

Анализ вещества

Substances analysis

DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2023-89-12-5-12>ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОНОЙОДАЦЕТАТА
В ЛИПИДНЫХ НАНОСТРУКТУРАХ© Дмитрий Афанасьевич Коршунов^{1*}, Ирина Викторовна Кондакова¹,
Евгения Александровна Сиденко¹, Елена Евгеньевна Середа^{1,2},
Наталья Юрьевна Золотухина³¹ Научно-исследовательский институт онкологии Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, 634009, Россия, г. Томск, Кооперативный пер., д. 5; *e-mail: ieved@ya.ru² Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2.³ Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, г. Томск, просп. Ленина, д. 30.

*Статья поступила 1 марта 2023 г. Поступила после доработки 10 сентября 2023 г.
Принята к публикации 21 сентября 2023 г.*

Для уменьшения системной токсичности и улучшения фармакокинетики противоопухолевых препаратов часто используют их липосомальную форму. Монойодацетат натрия (МЙА) — ингибитор гликолиза — противоопухолевый препарат, находящийся на стадии клинических испытаний. МЙА инкапсулировали в липосомы (липосомальная эмульсия содержала 1,2-дипальмитоил-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) и холестерин (Хол) в молярном соотношении 9:0,8) методом экструзии: в зависимости от условий диаметр полученных липосом составил 100 или 400 нм. Полученные липосомы очищали от невключенного МЙА путем диализа в течение 3 ч. Для определения МЙА, содержащегося непосредственно в липосомах, необходимо сначала отделить липосомы от межлипосомальной жидкости, которая также содержит невключенный МЙА. Для этой цели использовали сорбцию липосом на активированном угле. Затем необходимо разрушить оболочку липосом: из исследованных агентов (ПАВ, бензалкония хлорид, апротонные растворители) наиболее эффективным для этой цели оказался диоксан. Разработана методика определения МЙА в липосомальной форме в диапазоне 31,3 мкг/мл – 7,9 мг/мл с пределом обнаружения 5,6 мкг/мл, обеспечивающая разделение МЙА, холестерина и фосфолипидов, с использованием метода хроматографии гидрофильного взаимодействия со спектрофотометрическим детектированием на длине волны $\lambda = 260$ нм. В качестве подвижной фазы использовали раствор ацетонитрила в воде в объемном соотношении 50:50 с добавлением модификаторов — уксусной кислоты (60 ммоль/л) и формиата аммония (30 ммоль/л), неподвижная фаза — аминопропилсиликагель. Установлено, что независимо от диаметра доза МЙА в 1 мл липосом составила 0,20 – 0,23 мг. Для использования в дальнейших исследованиях выбраны липосомы диаметром 400 нм, более мягкие условия получения которых обеспечивают меньшие степень окисления липидов и потери МЙА.

Ключевые слова: ингибиторы гликолиза; монойодацетат; определение; липосомы; ВЭЖХ.

CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF IODOACETATE
IN LIPID NANOSTRUCTURES© Dmitry A. Korshunov,^{1*} Irina V. Kondakova,¹ Evgenia A. Sidenko,¹
Elena E. Sereda,^{1,2} Natalia Yu. Zolotukhina³¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, 5, Cooperativny per., Tomsk, 634009, Russia;
*e-mail: ieved@ya.ru² Siberian State Medical University, 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia.³ National Research Tomsk Polytechnic University, 30, prosp. Lenina, Tomsk, 634050, Russia.

Received March 1, 2023. Revised September 10, 2023. Accepted September 21, 2023.

A liposomal form of anticancer drugs is often used to improve pharmacokinetics and reduce systemic toxicity of the drugs. The goal of the study is to develop a method for quantitative analysis of a liposomal form

of sodium iodoacetate (IA), glycolysis inhibitor, which exhibits a pronounced antitumor activity. Liposomes were prepared by extrusion at a temperature of 25 – 55°C under argon pressure ranged from 2 to 10 MPa. The obtained liposomes were purified from the non-incorporated component using dialysis. The method of HPLC was used to analyze the inhibitor solution in liposomes. The method of hydrophilic interaction chromatography revealed a high selectivity of iodoacetate with aminopropyl silica gel as a stationary phase. The best option for analysis was to use a spectrophotometric detector. The results of analysis showed that the dose of the inhibitor in 1 ml of liposomes was 0.20 – 0.23 mg regardless of the liposome size. In terms of the weight of an animal, the amount of iodoacetate was 8 – 9 mg/kg. The analysis of liposomes by the developed method showed that the highest yield and a high degree of purification is attained at low temperature (no more than 40°C) and duration of dialysis for about 3 h. For these purposes, the use of liposomes with a diameter of 400 nm turned out to be the best option.

