по определению сопутствующих примесей в субстанции хлорина е6 коэффициент корреляции (R) составлял 0,99 (должен быть не менее 0,99), а пересечение с осью Y – 4,7% (не должен превышать 5,0% отклика номинальной концентрации). Соответственно при определении сопутствующих примесей в субстанции ДМЭ Хе6 R=1,00, а пересечение с осью Y – 0,3%. Показатели сходимости (RSD<15,0%) и внутрилабораторной воспроизводимости (RSD<25,0%) при определении точности обеих методик также соответствовали установленным критериям приемлемости.

Правильность методики доказывалась сходимостью результатов двух подходов определения (метод внешнего стандарта и метод внутренней нормализации) как максимальной единичной примеси, так и суммы примесей. Относительное стандартное отклонение для двух подходов определения максимальной единичной примеси в субстанции хлорина е6 составило 18,1%; в субстанции ДМЭ Хе6 – 12,1% (должно быть не более 20,0%). Соответствующие результаты для суммы примесей: 19,2% (для хлорина е6) и 6,5% (для ДМЭ Хе6).

Предел количественного определения для обеих методик составил 0,05%, что также соответствует установленным критериям.

Результаты валидаций показывают, что разработанные методики пригодны для проведения контроля содержания сопутствующих примесей в исследуемых субстанциях при рутинном анализе, а также при проведении исследования их стабильности в стрессовых условиях.

Таблица 2 - Результаты исследования деструкции хлорина еб и его диметилового эфира при воздействии излучения красного оптического диапазона мощностью 130 мВт.

Время воздействия излучения красного диапазона, мин	Содержание основного вещества, %	
	Хлорин еб	ДМЭ Хеб
0	97,77	99,65
5	96,06	99,67
10	89,51	99,65
20	79,34	99,64

Результаты сравнительного исследования воздействия излучений красного оптического диапазона на обе субстанции показали, что субстанция ДМЭ Хеб обладает гораздо большей устойчивостью, чем субстанция хлорина еб.

Выводы: разработанные методики ВЭЖХ для определения примесей в образцах хлорина еб и его диметилового эфира показали себя пригодными для поставленных целей. Сравнение динамики роста примесей в образцах хлорина еб и его диметилового эфира при воздействии излучений различных оптических диапазонов, показали уникальную устойчивость диметилового эфира хлорина еб при высокой лабильности хлорина еб.

Литература

1. Spikes, J.D. New trends in photobiology (Invited review) chlorines as photosensitizers in biology and medicine / J.D. Spikes // J. of Photochemistry and Photobiology, B: Biology. – 1990. – № 6. – P. 259-274.
2. Исследование термо- и фотодеструкции хлорина еб и лекарственного средства Фотолон / С.Л. Федорук [и др.] // Вестн. фармации. – 2014. – № 2. – С. 70-77.