

УДК 615.074: 615.456.3

А.В. СТАДНИЧЕНКО<sup>1</sup>, Ю.М. КРАСНОПОЛЬСКИЙ<sup>2</sup>, Т.Г. ЯРНЫХ<sup>1</sup><sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина<sup>2</sup>Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», Харьков, Украина/

## Валидация методики определения степени инкапсуляции оксалиплатина в липосомы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

### Резюме

**Цель исследования** – определение диапазона концентраций оксалиплатина, изучаемых при разработке его липосомальной формы; разработка экспресс-методики определения инкапсуляции оксалиплатина в липосомы во всём диапазоне концентраций и валидация разработанной методики.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовали липосомальную форму оксалиплатина. Для валидационных исследований использовали аналитические весы XP205DR, Mettler Toledo, Швейцария, систему высокоэффективной жидкостной хроматографии Shimadzu LC-20. Определение производили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в его варианте – гель-проникающей хроматографии. Скорость элюирования – 1 мл/мин, объём пробы 1 мкл, температура колонки 30 °С, регистрация аналитического сигнала – 230 нм при ширине оптической щели 4 нм, подвижная фаза – вода для хроматографии, профильтрованная через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

**Результаты.** Валидацию проводили с принятым научно-методическим подходом. Были изучены такие характеристики как специфичность, правильность, линейность, прецизионность. Специфичность методики была подтверждена хроматограммами плацебо липосом, без добавления оксалиплатина. На хроматограммах плацебо отсутствовали пики, по времени удерживания совпадающие с пиками неинкапсулированного оксалиплатина.

**Выводы.** В результате исследований была разработана экспресс ВЭЖХ методика, позволяющая достоверно определять оксалиплатин в концентрациях от 0,25 мг/мл до 4,0 мг/мл в присутствии липосом. Методика основана на варианте гель-проникающей хроматографии, соответствует необходимым критериям, обладает высокими экологическими показателями.

**Ключевые слова:** оксалиплатин, липосомы, инкапсуляция, валидация, фармацевтическая разработка, высокоэффективная жидкостная хроматография

Оксалиплатин – платиносодержащий химиотерапевтический препарат третьего поколения, который используется как в комбинации с другими лекарственными веществами, так и в качестве монотерапии [1, 2]. Молекула оксалиплатина является комплексным соединением, в котором центральное место занимает атом платины, окружённый лигандами – оксалатом и диаминоциклогексаном.

Фармакологическое действие оксалиплатина обусловлено возможностью его взаимодействия с ДНК. При этом образуются внутри- и межспиральные сшивки, блокирующие синтез и дальнейшую репликацию. Образование связей оксалиплатина с ДНК происходит за 10 – 15 мин, что быстрее аналогичного показателя у платиносодержащего препарата предыдущего поколения – цисплатина, в случае которого процесс ингибирования ДНК занимает 4 – 8 часов.

Нарушение синтеза ДНК приводит к ингибированию транскрипции, и в результате препятствует синтезу клеточного белка, что приводит к гибели клетки. Так же перспективность оксалиплатина обусловлена его меньшей токсичностью и отсутствием перекрёстной резистентности, в сравнении с

цисплатином и карбоплатином, а так же сенергизмом действия с рядом противоопухолевых препаратов, в частности с иринотеканом [3].

Несмотря на более низкие показатели токсичности, в сравнении с платиносодержащими препаратами предыдущих поколений, ограничением при применении оксалиплатина является его высокая токсичность [4, 5]. Как и в случае подавляющего большинства цитостатиков, это обусловлено неселективностью взаимодействия препарата с ДНК целевых органов, нуждающихся в терапии, и остального организма в целом. Применение бионанотехнологической липосомальной платформы для лекарственных форм цитостатиков позволяет уменьшить проявление токсических эффектов и повысить селективность препаратов [6, 7].

Согласно требованиям руководства ICH Q8, при фармацевтической разработке необходимо изначально идентифицировать критические точки и использовать их для контроля технологического процесса [8]. Для липосомальных препаратов показатель инкапсуляции является одним из важнейших, и в целом определяет их фармакокинетику [9]. Контроль инкапсуляции

необходим на всех стадиях фармацевтической разработки, а также в течение технологического процесса, начиная с загрузки активного вещества, контроля в процессе производства, контроля качества и исследования стабильности.