Keywords: glycolysis inhibitors; sodium iodoacetate; determination; liposomes; HPLC.

Введение

Несмотря на активный поиск новых лекарственных средств для лечения рака, все необходимые клинические испытания проходит лишь 5 % исследуемых препаратов. Это связано с тем, что половина новых исследуемых агентов не проходит первый этап клинических испытаний по оценке токсичности и фармакокинетики [1]. Множество потенциальных агентов и некоторые существующие противоопухолевые средства слабо растворимы в воде и плохо проникают через мембраны клеток, поэтому требуется использование нанотехнологий адресной доставки для улучшения фармакокинетики и снижения системной токсичности препаратов. Список потенциальных средств наномедицины для целевой доставки лекарств постоянно растет и расширяется: в основном используют липосомы, мицеллы, наночастицы и конъюгаты полимеров [2].

На сегодняшний день существует множество биоматериалов, используемых при лечении онкологических заболеваний. Липосомы и другие нанобиоматериалы на основе липидов выделяются тем, что они были первой клинически одобренной терапевтической наноплатформой для лечения рака и широко представлены в клинических испытаниях [3 – 7]. Кроме того, было показано, что липосомы улучшают фармакокинетику и биораспределение молекул противоопухолевых препаратов [8].

В настоящее время активно ведутся поиски новых средств против рака, к числу которых относятся препараты, связанные с метаболическим перепрограммированием [9, 10]. Несмотря на то, что опухоли содержат метаболические изменения, воздействие на которые критично для жизнеспособности клеток, до сих пор эта идея не привела к появлению множества антиметаболических агентов с высокой и предсказуемой эффективностью. Ключевой проблемой антиметаболитов, выявленной в испытаниях, является их высокая системная токсичность [11, 12]. Стоит отметить, что на данный момент испытания эффективности и безопасности ингибиторов гликолиза находятся на ранней стадии и сосредоточены

лишь на оценке их действия в самостоятельной форме, в отличие от активной разработки липидных и иных наноструктур хорошо изученных лекарственных препаратов противоопухолевого ряда [13, 14]. Среди известных ингибиторов гликолиза можно выделить ряд соединений, которые обладают потенциально высокой синергией с липосомами при воздействии на опухоль в силу их индивидуальных свойств [15]. К ним относится ингибитор моноиодацетат, один из потенциальных противоопухолевых агентов [16]. Побочным действием этого препарата является кардиотоксичность, которую можно значительно снизить за счет изменения его биораспределения при использовании его липосомальной формы [17]. Поэтому для исследования противоопухолевой активности моноиодацетата в липосомальной форме необходимо первоначально разработать рабочую и стабильную наноформу и провести определение включенного препарата.

Большинство лекарственных препаратов является многокомпонентными смесями, и для определения в них содержания действующего вещества прежде всего необходимо отделить его от вспомогательных веществ. Кроме того, анализ лекарственных форм подразумевает большой поток проб и рутинность. Исходя из этого для анализа липосомальных лекарственных форм целесообразно использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Среди вариантов ВЭЖХ наибольший интерес представляет хроматография гидрофильного взаимодействия (режим HILIC), которую можно использовать для разделения полярных соединений, слабо удерживаемых в обращенно-фазовой ВЭЖХ, таких как фосфолипиды, из-за гидрофильной «головки» [18]. Целесообразно также применение модифицированного сорбента, например, аминопропилсиликагеля, который за счет наличия $-NH_2$ групп способен удерживать моноиодацетат-анион. В отличие от режима HILIC, определение полярных и основных соединений методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) осложняется необходимостью использования высококонцентрированных водных буферных растворов

даже в случае самых инертных сорбентов, что приводит к искажению формы пиков. Разделение таких соединений методом нормально-фазовой ВЭЖХ (НФ ВЭЖХ) на полярных неподвижных фазах с использованием органических растворителей в качестве элюентов малоэффективно и характеризуется асимметричной формой пиков [19]. Гидрофильная хроматография сочетает в себе применение неподвижных фаз, характерных для НФ ВЭЖХ, и подвижных фаз, используемых в ОФ ВЭЖХ, и представляет собой альтернативу для разделения и определения полярных и заряженных соединений [20].

