

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

ВЛАСОВ СЕРГЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**СИНТЕЗ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ
ДОКСОРУБИЦИНА НА ОСНОВЕ МИКРОЧАСТИЦ Fe(0)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук
Белоусов Михаил Валерьевич

Томск–2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ИСТОЧНИКОВ ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Химиотерапевтические средства в онкологии	10
1.2. Системы доставки лекарственных средств	11
1.2.1. Классификация систем доставки ЛС	14
1.2.2. Неорганические системы доставки лекарственных средств для терапии и диагностики	17
1.2.3. Способы получения нано- и микрочастиц ноль-валентного железа	21
1.3. Разработка системы доставки доксорубицина на основе микрочастиц Fe(0)	26
1.4. Стандартизация разрабатываемой СДЛС	28
Выводы по главе 1	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, АППАРАТУРА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Описание реактивов и оборудования	34
2.2. Методики анализа микрочастиц	36
2.3. Определение содержания железа	36
2.4. Дериватизация глюкозамина	37
2.5. Определение емкости загрузки доксорубицина	38
2.6. Изучение высвобождения доксорубицина при различных значениях pH среды	39
2.7. Определение оптимальных параметров синтеза микрочастиц Fe-CS	39
2.8. Определение оптимальных параметров конъюгирования	41
2.9. Изучение контрастных свойств носителя Fe-CS	41
2.10. Методы статистической обработки результатов	42
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИИ МИКРОЧАСТИЦ Fe-CS И КОНЬЮГАТА Fe-CS-ДОКС	43
3.1. Синтез микрочастиц Fe-CS и конъюгата Fe-CS-ДОКС	43

3.1.1. Разработка методики получения микрочастиц Fe-CS с заданными размерами	43
3.1.2. Синтез конъюгата Fe-CS с ДОКС	60
3.2. Стандартизация микрочастиц Fe-CS и Fe-CS-ДОКС	67
Выводы по главе 3	81
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАНОСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИРОКЧАСТИЦ Fe-CS-ДОКС	82
4.1. Высвобождение доксорубина под воздействием внешних и внутренних факторов среды.	82
4.2. Изучение контрастных свойств микрочастиц Fe-CS	86
Выводы по главе 4	88
Выводы	89
Заключение	91
Список сокращений и условных обозначений	92
Список литературы	94
Приложение 1. Проект нормативной документации	116
Приложение 2. Акты внедрения	123
Приложение 3. Протокол валидации	126

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Несмотря на то, что химиотерапия является одним из наиболее эффективных методов консервативного лечения злокачественных новообразований [1], ее применение ограничивается серьезными побочными эффектами, причиной возникновения которых является неспецифическое воздействие химиотерапевтических агентов на здоровые клетки организма [2-4]. Одним из путей решения данной проблемы является использование систем доставки лекарственных средств (СДЛС), которые уменьшают число возникающих побочных эффектов за счет селективного накопления в опухоли [5-8]. Более того, высвобождение терапевтического агента в целевом участке может быть инициировано за счет воздействия таких факторов как температура, переменное магнитное поле или ультразвуковое (УЗ) излучение, что в свою очередь позволяет использовать индивидуальные режимы лечения [9, 10, 11].

Обладающие магнитными свойствами СДЛС могут быть использованы для магнитно-направленной доставки химиотерапевтических агентов, а также в качестве МРТ-контрастных средств [12]. Для этой цели применяют нано- и микрочастицы на основе $Fe(0)$, Fe_2O_3 , Fe_3O_4 . При этом, микрогабаритные частицы имеют ряд преимуществ по сравнению с наночастицами. Так, за счет положительного воздействия локальных неоднородностей магнитного поля микрогабариты обладают большей интенсивностью контрастирования и менее восприимчивы к экстравазации или неспецифическому поглощению эндотелиальными клетками [13]. Однако, предложенные в литературе методы получения магнитных частиц являются многостадийными и не позволяют достичь оптимальных параметров для разработки эффективной СДЛС вследствие полимодального распределения размеров получаемых частиц, низкой емкости загрузки химиотерапевтического агента и нестабильности конъюгатов при физиологических значениях pH. Таким образом, разработка новых методик синтеза магнитных микрогабаритов, обладающих оптимальными параметрами для создания

эффективной системы доставки лекарственных средств на их основе, с возможностью ее применения в терапии и диагностике онкозаболеваний, является актуальной задачей.

Степень разработанности темы. За последние годы опубликован ряд исследований, посвященных разработке и изучению систем доставки лекарственных средств на основе микроразмерных носителей, среди которых микрочастицы ноль-валентного железа представляют наибольший интерес [13, 14]. Однако, имеющиеся на сегодняшний день способы получения микрочастиц Fe(0) обладают рядом недостатков, основными из которых являются низкая экономическая эффективность и доступность методов, высокая токсичность используемых реактивов, а также широкий диапазон размеров получаемых частиц. Кроме того, в доступной литературе не представлены методики стандартизации гибридных СДЛС (металлическое ядро с органическим покрытием и терапевтическим агентом) с многокомпонентным составом.

Цель исследования. Разработка однореакторного синтеза и методик контроля качества микроразмерной системы доставки доксорубина на основе ноль-валентного железа (Fe-CS-ДОКС) для тераностики локализованных солидных опухолей.

Задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели:

1. Установить степень влияния параметров синтеза микрочастиц железа и определить их оптимальные значения.
2. Установить степень влияния параметров синтеза конъюгата с химиотерапевтическим агентом (Fe-CS-ДОКС) и определить их оптимальные значения.
3. Изучить высвобождение доксорубина (*in vitro*) из Fe-CS-ДОКС при воздействии стимулирующих факторов.

4. Изучить контрастные свойства (*in vivo*) полученного носителя (Fe-CS) в МРТ исследовании.

5. Разработать и валидировать методики стандартизации для включения в проект НД на лиофилизат для приготовления суспензии для внутривенного введения «Конъюгат Fe-CS-ДОКС».

Научная новизна:

1. Впервые разработана методика одnoreакторного («single tube») синтеза носителя на основе микрочастиц Fe(0) с мономодальным распределением и возможностью контроля размеров.

2. Установлено влияние параметров синтеза на размер микрочастиц Fe-COOH при восстановлении Fe³⁺ боргидридом натрия, с последующей стабилизацией 4-карбоксибензилдизония тозилатом.

3. Впервые изучено высвобождение доксорубина из конъюгата Fe-CS-ДОКС под воздействием внешних (ультразвуковое излучение) и внутренних (рН среды) факторов.

4. Впервые исследованы *in vivo* МРТ-контрастные свойства полученного носителя Fe-CS.

5. Впервые определены показатели качества лиофилизата микрочастиц Fe-CS-ДОКС.

Научная новизна подтверждена патентом РФ на изобретение № 2696303 «Способ получения микрочастиц ноль-валентного железа, иммобилизованных терапевтическим агентом» (опубл. 01.08.2019).

Практическая значимость. Разработанный носитель на основе микрочастиц Fe(0) с мономодальным распределением (1-10 мкм) может быть использован в качестве контрастного агента для лучевой диагностики (МРТ), а также в качестве носителя химиотерапевтических лекарственных средств (ХТС), значительно повышая эффективность терапии онкологических заболеваний и

снижая частоту возникновения побочных эффектов, за счет направленной доставки ХТС и его контролируемого высвобождения. Установленные закономерности получения микрочастиц Fe(0) могут быть использованы для создания на их основе ЛС для транскатетерной артериальной хемоземболизации или систем таргетной доставки ХТС.

На основе валидации разработанных методик стандартизации предложен проект нормативной документации на лекарственную форму «Конъюгат Fe-CS-ДОКС» для внутривенного введения (Приложение 1). Результаты проведенных исследований внедрены в учебную работу кафедры фармацевтического анализа ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России и кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России (Приложение 2).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования основывается на значительном объеме экспериментальных данных, полученных с применением адекватных поставленным задачам методик на основе современных аналитических методов исследования. Полученные результаты обработаны соответствующими статистическими методами и представлены в виде рисунков и таблиц в тексте диссертации и в приложениях.

Результаты диссертационной работы представлены на конференциях: Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва (Томск, 2017, 2018); Всероссийской конференции молодых учёных-химиков с международным участием (Нижний Новгород, 2018); Всероссийской конференции с международным участием посвященной памяти академика А.Е. Фаворского: V научные чтения (Иркутск, 2017); Международной конференции «NANOCON: Conference on Nanomaterials» (Брно, 2017); Международной конференции «EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry» (Любляна, 2018).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Методика одnoreакторного синтеза носителя Fe-CS на основе микрочастиц Fe(0), позволяющая получить частицы с мономодальным распределением размеров.
2. Методика одnoreакторного синтеза конъюгата Fe-CS-ДОКС.
3. Результаты изучения (*in vitro*) высвобождения доксорубина при воздействии ультразвукового излучения и при различных значениях pH среды.
4. Результаты изучения (*in vivo*) МРТ-контрастных свойств носителя Fe-CS.
5. Стандартизация конъюгата Fe-CS-ДОКС и валидация разработанных методик контроля качества.

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов. Автор принимал непосредственное участие в планировании, получении экспериментальных данных, их обработке и систематизации, обобщении и обсуждении результатов диссертационной работы, а также написании текста диссертационной работы и всех опубликованных работ по тематике исследования.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно, области исследований, соответствующей п. 2 – Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств и п. 3 – Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Публикация материалов исследования. Основные результаты исследования легли в основу 12 работ, в том числе 3-ех статей в журналах из перечня ВАК, 1-го патента Российской Федерации и 8 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность руководителю, д. фарм.н., профессору М.В. Белоусову, к.х.н. С.В. Кривошекову и д.х.н., профессору М.С. Юсубову за организацию и помощь в проведении исследований; к.х.н., доценту П.С. Постникову и PhD. А. Ди Мартино за консультативную помощь, и ценные рекомендации при изучении тераностических свойств разработанной системы, а также д.мед. наук, профессору В.Ю. Усову за проведение МРТ-исследования полученного носителя и анализ результатов.

Структура и объем работы. Материалы диссертационного исследования представлены на 166 страницах. Диссертационная работа включает введение, литературный обзор (глава 1), материалы и методы исследования (глава 2), обсуждение собственных исследований (глава 3), изучение тераностических свойств разработанной системы (глава 4), заключение, список литературы, приложения. Диссертация содержит 28 таблиц и 34 рисунка. Список литературы состоит из 198 работ, 172 из них на иностранном языке.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ИСТОЧНИКОВ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Химиотерапевтические средства в онкологии

Химиотерапия представляет собой метод лечения онкологических заболеваний с использованием одного или нескольких цитотоксических агентов, нацеленных на быстро пролиферирующие раковые клетки [15]. На сегодняшний день существует множество классов ХТС, обладающих индивидуальным механизмом действия и характерными побочными эффектами, возникающими за счет отсутствия специфичности ХТС к опухоли [16-20]. Несмотря на то, что химиотерапия является одним из основных подходов к лечению злокачественных новообразований, ее возможности существенно ограничиваются низкой биодоступностью ХТС, их неоднородным распределением в целевом участке, а также многочисленными побочными эффектами [21-23]. Более того, для достижения максимальной эффективности лечения так же необходим мониторинг индивидуального терапевтического отклика, проведение которого осуществляется с использованием современных методов диагностики (УЗИ, КТ, МРТ). Однако, в связи с отсутствием контрастирующей активности у основных ХТС, для применения данного подхода требуется дополнительное использование визуализирующих агентов [24]. На сегодняшний день, существует несколько способов преодоления данных ограничений, наиболее эффективными из которых являются применение тераностических средств (ТС) и систем целевой доставки.

Тераностика представляет собой комплексный подход к лечению онкозаболеваний, позволяющий в значительной степени повысить эффективность проводимой терапии и диагностики, за счет контрастных свойств ТС и их избирательного накопления в опухоли [25, 26].

Другой подход заключается в использовании систем доставки лекарственных средств (СДЛС), которые помимо снижения частоты возникновения побочных эффектов (за счет целевой доставки химиотерапевтического агента в опухоль), позволяют применять новые, более эффективные режимы лечения онкологических заболеваний (контролируемая динамика высвобождения ХТС) [27].

1.2. Системы доставки лекарственных средств

Разработка первых носителей лекарственных средств берет свое начало с середины 60 годов XX века (рисунок 1). Так, в 1965 году группой ученых, под руководством Бангама были разработаны наноразмерные липосомы на основе фосфолипидов [28]. В последующие годы, наблюдалось интенсивное развитие данной области, что привело к появлению новых типов носителей, таких как полимерные системы (1976), дендримеры (1978), а также ПЭГ-липосомы (1980) [29, 30].

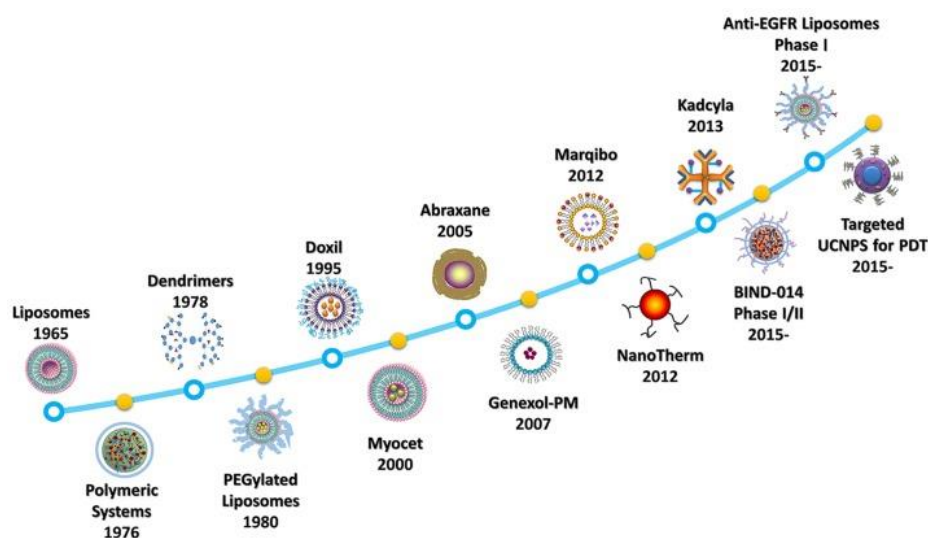


Рисунок 1 – Развитие систем доставки химиотерапевтических средств [31]

Первыми системами доставки, одобренными управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) стали препараты Doxil (1995) и Myocet (2000), являющиеся ПЭГ-модифицированными липосомами, загруженными доксорубицином, а также Abraxane (2005), представляющий собой конъюгат паклитаксела и наночастиц альбумина. Благодаря своей высокой эффективности, первые СДЛС нашли широкое применение в терапии многих видов злокачественных новообразований, таких как СПИД-ассоциированная саркома Капоши, рак яичников, молочной и поджелудочной железы, и т.д. [32-36].

Таким образом, внедрение первого поколения СДЛС в медицинскую практику позволило значительно уменьшить число возникающих побочных

эффектов проводимой химиотерапии, однако, для достижения максимальной биодоступности и эффективности переносимых ХТС, необходимо применение систем, реализующих принцип активного нацеливания на опухоль.

Второе поколение СДЛС характеризуется наличием специфических к определенному виду опухоли маркеров, что позволяет существенно повысить эффективность лечения, за счет избирательного накопления системы в целевом участке. Одной из таких СДЛС, одобренной в 2013 году для лечения HER-2-позитивного рака молочной железы является конъюгат химиотерапевтического средства - мертансина и моноклонального антитела трастузумаба, благодаря которому обеспечивается целевая доставка ХТС непосредственно в опухоль [37].

В последние годы, значительные усилия исследователей направлены на создание СДЛС с возможностью контролируемого высвобождения терапевтического агента. Использование данных систем позволяет существенно повысить эффективность проводимой химиотерапии благодаря возможности изменения профиля высвобождения полезной загрузки в соответствии с индивидуальными особенностями пациента. Инициирование высвобождения, в свою очередь, может осуществляться под воздействием стимулирующих факторов, которые делятся на внешние (физические стимулы, включая свет, ультразвуковое излучение, электрическое и магнитное поле) и внутренние (изменение рН, температуры или окислительно-восстановительного состояния) [38] (рисунок 2).

Стимулирующий потенциал внутренних факторов реализуется за счет существенных различий между физиологическими параметрами здоровых и опухолевых тканей, в результате чего, обеспечивается контролируемое высвобождение терапевтического агента непосредственно в опухоли. Среди стимулирующих факторов данной группы, наиболее часто используемым при создании СДЛС является разность значений рН между опухолевой и здоровой тканью. К преимуществам рН чувствительных систем относятся простота создания носителей, а также высокая интенсивность высвобождения полезной загрузки.



Рисунок 2 – Внутренние и внешние стимулирующие факторы

Внешние стимулирующие факторы, в свою очередь, позволяют осуществлять более точный контроль высвобождения ЛС. Среди СДЛС, обладающих чувствительностью к факторам данной группы, системы доставки, с возможностью высвобождения полезной загрузки под воздействием магнитного и ультразвукового полей обладают значительными преимуществами, а именно возможностью их использования в качестве контрастных агентов при УЗ и МРТ исследованиях, а также интенсивным и прогнозируемым высвобождением терапевтического агента [65]. Однако, для обеспечения оптимального профиля высвобождения полезной загрузки, современные СДЛС должны обладать, чувствительностью как к внешним, так и внутренним стимулам.

1.2.1. Классификация систем доставки ЛС

Благодаря постоянным исследованиям в области целевой доставки лекарственных средств, с каждым годом появляются новые, более эффективные системы, способные значительно снизить частоту возникновения побочных эффектов, а также повысить эффективность проводимой химиотерапии, за счет возможности применения персонализированного подхода к лечению пациентов (контролируемое высвобождение, тераностика).

Системы доставки (рисунок 3) могут быть классифицированы в соответствии с размером носителя (нано-, микро-), происхождением компонентов (фосфолипиды, полимеры, неорганические материалы и т.д.) и областью применения (терапия, тераностика). Каждый класс обладает характерными преимуществами и недостатками, а также чувствительностью к стимулирующим факторам.

Таким образом, несмотря на имеющиеся недостатки, СДЛС позволяют существенно повысить эффективность химиотерапии за счет возможности контролируемого высвобождения ЛС, а также значительного снижения частоты возникновения побочных эффектов [92-94]. Однако, для достижения максимальной эффективности лечения, необходимо осуществление контроля

проводимой терапии посредством инструментальных методов диагностики (ультразвуковое исследование, магнитно-резонансная томография и др.). Такой подход позволит использовать индивидуально подобранные и наиболее эффективные режимы лечения для каждого пациента. В связи с этим, разработка тераностических СДЛС, которые одновременно сочетают в себе свойства как носителя ХТС, так и визуализирующего агента является актуальным направлением в области создания систем доставки. В то же время, особые свойства неорганических материалов (оптические, электрические и магнитные) делают их наиболее перспективной платформой для создания тераностических носителей лекарственных средств.