При этом методика должна быть валидирована и соответствовать критериям ДФУ. Также стоит принять во внимание лабильность объекта изучения – липосомальной наноструктурированной формы оксалиплатина, и учесть требование к минимальному простоя в процессе изготовления препарата, так называемому времени ожидания результатов контроля. Ввиду этого, на этапе разработки методики необходимо заложить возможность экспресс-определения, с минимальной затратой времени, без потери качества результатов контроля.

**Цель исследования** – определение диапазона концентраций оксалиплатина, изучаемых при разработке его липосомальной формы; разработка экспресс-методики определения инкапсуляции оксалиплатина в липосомы во всём диапазоне концентраций и валидация разработанной методики.

## Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали липосомальную форму оксалиплатина, которая была получена по следующей технологии: липиды – яичный фосфатидилхолин / холестерин / дипальмитоилфосфатидилглицерин в соотношении 50 / 20 / 30 – помещали в круглодонную колбу, растворяли в смеси подходящих растворителей при кратковременном воздействии ультразвука с частотой 35 кГц. Получали липидную плёнку при помощи роторного испарителя. Гидратировали липидную плёнку концентрированным раствором оксалиплатина с концентрацией 4 мг/мл в течение 60 минут при 20 °С. Добавляли раствор криопротектора. Корректировали концентрацию оксалиплатина в готовых липосомах с помощью воды для инъекций. В конечном продукте концентрация оксалиплатина составила 2 мг/мл, общая концентрация липидов – 20 мг/мл. Для валидационных исследований использовали аналитические весы XP205DR, Mettler Toledo, Швейцария, ВЭЖХ систему Shimadzu LC-20, Япония, в составе автоматического инжектора SIL-30AC, термостата колонок CTO-20AC, насос LC-30AD, спектрофотометрический детектор с диодной матрицей SPD-M20A, оснащённый хроматографической колонкой Tricorn (GE Healthcare, Швеция) 5x150 мм, заполненной сефадексом.

Определение производили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в варианте гель-проникающей хроматографии. Скорость элюирования – 1 мл/мин, объём пробы

1 мкл, температура колонки 30 °С, регистрация аналитического сигнала – 230 нм при ширине оптической щели 4 нм, подвижная фаза – вода для хроматографии, профильтрованная через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Липосомы, как надмолекулярные структуры, выходят в неударживаемый объём, а неинкапсулированный оксалиплатин удерживается в порах геля, за счёт чего и достигается разделение. Зная количество неинкапсулированного оксалиплатина и общее количество оксалиплатина в препарате можно подсчитать степень инкапсуляции. На рисунке 1 представлен пример хроматограммы липосомального оксалиплатина. Липосомы имеют ориентировочное время удерживания 1 мин, неинкапсулированный оксалиплатин имеет время удерживания 3,8 мин.

В процессе фармацевтической разработки на этапе оптимизации инкапсуляции изучались концентрации оксалиплатина от 0,5 мг/мл, при этом инкапсуляция варьировала в диапазоне от 20 до 50 %, что составляет от 0,4 мг/мл до 0,25 мг/мл свободного оксалиплатина. В процессе изготовления на этапе гидратирования липидной плёнки концентрированным раствором оксалиплатина используются концентрации до 4 мг/мл. При этом в готовом препарате в регидратированном состоянии концентрация оксалиплатина составляет 2 мг/мл.

Валидацию проводили с принятым научно-методическим подходом [10, 11]. Были изучены такие характеристики, как специфичность, правильность, линейность, прецизионность.