Необходимо также отметить, что создание липосом требует соблюдения ряда условий, которые необходимо учитывать [21]. Оптимальная температура для инкапсулирования препарата в липосомы лежит в диапазоне 60 – 80 °С, что может оказаться неприемлемым для многих ингибиторов. Температурный режим является одним из ключевых факторов сдерживания в разработке липосомальной лекарственной формы, так как многие потенциальные агенты при указанных температурах легко окисляются. Моноидоацетат является светочувствительным, также возможны его потери при экструзии [22]. Поэтому процесс создания липосом необходимо контролировать: надо найти приемлемые условия, при которых будет возможно инкапсулирование агента с наименьшими потерями. Другим важным моментом является очистка липосомальной формы от невключенного препарата. Все перечисленные задачи можно решить с помощью метода ВЭЖХ, т.е. использование хроматографии гидрофильного взаимодействия может решать сразу несколько ключевых проблем создания липосомальной лекарственной формы моноидоацетата.

Цель работы — разработка методики определения моноидоацетата в липидных наноструктурах и нахождение оптимальных условий получения липосом.

Экспериментальная часть

В исследовании использовали липосомы с различным диаметром. Для получения эмульсии полых липосом использовали 1,2-дипальмитоил-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) и холестерин (Хол) (Sigma Aldrich, США) в молярном соотношении ДПФХ:Хол = 9:0,8.

Для инкапсулирования в липосомы ингибитор гликолиза моноидоацетат натрия (МИА, Sigma-Aldrich, США) помещали в камеру экструдера, содержащую липосомальную эмульсию. Полученную эмульсию с препаратом фильтровали 12 раз через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 100 или 400 нм (Sartorius, Германия) в экструдере при температуре 25 – 55 °С и давлении аргона в диапазоне от 2 до 10 МПа в зависи-

мости от диаметра пор мембран, используемых для экструзии [23]. Полученные липосомы очищали от невключенного компонента с помощью диализной мембраны (ROTH, США). Для определения полученного содержания МИА в липосомах их предварительно разрушали с использованием апротонного растворителя диоксана (suitable for HPLC, Sigma-Aldrich, США).

Для анализа в качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила (УФ-ИК-ВЭЖХ (градиент), ACS, Panreac, Испания) с водой в объемном соотношении 50:50 с добавлением 60 ммоль/л ледяной уксусной кислоты (хч, ГОСТ 61–75, Scharlab, Испания) и 30 ммоль/л формиата аммония ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, США) для контроля кислотности подвижной фазы и стабилизации МИА. При использовании ПАВ Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США) для разрушения липосом объемное соотношение ацетонитрила и воды составляло 80:20 с теми же концентрациями модификаторов подвижной фазы. В качестве неподвижной фазы использовали аминопропил-силикагель на 5-мкм колонке ZorbaxNH2 4,6 × 150 мм (Agilent Technologies, США). МИА определяли с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1260 (Agilent Technologies, США) со спектрофотометрическим детектором на диодной матрице. Количество вводимой пробы составляло 5 мл. По завершении анализа с помощью программного обеспечения Agilent MassHunter определяли площади хроматографических пиков МИА при длине волны $\lambda = 260$ нм, объемная скорость потока составляла 1 мл/мин, температуру термостата колонки устанавливали на уровне 20 °С. Время удерживания МИА составляет порядка 7 мин, холестерина — 1,6 мин, фосфолипидов — 2,5 мин. Время удерживания определяли добавлением стандартных образцов соответствующих компонентов.

Для приготовления подвижной фазы в химический стакан вместимостью 1 л вносили 1,8916 г формиата аммония, прибавляли 500 мл воды, очищенной для ВЭЖХ. Доводили значение pH раствора до 1,5, прибавляя уксусную кислоту (ее примерный объем составлял 3,4 мл). К раствору добавляли 500 мл ацетонитрила и перемешивали. Полученный буферный раствор переносили в емкость для подвижной фазы. Перед проведением анализа элюент дегазировали в ультразвуковой ванне ElmasonicP10H в течение 30 мин.

Для построения градуировочных зависимостей готовили две серии растворов МИА в смеси ацетонитрил:вода = 50:50: 7 растворов в первой серии и 4 — во второй. Массы взятых навесок измеряли с точностью 0,1 мг. Концентрации МИА в растворах первой серии составляли от 0,198 до 7,9 мг/мл, в растворах второй серии — от 0,03125 до 0,25 мг/мл.