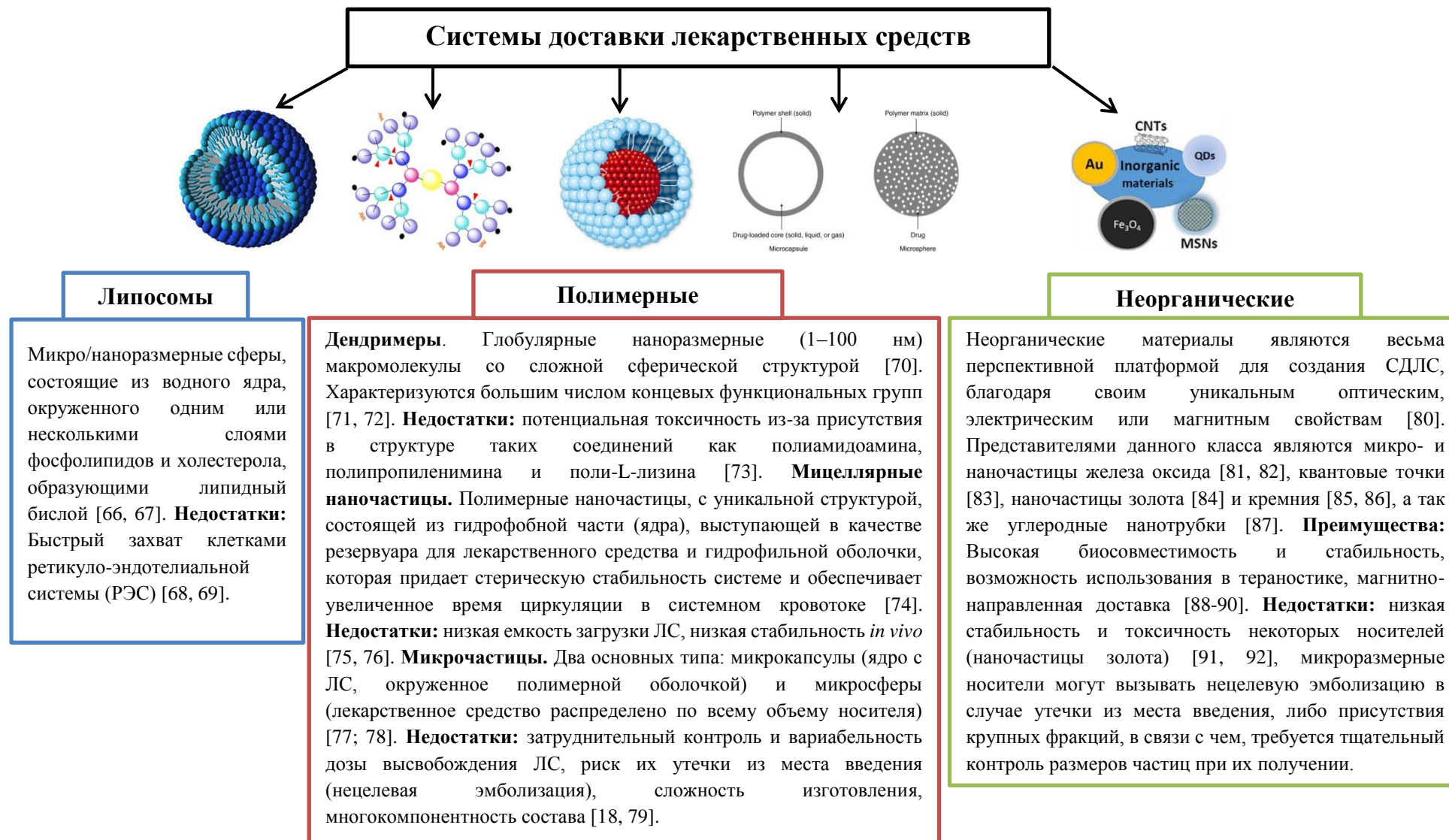


Рисунок 3 – Классы систем доставки лекарственных средств

1.2.2. Неорганические системы доставки лекарственных средств для терапии диагностики

Углеродные нанотрубки (УНТ), представляют собой аллотропную форму углерода с цилиндрической наноструктурой [95, 96]. Преимуществами их использования в качестве тераностических СДЛС являются высокая биосовместимость и большая площадь поверхности (благодаря внешней и внутренней поверхности трубки), которая обеспечивает высокую загрузку терапевтических и диагностических агентов. Более того, способность УНТ поглощать ближнее инфракрасное излучение делает их перспективными контрастными средствами для фотоакустической и термоакустической томографии [97], а также обеспечивает возможность их применения в качестве фототермического агента [98, 99].

Несмотря на то, что УНТ имеют большие перспективы в терапии и диагностике онкозаболеваний, их использование по-прежнему ограничивается такими недостатками как низкая растворимость в воде (затрудненная функционализация поверхности), высокая стоимость производства, а также высокая тенденция к агрегации [100-102].

Еще одной платформой для создания носителей лекарственных средств являются мезопористые наночастицы кремния (МНК). Данный материал обладает высокой площадью поверхности благодаря пористой структуре, в результате чего, системы доставки на основе МНК способны инкапсулировать относительно большие количества биологически активных молекул [103, 104]. Благодаря ряду преимуществ, таких как легко изменяемый размер частиц и размер пор, высокая стабильность (устойчивость к нагреву, гидролизу, воздействию pH и механическим воздействиям), жесткая основа, большая площадь поверхности и ее бифункциональность (наличие внутренней и внешней поверхности), а также простота методик изготовления МНК, обуславливается высокий интерес исследователей из различных областей (материаловедение, катализ и т.д.) [105, 106]. Однако основными ограничениями их применения в клинической практике

являются, низкая специфичность платформ к опухолевым клеткам, токсичность компонентов носителя, сложность дозирования (т.к. доза для достижения терапевтического эффекта, как правило, намного выше дозы, требующейся для диагностики), а также подверженность агрегации *in vivo*, которая может приводить как к потере тераностической функциональности, так и к окклюзии капилляров печени, легких, почек и селезенки.

Следующей платформой для создания тераностических носителей ХТС являются квантовые точки (КВТ), представляющие собой наноразмерные кристаллы (халькогениды металлов - CdSe, CdTe, CdS и др.), способные генерировать световое излучение, при воздействии на них света видимой области спектра [107]. Длина волны испускаемого света, в свою очередь, зависит как от размера КВТ, так и от их химического состава. Помимо эндогенного оптического контраста, КВТ также обладают большой функциональной поверхностью, которая может быть использована для загрузки терапевтического агента. Еще одно существенное преимущество использования КВТ, по сравнению с традиционными флуорофорами заключается в том, что они в меньшей степени подвержены фотообесцвечиванию (фотохимическому разрушению) [108, 109]. Однако, основным ограничением использования СДЛС данного класса является их токсичность, поскольку большинство тераностических КВТ содержат по меньшей мере, один токсичный неорганический элемент (Cd, Hg, As, Pb и др.) [110].

Следующей широко используемой платформой для создания тераностических СДЛС являются микро- и наночастицы, на основе магнитных материалов. С химической точки зрения, материалы, используемые для создания ядра носителя, можно разделить на соединения железа (обычно оксиды), кобальта, никеля, а также на комплексные соединения, включающие в себя несколько металлов (меди, цинка, стронция и бария) [111, 112]. Размеры частиц могут варьироваться в диапазоне от 10 нм до 700 мкм, в зависимости от их конечного назначения. Для терапевтического применения, а также для повышения стабильности и биосовместимости магнитных частиц (МЧ), необходима их

поверхностная модификация, в ходе которой происходит присоединение терапевтических, таргетных и стабилизирующих агентов (рисунок 4). Более того, за счет магнитных свойств неорганического ядра, модифицированные частицы могут концентрироваться и высвобождать полезную нагрузку в целевом участке под действием внешнего магнитного поля [113, 114].

Еще одним видом терапии злокачественных новообразований с применением МЧ, благодаря их магнитным свойствам, является локальная гипертермия. Данный метод основан на повышении температуры (42-43 °С) в области опухоли, под воздействием переменного магнитного поля и, в основном, используется в качестве дополнительной терапии, поскольку, неоднородность опухолевой ткани, неконтролируемый рост сосудов и инвазивный рост опухоли, а также некротические ядра, ограничивает доступ МЧ ко всем ее участкам [15, 115].

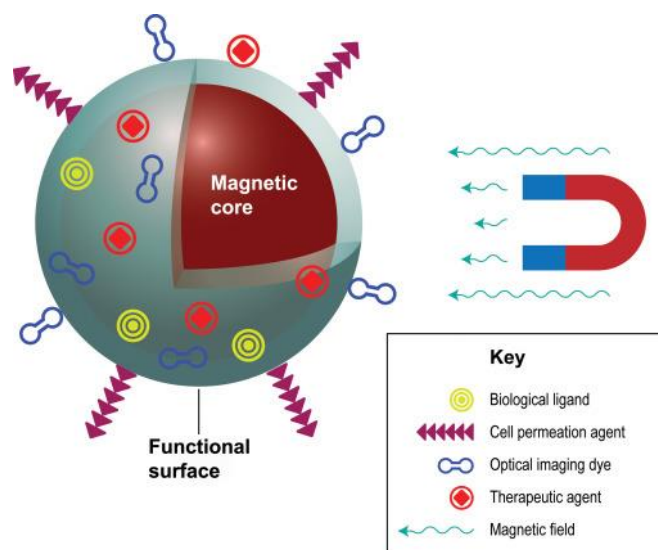


Рисунок 4 – Схематическое изображение функционализированной НМЧ [18]

Использование МЧ в качестве контрастных агентов для МРТ-визуализации так же обуславливается их магнитными свойствами [15]. Эффективность контрастирования, в свою очередь, зависит от величины магнитного насыщения (магнитная сатурация) визуализирующего агента, в результате чего, магнитные материалы с высокими значениями данного параметра являются наиболее

перспективными платформами для создания магнитных систем доставки (таблица 1) [116].

Таблица 1 – Величины магнитного насыщения неорганических материалов [117].

Материал	Магнитное насыщение, emu/g
Fe (0)	212
Fe ₃ O ₄	100
γ-Fe ₂ O ₃	85
MnFe ₂ O ₄	110
Co	160

Таким образом, исходя из приведенных данных, наибольшей контрастирующей способностью обладает ноль-валентное железо, которое помимо высокой чувствительности к магнитному полю имеет низкую токсичность [118].

Другим важным параметром, оказывающим существенное влияние на эффективность контрастирования, является размер МЧ. На сегодняшний день, существует множество микро- и наноразмерных носителей на основе магнитных материалов, однако, микрочастицы имеют ряд преимуществ в МРТ-контрастировании перед наноразмерными системами. Так, микроразмерность оказывает положительное влияние на локальную однородность магнитного поля и, соответственно, на обнаруживаемый контраст, распространяющийся на расстояние, примерно в 50 раз превышающее диаметр частицы. Более того, микроразмерные частицы, менее подвержены экстравазации и неспецифическому поглощению эндотелиальными клетками в отличие от нано частиц, что обуславливает предпочтительность их использования для создания таргетных контрастных агентов [12, 14]. Помимо использования в МРТ-контрастировании, магнитные нано- и микрочастицы находят широкое применение в качестве контрастного агента для ультразвуковой визуализации [119, 120].

Подводя итог вышесказанному, магнитные материалы являются одной из наиболее перспективных платформ для разработки тераностических систем

доставки. Среди них, наибольший интерес для создания МЧ представляет ноль-валентное железо ($\text{Fe}(0)$), благодаря таким преимуществам, как доступность, низкая токсичность и высокое значение магнитной сатурации. В связи с тем, что на эффективность системы, помимо используемого материала, существенное влияние так же оказывает размер носителя, создание тераностических систем на основе микрочастиц $\text{Fe}(0)$ является наиболее перспективным направлением в данной области.

1.2.3. Способы получения нано- и микрочастиц ноль-валентного железа

Существующие способы получения нано- и микроразмерных частиц ноль-валентного железа, условно делятся на физические и химические (рисунок 5).



Рисунок 5 – Способы получения микро- и наночастиц $\text{Fe}(0)$

Механическое измельчение является общепринятым физическим методом уменьшения размера материалов с использованием тяжелых измельчающих сред, обычно металлических шаров [121]. Однако, высокая энергоемкость, низкая однородность размеров конечного продукта, необходимость использования дополнительного оборудования (для получения наночастиц), а также выделение

тепла во время процесса являются основными недостатками, ограничивающими его применение [122, 123].

Другой физический метод (метод газовой конденсации) основан на конденсации паров, содержащих атомы железа, с использованием жидкого азота в атмосфере инертного газа [124]. К его основным ограничениям относятся высокое потребление энергии, а также жесткие условия проведения синтеза (высокая температура, высокое давление и значительное охлаждение). Более того, выход конечного продукта крайне низок, что ограничивает применение данного метода в промышленном производстве [122].

Еще одним серьезным недостатком, ограничивающим использование физических методов является отсутствие возможности проведения модификации получаемых микро- и наночастиц Fe(0) в процессе их формирования. Проведение данного этапа необходимо для увеличения стабильности носителя (защита поверхности МЧ от окисления) и обеспечения возможности конъюгации ХТС. Помимо описанного преимущества, химические способы получения микро- и наночастиц Fe(0) так же обладают высокой доступностью и пригодностью использования как в промышленных так и в лабораторных условиях, в связи с чем, находят более широкое применение по сравнению с физическими методами.

Основные способы данной группы заключаются в восстановлении водных растворов солей железа (II и III) с использованием различных восстанавливающих агентов, основными из которых являются натрия боргидрид (NaBH_4), молекулярный водород, а так же алюмогидриды щелочных металлов (NaAlH_4 , LiAlH_4), однако, благодаря таким преимуществам, как мягкие условия и простота проведения реакции, а так же высокая однородность образующихся частиц, метод восстановления с использованием натрия борогидрида находит более широкое применение [125-127].

В основном, качестве железосодержащих реагентов используют соли трехвалентного железа, что обусловлено высоким электродным потенциалом пары $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^0$ (-0,037 В), по сравнению с $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^0$ (-0,447 В), в результате чего обеспечивается более полное и прогнозируемое протекание реакции, даже в

присутствии низких концентраций восстановителя [128]. К основным недостаткам данного метода можно отнести токсичность восстановителя (натрия боргидрида), а также образующейся в ходе реакции борной кислоты (H_3BO_3) [122, 129].

Следующий способ синтеза заключается в термическом разложении металлоорганических молекул содержащих железо ($\text{Fe}(\text{CO})_5$), позволяющий получать сферические частицы сверхмалых (2 нм) и микронных размеров с высокой степенью однородности [130-131]. Тем не менее, данный метод также имеет некоторые недостатки, основными из которых являются высокая токсичность и нестабильность пентакарбонила железа ($\text{Fe}(\text{CO})_5$), высокая энергоёмкость процесса, а также образование значительного количества токсичного и легковоспламеняющегося оксида углерода (CO) [122].

Другой альтернативой получения наноразмерных частиц $\text{Fe}(0)$ является гидротермальный синтез. С использованием данного метода (рисунок 6), группой ученых, под руководством Wang были успешно получены наночастицы $\text{Fe}(0)$ (~ 10 нм), с их последующей инкапсуляцией в углеродные микросферы (6–8 мкм). Благодаря углеродной оболочке, образующиеся частицы обладают высокой стабильностью, однако, процессы получения и выделения конечного продукта являются относительно трудоемким [122, 132].

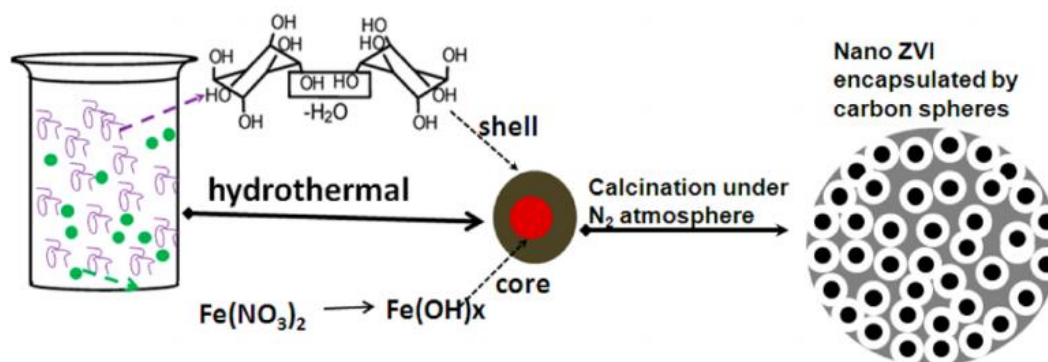


Рисунок 6 – Схематическое изображение получения наночастиц $\text{Fe}(0)$ гидротермальным методом, с их последующей инкапсуляцией в углеродные микросферы [132]

Следующим распространенным способом получения наночастиц $\text{Fe}(0)$ является микроэмульсионный метод (обратных мицелл). Способ заключается во

введении Fe^{2+} в мицеллярный раствор, состоящий из цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ) и бутанола, в качестве поверхностно-активных веществ, а также октана в качестве липофильной фазы. Далее, происходит восстановление Fe^{2+} до $\text{Fe}(0)$ путем введения гидразина в систему. Данный метод позволяет осуществлять контроль за формой и размером образующихся наночастиц $\text{Fe}(0)$, путем изменения количеств поверхностно-активных веществ. Тем не менее, полученные частицы имеют тенденцию к агрегации, вследствие их низкой стабильности [133].

Другим, более дешевым и простым способом получения наночастиц является электрохимический синтез (рисунок 7). Принцип данного метода заключается в восстановлении Fe^{3+} или Fe^{2+} до $\text{Fe}(0)$ на катоде, и удаления полученного продукта из системы по мере его концентрирования. Диаметр образующихся частиц находится в диапазоне 1–20 нм, а удельная площадь поверхности может достигать более $25 \text{ м}^2/\text{г}$. Однако, несмотря на простоту и дешевизну данного метода, готовый продукт обладает низкой стабильностью и имеет тенденцию к агрегации [134].