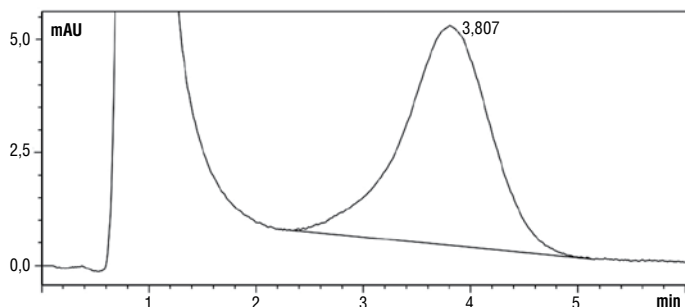
Специфичность методики была подтверждена хроматограммами плацебо липосом, без добавления оксалиплатина. На хроматограммах плацебо отсутствовали пики, по времени удерживания совпадающие с пиками неинкапсулированного оксалиплатина. На рисунке 2 представлен пример хроматограмм, подтверждающих селективность методики.

Характеристики правильности, линейности и прецизионности исследовались на модельных образцах препарата. В таблице 1 приведены результаты исследования указанных характеристик.

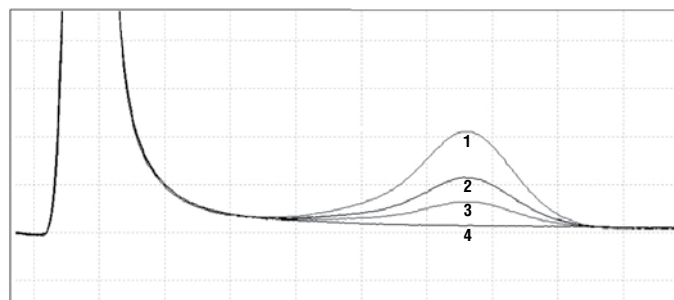
На рисунке 3 представлен график линейной зависимости найденных количеств оксалиплатина от введенных, в нормализованных единицах.

В таблице 2 представлены критерии и метрологические характеристики линейной зависимости.

Также следует отметить, что методика соответствует требованиям экспрессности. Целевой компонент – несвязанный оксалиплатин – имеет время удерживания 3,6 мин, а общее время хроматографирования составляет около 8 минут, включая время стабилизации сигнала. Достоверное значение инкапсуляции можно получить после предварительного хроматографирования раствора РСО, проведя хроматографирование исследуемого



**Рис. 1.** Пример хроматограммы липосомального оксалиплатина, полученной в условиях валидируемой методики



**Рис. 2.** Хроматограмма плацебо (1) и хроматограммы испытуемого раствора препарата (2, 3, 4) на различных этапах технологии

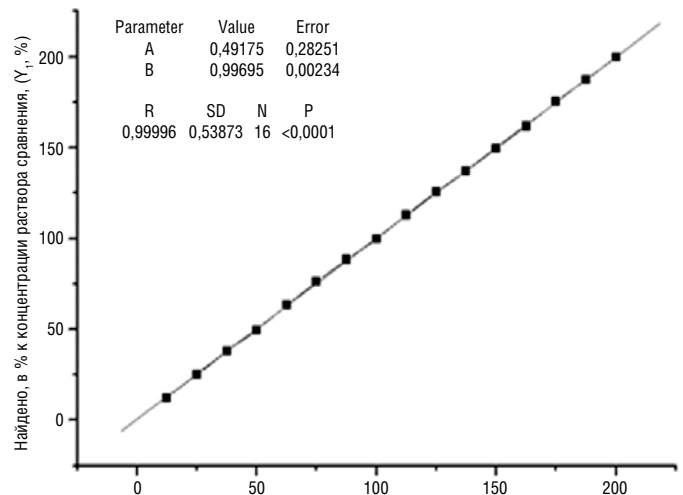
**Таблица 1.** Результаты определения оксалиплатина в модельных растворах