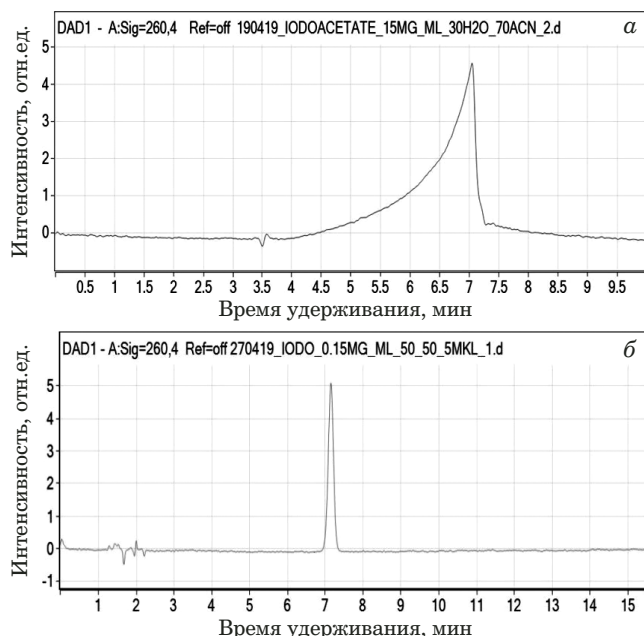


Рис. 1. Хроматограмма раствора МЙА в подвижной фазе ацетонитрил – вода (50:50): *a* — без добавления кислот и солей; *b* — с добавлением уксусной кислоты и формиата аммония

Fig. 1. Chromatogram of IA solution in acetonitrile – water (50:50) mobile phase: *a* — without addition of acids and salts; *b* — with acetic acid and ammonium formate

Липосомы отделяли от межлипосомальной жидкости методом сорбции. В пробирку Эппендорфа помещали 1,5 мл липосом, добавляли к ним 35 мг активированного угля, встряхивали и замораживали на 12 ч. Через 12 ч размораживали содержимое пробирки при комнатной температуре в течение 60 мин до момента его разделения на два слоя. Верхний прозрачный слой содержал межлипосомальную жидкость, осажженный слой был со сгустками липосом, адсорбированных на активированном угле.

Оптимальность выбранных условий анализа оценивали по коэффициенту асимметрии пиков As и разрешению между парами пиков МЙА и компонентов липосом на хроматограмме. Для доказательства пригодности методики анализа также использовали валидационные критерии в соответствии с рекомендациями протоколов по хроматографии для оценки чувствительности, повторяемости, промежуточной прецизионности, правильности и диапазона определяемых содержаний [24 – 26].

Значение коэффициента асимметрии рассчитывали по формуле:

$$As = W_{0,05}/2Ac,$$

где $W_{0,05}$ — ширина пика на уровне 5 % высоты, мин; Ac — длина отрезка, проведенного от перед-

ней части пика до его середины на уровне 5 % высоты, мин.

Коэффициент разрешения между двумя пиками рассчитывали по формуле:

$$RS = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{W_1 + W_2},$$

где t_r — время удерживания для хроматографического пика, мин; W — ширина хроматографического пика у основания, мин.

Коэффициент вариации вычисляли по формуле:

$$CV = \frac{S}{x} \cdot 100 \%,$$

где S — стандартное отклонение; x — среднее значение.

Концентрацию МЙА (мг/мл) рассчитывали по формуле:

$$C_i = \frac{aS_iV_{al}}{V_c},$$

где a — коэффициент пропорциональности градуировочной зависимости; S_i — площадь хроматографического пика компонента, отн.ед.; V_{al} — объем аликвоты пробы при разбавлении на стадии пробоподготовки, мл; V_c — объем мерной колбы, используемой при разбавлении пробы на стадии пробоподготовки, мл.

Обсуждение результатов

МЙА имеет два максимума поглощения в УФ-диапазоне (200 и 260 нм) [27]. Однако длина волны в районе 200 нм неприменима для детектирования, так как соответствует максимуму поглощения ацетонитрила, основного компонента подвижной фазы в режиме HILIC. Хроматограмма раствора МЙА с использованием колонки ZorbaxNH2 и подвижной фазы ацетонитрил: вода (50:50) показана на рис. 1. При добавлении в подвижную фазу уксусной кислоты и формиата аммония для поддержания необходимого уровня кислотности, стабилизирующего МЙА, форма пика МЙА значительно улучшается (см. рис. 1, б).

Поскольку размытие пиков затрудняет количественный анализ, процедура определения должна обеспечивать достаточную хроматографическую эффективность и симметрию для всех хроматографических пиков. Для определения мертвого времени в этих условиях был проанализирован раствор нафталина. Время удерживания нафталина составило 1,5 мин при скорости потока 1 мл/мин. Значение коэффициента разрешения между пиками МЙА и компонентов липосом

с растворителем составило 13,4 ед. при необходимости минимального значения 1,5 ед., что соответствует требованиям пригодности хроматографической системы. Значение фактора асимметрии пика *As*, равное 1,1 при необходимом диапазоне 0,8 – 1,3, также свидетельствует об оптимальности выбранных условий анализа [24 – 26].