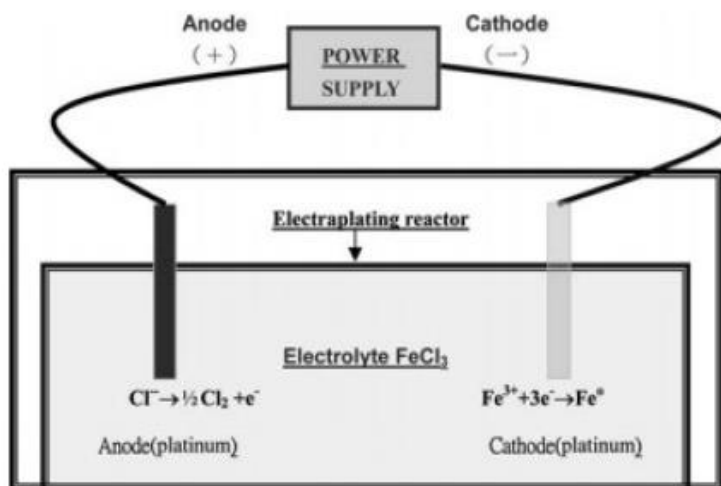


Рисунок 7 – Схематическое изображение процесса электрохимического получения наночастиц $\text{Fe}(0)$ [134]

Еще одним методом, в основе которого лежат электрохимические процессы, является плазменная генерация. Данный способ позволяет получать микро- и наночастицы $\text{Fe}(0)$ путем восстановления ионов железа из раствора под действием высоковольтной плазмы. За счет таких преимуществ как низкая стоимость и

энергоёмкость, метод плазменной генерации находит широкое применение в различных областях, однако, низкий выход и однородность конечного продукта, по-прежнему ограничивают его использование [135-137].

Метод водной атомизации так же находит широкое применение в области получения микро- и наноразмерных частиц, в частности ноль-валентного железа. Образование частиц происходит посредством распыления воды под высоким давлением (50-150 МПа) через поток расплавленного металла, тем самым образуя мелкодисперсный порошок [138, 139]. Основным преимуществом данного метода является возможность получения микро- и наночастиц сферической формы с мономодальным распределением их размеров [140]. Недостатком, ограничивающим повсеместное применение водной атомизации, является высокая стоимость оборудования, а также высокая энергоёмкость процесса [141].

В последние годы, в связи с высоким уровнем загрязнения окружающей среды, многие исследователи сосредоточили свое внимание на экологически чистых методах синтеза. Так, в 2009 году группа ученых под руководством Ноаг представила экологически чистый и одностадийный метод синтеза наночастиц Fe(0), заключающийся в восстановлении водных растворов солей железа (II и III) экстрактом зеленого чая [142]. Успех данной работы вдохновил многих последователей на получение наночастиц Fe(0) с использованием растительных экстрактовсодержащих восстановители, такие как полифенолы и кофеин [143]. Очевидно, что зеленый синтез (green synthesis) является экологически чистым, энергосберегающим и дешевым методом, однако восстановление ионов железа часто бывает неполным и, следовательно, приводит к образованию нескольких видов побочных продуктов, таких как оксиды железа. Более того, полученные с использованием данного метода частицы склонны к агрегации [122].

Таким образом, на сегодняшний день существует широкий арсенал методов получения частиц Fe(0), каждый из которых характеризуется собственными преимуществами и недостатками. В свою очередь, метод получения микро- и наночастиц для создания тераностических СДЛС должен обладать высокой эффективностью (полнота протекания процессов, выход конечного продукта),

простотой осуществления, доступностью оборудования, а также обеспечивать получение частиц с высокой однородностью (размер, форма) и стабильностью. Более того, многие из имеющихся методов не пригодны для получения микроразмерных частиц. В связи с этим, разработка экспрессных, дешевых, отвечающих принципам «green chemistry» способов получения микрочастиц Fe(0) как платформы для тераностических систем доставки ХТС является актуальной задачей фармацевтической науки.

1.3. Разработка системы доставки доксорубина на основе микрочастиц Fe(0)

Как отмечено в разделе 1.2.2, микрочастицы ноль-валентного железа являются одной из наиболее перспективных платформ для создания тераностических СДЛС, однако, их низкая стабильность (высокая скорость окисления), а также отсутствие функциональных групп, необходимых для связывания терапевтического агента, не позволяют использовать их в качестве носителей ХТС без предварительной модификации. Среди существующих на сегодняшний день способов модификации частиц (присоединение дисульфидов, аминов, фосфинов и солей диазония), одним из основных и наиболее эффективных является функционализация поверхности с использованием солей диазония. Данный подход обладает рядом преимуществ, таких как простота приготовления солей, возможность введения в их структуру различных функциональных групп, а также способность к образованию стабильной ковалентной связи с поверхностью металла [144-149].

Второй этап модификации проводится с целью увеличения емкости загрузки (DLC) терапевтического агента. Образование конъюгата ХТС и носителя осуществляется благодаря электростатическим взаимодействиям между функциональными группами обоих компонентов, в связи с чем, для достижения максимального значения DLC, используемый модифицирующий агент должен существенно увеличивать их число на поверхности СДЛС. На сегодняшний день существует множество различных модификаторов, среди которых, наиболее часто

используемыми являются амфифильные полипептиды [150], олигонуклеотиды [151], а также аминополисахариды, основным представителем которых является хитозан. В свою очередь, благодаря высокой доступности, биосовместимости и биоразлагаемости, а также отсутствию токсичности (в частности и для продуктов их разложения) и устойчивости к воздействию кислот, аминополисахариды представляют большой интерес в качестве модификаторов при создании носителей ХТС [152]. Осуществление данного этапа заключается в образовании амидной связи между аминогруппами хитозана и карбоксильными группами остатков бензойной кислоты, располагающихся на поверхности железного ядра. Однако, для взаимодействия данных компонентов, необходима предварительная активация карбоксильных групп. Среди существующих методов активации (образование хлорангидридов, ангидридов, азидов кислот и т.д.), наиболее часто используемым активации является синтез производных N-гидроксисукцинимиды (NHS), через предварительную модификацию карбоксильных групп 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлоридом (EDC) [153, 154]. Преимуществами данного подхода являются возможность образования стабильных и реакционноспособных производных, мягкие условия модификации, отличная биосовместимость и незначительное влияние на биологическую активность [155].

В качестве типовой модели ХТС для апробации исследуемой системы доставки выбран доксорубин (ДОКС), который представляет собой противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда. Поскольку в структуре ДОКС и хитозана присутствуют положительно заряженные аминогруппы, образование электростатических взаимодействий между данными компонентами возможно при введении в состав СДЛС сшивающего агента (кросслинкера) анионного типа. Кросслинкеры анионного типа, в зависимости от происхождения делятся на полимерные (пектин, желатин, натрия альгинат) и низкомолекулярные (натрия трифосфат, натрия сульфат, лимонная кислота). Использование полимерных кросслинкеров при создании СДЛС, с одной стороны, приводит к снижению скорости высвобождения терапевтического агента, а с другой

значительно уменьшает чувствительность системы к низким значениям pH (выступают в качестве буферной системы). В связи с этим, наиболее предпочтительным является использование низкомолекулярных сшивающих агентов, среди которых, большой интерес представляет натрия трифосфат, за счет его низкой токсичности, высокой доступности и возможности легко контролировать степень конъюгации ХТС путем изменения значений pH [156, 157].

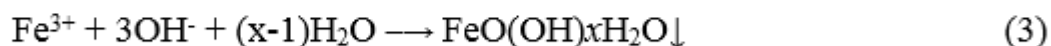
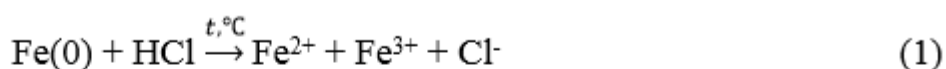
В результате, разрабатываемая СДЛС представляет собой микрочастицы ноль-валентного железа, к поверхности которых, ковалентно присоединены остатки бензойной кислоты и молекулы хитозана, которые в свою очередь, посредством электростатических взаимодействий связаны со сшивающим агентом, натрия трифосфатом и химиотерапевтическим средством доксорубицином.

1.4. Стандартизация разрабатываемой СДЛС

Рекомендации к разработке, контролю качества и процедуре регистрации лекарственных средств в Российской Федерации изложены в Федеральном законе № 61 «Об обращении лекарственных средств», Государственной Фармакопее (ГФ) XIV, а также руководствах ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России [158]. Перечисленные документы подробно описывают подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья, а также фармацевтических субстанций синтетического и биологического происхождения, включая препараты на их основе. Тем не менее, ГФ XIV не содержит рекомендаций для проведения стандартизации тераностических систем доставки ЛС на основе неорганических материалов. Таким образом, в связи с постоянным развитием данной группы лекарственных препаратов, разработка подходов к их стандартизации является актуальным направлением. Для обеспечения максимальной безопасности и эффективности применения систем на основе неорганических микро- и наночастиц критическими параметрами являются размер носителя, содержание действующего вещества, вспомогательных компонентов, а также примесей активной субстанции [159, 160]. В свою очередь, системы доставки характеризуются многокомпонентным составом

(неорганическое ядро, стабилизатор, связывающий агент, лекарственное средство и т.д.), что затрудняет количественное определение данных компонентов при совместном присутствии [161]. Таким образом, разрабатываемые методики количественного определения, должны обладать высокой специфичностью по отношению к анализируемым компонентам исследуемого конъюгата в присутствии сопутствующих веществ, оказывающих мешающее влияние.

Для оценки количественного содержания Fe(0), входящего в состав разрабатываемой системы доставки могут быть использованы следующие группы методов: титриметрические (перманганатометрия, комплексометрия), гравиметрические и физико-химические (вольтамперометрия, спектрофотометрия) [162-165]. Однако, для экспрессной и точной оценки количественного содержания железа в присутствии мешающих компонентов, рациональным является использование гравиметрии, несмотря на все преимущества титриметрических (дешевизна, экспрессность, точность) и физико-химических (экспрессность, простота проведения анализа) методов [166, 167]. Химизм основных этапов гравиметрического определения Fe(0) в составе разрабатываемой системы, включающих в себя растворение, окисление, осаждение и термическую обработку представлен уравнениями 1-4 [168]:



Оценка количественного содержания натрия трифосфата (ТФН) в составе исследуемого конъюгата может осуществляться с использованием спектральных (ИК- и УФ-спектроскопия), хроматографических (ионообменная хроматография) и титриметрических (обратное титрование фосфат-ионов с использованием ЭДТА) методы [169-172], среди которых, спектроскопический анализ находит более широкое применение, благодаря своей простоте, экспрессности и доступности

оборудования. Спектрофотометрическое определение трифосфат-иона включает в себя стадию его перевода в PO_4 -форму посредством кислотного гидролиза [173] и дальнейшее получение фосфорномолибденовых кислот с их последующим восстановлением и определением, согласно ОФС 1.2.3.0020.15 «Спектрофотометрическое определение фосфора» [158].

Количественное определение хитозана и бензойной кислоты проводят с использованием титриметрических и физико-химических методов анализа, основными из которых являются спектрофотометрия в УФ-области, а также хроматографические методы [174-178]. Для количественного определения доксорубина так же могут быть использованы методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и спектрофотометрия в видимой области [179, 180]. Поскольку использование титриметрических и спектрофотометрических методов ограничивается мешающим влиянием сопутствующих компонентов конъюгата, наиболее рациональным является использование метода ВЭЖХ с УФ детектированием. Благодаря возможности разделения смеси анализируемых компонентов, а также высокой скорости, точности, чувствительности, автономности и универсальности (возможности применения метода для анализа объектов различного происхождения), хроматографические методы находят широкое применение в анализе многокомпонентных смесей [181-182]. Таким образом, описанные преимущества данного метода позволяют разработать единую методику определения количественного содержания хитозана, бензойной кислоты и доксорубина в условиях совместного присутствия.

Основной особенностью пробоподготовки исследуемой СДЛС для количественного анализа компонентов является стадия гидролиза. Данный этап проводится с целью выделения анализируемых веществ в свободном виде, за счет разрушения ковалентных и электростатических взаимодействий в системе. В свою очередь, количественное определение хитозана, с использованием метода ВЭЖХ-УФ, возможно только после его предварительной конверсии до глюкозамина (путем кислотного гидролиза) с последующей дериватизацией последнего. В

литературе описаны методы дериватизации, включающие в себя образование комплексов глюкозамина с фенилизотиоцианатом, *орто*-фталевым альдегидом, 3-меркаптопропионовой кислотой, фенилтиомочевинной и 9-флуоренилметоксикарбонил гидрохлоридом (FМОС-Cl), среди которых, в виду доступности и стабильности деривативов, использование FМОС-Cl является наиболее рациональным [183-186]. Поскольку принцип дериватизации с использованием FМОС-Cl заключается в его ковалентном связывании с аминогруппами глюкозамина, одновременное присутствие доксорубина может оказывать мешающее воздействие, за счет наличия в его структуре аминсахара (даунозамина), что необходимо учитывать при проведении процесса.

Следующей особенностью стадии гидролиза является образование солей железа в анализируемой смеси, вследствие растворения металлического ядра носителя. Доксорубин, в свою очередь, образует стабильные комплексы с ионами Fe^{2+} и Fe^{3+} , что может оказывать существенное влияние на правильность и точность количественного анализа, в связи с чем, проведение дополнительных мероприятий по устранению мешающего воздействия ионов железа является обязательным этапом пробоподготовки [187, 188].

Следующим этапом стандартизации СДЛС на основе микро- и наночастиц является определение их размеров. Исходя из литературных данных, а также в соответствии с ГФ XIV, для определения размеров частиц рекомендованы методы оптической микроскопии (ОФС.1.2.1.0009.15) и лазерной дифракции (ОФС.1.2.1.0008.15) [158, 189, 190]. Однако, несмотря на высокую точность микроскопического анализа, метод лазерной дифракции находит более широкое применение в фармации, за счет простоты и быстроты проведения измерений, высокой воспроизводимости результатов, широкому диапазону определяемых размеров и отсутствию необходимости использования калибровочных образцов [191-193].

На сегодняшний день, существует широкий арсенал методов, позволяющих осуществлять стандартизацию СДЛС, однако, для получения достоверных и точных результатов, необходимы методики, обладающие высокой правильностью

и специфичностью при анализе многокомпонентных составов. В связи с этим, разработка методик количественного определения компонентов разрабатываемого конъюгата, удовлетворяющих всем описанным выше требованиям, является актуальной задачей.

Выводы по главе 1

В настоящем обзоре отражены имеющиеся на сегодняшний день классы химиотерапевтических средств применяемых для лечения онкологических заболеваний, представлены основные типы систем доставки химиотерапевтических агентов (включая тераностические СДЛС), основные физические и химические способы получения микро- и наноразмерных частиц Fe(0) с их преимуществами и недостатками, а также приведено описание компонентов, входящих в состав разрабатываемой СДЛС и методик их количественного определения.

Среди существующих носителей ХТС, наибольший интерес для создания тераностических систем доставки представляют микро- и наночастицы на основе ноль-валентного железа (Fe(0)), благодаря таким преимуществам как высокая доступность и низкая токсичность материала, а так же высокое значение магнитной сатурации. Однако, в связи с существенным влиянием размера на эффективность СДЛС, создание тераностических систем на основе микрочастиц Fe(0) является наиболее перспективным направлением в данной области.

Среди представленных в литературе способов получения микрочастиц Fe(0), химические методы находят более широкое применение, однако, в связи с высокой токсичностью реагентов, а также низкой степенью изученности влияния параметров синтеза на размер частиц, разработка однореакторных способов, обладающих высокой экологичностью и экономической эффективностью, по-прежнему остается актуальным вопросом, требующим дальнейшего решения.

Стандартизация тераностических СДЛС так же является нетривиальной задачей, поскольку для получения достоверных и точных результатов, используемые методики должны обладать высокой правильностью и специфичностью при анализе многокомпонентных составов. В связи с этим, разработка методик количественного определения, в условиях совместного присутствия анализируемых компонентов является перспективной областью для дальнейшего изучения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, АППАРАТУРА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Описание реактивов и оборудования

Таблица 2 – Используемые реактивы и растворители

Название	Чистота	Производитель
Реактивы		
Железа (III) хлорид гексагидрат	99	ХПК ГРУПП
Натрия боргидрид	99	Sigma-Aldrich
4-карбоксивензилдиазония тозилат	98	Fluka
N-гидроксисукцинимид	98	Sigma-Aldrich
1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидагидрохлорид	99	Sigma-Aldrich
Хитозан 50-190	98	Sigma-Aldrich
Хитозан 190-310	98	Sigma-Aldrich
Хитозан 310-375	98	Sigma-Aldrich
Хитозан	95	Wilke Resources
Глюкозамин	95	Sigma-Aldrich
Доксорубицин, USP стандарт	99	Sigma-Aldrich
Доксорубицин	98	Sigma-Aldrich
Натрия трифосфат	99	Sigma-Aldrich
Соляная кислота	хч	ЛенРеактив
Азотная кислота	65	ЛенРеактив
Нитрат аммония	98	ЛенРеактив
Серебра нитрат	98	ЛенРеактив
Аскорбиновая кислота	99	ЛенРеактив
Аммоний молибдат	99	Sigma-Aldrich
Калия дигидрофосфат	хч	Sigma-Aldrich
Натрия дигидрофосфат моногидрат	хч	Sigma-Aldrich
Динатрия гидрофосфат	хч	Sigma-Aldrich
Динатрия гидрофосфат гептагидрат	хч	Sigma-Aldrich
Фосфорная кислота	87	ЛенРеактив
Динатрия гидрофосфат гептагидрат	хч	Sigma-Aldrich
Натрия дигидрофосфат	хч	Sigma-Aldrich
Трифторуксусная кислота	99	ЛенРеактив
Гидроксид аммония	99	ЛенРеактив
Натрия ацетат	99	ЛенРеактив
Серная кислота	хч	ЛенРеактив
Натрия тетраборат	98	ЛенРеактив
Натрия гидроксид	98	ЛенРеактив
9-флуоренилметоксикарбонила гидрохлорида	99	Sigma-Aldrich

Название	Чистота	Производитель
Этилендиаминтетрауксусная кислота	98	Sigma-Aldrich
Натрия хлорид	98	ЛенРеактив
Растворители		
Этанол	96	Essentica
Ацетон	хч	Компонент реактив
Ацетонитрил	HPLC-g	Sigma-Aldrich
Уксусная кислота	хч	ЛенРеактив
Инертная среда		
Гексафторид серы	99	Галополимер Кирово – Чепецк
Азот	99	М-газ
Аргон	99	М-газ

Оборудование:

Перестальтический насос BT100J (Longer, Китай)

Centrifuge 5702 (Eppendorf, Германия)

Магнитные мешалки C-MAGHS 7 (IKA, Германия)

УФ спектрофотометр Unico 2800 (United products & Instruments, США)

Лиофильнаясушка FD 8518 (IShin, Корея)

ИК-спектрометр Nicolet iS5 Infrared Spectrometer iD5 ATR с кристаллом ZnSe (Thermo, США)

Mastersizer 3000 с автоматическим диспергатором HydroMV (Malvern, Великобритания)

Термостат лабораторный ТС-1/20 (СКТБ СПУ, Россия)

Аналитическая ВЭЖХ-система на базе хроматографа Ultimate 3000 (Thermo, США), оснащенного градиентным насосом, термостатом колонок, диодно-матричным детектором с возможностью сканирования 190-900 нм.