№ модельного раствора	Концентрация оксалиплатина, мг/мл (с <sub>ст</sub> =2,0 мг/мл)	Средние площади пиков (S <sub>ст</sub> =549326)	Найдено в % к введенному Z <sub>1</sub> =100·(Y <sub>i</sub> /X <sub>1</sub> ), %
1	0,25	67985	99,04
2	0,5	138373	100,76
3	0,75	208818	101,36
4	1,0	273198	99,46
5	1,25	347334	101,17
6	1,50	418973	101,69
7	1,75	486218	101,15
8	2,00	548223	99,8
9	2,25	620263	100,36
10	2,50	689674	100,44
11	2,75	753119	99,71
12	3,00	821104	99,65
13	3,25	889089	99,6
14	3,50	962872	100,16
15	3,75	1029922	99,99
16	4,00	1098224	99,96
<b>Среднее, <math>\bar{Z}</math>, %</b>			100,27
<b>Относительное стандартное отклонение, S<sub>z</sub>, %</b>			0,77
<b>Относительный доверительный интервал, <math>\Delta_z = S_z(\%) \cdot t(95\%, n-1) \leq \Delta_{Ac}</math></b>			1,34
<b>Критическое значение для сходимости результатов, <math>\Delta_{zr}</math>, %</b>			1,60
<b>Оценка сходимости <math>\Delta_z \leq 1,6\%</math></b>			1,34 < 1,60
<b>Систематическая погрешность <math>\delta\% = \bar{Z} - 100</math></b>			0,27
<b>Оценка правильности</b>			
<b>Критерий незначимости систематической погрешности статистической незначимости</b>			0,27 < 0,34
$\delta\% = \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = \frac{1,34}{4} = 0,34$ выполняется			

**Таблица 2.** Критерии и метрологические характеристики линейной зависимости найденного количества оксалиплатина от введенного

Величина	Значение	Критерий (P=95), n=16	Вывод
b	0,997	–	–
Sb	0,0023	–	–
a	0,4918	$\leq 1,7613 \cdot S_b = 0,4976$	соответствует
Sa	0,2825	–	–
S0	0,5387	$\frac{S_0}{b} \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, n-2)} = \frac{1,6}{1,7613} = 0,540 < 0,908$	соответствует
r	0,99996	$\geq 0,9999$	соответствует

образца два раза и затратив на это не более 16 минут. Методика не предполагает пробоподготовку образца, наряду с этим, используется проба минимального объема – 1 мкл. Методика обладает хорошими экологическими показателями, поскольку в качестве подвижной фазы используется чистая вода для хроматографии.



**Рис. 3.** Параметры линейной зависимости и график линейной зависимости найденного количества оксалиплатина от введенного

## Выводы

1. Определён диапазон целевых концентраций неинкапсулированного оксалиплатина, возникающих на этапах фармацевтической разработки, реализации технологии и контроля качества готового продукта.

2. Разработана и валидирована экспресс ВЭЖХ методика определения степени инкапсуляции оксалиплатина в липосомы в требуемом диапазоне концентраций.

## Список использованной литературы

1. Apps M. G. The state-of-play and future of platinum drugs / M. G. Apps, E. H. Choi, N. J. Wheater // Endocrine-related Cancer. – 2015. – Vol. 22. – P. 219–233.
2. Ehrsson H. Pharmacokinetics of oxaliplatin in humans / H. Ehrsson, I. Wallin, J. Yachnin // Medical Oncology. – 2002. – Vol. 19. – P. 261–265.
3. Личиницер М. Р. Оксалиплатин (элоксатин®): новые возможности лечения больных раком и лимфомой / М. Р. Личиницер // Провизор. – 2001. – № 19. – P. 67–71.
4. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? / L. M. Pasetto, M. R. D'Andrea, E. Rossi [et. al.] // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 2006. – Vol. 59. – P. 159–168.
5. An association between transient hypokalemia and severe acute oxaliplatin-related toxicity predominantly in women / W. Y. Chay, L. Chew, T. T. Yeoh [et. al.] // Acta Oncol. – 2010. – Vol. 49. – P. 515–517.
6. Rafiyath S. M. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis / S. M. Rafiyath, M. Rasul, B. Lee [et al.] // Experimental Hematology & Oncology. – 2012. – Vol. 10. – P. 1–9.
7. Швец В. И. Липосомы в фармации продукты нанобиотехнологии / В. И. Швец, Ю. М. Краснопольский / В. И. Швец // Провизор. – 2008. – № 03. – С. 74–81.
8. ICH Q8 (R2). Pharmaceutical development. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002872.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002872.pdf).
9. Краснопольский Ю. М. Технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов и их применение в клинике / Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец // Нанотехнологии и охрана здоровья. – 2013. – Vol. 5. – P. 10–20.
10. Валидація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: PIPEG, 2001. – С. 58–67.
11. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / под ред. Н. В. Юргеля, А. Л. Младенцева, А. В. Бурдейна и др. – М.: Фармацевтическая промышленность, 2007. – 58 с.