Для разработки методики определения МЙА мы зарегистрировали хроматограмму раствора МЙА с добавлением фосфатидилхолина и холестерина (рис. 2).

На рис. 2 первая группа пиков соответствует смеси липидов, пику МЙА соответствует *t_r* ≈ 7 мин.

Диапазоны определяемых содержаний МЙА, инкапсулированного в липосомы, выбирали исходя из его предполагаемой концентрации в лекарственной форме. Метод должен был обеспечивать определение МЙА в широком диапазоне концентраций, так как при оценке содержания препарата в липосомах необходимо также учитывать его содержание в межлипосомальной жидкости и, кроме того, учитывать потери препарата, происходящие в результате нагревания в экстрадуре. Из-за большого разброса концентраций МЙА в липосомах и межлипосомальной жидкости потребовалось построить две градуировочные зависимости для диапазонов концентраций 0,2 – 7,9 мг/мл и 31,3 – 250 мкг/мл: $y = 388,005x$ ($R^2 = 0,99994$) и $y = 343,8946x$ ($R^2 = 0,9996$) соответственно.

Расширение диапазона концентраций для любой из этих градуировочных зависимостей приводит к потере линейности, что свидетельствует о необходимости использовать их обе. В дальнейшем оценка валидности методики показала, что разработанный метод определения МЙА является специфичным в диапазоне концентраций от 0,7 до 7,0 мг/мл, обеспечивает повторяемость, промежуточную прецизионность и



Рис. 2. Хроматограмма раствора фосфатидилхолина, холестерина и моноиодацетата

Fig. 2. Chromatogram of a solution of phosphatidylcholine, cholesterol and iodoacetate

чувствительность на достаточном уровне (табл. 1) [24 – 26].

При выборе условий подготовки пробы для анализа методом ВЭЖХ необходимо было учесть еще два аспекта. Во-первых, для оценки содержания МЙА непосредственно в липосомах необходимо отделять липосомы от межлипосомальной жидкости, так как она также содержит МЙА. Для разделения использовали несколько подходов: центрифугирование, фильтрование и сорбцию. Первые два способа оказались неэффективными. Так, при центрифугировании раствора липосом не происходило разделения содержимого пробирки Эппендорфа на два слоя: липосомы оставались равномерно распределенными в объеме межлипосомальной жидкости. Разделить липосомы и межлипосомальную жидкость фильтрованием также не удалось, так как фильтр с диаметром пор, меньшим, чем самые маленькие из исследуемых липосом (100 нм), применим только при использовании дополнительного давления, а в случае липосом это приводит к их разрыву и, как следствие, выходу из них действующего вещества. Использование фильтра с порами, чей

Таблица 1. Метрологическая характеристика методики хроматографического определения моноиодацетата

Table 1. Metrological characteristics of chromatographic determination of IA

Характеристика методики		Значение	Требуемое значение
Повторяемость	Относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости, CV, %	0,4 %, 0,8 %, 2,5 %	Не более 3,0 %
Промежуточная прецизионность	Относительное среднеквадратическое отклонение промежуточной прецизионности, CV	1,2 %	Не более 3,0 %
Специфичность	Разрешение между парой пиков моноиодацетат/холестерин, <i>RS</i>	15,0	Не менее 1,5
	Разрешение между парой пиков моноиодацетат/фосфолипиды, <i>RS</i>	13,4	Не менее 3,0
	Коэффициент асимметрии пика МЙА, <i>As</i>	1,1	0,8 – 1,3
Чувствительность	Предел обнаружения	5,6 мкг/мл	Не более 0,5 мг/мл
	Отношение сигнал/шум на уровне нижней точки диапазона, <i>S/N</i>	55,5	Не менее 10
	Относительное смещение на уровне нижней точки диапазона, δX , %	2,2	Не более 5,0 %