Аналитическая колонка LunaC18(2), 250×4,6 мм, 5 мкм

Муфельный шкаф ЭКСП-10 (ОАО «Электроприбор», Россия)

Инкубатор Stuart SI 500 (Stuart, Великобритания).

Ультразвуковая ванна Elmasonic S10H (Elma, Германия).

Магниторезонансный томограф Toshiba Vantage Titan 1,5T (Toshiba, Япония).

2.2. Методики анализа микрочастиц

ИК спектроскопия микрочастиц Fe-COOH и Fe-CS. Для подтверждения модификации поверхности микрочастиц ноль-валентного железа использовали метод ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием [11]. Навеску исследуемых микрочастиц массой 10 мг помещали на предметный столик прибора и равномерно распределяли порошок по всей площади кристалла. Далее, образец фиксировали на кристалле и проводили запись спектров в режиме ATR, разрешение 4 см^{-1} , количество сканов – 64.

Определение размеров частиц методом лазерной дифракции. Навеску анализируемых микрочастиц (Fe-CS или Fe-CS-ДОКС) массой 50 мг суспендировали в 50 мл дистиллированной воды в течение 5 минут, далее, аликвоту полученной суспензии объемом 1,0 мл переносили в диспергатор лазерного дифрактометра для проведения измерений [194].

Параметры проведения анализа:

- обсчет данных с использованием теории Ми для несферических частиц и универсальной модели анализа;
- показатель преломления материала ($n=2,86$);
- дисперсант: вода ($n=1,33$);
- длительность измерений: красный и синий свет – Фон: 10 секунд; Образец: 10 секунд;
- количество измерений: 5;
- ослабление сигнала лазера 5-7 %.

2.3. Определение содержания железа

Точную навеску образца 0,3 г помещали в химический стакан на 50 мл. Далее, добавляли 20 мл концентрированной ($\sim 12 \text{ M}$) HCl. Полученную смесь нагревали до $70 \text{ }^\circ\text{C}$ при постоянном перемешивании до полного растворения навески. Далее, добавляли 5 мл 6 M HNO₃ и продолжали нагревание еще 10 минут. По окончании процесса, смесь охлаждали до комнатной температуры, переносили в стакан на 400 мл, прибавляли 100 мл воды очищенной и добавляли 3 M раствор NH₄OH при

постоянном перемешивании до достижения рН 7,5-7,9 (потенциометрически) и снова нагревали смесь в течение 5 минут. После, осадок отфильтровывали через беззольный фильтр (синяя лента), промывая стакан и осадок на фильтре горячим 1 % раствором NH_4NO_3 . Промывку осадка осуществляли до отрицательной пробы на хлорид-ион с использованием 0,1 М AgNO_3 . По окончании процесса, фильтр с осадком переносили в тигель, предварительно доведенный до постоянной массы. Далее, тигель с осадком помещали в муфельный шкаф и выдерживали при температуре 110 °С в течение 30 минут, затем температуру увеличивали до 900 °С и производили сжигание образца в течение 1 часа. По окончании процесса, тигель извлекали из муфельного шкафа и охлаждали на воздухе в течение 30 минут, затем переносили в эксикатор для полного остывания [168]. Полученный осадок взвешивали на аналитических весах, а расчет количества $\text{Fe}(0)$ производили по следующей формуле:

$$\%Fe(0) \text{ в образце} = \frac{\left(\frac{112 * m(\text{осадка, г})}{160}\right)}{m(\text{навески})} \times 100\% , \text{ где} \quad (5)$$

112 – удвоенная молекулярная масса Fe^0 в соответствии с уравнением 4;

160 – молекулярная масса Fe_2O_3 ;

m (осадка) – масса образовавшегося осадка Fe_2O_3 , грамм;

m (навески) – масса навески Fe-CS-ДОКС;

2.4. Дериватизация глюкозамина

Аликвоту раствора глюкозамина (1,0 мл), образовавшегося в ходе гидролиза хитозана (рисунок 8), приливали к раствору 9-флуоренилметоксикарбонила гидрохлорида (FMOC-Cl) в ацетонитриле (1,0 мл) с концентрацией 10 мг/мл. Образовавшуюся смесь оставляли без перемешивания на 4 часа при комнатной [176].

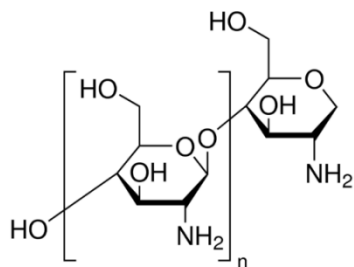


Рисунок 8 – Структурная формула хитозана

2.5. Определение емкости загрузки доксорубина

Навеску полученных микрочастиц Fe-CS массой 10 мг суспендировали в 10 мл фосфатного буферного раствора с pH 5,5. К полученной суспензии прибавляли раствор натрия трифосфата (рисунок 9 Б.) с концентрацией 1 мг/мл объемом 10 мл в фосфатном буфере (pH 5,5). Образовавшуюся смесь перемешивали в течение 15 минут, затем добавляли 10 мл водного раствора доксорубина (рисунок 9 А.) с концентрацией 1 мг/мл и осуществляли конъюгацию в течение еще 15 минут. Далее, полученную реакцию массу центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 минут.

Полученный супернатант, фотометрировали при длине волны 480 нм [195]. Для расчета концентрации использовали калибровочную зависимость, построенную по стандартным растворам доксорубина в диапазоне концентраций от 3,75 до 60,0 мкг/мл. Приготовление буферных растворов осуществляли в соответствии с ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы» ГФ XIV [158]. Количество доксорубина инкапсулированное носителем Fe-CS рассчитывали по формулам 6 и 7, соответственно:

$$m \text{ (инкапсулированного ДОКС), мг} = m \text{ (ДОКС начальная)} - m \text{ (ДОКС в супернатанте)} \quad (6)$$

$$DLC, \text{ мг/мг} = \frac{m \text{ (инкапсулированного ДОКС)}}{m \text{ (носителя Fe-CS)}} \quad (7)$$

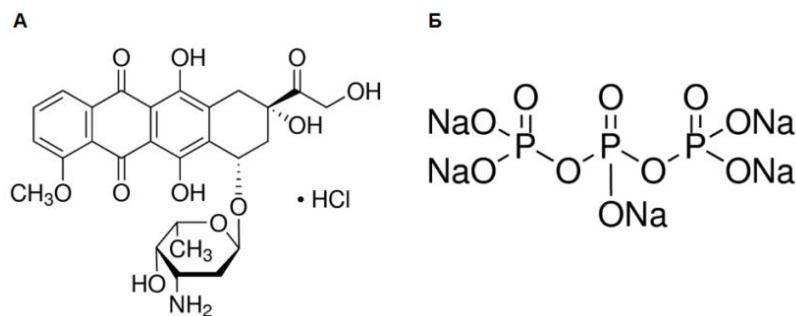


Рисунок 9 – Структурные формулы А) Доксорубицина гидрохлорида; Б) Натрия трифосфата

2.6. Изучение высвобождения доксорубицина при различных значениях pH среды

В три отдельные пробирки помещали навески конъюгата Fe-CS-ДОКС массой 10 мг, далее в каждую пробирку добавляли по 20 мл фосфатного буферного раствора с соответствующим значением pH (3,3; 5,5; 7,4). Плотные закрытые пробирки помещали в инкубатор и проводили процесс при постоянном перемешивании 100 об/мин и температуре 37 °С в течение 12 часов. Через установленные промежутки времени отбирали пробы среды высвобождения в объеме 2,0 мл. Отобранный объем среды замещали эквивалентным объемом свежего фосфатного буферного раствора с соответствующим значением pH и продолжали процесс [196]. Образец предварительно центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 минут. Концентрацию высвободившегося доксорубицина в пробе определяли по калибровочному графику методом УФ-спектроскопии при длине волны 480 нм. Приготовление буферных растворов осуществляли в соответствии с ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы» ГФ XIV [158].

2.7. Определение оптимальных параметров синтеза микрочастиц Fe-CS

Навески железа (III) хлорида гексагидрата и натрия боргидрида по отдельности растворяли в 10 мл дистиллированной воды для получения растворов с концентрациями $C(\text{FeCl}_3)$ и $C(\text{NaBH}_4)$. Затем, раствор железа (III) хлорида перемещали в трехгорлую колбу и добавляли раствор NaBH_4 со скоростью $V(\text{NaBH}_4)$ с использованием перестальтического насоса. Синтез осуществляли в

среде инертного газа (азота, аргона или гексафторида серы), который непрерывно подавали из баллона в реакционную массу. Образовавшуюся смесь перемешивали в течение $t_{\text{син.}}$ (**время синтеза**) с использованием магнитной мешалки. Затем, к полученным микрочастицам Fe(0) приливали 20 мл водного раствора 4-КБДТ с концентрацией C (**4-КБДТ**). Полученную смесь интенсивно перемешивали в течение $t_{\text{стаб.}}$ (**время стабилизации**), затем, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант декантировали, а осадок промывали путем последовательного суспендирования в воде, этаноле и ацетоне с повторным центрифугированием и декантацией супернатанта.

На следующем этапе, полученный полупродукт – микрочастицы (**Fe-COOH**) суспендировали в 20 мл этанола при интенсивном перемешивании. К полученной суспензии приливали этанольный раствор (10 мл) с исследуемыми концентрациями N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорида (**C (EDC)**) и N-гидроксисукцинимидом (**C (NHS)**). Активацию проводили при постоянном перемешивании в течение $t_{\text{акт.}}$ (**время активации**). Параллельно готовили раствор хитозана (50 мл) в 1 % (об/об) уксусной кислоте с молекулярной массой M_w **CS** и концентрацией C (**CS**). Затем, полученную суспензию Fe-COOH по истечении $t_{\text{акт}}$ центрифугировали при 2000 об/мин, супернатант отбрасывали, а образовавшийся осадок повторно суспендировали в 50 мл воды и центрифугировали при тех же условиях. Образовавшийся осадок активированных микрочастиц Fe-COOH смешивали с 20 мл воды очищенной и приливали полученную суспензию к раствору хитозана. Реакцию проводили в течение $t_{\text{прис.}}$ (**время присоединения**) при интенсивном перемешивании. Далее, полученные микрочастицы Fe-CS извлекали из реакционной массы путем центрифугирования при 2500 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость отделяли, а осадок смешивали с 50 мл дистиллированной воды и повторно центрифугировали при тех же условиях. Очищенные микрочастицы **Fe-CS** высушивали лиофильно. Исследуемые параметры синтеза Fe-CS приведены в разделе 3.1.

2.8. Определение оптимальных параметров конъюгирования

Навеску микрочастиц Fe-CS массой 10 мг суспендировали в 10 мл фосфатного буферного раствора. К полученной суспензии прибавляли раствор натрия трифосфата с концентрацией **C (ТФН)**, затем, образовавшуюся смесь перемешивали в течение **t_{ТФН}** и добавляли раствор доксорубицина в фосфатном буфере с концентрацией **C (ДОКС)**, и осуществляли конъюгацию в течение исследуемого времени **t_{ДОКС}**. Далее, полученный конъюгат центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 минут. Образовавшийся в результате осадок Fe-CS-ДОКС лиофильно высушивали, а супернатант анализировали методом УФ-спектроскопии при длине волны 480 нм. Расчет емкости загрузки доксорубицина проводили в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.5. Значения параметров конъюгирования приведены в таблице 3. Приготовление буферных растворов осуществляют в соответствии с ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы» ГФ XIV [158].

Таблица 3 – Параметры получения конъюгата Fe-CS-ДОКС

Исследуемые параметры конъюгирования	Значения параметров конъюгирования				
	C (ТФН), мг/мл	C (ДОКС), мг/мл	t _{ТФН} , мин.	t _{ДОКС} , мин.	pH среды
C (ТФН), мг/мл	0,5-2,0	1,0	15	15	5,5
C (ДОКС), мг/мл	1,0	0,5-2,0	15	15	5,5
t_{ТФН}, мин.	1,0	1,0	15-60	15	5,5
t_{ДОКС}, мин.	1,0	1,0	30	15-60	5,5
pH среды	1,0	1,0	30	30	3,3-7,4

2.9. Изучение контрастных свойств носителя Fe-CS

Навеску микрочастиц Fe-CS массой 40 мг суспендировали в 10 мл физиологического раствора натрия хлорида, далее, образец полученной суспензии в объеме 200 мкл вводили в хвостовую вену экспериментальных животных (мышь гибридной линии (F1 C57B2/6 XDBA) с перевитой саркомой Льюиса). Животных наркотизировали путем внутримышечного введения препарата «Телазол». В

эксперименте использовали 8 мышей, массой до 50-65 г. Масса опухоли составляла 5-7 г и во всех случаях располагалась на задней лапке мыши. Условия МРТ-анализа: МРТ-томографию в T1- взвешенном спин-эхо режиме проводили при величинах TR=710 мс, TE=10 мс в сагиттальных, аксиальных и фронтальных плоскостях. Исследование в T2-режиме проводили при величинах TR=2000 мс, TE=105 мс. Толщина срезов составляет 3-5 мм, матрица 256x256, поле зрения 200x200 мм. Поглощение микрочастиц тканями оценивали визуально как изменение интенсивности T1 и T2-сигнала МРТ, и также количественно, с расчетом индекса усиления (ИУ) T1/T2- взв. МРТ, как отношение интенсивности на элемент изображения (уравнение 8):

$$\text{ИУ} = \frac{\left(\text{Средн. Инт.} \frac{T1}{T2} \text{-взв. МРТ} \right)_{Fe(0)}}{\left(\text{Средн. Инт.} \frac{T1}{T2} \text{-взв. МРТ} \right)_{\text{исходн.}}} \quad (8)$$

2.10. Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку экспериментально полученных данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 8.0, Microsoft Excel, в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» с использованием критерия Стьюдента [158].

Статистическую обработку результатов биологического эксперимента проводили с использованием параметрических (Стьюдента) и непараметрических (Манна-Уитни) критериев с помощью пакета Statistica 8.0, Microsoft Excel.

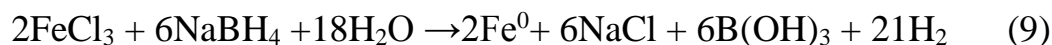
Глава 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ПОЛУЧЕНИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИИ МИКРОЧАСТИЦ Fe-CS И КОНЬЮГАТА Fe-CS-ДОКС

3.1. Синтез микрочастиц Fe-CS и конъюгата Fe-CS-ДОКС

Как описано в разделах 1.2.3 и 1.3., методики, используемые при создании систем доставки лекарственных средств на основе неорганических материалов должны обеспечивать получение носителя с высокой стабильностью, мономодальным распределением размеров и наличием функциональных групп на поверхности для инкапсуляции ХТС. Однако, помимо описанных требований, не менее важными аспектами так же остаются низкая токсичность (уменьшение количеств используемых реагентов и растворителей, а также токсичных отходов) и высокая экономическая эффективность данных методов (минимальное количество стадий, а также затрат труда и времени), в связи с этим, разработка одnoreакторных способов получения СДЛС является актуальным направлением в данной области. Более того, разработка методик стандартизации многокомпонентных СДЛС, с целью обеспечения их безопасного и эффективного применения в медицинской практике так же является обязательной и нетривиальной задачей.

3.1.1. Разработка методики получения микрочастиц Fe-CS с заданными размерами

Микрочастицы Fe-CS получали путем восстановления соли FeCl₃ с использованием NaBH₄ (уравнение 9), с последующей ступенчатой модификацией поверхности образовавшихся частиц 4-карбоксибензилдиазония тозилатом и хитозаном (рисунки 10, 11), проводимой с целью повышения стабильности носителя, а также для увеличения емкости загрузки ХТС.



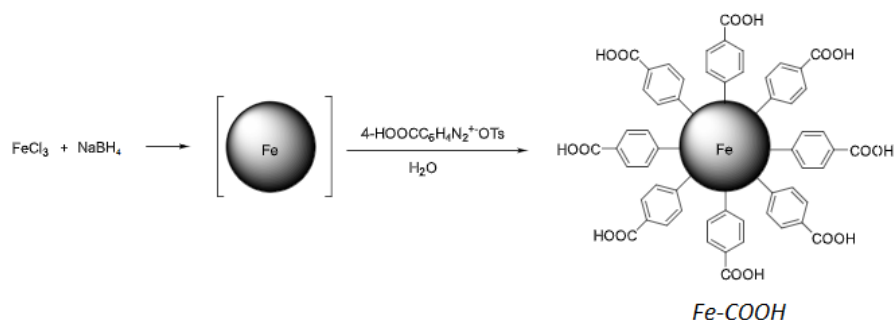


Рисунок 10 – Получение и модификация поверхности микрочастиц Fe(0) с использованием 4-карбоксивензилдiazония тозилата (4-КБДТ)

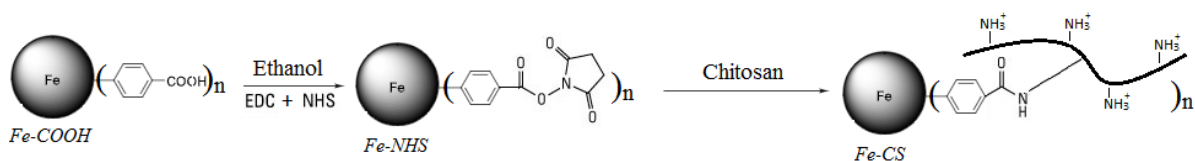


Рисунок 11 – Ковалентное присоединение хитозана к поверхности микрочастиц Fe-COOH

Метод получения микрочастиц для доставки ЛС должен обеспечивать мономодальное распределение их размеров в диапазоне от 1 до 10 мкм, так как системное введение более крупных частиц (10-25 мкм) характеризуется риском нецелевой эмболизации с последующим повреждением здоровых органов и тканей, а введение частиц крупнее 25 мкм существенно увеличивает вероятность ее возникновения. Таким образом, проведена оценка влияния параметров синтеза и модификации микрочастиц Fe(0) на их размер. В ходе отработки параметров получали 3 серии экспериментальных образцов (1-45) при одинаковых условиях. Синтез микрочастиц Fe-COOH на данном этапе осуществляли в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.7.

3.1.1.1. Определение оптимальной концентрации Fe^{3+}

Исходные параметры синтеза микрочастиц и результаты проведенных экспериментов отражены в таблице 4. Графики распределения размеров представлены на рисунке 12.