## Резюме

### Валідація методики визначення ступеня інкапсуляції оксаліплатину у ліпосоми методом високоефективної рідинної хроматографії

А.В. Стадніченко<sup>1</sup>, Ю.М. Краснопольський<sup>2</sup>, Т.Г. Ярних<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

<sup>2</sup>Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Харків, Україна

**Мета дослідження** – визначення діапазону концентрацій оксаліплатину, досліджуваних при розробці його ліпосомальної форми; розробка експрес-методики визначення інкапсуляції оксаліплатину в ліпосоми у всьому діапазоні концентрацій і валідація розробленої методики.

**Матеріали та методи.** Як об'єкт дослідження використовували ліпосомальну форму оксаліплатину. Для валідаційних досліджень використовували аналітичні ваги XP205DR, Mettler Toledo, Швейцарія, ВЕРХ систему Shimadzu LC-20. Визначення проводилося методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) в його варіанті – гель-проникаючої хроматографії. Швидкість елювання – 1 мл/хв, об'єм проби – 1 мкл, температура колонки 30 °С, реєстрація аналітичного сигналу – 230 нм при ширині оптичної щілини 4 нм, рухлива фаза – вода для хроматографії, профільрована через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

**Результати.** Валідацію проводили за прийнятим науково-методичним підходом. Були вивчені такі характеристики, як специфічність, правильність, лінійність, прецизійність. Специфічність методики була підтверджена хроматограмами плацебо ліпосом без додавання оксаліплатину. На хроматограмах плацебо були відсутні піки, які за часом утримування збігаються з піками неінкапсульованого оксаліплатину.

**Висновки.** В результаті досліджень була розроблена експрес ВЕРХ методика, що дозволяє достовірно визначати оксаліплатин в концентраціях від 0,25 мг/мл до 4,0 мг/мл в присутності ліпосом. Методика заснована на варіанті гель-проникаючої хроматографії, відповідає необхідним критеріям та має високі екологічні показники.

**Ключові слова:** оксаліплатин, ліпосоми, інкапсуляція, валідація, фармацевтична розробка, високоефективна рідинна хроматографія

## Summary

### Validation of the method for encapsulation degree determination in liposomal oxaliplatin by hplc method

A.V. Stadnichenko<sup>1</sup>, Y.M. Krasnopolsky<sup>2</sup>, T.G. Yarnykh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>National University of Technology «Kharkiv Polytechnical Institute», Kharkiv, Ukraine

**The aim.** Determination of the range of concentrations of oxaliplatin studied in the development of its liposomal form. Development of an express technique for determining encapsulation of oxaliplatin in liposomes in the entire concentration range and validation of the developed procedure.

**Materials and methods.** The liposomal form of oxaliplatin was used as the object of the study. For validation studies, the analytical scales XP205DR, Mettler Toledo, Switzerland, HPLC system Shimadzu LC-20 were used. The determination was made by HPLC in its version - gel permeation chromatography. The elution rate is 1 ml/min, the volume of the sample is 1 µl, the column temperature is 30 °C, the analytical signal is recorded at 230 nm, the optical gap is 4 nm, the mobile phase is water for chromatography filtered through a 0.45 µm filter.

**Results.** The validation was conducted with the accepted scientific and methodological approach. Such characteristics as specificity, regularity, linearity, precision were studied. The specificity of the procedure was confirmed by placebo liposome chromatograms, without the addition of oxaliplatin. There were no peaks on the placebo chromatograms, which coincide in time with the peaks of unencapsulated oxaliplatin.

**Conclusions.** As a result of the research, an express HPLC method was developed that allows to reliably determine oxaliplatin in concentrations from 0,25 mg/ml to 4,0 mg/ml in the presence of liposomes. The method is based on the gel-permeation chromatography, meets the necessary criteria, has high ecological indexes.

**Key words:** oxaliplatin, liposomes, incapsulation, validation, pharmaceutical development, high performance liquid chromatography