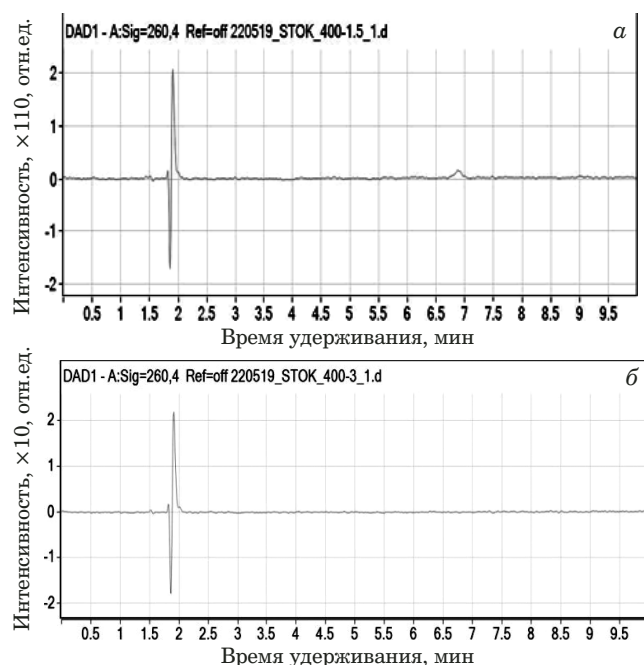


Рис. 3. Хромотограмма стока: *а* — 1,5 ч диализа; *б* — после 3 ч диализа

Fig. 3. Chromatogram of the flow: *a* — 1.5 h of dialysis; *b* — 3 h after dialysis

диаметр больше, чем размеры липосом, нецелесообразно.

Эффективным способом разделения оказался метод сорбции с использованием активированного угля: получали межлипосомальную жидкость в виде верхнего прозрачного слоя и активированный уголь с адсорбированными липосомами — нижний слой.

Во-вторых, была поставлена задача подобрать альтернативу существующим агентам, способствующим раскрытию липосом и выходу МЙА из них. Один из самых распространенных способов раскрывать липосомы — это использование ПАВ. Среди упоминающихся в опубликованных исследованиях ПАВ, применяемых для этой цели, — Тритон X, Нанидет Р-40 [28 – 31]. Второй альтернативный способ — использование бензалкония хлорида, имеющего свойство разрушать оболочки живых клеток [32, 33], а липосомы, в сущности, схожи своей оболочкой с оболоч-

Таблица 2. Сравнительная оценка эффективности агентов, разрушающих оболочку липосомы

Table 2. Comparative evaluation of the effectiveness of liposome-damaging agents

Разрушающий агент	<i>S</i> пика МЙА, отн.ед.
ПАВ (Тритон X, Нанидет Р-40)	20,52
Бензалкония хлорид	17,28
Апротонные растворители (тетрагидрофуран, диоксан и др.)	31,31

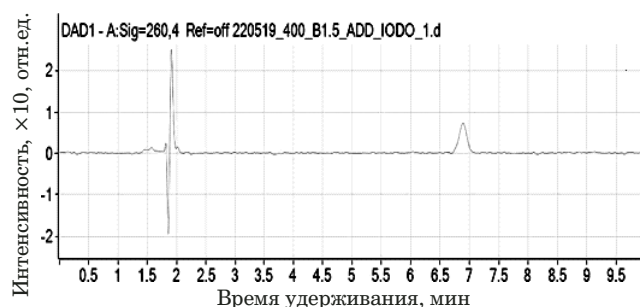


Рис. 4. Хромотограмма раствора липосом размером 400 нм, содержащих монойодацетат

Fig. 4. Chromatogram of the solution of liposomes (400 nm) with iodoacetate

кой клетки живого организма. И третий способ — это использование апротонных растворителей, например, тетрагидрофурана или диоксана.

Для сравнения эффективности каждого из способов лекарственную форму смешивали с раскрывающим агентом и раствором ацетонитрил – вода (50:50) так, чтобы визуально можно было оценить степень растворения липосом, т.е. до получения прозрачной пробы. Рекомендуемое соотношение — 5:9:5, например, 250 мкл липосом, 450 мкл тетрагидрофурана и 250 мкл раствора ацетонитрил – вода (50:50). В случае использования ПАВ добавка раскрывающего агента — до 5 капель (около 20 мкл), а раствора ацетонитрила с водой добавляли больше (680 мкл), чтобы объем полученных проб был одинаков.

После анализа каждого из трех вариантов можно сделать вывод о том, что наиболее эффективным способом раскрытия липосом можно считать применение апротонных растворителей (табл. 2).

Для определения количества действующего вещества в липосомах необходимо предварительно очистить раствор от невключенного компонента. Первоначально мы использовали для этих целей колоночную гель-фильтрацию с сефадексом, но этот метод оказался неприемлемым, так как до 50 % липосом оседало на геле. Поэтому в итоге был использован метод диализа через мембрану. Пробы анализировали каждые полчаса, и по результатам анализа, представленным на рис. 3, можно сделать вывод о том, что 3 ч диализного времени достаточно для полного отмывания липосомальных лекарственных форм от МЙА, не попавшего внутрь липосом. Это время является минимально необходимым для того, чтобы полноценно очистить раствор липосом с учетом разброса концентраций агента при его приготовлении из-за потерь МЙА за счет распада, оседания на стенках экструдера и сменных мембранах.

Таким образом, были найдены оптимальные условия для хроматографического разде-

ления и определения МЙА, фосфолипидов и холестерина.