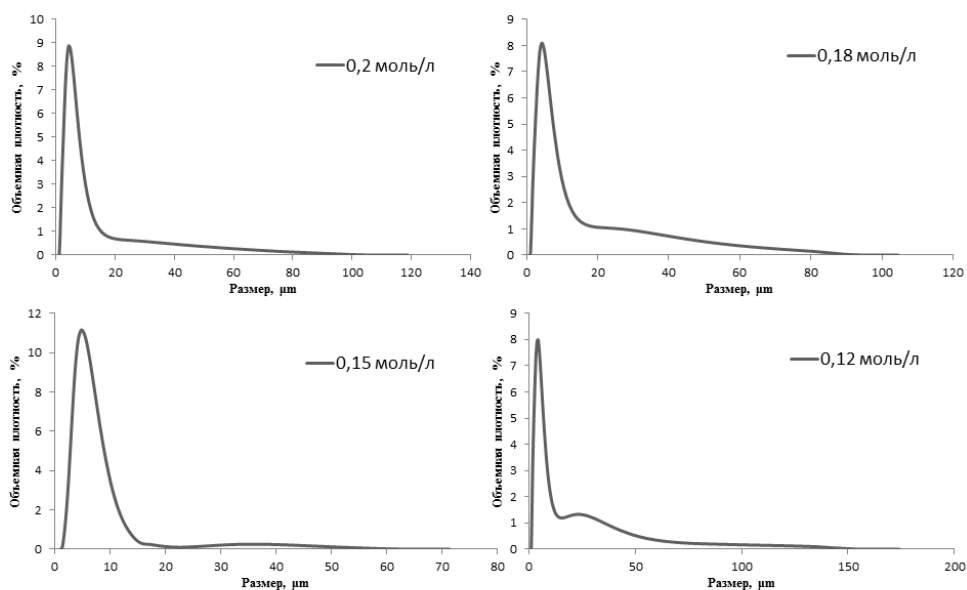


Рисунок 12 – Распределение размеров микрочастиц Fe-COOH в зависимости от начальной концентрации FeCl₃.

Таблица 4 – Влияние начальной концентрации FeCl₃ на размер образующихся микрочастиц Fe-COOH

Исходные параметры синтеза микрочастиц		
Концентрация NaBH ₄ , моль/л		0,45
Скорость подачи раствора NaBH ₄ , мл/мин		15,0
Концентрация 4-КБДТ, ммоль/л		47,0
Время синтеза микрочастиц, мин		10,0
Время стабилизации микрочастиц, мин		40,0
Результаты определения оптимальной концентрации FeCl₃		
Образец, №	C (FeCl ₃), моль/л	Содержание фракции 1-10 мкм, %
1	0,20	89,7±0,2
2	0,18	86,1±0,2
3	0,15	95,3±0,3
4	0,12	84,6±0,4

Среди полученных образцов микрочастиц Fe-COOH наибольшее содержание целевой фракции (1-10 мкм) достигнуто при начальной концентрации ионов Fe³⁺ равной 0,15 моль/л, а увеличение или уменьшение начальной концентрации приводит к росту размеров частиц и, соответственно, к снижению содержания

целевой фракции. Таким образом, для дальнейшей работы выбрана начальная концентрация FeCl_3 , равная 0,15 моль/л.

3.1.1.2. Определение оптимальной концентрации NaBH_4

Исходные параметры синтеза и результаты проведенных экспериментов отражены в таблице 5. Графики распределения размеров представлены на рисунке 13.

Таблица 5 – Влияние начальной концентрации NaBH_4 на размер образующихся микрочастиц Fe-COOH

Исходные параметры синтеза микрочастиц		
Концентрация FeCl_3 , моль/л		0,15
Скорость подачи раствора NaBH_4 , мл/мин		15,0
Концентрация 4-КБДТ, ммоль/л		47,0
Время синтеза микрочастиц, мин		10,0
Время стабилизации микрочастиц, мин		40,0
Результаты определения оптимальной концентрации NaBH_4		
Образец, №	С (NaBH_4), моль/л	Содержание фракции 1-10 мкм, %
5	0,60	84,0±0,2
6	0,54	84,3±0,3
7	0,45	95,3±0,3
8	0,36	82,7±0,4

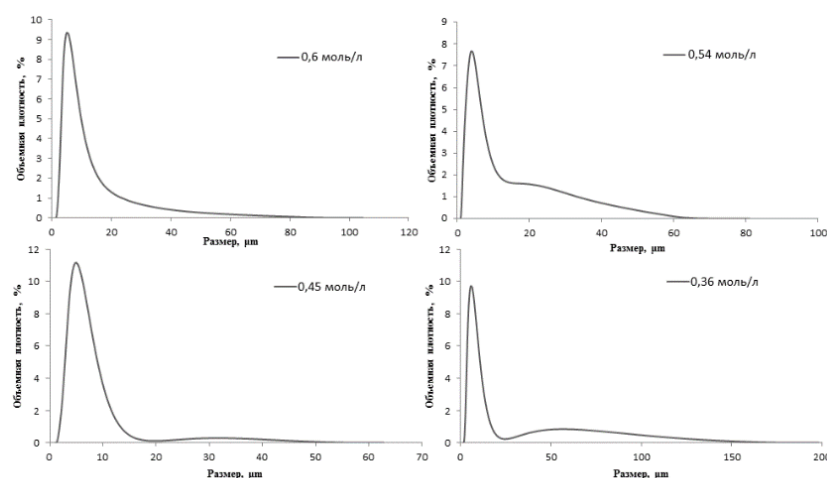


Рисунок 13 – Распределение размеров микрочастиц Fe-COOH в зависимости от концентрации NaBH_4 .

Исходя из результатов эксперимента, наибольшее содержание целевой фракции микрочастиц достигается при использовании концентрации NaBH_4 равной 0,45 моль/л. Как и на предыдущем этапе, увеличение или уменьшение начальной концентрации приводит к значительному снижению содержания целевой фракции, более того, при низкой концентрации NaBH_4 , происходит окисление образующихся частиц, о чем свидетельствует изменение окраски реакционной смеси с черной на светло-коричневую. Таким образом, в ходе проведенных экспериментов установлено, что использование стехиометрических соотношений FeCl_3 и NaBH_4 (0,15 и 0,45 моль/л исходя из уравнения 9) является наиболее оптимальным, поскольку позволяет достичь максимального содержания целевой фракции.

3.1.1.4. Определение оптимальной скорости подачи раствора NaBH_4

Полученные результаты экспериментов, а также исходные параметры синтеза микрочастиц Fe-COOH представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Влияние скорости подачи раствора NaBH_4 на содержание фракции 1-10 мкм

Исходные параметры синтеза микрочастиц		
Концентрация FeCl_3 , моль/л		0,15
Концентрация NaBH_4 , моль/л		0,45
Концентрация 4-КБДТ, ммоль/л		47,0
Время синтеза микрочастиц, мин		10,0
Время стабилизации микрочастиц, мин		40,0
Результаты определения оптимальной скорости подачи NaBH_4		
Образец, №	V (NaBH_4), мл/мин	Содержание фракции 1-10 мкм, %
9	20	89,3±0,3
10	15	95,0±0,2
11	8,6	83,0±0,2

Исходя из полученных результатов, скорость подачи восстанавливающего агента 15 мл/мин обеспечивает наиболее узкий диапазон распределения размеров. Снижение или увеличение скорости подачи NaBH_4 , в свою очередь, приводит к значительному укрупнению микрочастиц и, как следствие, к снижению

содержания целевой фракции, вследствие неадекватного содержания NaBH_4 в реакционной смеси (нарушение баланса между процессами синтеза частиц и их укрупнения).

3.1.1.2. Определение оптимальной начальной концентрации 4-карбоксибензилдiazоний тозилата и времени стабилизации микрочастиц Fe-COOH

Графики распределения размеров представлены на рисунках 14 и 15. Полученные в ходе проведения эксперимента результаты, а также исходные параметры синтеза отражены в таблице 7.

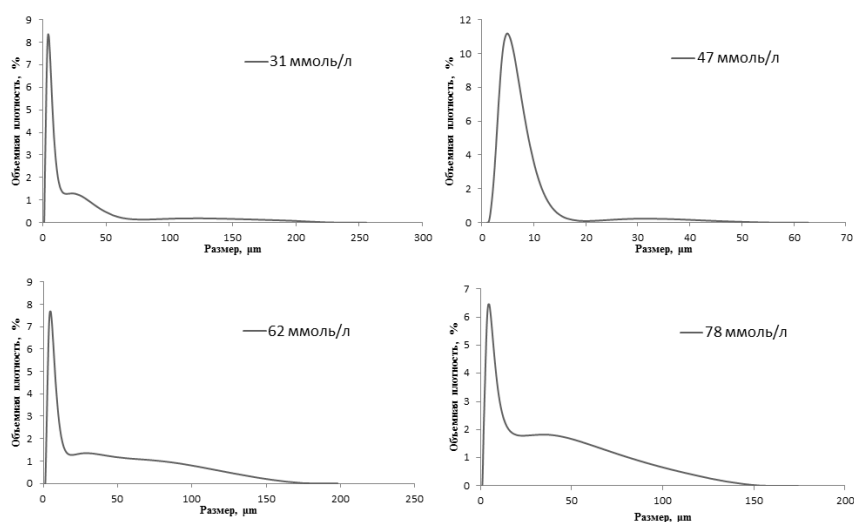


Рисунок 14 – Распределение размеров микрочастиц Fe-COOH в зависимости от начальной концентрации 4-КБДТ.

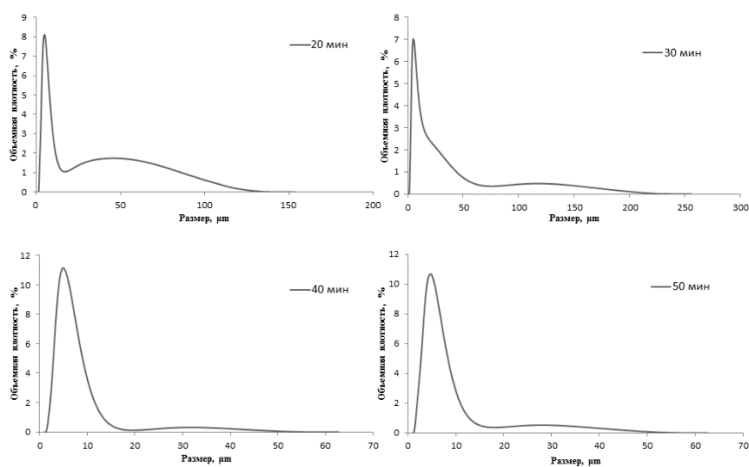


Рисунок 15 – Распределение размеров микрочастиц Fe-COOH в зависимости от времени их модификации.

Таблица 7 – Результаты оценки влияния концентрации 4-КБДТ и времени стабилизации микрочастиц Fe-COOH на содержание фракции 1-10 мкм.

Исходные параметры синтеза микрочастиц			
Концентрация FeCl ₃ , моль/л		0,15	
Концентрация NaBH ₄ , моль/л		0,45	
Скорость подачи раствора NaBH ₄ , мл/мин		15,0	
Время синтеза микрочастиц, мин		10,0	
Результаты определения оптимальной начальной концентрации 4-КБДТ и времени стабилизации микрочастиц			
Образец, №	Параметры	Значения	Содержание фракции 1-10 мкм, %
Время стабилизации – 40 мин			
12	С (4-КБДТ), ммоль/л	31	83,5±0,4
13		47	95,6±0,4
14		62	76,3±0,3
15		78	69,8±0,2
Начальная концентрация 4-КБДТ – 47 ммоль/л			
16	t _{стаб.} , МИН	20	75,4±0,4
17		30	70,4±0,4
18		50	93,9±0,3

Исходя из результатов эксперимента, наиболее однородное распределение размеров достигается при использовании начальной концентрации 4-КБДТ равной 47 ммоль/л и стабилизации образующихся частиц в течение 40 минут. Изменение начальной концентрации диазониевой соли или времени стабилизации микрочастиц, вызывает значительное увеличение содержания более крупных фракций. Данное явление объясняется исходя из механизма стабилизации. В водных растворах 4-КБДТ (рисунок 16) склонен к образованию карбоксифенильных радикалов, которые, в свою очередь, образуют ковалентную связь, с поверхностью микрочастиц Fe(0), формируя органический слой (рисунок 17А). Повышение концентрации радикалов в реакционной смеси вследствие увеличения начальной концентрации 4-КБДТ, приводит к росту органического слоя, за счет их взаимодействия с остатками бензойной кислоты на поверхности микрочастиц Fe(0) (рисунок 17В). Снижение начальной

концентрации, напротив, приводит к образованию тонкого и неравномерного органического слоя, что в свою очередь приводит к значительному снижению стабильности микрочастиц Fe(0) и их укрупнению, вследствие интенсификации процесса агрегации [148].

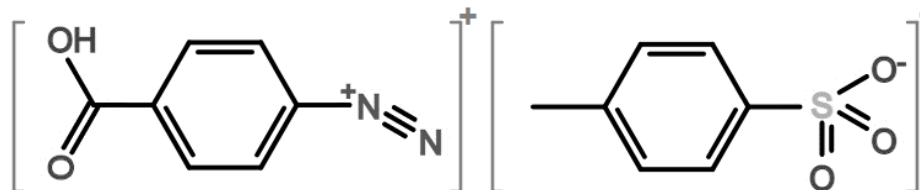


Рисунок 16 – Структурная формула 4-карбоксивензилдизония тозилата

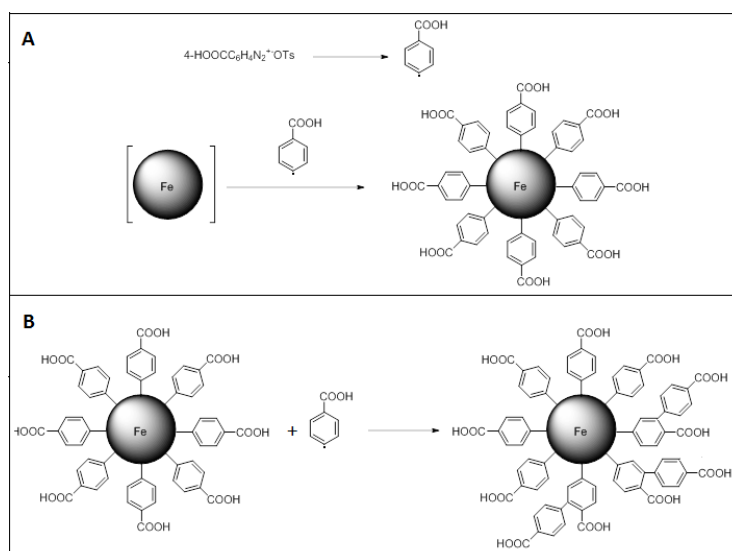


Рисунок 17 – Модификация поверхности микрочастиц Fe(0) (А) и рост органического слоя (В)

Помимо начальной концентрации 4-КБДТ, в ходе эксперимента установлено влияние времени стабилизации микрочастиц на однородность распределения их размеров. Как и при высоких концентрациях стабилизирующего агента, увеличение времени взаимодействия карбоксифенильных радикалов с поверхностью частиц так же приводит к их укрупнению вследствие роста органического слоя, тогда как уменьшение времени стабилизации, приводит к формированию тонкого и неоднородного органического слоя не позволяющего обеспечить достаточную степень стабилизации. Более того, о низкой стабильности образующихся при данных условиях микрочастиц так же свидетельствует их

интенсивное окисление при хранении в водной среде при комнатной температуре в течение 30 минут (изменение окраски суспензии с черной на светло-коричневую).

Подтверждение ковалентного присоединения бензойной кислоты осуществляли методом ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием (рисунок 18) по методике, описанной в разделе 2.2.

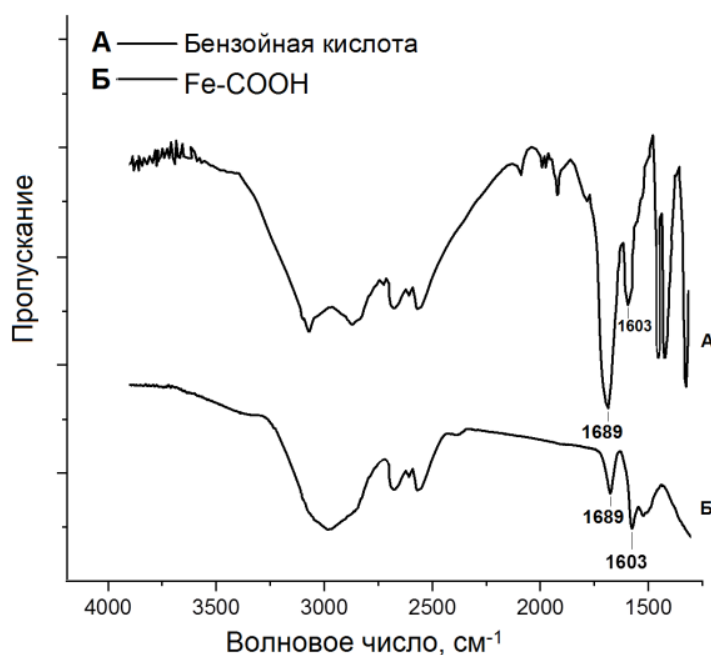


Рисунок 18 – ИК-спектры бензойной кислоты и микрочастиц Fe-COOH

При сравнении спектров поглощения микрочастиц Fe-COOH и бензойной кислоты наблюдаются общие полосы поглощения в диапазоне ν_{OH} 3200-2500 cm^{-1} и $\nu_{\text{C=O}}$ 1689 cm^{-1} , указывающие на присутствие карбоксильной группы (-COOH). Более того, полоса поглощения $\nu_{\text{C-C}}$ 1603 cm^{-1} , свидетельствует о присутствии бензольного кольца. Таким образом, полученные результаты могут подтверждать присоединение карбоксифенильных радикалов к поверхности микрочастиц.

3.1.1.3. Определение оптимального времени синтеза микрочастиц

Результаты экспериментов по определению оптимального времени синтеза микрочастиц Fe-COOH отражены в таблице 8. Графики распределения размеров представлены на рисунке 19.

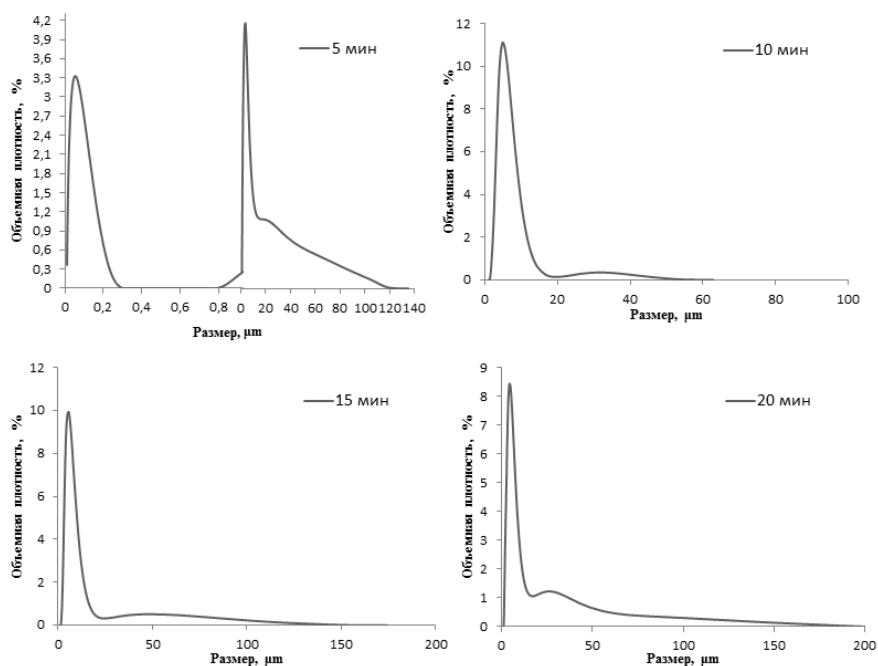


Рисунок 19 – Распределение размеров микрочастиц Fe-COOH в зависимости от времени их синтеза

Таблица 8 – Влияние времени синтеза микрочастиц Fe-COOH на содержание фракции 1-10 мкм.