В соответствии с разработанной методикой анализировали образцы липосомальных лекарственных форм, содержащих МЙА, с диаметром липосом 100 и 400 нм (рис. 4).

Было установлено, что независимо от размера липосом доза МЙА в 1 мл раствора липосом составила 0,20 – 0,23 мг. Этого количества достаточно для проведения экспериментов на животных, так как в пересчете на массу животного доза МЙА составляет 8 – 9 мг/кг. По результатам наших предварительных экспериментов на животных максимально переносимая доза МЙА в самостоятельной форме для интактных животных составляла 18 мг/кг, а для животных с привитой опухолью — 9 мг/кг. Следует отметить, что для приготовления липосом размером 100 нм необходимы высокие температуры (55 – 60 °C) и высокое давление газа, что в конечном итоге приводит к большим потерям ингибитора, а также к избыточному уровню окисления липидов при их приготовлении. Поэтому одним из ключевых моментов является использование в дальнейших исследованиях *in vivo* липосом размером 400 нм с наименьшей степенью окисления липидов и агента.

Заключение

Разработанная хроматографическая методика обеспечивает разделение МЙА, холестерина и фосфолипидов в образцах липосомальных лекарственных форм и определение МЙА в диапазоне от 31,3 мкг/мл до 7,9 мг/мл с пределом обнаружения 5,6 мкг/мл. Методика пригодна для анализа липосомальных лекарственных форм, содержащих МЙА, с использованием классической аппаратуры для ВЭЖХ, что позволит в дальнейшем применять ее при рутинном анализе на производстве. Анализ липосом различного диаметра данным методом показал, что получение липосом наиболее эффективно при низких температурах (не более 40 °C), а для очистки раствора липосом от невключенного агента достаточно 3 ч диализа. Таким образом, наилучшим вариантом оказалось использование липосом с диаметром 400 нм.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Sun D., Gao W., Hu H., Zhou S. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? / *Acta. Pharm. Sin. B*. 2022. V. 12. N 7. P. 3049 – 3062. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.02.002
2. Veselov V. V., Nosyrev A. E., Jicsinszky L., et al. Targeted Delivery Methods for Anticancer Drugs / *Cancers*. 2022. V. 14. N 3. 622. DOI: 10.3390/cancers14030622
3. Tran S., DeGiovanni P. J., Piel B., Rai P. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery / *Clin. Transl. Med.* 2017. V. 6. N 1. 44. DOI: 10.1186/s40169-017-0175-0
4. Liu Y., Li J., Chen M., et al. Palladium-based nanomaterials for cancer imaging and therapy / *Theranostics*. 2020. V. 10. N 22. P. 10057 – 10074. DOI: 10.7150/thno.45990
5. Cui G., Wu J., Lin J., et al. Graphene-based nanomaterials for breast cancer treatment: promising therapeutic strategies / *J. Nanobiotechnol.* 2021. V. 19. N 1. 211. DOI: 10.1186/s12951-021-00902-8
6. Zhu L., Zhao J., Guo Z., et al. Applications of Aptamer-Bound Nanomaterials in Cancer Therapy / *Biosensors*. 2021. V. 11. N 9. 344. DOI: 10.3390/bios11090344
7. Luo L., Wang H., Tian W., et al. Targeting ferroptosis-based cancer therapy using nanomaterials: strategies and applications / *Theranostics*. 2021. V. 11. N 20. P. 9937 – 9952. DOI: 10.7150/thno.65480
8. Bor G., Mat Azmi I. D., Yaghmur A. Nanomedicines for cancer therapy: current status, challenges and future prospects / *Ther Delivery*. 2019. V. 10. N 2. P. 113 – 132. DOI: 10.4155/tde-2018-0062
9. Korshunov D. A., Kondakova I. V., Shashova E. E. Modern perspective on metabolic reprogramming in malignant neoplasms / *Biochemistry (Moscow)*. 2019. V. 84. N 10. P. 1129 – 1142. DOI: 10.1134/S000629791910002X
10. Mikubo M., Inoue Y., Liu G., Tsao M. S. Mechanism of Drug Tolerant Persister Cancer Cells: The Landscape and Clinical Implication for Therapy / *J. Thorac. Oncol.* 2021. V. 16. N 11. P. 1798 – 1809. DOI: 10.1016/j.jtho.2021.07.017
11. Faubert B., Solmonson A., De Berardinis R. J. Metabolic reprogramming and cancer progression / *Science*. 2020. V. 368. N 6487. eaaw5473. DOI: 10.1126/science.aaw5473
12. Cheng Z., Li M., Dey R., Chen Y. Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives / *J. Hematol. Oncol.* 2021. V. 14. N 1. 85. DOI: 10.1186/s13045-021-01096-0
13. Sun X., Peng Y., Zhao J., et al. Discovery and development of tumor glycolysis rate-limiting enzyme inhibitors / *Bioorg. Chem.* 2021. V. 112. 104891. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.104891
14. Korshunov D. A., Kondakova I. V., Klimov I. A., Ivanov V. V. Glycolysis inhibitors monoiodoacetate and 2-deoxyglucose as antitumor agents: experimental study on lewis lung carcinoma model / *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018. V. 165. N 5. P. 695 – 697. DOI: 10.1007/s10517-018-4244-1
15. Brennan S., Esposito S., Abdelaziz M. I. M., et al. Selective protein kinase C inhibition switches time-dependent glucose cardiotoxicity to cardioprotection / *Front. Cardiovasc. Med.* 2022. V. 9. 997013. DOI: 10.3389/fcvm.2022.997013
16. Yashin Ya., Vedenin A., Yashin A. HPLC and ultra-HPLC: a state and prospects / *Analitika*. 2015. N 2(21). P. 70 – 84 [in Russian].
17. Lau B. P., Becalski A. Determination of iodoacetic acid using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry / *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 2008. V. 22. N 12. P. 1787 – 1791. DOI: 10.1002/rcm.3547
18. Guo Y. A survey of polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography and recent progress in understanding retention and selectivity / *Biomed. Chromatogr.* 2022. V. 36. N 4. e5332. DOI: 10.1002/bmc.5332
19. Singh D., Pahwa S. A review on physico-chemical parameters of liposomal doxorubicin / *Int. J. Appl. Pharm.* 2020. V. 12. N 2. P. 1 – 5. DOI: 10.22159/ijap.2020v12i2.35330
20. Iodoacetic acid. CAMEO Chemicals database, 2023. <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/20524> (accessed March 1, 2023).
21. Milto I. V., Sukhodolo I. V., Usov V. Y. Mononuclear phagocytes of rat liver and lung after intravenous introduction of suspension of magnetite nanoparticles / *Cell Tissue Biol.* 2012. V. 6. N 5 – 6. P. 490 – 497. DOI: 10.1134/S1990519X12050082
22. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 8th Ed. — European Pharmacopeia, 2022. P. 45 – 56.
23. United States Pharmacopeia. General Chapter, «621» Chromatography. USP-NF. — Rockville, MD: United States Pharmacopeia. 2023. DOI: 10.31003/USPNF_M99380_06_01

24. Chromatography / Russian Federation State Pharmacopoeia, XIV ed. V. 1. P. 845 – 872 [in Russian].
25. Iodoacetic acid (64-69-7). NIST Chemistry WebBook. NIST Standard Reference Database No. 69, Feb 2015 Release. — Washington, DC: US Sec. Commerce, 2018. <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C64697&Mask=400#UV-Vis-Spec> (accessed March 1, 2023).
26. **Paternostre M. T., Roux M., Rigaud J. L.** Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate / *Biochemistry*. 1988. V. 27. N 8. P. 2668 – 2677. DOI: 10.1021/bi00408a006
27. **Bjørnstad V. A., Lund R.** Pathways of Membrane Solubilization: A Structural Study of Model Lipid Vesicles Exposed to Classical Detergents / *Langmuir*. 2023. V. 39. N 11. P. 3914 – 3933. DOI: 10.1021/acs.langmuir.2c03207
28. **Bjørnstad V. A., Soto-Bustamante F., Tria G., et al.** Beyond the standard model of solubilization: Non-ionic surfactants induce collapse of lipid vesicles into rippled bilamellar nanodiscs / *J. Colloid Interface Sci.* 2023. V. 641. P. 553 – 567. DOI: 10.1016/j.jcis.2023.03.037
29. **Labeta M. O., Fernandez N., Festenstein H.** Solubilisation effect of Nonidet P-40, triton X-100 and CHAPS in the detection of MHC-like glycoproteins / *J. Immunol. Methods*. 1988. V. 112. N 1. P. 133 – 138. DOI: 10.1016/0022-1759(88)90043-9
30. **Kim M., Hatt J. K., Weigand M. R., et al.** Genomic and Transcriptomic Insights into How Bacteria Withstand High Concentrations of Benzalkonium Chloride Biocides / *Appl. Environ. Microbiol.* 2018. V. 84. N 12. e00197 – 18. DOI: 10.1128/AEM.00197-18
31. **Wessels S., Ingmer H.** Modes of action of three disinfectant active substances: a review / *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2013. V. 7. N 3. P. 56 – 67. DOI: 10.1016/j.yrtph.2013.09.006