Исходные параметры синтеза микрочастиц		
Концентрация FeCl ₃ , моль/л		0,15
Концентрация NaBH ₄ , моль/л		0,45
Концентрация 4-КБДТ, ммоль/л		47,0
Скорость подачи раствора NaBH ₄ , мл/мин		15,0
Время стабилизации микрочастиц, мин		40,0
Результаты определения оптимального времени синтеза микрочастиц Fe-COOH		
Образец, №	t _{синт.} , мин.	Содержание фракции 1-10 мкм, %
19	5	43,2±0,4
20	10	95,0±0,3
21	15	87,0±0,3
22	20	83,4±0,5

Как показали результаты экспериментов, при синтезе частиц в течение 5 минут (**19**) наблюдалось самое низкое содержание целевой фракции, тогда как

серия образцов, полученная при времени образования равном 10 минутам (20), напротив, характеризуется самым высоким ее содержанием. При проведении синтеза микрочастиц в течение 15 и 20 минут, происходит значительное расширение диапазона их размеров и, соответственно, снижение содержания целевой фракции.

Столь существенное влияние данного параметра на размер микрочастиц объясняется особенностью процесса их синтеза. На начальном этапе, образуются наноразмерные частицы железа, затем, происходит их постепенное укрупнение до микроразмеров, вследствие агломерации и формирования дополнительных слоев Fe(0) вокруг наноразмерных ядер. Последующее укрупнение частиц до 50 и более микрометров, происходит в ходе продолжающегося процесса агломерации. Введение стабилизатора на определенном этапе синтеза предотвращает протекание данных процессов, что приводит к прекращению укрупнения частиц и, тем самым, к преобладанию определенных фракций.

Таким образом, в ходе всех проведенных экспериментов установлены оптимальные значения параметров синтеза микрочастиц Fe-COOH (таблица 9), позволяющие достичь высокого содержания целевой фракции - не менее 95%.

Таблица 9 – Оптимальные параметры синтеза микрочастиц Fe-COOH

Параметр	Значение
Начальная концентрация FeCl ₃ , моль/л	0,15
Начальная концентрация NaBH ₄ , моль/л	0,45
Начальная концентрация 4-КБДТ, ммоль/л	47
Время стабилизации, мин	40
Время синтеза частиц, мин	10
Скорость подачи NaBH ₄ , мл/мин	15

На следующем этапе, осуществляли синтез носителя Fe-CS, путем ковалентного присоединения хитозана к поверхности полученных микрочастиц Fe-COOH с целью достижения максимальной значения емкости загрузки

доксорубицина (DLC) и повышения стабильности системы. Синтез проводили в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.7.

Как отмечено в разделе 1.3., для ковалентного присоединения хитозана к поверхности микрочастиц, необходима предварительная активация карбоксильных групп использованием N-гидроксисукцинимид (NHS) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорида (EDC). В связи с этим, изучено влияния таких параметров, как начальные концентрации EDC, NHS и CS, молекулярная масса CS, а также время проведения модификации микрочастиц на емкость загрузки доксорубицина. Оценку емкости загрузки получаемых микрочастиц, в свою очередь, осуществляли в соответствии с методикой, описанной в разделе 2.8., с использованием параметров конъюгации, представленных в таблице 10.

Таблица 10 – Параметры конъюгации микрочастиц Fe-CS с доксорубицином

Параметры конъюгации	Значения
Концентрация доксорубицина, мг/мл	1,0
Концентрация натрия трифосфата, мг/мл	1,0
Время конъюгации Fe-CS и ТФН, мин.	15,0
Время конъюгации Fe-CS-ТФН и ДОКС, мин.	15,0
рН среды	5,5

3.1.1.5. Определение оптимальной концентрации EDC

Результаты проведенных экспериментов, а также исходные параметры синтеза микрочастиц Fe-CS и представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты оценки влияния начальной концентрации EDC на емкость загрузки ДОКС

Исходные параметры синтеза микрочастиц		
Концентрация NHS, моль/л		0,07
Концентрация хитозана, мг/мл		1,0
Время активации микрочастиц, час		1,0
Молекулярная масса хитозана, кДа		190-310
Время присоединения хитозана, час.		12,0
Результаты определения оптимальной концентрации EDC		
Образец, №	C (EDC), моль/л	DLC, мг/мг доксорубицина
23	0,070	0,41±0,03
24	0,140	0,56±0,04
25	0,280	0,61±0,01
26	0,560	0,63±0,02

Среди полученных серий образцов микрочастиц Fe-CS рациональным является использование начальной концентрации EDC равной 0,280 моль/л. Снижение концентрации, в свою очередь, приводит к существенному уменьшению емкости загрузки, тогда как ее увеличение не способствует значительному повышению DLC. Это связано с уменьшением числа модифицированных карбоксильных групп, в результате чего, происходит снижение количества ковалентно-связанного хитозана, который в свою очередь участвует в конъюгации доксорубицина. Более того, рост значения DLC при высоких концентрациях EDC объясняется увеличением скорости реакции, поскольку величина данного параметра изменяется прямо пропорционально в зависимости от мольного соотношения реагентов EDC/NHS к карбоксигруппам.

3.1.1.6. Определение оптимальной концентрации NHS и времени проведения активации

Результаты оценки влияния параметров синтеза микрочастиц Fe-CS на емкость загрузки доксорубицина, а также исходные параметры их получения представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты оценки влияния параметров синтеза микрочастиц Fe-CS на емкость загрузки доксорубицина

Исходные параметры синтеза микрочастиц			
Концентрация EDC, моль/л			0,28
Концентрация хитозана, мг/мл			1,0
Молекулярная масса хитозана, кДа			190-310
Время присоединения хитозана, час			12,0
Результаты определения оптимальной концентрации NHS и времени активации			
Образец, №	Параметры	Значения	DLC, мг/мг доксорубицина
Время активации – 1 час			
27	С (NHS), моль/л	0,070	0,63±0,01
28		0,140	0,68±0,03
29		0,560	0,72±0,02
Концентрация NHS– 0,280 моль/л			
30	t _{акт.} , час	0,5	0,65±0,04
31		1,0	0,71±0,03
32		3,0	0,72±0,02

Наиболее высокая емкость загрузки доксорубицина наблюдалась при проведении активации в течение 1 часа с использованием начальных концентраций NHS равных 0,280 и 0,560 моль/л. Снижение концентрации модифицирующего агента, напротив, приводило к уменьшению содержания ДОКС в конъюгате Fe-CS-ДОКС, что объясняется зависимостью скорости протекания реакции модификации от соотношения концентраций EDC/NHS и карбоксильных групп. Более того, при низких концентрациях, происходит снижение полноты функционализации, что обуславливает уменьшение количества присоединившегося хитозана и, как следствие, уменьшение содержания терапевтического агента в конъюгате. Присоединения хитозана к поверхности микрочастиц Fe-COOH проводится в

водной среде при pH равной 7,0-7,4, в связи с чем, для достижения максимальной полноты ее протекания, необходимо получение устойчивых к гидролизу активированных производных. В свою очередь, модификация с использованием NHS позволяет получить соединения с высокой реакционной способностью и стабильностью в водных средах, по сравнению с EDC-производными, которые в высокой степени подвержены гидролизу. Таким образом, использование высоких начальных концентраций исследуемого реагента способствует увеличению содержания NHS-модифицированных карбоксильных групп на поверхности носителя Fe-COOH, что оказывает положительное влияние на полноту присоединения хитозана и, как следствие, на емкость загрузки доксорубицина.

При исследовании влияния времени модификации установлено, что проведение реакции в течение 1 часа (31) обеспечивает достижение высокой емкости загрузки доксорубицина. Дальнейшее увеличение времени модификации не приводит к существенному повышению DLC, что свидетельствует о достижении максимальной степени модификации микрочастиц. Уменьшение времени реакции, в свою очередь, способствует неполной функционализации карбоксильных групп, что приводит к снижению содержания хитозана на поверхности микрочастиц и, соответственно, емкости загрузки доксорубицина.

3.1.1.7. Определение оптимальной концентрации и времени присоединения хитозана

Полученные в ходе проведенных экспериментов результаты, а также исходные параметры синтеза микрочастиц Fe-CS представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты оценки влияния начальной концентрации и времени присоединения CS на емкость загрузки ДОКС

Исходные параметры синтеза микрочастиц			
Концентрация EDC, моль/л		0,28	
Концентрация NHS, моль/л		0,28	
Молекулярная масса хитозана, кДа		190-310	
Время активации микрочастиц, час		1,0	
Результаты определения оптимальной концентрации CS и времени активации			
Образец, №	Параметры	Значения	DLC, мг/мг доксорубицина
Время присоединения CS– 12 часов			
33	C(CS), мг/мл	0,25	0,63±0,03
34		0,5	0,65±0,02
35		1,0	0,71±0,02
36		2,0	0,72±0,04
Концентрация CS– 1,0 мг/мл			
37	t _{прис.} , ч.	3	0,44±0,04
38		6	0,59±0,05
39		24	0,73±0,02

Исходя из полученных данных, проведение реакции в течение 12 часов и начальной концентрации CS равной 1,0 мг/мл (**35**) позволяет достичь высокой емкости загрузки доксорубицина и является наиболее оптимальным. Дальнейшее повышение концентрации хитозана и времени его присоединения не приводит к существенному повышению DLC, что свидетельствует о максимальной полноте прохождения данной модификации. Снижение начальных значений исследуемых параметров, напротив, способствует значительному уменьшению содержания доксорубицина в конъюгате, что объясняется образованием более тонкого и менее равномерного слоя хитозана вокруг поверхности Fe-COOH. Подтверждение ковалентного присоединения хитозана к микрочастицам Fe-COOH осуществляли методом ИК-спектроскопии (рисунок 20).

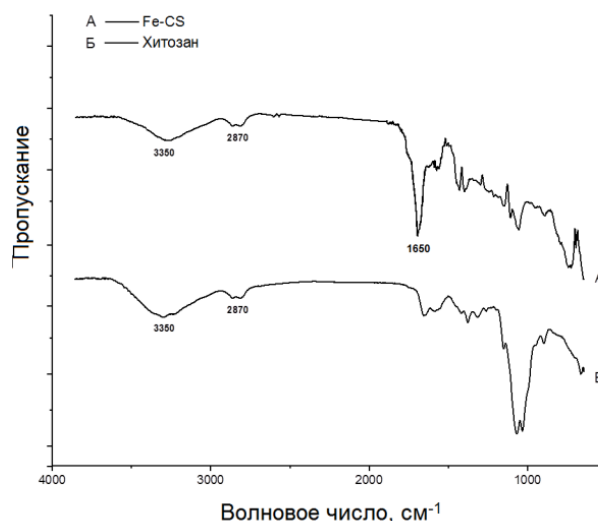


Рисунок 20 – ИК-спектры микрочастиц Fe-CS и чистого хитозана

Спектры микрочастиц Fe-CS и хитозана характеризуется наличием общих полос поглощения при длинах волн 3350 см^{-1} (ν_{OH}) и 2870 см^{-1} (ν_{CH}). Увеличение интенсивности полосы поглощения при 1650 см^{-1} (ν_{CONH_2}) в спектре Fe-CS указывает на присутствие амидной связи, которая свидетельствует о ковалентном присоединении хитозана.

3.1.1.8. Определение влияния молекулярной массы CS на емкость загрузки ДОКС

Исходные параметры синтеза микрочастиц Fe-CS, а также результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты оценки влияния молекулярной массы CS на емкость загрузки ДОКС

Исходные параметры синтеза микрочастиц			
Концентрация EDC, моль/л		0,28	
Концентрация хитозана, мг/мл		1,0	
Время активации микрочастиц, час		1,0	
Концентрация NHS, моль/л		0,28	
Время присоединения хитозана, час.		12,0	
Результаты определения оптимальной молекулярной массы хитозана			
Образец, №	Параметры	Значения	DLC, мг/мг доксорубицина
40	M_w CS, кДа	50-190	$0,60 \pm 0,02$
41		190-310	$0,71 \pm 0,03$
42		310-375	$0,70 \pm 0,03$

Исходя из полученных данных, значительное снижение емкости загрузки доксорубицина наблюдается при проведении модификации с использованием низкомолекулярного хитозана, что объясняется меньшим числом аминогрупп в его структуре (по сравнению с хитозаном средней и высокой молекулярной массы), необходимых для образования конъюгата с ТФН и ДОКС. Использование хитозана со средней и высокой молекулярной массой позволяет значительно увеличить емкость загрузки, однако, в связи с высокой стоимостью и низкой скоростью растворения CS с высокой M_w , применение среднемолекулярного хитозана является наиболее рациональным для проведения модификации микрочастиц.

По окончании эксперимента, проводили определение размеров микрочастиц Fe-CS полученных с использованием установленных параметров. В результате, подтверждено незначительное влияние хитозанового покрытия на значение данного параметра, а количественное содержание основной фракции (1-10 мкм) составляло **93,5±0,3 %**.

В результате проведенных экспериментов предложен оптимальный алгоритм получения носителя Fe-CS, с содержанием фракции 1-10 мкм не менее 93 %.

3.1.2. Синтез конъюгата Fe-CS с ДОКС

На данном этапе проведено изучение влияния параметров конъюгирования Fe-CS и ДОКС (начальные концентрации ТФН и ДОКС, pH, время проведения конъюгации) на емкость загрузки доксорубицина, а также разработана однореакторная методика получения конъюгата Fe-CS-ДОКС. В ходе отработки параметров синтеза получали 3 серии экспериментальных образцов (**43-59**) по методике, описанной в разделе 2.8., с использованием исходных параметров конъюгирования, представленных в таблице 3.

3.1.2.1. Определение влияния концентрации ТФН на емкость загрузки ДОКС

Результаты оценки влияния исследуемого параметра на емкость загрузки доксорубицина представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты оценки влияния начальной концентрации ТФН на емкость загрузки ДОКС

Образец, №	Параметры	Значения	DLC, мг/мг доксорубицина
43	С(ТФН), мг/мл	0,5	0,38±0,02
44		0,75	0,57±0,03
45		1,0	0,71±0,02
46		2,0	0,73±0,05

В ходе экспериментов установлено оптимальное значение начальной концентрации ТФН, равное 1,0 мг/мл (**45**). Дальнейшее повышение концентрации ТФН не приводит к существенному увеличению содержания ДОКС в конъюгате, тогда как ее уменьшение способствует значительному снижению количества конъюгированного ХТС. Полученные результаты свидетельствуют о прямо пропорциональной зависимости величины емкости загрузки доксорубицина от содержания ТФН в конъюгате Fe-CS-ТФН. При низких начальных концентрациях трифосфата натрия происходит недостаточное насыщение активных центров (амоногрупп) хитозана и, как следствие уменьшение его содержание в конъюгате Fe-CS-ТФН, что приводит к снижению конъюгирующей способности носителя в отношении ХТС. Использование избыточных количеств ТФН так же не приводит к значительному увеличению конъюгирующей способности носителя, в связи с ограниченным числом свободных аминогрупп в структуре хитозана.

3.1.2.2. Определение оптимальной концентрации доксорубицина

Результаты проведенных экспериментов по определению оптимальной концентрации доксорубицина для получения конъюгата Fe-CS-ДОКС представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты определения оптимальной концентрации ДОКС

Образец, №	Параметры	Значения	DLC, мг/мг доксорубицина
47	С(ДОКС), мг/мл	0,5	0,44±0,03
48		0,75	0,63±0,02
49		1,0	0,72±0,02
50		2,0	0,73±0,03

В ходе экспериментов установлено оптимальное значение начальной концентрации ДОКС, равное 1 мг/мл (**49**). Дальнейшее увеличение концентрации не приводит к существенному повышению содержания доксорубицина, в связи с прямой зависимостью конъюгирующей способности Fe-CS-ТФН от количества остатков -CS-ТФН, обеспечивающих электростатическое связывание ДОКС. Таким образом, в ходе эксперимента установлены оптимальные условия конъюгирования доксорубицина, при которых обеспечивается максимальная емкость его загрузки.

3.1.2.3. Определение оптимального времени конъюгации Fe-CS и ТФН

Результаты оценки влияния времени конъюгации микрочастиц Fe-CS и ТФН на емкость загрузки доксорубицина представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты определения оптимального времени конъюгации Fe-CS и ТФН

Образец, №	Параметр	Значения	DLC, мг/мг доксорубицина
51	t _{ТФН} , МИН	15	0,70±0,03
52		30	0,79±0,03
53		60	0,80±0,02

В ходе эксперимента установлено, что серии конъюгатов Fe-CS-ТФН полученные при проведении реакции в течение 30 и 60 минут обладают большей емкостью загрузки доксорубицина, что объясняется зависимостью полноты протекания данного процесса от времени его проведения. Исходя из полученных данных, оптимальным является проведение конъюгации в течение 30 минут, так

как дальнейшее увеличение времени реакции (**53**) не приводит к значимому росту емкости загрузки доксорубицина. Снижение времени проведения процесса конъюгации, оказывало значительное влияние на содержание доксорубицина в составе Fe-CS-ДОКС (**51**), что так же подтверждает зависимость полноты протекания данного процесса от времени его прохождения.

3.1.2.4. Определение оптимального времени конъюгации Fe-CS-ТФН и ДОКС

Результаты оценки влияния исследуемого параметра на емкость загрузки доксорубицина представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты определения оптимального времени конъюгации Fe-CS-ТФН и ДОКС

Образец, №	Параметр	Значения	DLC, мг/мг доксорубицина
54	t _{ДОКС} , мин	15	0,78±0,04
55		30	0,90±0,03
56		60	0,91±0,04

В ходе проведенных экспериментов установлено, что серии конъюгатов Fe-CS-ДОКС полученные при проведении реакции в течение 30 и 60 минут характеризуются большим содержанием доксорубицина, что, так же как и в предыдущем эксперименте обусловлено различной полнотой протекания реакции. Исходя из полученных данных, оптимальным является конъюгирование в течение 30 минут, так как дальнейшее увеличение времени реакции не приводит к значимому изменению емкости загрузки доксорубицина (**55, 56**).

3.1.2.5. Изучение влияния pH среды на содержание доксорубина в конъюгате Fe-CS-ДОКС

Результаты экспериментов по определению оптимального значения pH среды для синтеза конъюгата Fe-CS-ДОКС представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты изучения влияния pH на емкость загрузки ДОКС

Образец, №	Параметр	Значения	DLC, мг/мг доксорубина
57	Значение pH	3,3	0,81±0,03
58		5,5	0,90±0,03
59		7,4	0,34±0,02

Исходя из полученных данных, кислотность среды оказывает существенное влияние на емкость загрузки доксорубина, что объясняется зависимостью прочности электростатических взаимодействий от величины электрического заряда каждого из компонентов системы (ДОКС, ТФН, хитозан) вследствие протонирования и депротонирования их функциональных групп при различных значениях pH.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов разработан однореакторный метод получения конъюгата Fe-CS-ДОКС с мономодальным распределением размеров и емкостью загрузки доксорубина не менее 0,9 мг/мг. Схема получения конъюгата Fe-CS-ДОКС представлена на рисунке 21, химическая схема получения представлена на рисунке 22.

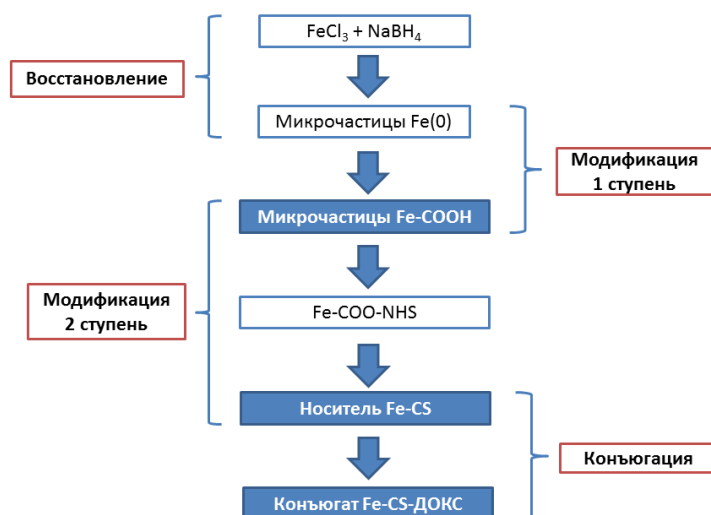


Рисунок 21 – Схема получения конъюгата Fe-CS-ДОКС

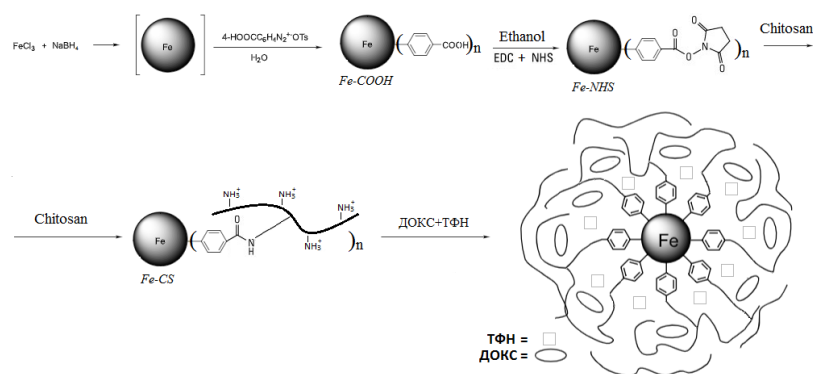


Рисунок 22 – Схема одnoreакторного синтеза конъюгата Fe-CS-ДОКС

Навески $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (406 мг; 1,5 ммоль) и NaBH_4 (171 мг; 2,25 ммоль) по отдельности растворяют в 10 мл дистиллированной воды для приготовления растворов с концентрациями 0,15 и 0,45 моль/л, соответственно. Затем, раствор FeCl_3 переносят в трехгорлую колбу и приливают раствор NaBH_4 со скоростью 15 мл/мин с использованием перестальтического насоса. Синтез проводят при непрерывном барботировании реакционной смеси инертным газом, подаваемым из баллона (азотом, аргоном или гексафторидом серы). Перемешивание осуществляют с использованием магнитной мешалки в течение 10 минут. Затем, к образовавшимся частицам железа приливают 20 мл водного раствора 4-КБДТ с

концентрацией 47 ммоль/л. Полученную смесь оставляют при интенсивном перемешивании в течение 40 минут. Далее, смесь центрифугируют со скоростью 2000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант декантируют, а осадок отмывают путем последовательного суспендирования в воде, этаноле и ацетоне.

Далее, полученные частицы Fe-COOH суспендируют в 20 мл этанола с использованием магнитной мешалки. К полученной суспензии добавляют 10 мл раствора, содержащего N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида гидрохлорид и N-гидроксисукцинимид в концентрациях 0,28 моль/л каждого компонента, соответственно, смесь перемешивают в течение 1 часа. Параллельно готовят раствор хитозана (Mw 190-310) с концентрацией 1,0 мг/мл объемом 50 мл в 1% (об/об) уксусной кислоте. Затем, суспензию Fe-COOH по истечении времени модификации центрифугируют при 2000 об/мин., супернатант отбрасывают, а осадок повторно суспендируют в 50 мл воды и центрифугируют при тех же условиях. Далее, полученные после центрифугирования микрочастицы смешивают с 20 мл воды, приливают к раствору хитозана и оставляют при постоянном перемешивании в течение 12 часов. По завершении модификации, полученную суспензию микрочастиц Fe-CS центрифугируют при 2500 об/мин. в течение 10 минут, супернатант отделяют, а осадок повторно суспендируют в 50 мл дистиллированной воды и центрифугируют при тех же условиях.

Далее, полученные микрочастицы Fe-CS суспендируют в 200 мл фосфатного буферного раствора (pH 5,5) с использованием магнитной мешалки. К полученной суспензии прибавляют раствор натрия трифосфата с концентрацией 1,0 мг/мл объемом 200 мл в фосфатном буферном растворе с pH 7,4 (ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы»). Образовавшуюся смесь интенсивно перемешивают в течение 30 минут на магнитной мешалке, затем, добавляют водный раствор доксорубицина (1,0 мг/мл; 200 мл) и осуществляют конъюгацию в течение еще 30 минут. Далее, полученную реакционную массу центрифугируют при 2000 об/мин. в течение 5 минут. Образовавшийся супернатант отбрасывают, а полученный конъюгат Fe-CS-ДОКС лиофильно высушивают. Структурные

формулы носителя Fe-CS и конъюгата Fe-CS-ДОКС приведены на рисунке 23 (А, Б).

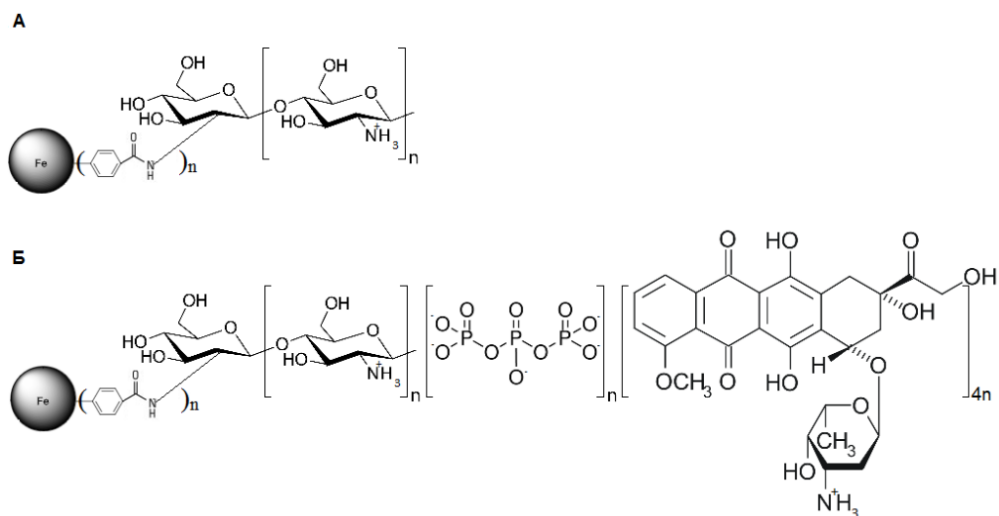


Рисунок 23 – Структурные формулы носителя Fe-CS (А) и конъюгата Fe-CS-ДОКС (Б)

3.2. Стандартизация микрочастиц Fe-CS и Fe-CS-ДОКС

Для стандартизации микрочастиц Fe-CS и конъюгата Fe-CS-ДОКС разработаны методики определения: размеров частиц методом лазерной дифракции, содержания железа методом гравиметрии, натрия трифосфата методом спектрофотометрии и бензойной кислоты, хитозана, доксорубина методом ВЭЖХ.

3.2.1. Определение содержания Fe(0)

Определение содержания железа в конъюгате Fe-CS-ДОКС проводили гравиметрическим методом, описанным в разделе 2.3.1. В ходе проведенных экспериментов проанализировано три серии образцов конъюгата. Полученные данные представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Результаты гравиметрического определения содержания железа в конъюгате Fe-CS-ДОКС

Серия, №	% Fe(0)
1	16,71
2	16,68
3	16,69
Среднее значение	16,69
Доверительный интервал	0,04

Таким образом, установлено количественное содержание железа в системе Fe-CS-ДОКС, которое составило $16,69 \pm 0,04\%$.

3.2.2. Определение содержания трифосфата натрия

Для разработки методики количественного определения трифосфата взяли за основу ОФС 1.2.2.0008.15 «Спектрофотометрическое определение фосфора» ГФ XIV [158]. Указанная статья содержит 3 методики количественного определения фосфора в минеральных объектах, основанных на образовании фосфорномолибденовых кислот с последующим восстановлением (аскорбиновой кислотой, гидразина сульфатом и гидрохиноном). В виду доступности и относительной стабильности аскорбиновой кислоты в работе использовали методику А.

Трифосфат-ион не вступает в реакцию с молибдатами, поэтому основной задачей разработки методики являлся подбор условий кислотного гидролиза и перевода в PO_4 -форму. Для отработки условий использовали раствор трифосфата натрия (20 мкг/мл) и трифторуксусную кислоту 4 М в соотношении 1:1 при нагревании (90 и 100 °С). Время гидролиза составляло от 0,2 до 10 минут. Результаты представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Результаты определения оптимальных параметров гидролиза натрия трифосфата

	PO ₄ 20 мкг/мл	P ₃ O ₁₀ 20 мкг/мл							
T, °C	-	-	90	90	100	100	100	100	100
t, мин	-	-	0,2	1	1	2	5	10	10
A, mAU	0,068	0,001	0,003	0,007	0,011	0,014	0,085	0,160	0,159

Показано, что 10-минутное нагревание на кипящей водяной бане приводит к полному переходу трифосфат-иона в форму фосфата. Правильность методики проверена методом введено-найдено (таблица 22). Калибровочный график представлен на рисунке 24.

Таблица 22 – Результаты оценки правильности методики количественного натрия трифосфата (n=6)

Исходная концентрация ТФН, мг/мл	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	Θ_i , мг/мл	t_i	$t_{\text{табл}}$	$\Delta_{c,i}^*$
0	0,15	0,142±0,03	0,008	1,44	2,57	0,011
	0,1	0,091±0,02	0,009	2,15		0,007
	0,05	0,042±0,007	0,008	1,98		0,009

Θ – значение смещения;

t_i – критерий Стьюдента;

$\Delta_{c,i}^*$ - критерий правильности;

Таким образом, для исследуемых концентраций $t_i \leq t_{\text{табл}}$, следовательно, оценка смещения незначима на фоне случайного разброса, в результате чего, подтверждено отсутствие систематической погрешности, при использовании предложенной методики.

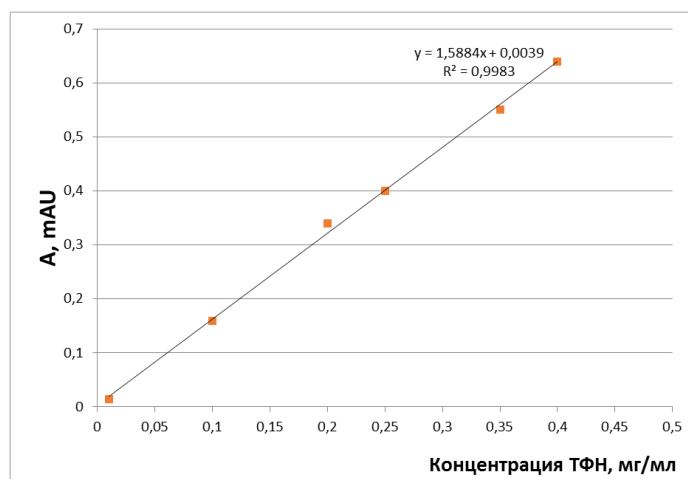


Рисунок 24 – График зависимости величины оптической плотности анализируемых растворов ТФН от его содержания

Таким образом, разработана методика количественного определения натрия трифосфата, а также продемонстрирована возможность ее применения для анализа микрочастиц Fe-CS-ДОКС:

Суспензию микрочастиц Fe-CS объемом 5 мл с концентрацией 1 мг/мл помещают в ампулу и добавляют 5 мл 4 М трифторуксусной кислоты. Далее, ампулу запаивают и проводят гидролиз в термостате при температуре 100 °С в течение 10 минут. Смесь переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 5 минут.

Далее, 2,0 мл полученного супернатанта помещают в мерную колбу на 25 мл и добавляют 10 мл ацетатного буферного раствора (рН 4,1), 2,5 мл 1 % раствора аммония молибдата в серной кислоте и 2,5 мл 1 % раствора аскорбиновой кислоты. Смесь доводят до метки ацетатным буферным раствором и интенсивно перемешивают. Через 10 минут проводят измерение оптической плотности раствора относительно контрольного раствора при длине волны 740 нм. Расчет концентрации осуществляют с использованием калибровочного графика, для построения которого готовят серию из 6 растворов натрия трифосфата с концентрациями 0,01; 0,1; 0,2; 0,25; 0,35; 0,4 мг/мл и проводят пробоподготовку в соответствии с описанной методикой. Приготовление контрольного раствора и раствора аммония молибдата осуществляют в соответствии с ОФС 1.2.2.0008.15

«Спектрофотометрическое определение фосфора» ГФ XIV [158]. Результаты анализа представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Результаты определения содержания натрия трифосфата в конъюгате Fe-CS-ДОКС

Серия, №	%
1	19,20
2	19,15
3	19,13
Среднее значение	19,16
Доверительный интервал	0,09

Таким образом, в ходе эксперимента установлено количественное содержание натрия трифосфата в составе конъюгата Fe-CS-ДОКС – **19,15±0,09%**.

3.2.3. Определение содержания доксорубина, хитозана и бензойной кислоты

На данном этапе, разработана хроматографическая методика и определены условия пробоподготовки, позволяющие проводить количественное определение доксорубина, хитозана и бензойной кислоты в условиях одновременного присутствия ионов Fe^{3+} . Пробоподготовка включает в себя кислотный гидролиз хитозана, в связи с чем, проведено изучение возможности применения концентрированной трифторуксусной кислоты и ее смеси с соляной кислотой, для интенсификации процесса. Для устранения мешающего влияния Fe^{3+} в гидролизат предложено делать добавку 10 эквивалентов ЭДТА для комплексообразования. В эксперименте использовали соляную и трифторуксусную кислоту (ТФУ) в объеме 10 мл, соответственно, и смесь HCl+ТФУ, объемом 10 мл в соотношении 1:1. Результаты эксперимента представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Определение оптимальных параметров гидролиза хитозана

CS2	Т, час	HCl, моль/л			ТФУ, моль/л			HCl (10M)+ТФУ, моль/л		
		8	10	12	2	4	6	2	4	6
GC, %	2	22	58	99	-	5	7	64	81	87
	4	56	93	80	-	7	8	94	95	95
	6	79	95	50	-	8	8	95	95	95

GC-степень гидролиза;

Исходя из полученных данных, наиболее оптимальными условиями проведения процесса является использование смеси HCl (10M) + ТФУ (4M) в объемном соотношении 1:1. Гидролиз с использованием концентрированной соляной кислоты (10M) так же позволяет достичь максимальной степени конверсии хитозана, однако, необходимо увеличение времени проведения процесса. Использование соляной кислоты с концентрацией 12 M приводит к разложению глюкозамина при данных условиях, о чем свидетельствует снижение концентрации глюкозамина в гидролизате. Экспериментальные данные, полученные при использовании ТФУ с концентрациями 2-6 M без добавки HCl, свидетельствуют о незначительном протекании гидролиза вне зависимости от времени проведения процесса.

Следующим задачей являлась оптимизация элюирования в условиях градиентного режима для одновременного определения трех аналитов. Для решения поставленной хроматографической задачи использована система подвижной фазы на основе водно-ацетонитрильного градиента с добавлением трифторуксусной кислоты, которая является общепринятой при определении аналитов, как показано в литературе. Однако в представленных источниках решаются частные задачи разделения аналитов без совместного присутствия.

В работе использовано 4 градиентных режима, отличающихся профилем возрастания содержания органической фазы (рисунок 25). В качестве элюента В

использован ацетонитрил, в качестве фазы D – 0,1 % уксусная кислота в воде деионизированной.

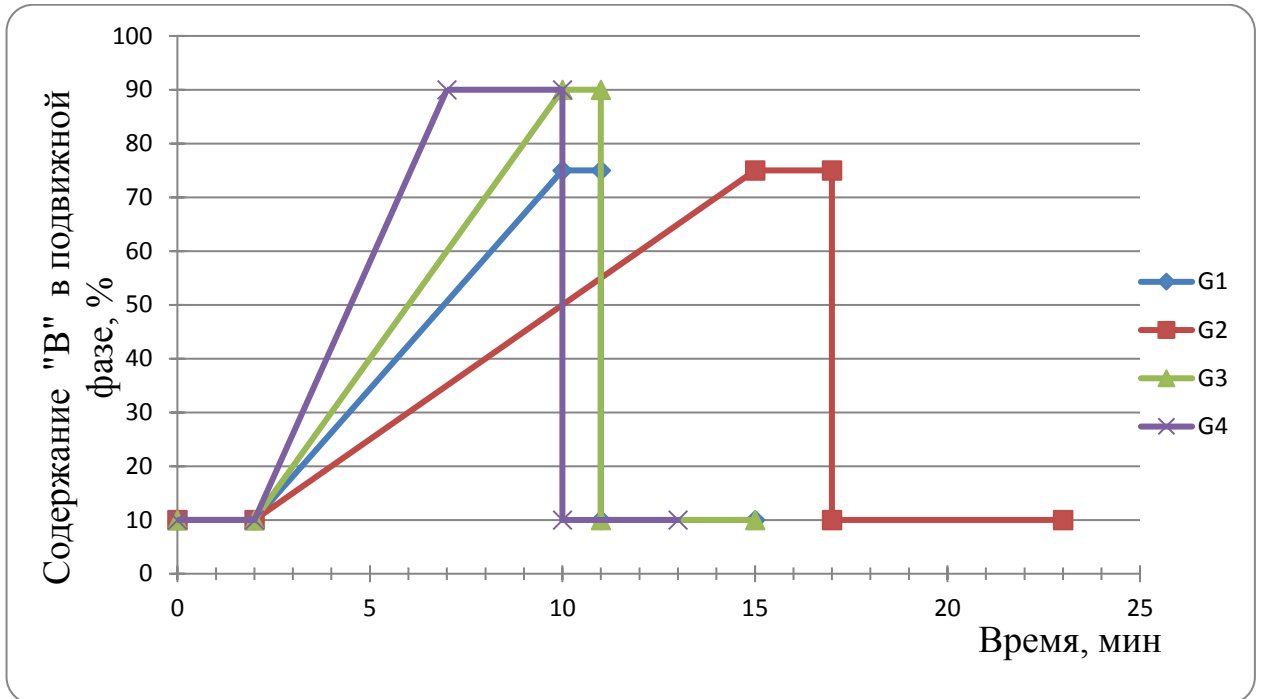


Рисунок 25 – Профили градиентного элюирования при отработке ВЭЖХ параметров

Используемые градиентные режимы отличались как по крутизне возрастания содержания органического модификатора, так и по абсолютному его значению (от 75 до 90 % «В»), что позволило оценить влияние данных параметров на хроматографические параметры аналитического сигнала аналитов (ДОКС-АГ, GluN-FMOC и ВА), представленные в таблице 25.

Таблица 25 – Хроматографические параметры пиков при различных градиентах элюирования

Градиент	Аналит	t_R	R_s	A_s
G1	ДОКС-АГ	13,116	3,98	1,83
	α GluN-FMOC	10,089	2,11	1,24
	β GluN-FMOC	10,298		1,45
	ВА	10,470	0,86	1,54
G2	ДОКС-АГ	н/о	н/о	н/о
	α GluN-FMOC	12,267	2,71	1,66
	β GluN-FMOC	12,580		1,53
	ВА	12,277	н/о	1,66
G3	ДОКС-АГ	12,010	1,66	2,08
	α GluN-FMOC	9,378	1,79	1,24
	β GluN-FMOC	9,556		1,36
	ВА	9,797	1,21	2,00
G4	ДОКС-АГ	10,936	3,41	1,13
	α GluN-FMOC	8,117	1,34	1,14
	β GluN-FMOC	8,244		1,18
	ВА	9,127	2,08	1,38

Из представленных данных видно, что снижение скорости подъема органического модификатора (градиент G2) приводит к ухудшению разделения пиков аналитов, снижая разрешение между пиками бензойной кислоты и производных глюкозамина до нуля, к тому же пик доксорубинона (ДОКС-АГ) сливается с пиком остаточного FMOC-Cl (рисунок 26), что делает градиент G2 не пригодным для одновременного определения всех трех компонентов пробы.

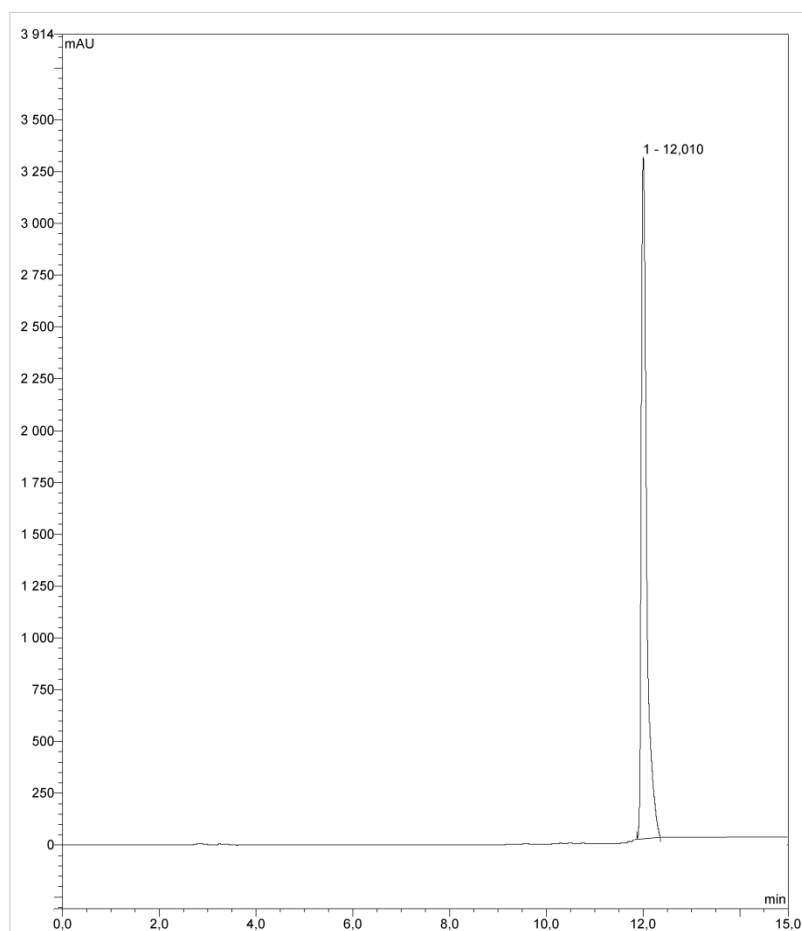


Рисунок 26 – Хроматограмма стандартного раствора ДОКС-АГ в режиме элюирования G2 ($\lambda = 240$ нм)

В свою очередь абсолютное максимальное содержание органического модификатора, как и увеличение скорости подъема приводит к снижению времен удерживания и асимметрии пиков аналитов, тем самым достигается оптимум времени, затрачиваемого на анализ. Поэтому в дальнейшей работе использовали режим элюирования G4 градиента (рисунок 27).

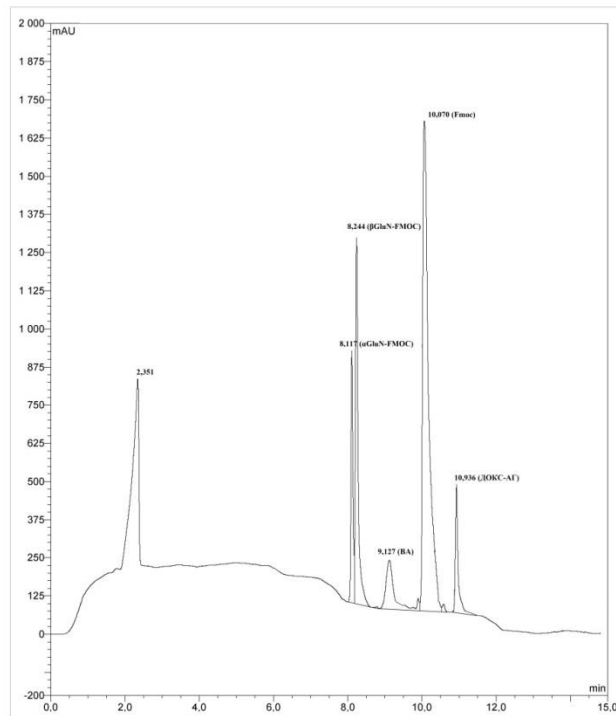


Рисунок 27 – Хроматограмма стандартного раствора ДОКС-АГ в режиме элюирования G4 ($\lambda = 240$ нм)

Для определения аналитической области построены калибровочные зависимости для каждого аналита (рисунки 28-30), причем для производного GluN-FMOC зависимость строили по сумме площадей пиков двух аномеров (рисунок 28).

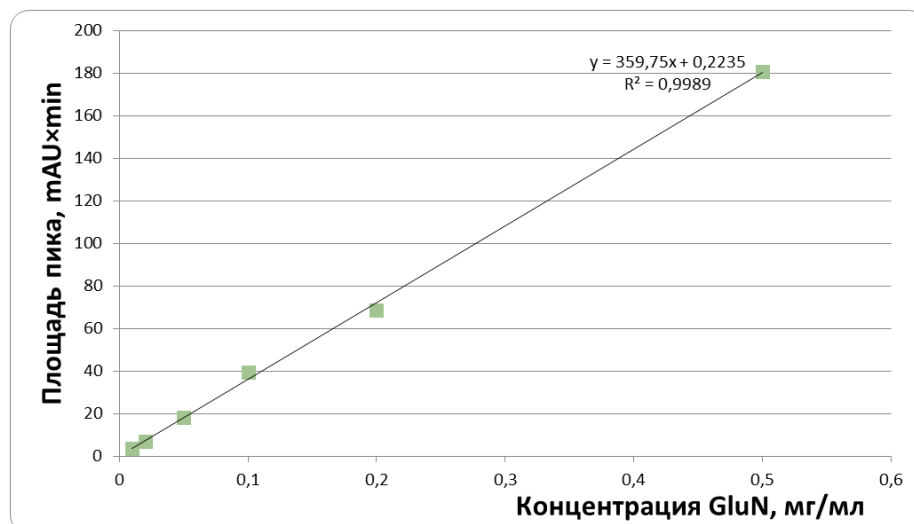


Рисунок 28 – Калибровочный график глюкозамина в диапазоне концентраций 0,5 – 0,01 мг/мл

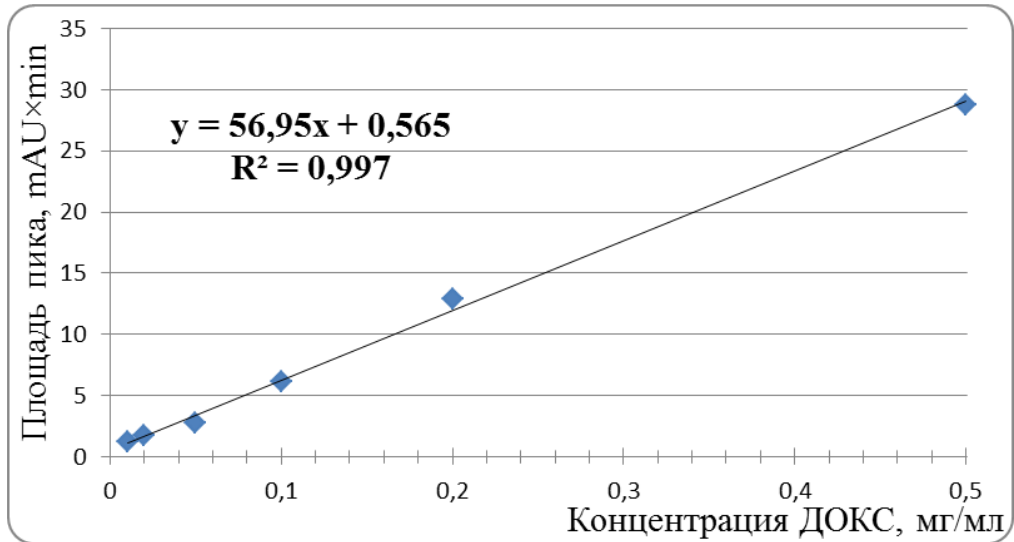


Рисунок 29 – Калибровочный график доксорубина в диапазоне концентраций 0,5 – 0,01 мг/мл

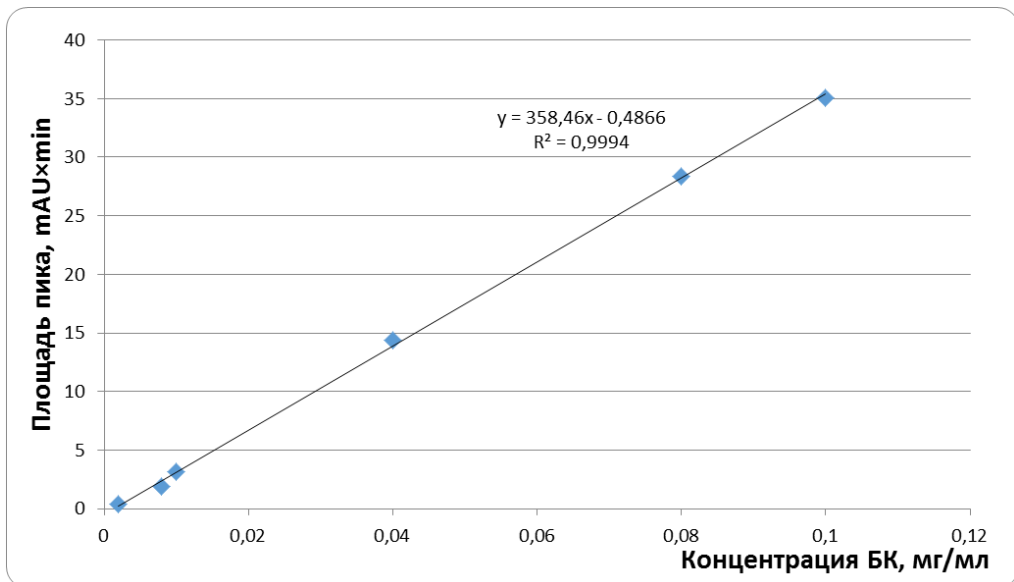


Рисунок 30 – Калибровочный график бензойной кислоты в диапазоне концентраций 0,1 – 0,002 мг/мл

Таким образом, показана аналитическая область методики для бензойной кислоты – 0,002-0,1 мг/мл; для доксорубина и глюкозамина – 0,01-0,5 мг/мл. Основные валидационные характеристики методики количественного определения хитозана, доксорубина и бензойной кислоты методом ВЭЖХ-УФ с предколоночной дериватизацией (таблица 26) установлены в соответствии с

ГФ XIV [158] по разработанной ранее схеме валидации [197], протокол валидации представлен в Приложении 3.

Таблица 26 – Результаты валидации методики количественного определения хитозана, доксорубицина и бензойной кислоты

Показатель	Значение валидационного параметра для аналита		
	Бензойная кислота	Доксорубицин	Глюкозамин
Специфичность	да	да	да
Линейность	0,002-0,1 мг/мл	0,01-0,5 мг/мл	0,01-0,5 мг/мл
Повторяемость	0,96 – 1,78 %	0,60 – 3,19 %	2,41 – 3,12 %
Воспроизводимость	0,93 – 1,55 %	0,51 – 2,38 %	2,02 – 2,95 %
Правильность	99,10 – 99,36 %	97,53 – 99,48 %	98,17– 99,37%

В результате проведенных экспериментов определены оптимальные параметры гидролиза хитозана, при которых достигается полная конверсия до глюкозамина при меньшем времени проведения процесса в сравнении с методикой, предложенной в литературе, а также высвобождение связанных бензойной кислоты и доксорубицина, что позволяет предложить единую хроматографическую методику для их одновременного определения:

Навеску хитозана (CS₂), массой 50 мг помещают в ампулу, содержащую 10 мл смеси соляной (10 М) и трифторуксусной (4 М) кислот (1:1). Далее, запаянную ампулу помещают в термостат при температуре 105 °С на 4 часа. Затем, полученную смесь остужают до комнатной температуры. Аликвоту в объеме 1 мл помещают в мерную колбу на 50 мл и добавляют 30 мл водного раствора натрия тетрабората с концентрацией 12,6 %. Значение рН полученного раствора доводят до 7,0 с использованием 10 М соляной кислоты. Полученную смесь доводят до метки с использованием боратного буферного раствора. Далее, для проведения хроматографического анализа, осуществляют дериватизацию образовавшегося глюкозамина по методике, описанной в пункте 2.4.

Для определения доксорубина, бензойной кислоты и хитозана в конъюгате Fe-CS-ДОКС при их совместном присутствии навеску конъюгата, массой 600 мг помещают в ампулу и смешивают с 10 мл раствора, соляной (10М) и трифторуксусной кислот (4М) в соотношении 1:1. Далее, запаянную ампулу помещают в термостат при температуре 105 °С и проводят растворение в течение 4 часов. Затем, полученную смесь остужают до комнатной температуры. Аликвоту в объеме 3 мл помещают в мерную колбу на 50 мл, добавляют 30 мл водного раствора натрия тетрабората с концентрацией 12,6 % и 3 мл раствора 2М ЭДТА. Значение рН полученного раствора доводят до 7,0 с использованием 10М соляной кислоты. Полученную смесь доводят до 50 мл с использованием боратного буферного раствора.

Для дериватизации глюкозамина в гидролизате, аликвоту объемом 1 мл смешивают с 10 мл раствора 9-флуоренилметоксикарбонила гидрохлорида в ацетонитриле с концентрацией 10 мг/мл. Полученную смесь оставляют при комнатной температуре в течение 4 часов без перемешивания. Затем, в образец вносят 3 мл подвижной фазы (0,05 % ТФУ/АЦН, 1:1) и проводят хроматографический анализ. Результаты анализа представлены в таблице 27. Расчет концентрации хитозана проводили по формуле [176]:

$$C(\%) = \frac{m(gla)}{215.7 \times m(0)} [161.2 + DA \times 43 + (1 - DA) \times MA] \times 100\% \quad (10)$$

$C(\%)$ – содержание хитозана, %;

$m(gla)$ – количество глюкозамина, определенное ВЭЖХ-УФ, мг;

215.7 – молекулярная масса глюкозамина (HCl);

$m(0)$ – масса образца для анализа, мг;

161.2 – молекулярная масса остатков глюкозамина в молекуле хитозана;

DA – степень ацетилированности хитозана;

43 – молекулярная масса одной ацетильной группы;

MA – молекулярная масса кислоты, образующей противоион.

Таблица 27 – Результаты определения содержания доксорубицина, бензойной кислоты и хитозана в конъюгате Fe-CS-ДОКС

Доксорубицин		Бензойная кислота	Хитозан
Серия, №	%	%	%
1	38,54	17,58	8,43
2	38,11	17,39	8,33
3	38,25	17,59	8,26
Среднее значение	38,30	17,52	8,34
Доверительный интервал	0,54	0,28	0,21

Таким образом, на данном этапе работы разработана методика стандартизации конъюгата Fe-CS-ДОКС и определено количественное содержание доксорубицина, хитозана и бензойной кислоты в конъюгате Fe-CS-ДОКС.

3.2.4 Определение размеров частиц носителя Fe-CS и конъюгата Fe-CS-ДОКС

Определение размеров частиц полученного носителя (Fe-CS) и конъюгата (Fe-CS-ДОКС) проводили методом лазерной дифракции по методике, описанной в разделе 2.2. В ходе анализа установлено количественное содержание основной фракции (1-10 мкм) в образцах Fe-CS и Fe-CS-ДОКС, которое составило $93,2 \pm 0,22$ и $91,80 \pm 0,29$ %, соответственно.

Выводы по главе 3

1. Проведено изучение влияния параметров синтеза на размер микрочастиц Fe-COOH, а также разработана методика получения магнитного носителя лекарственных средств Fe-CS и его конъюгата с доксорубицином (Fe-CS-ДОКС) с мономодальным распределением размеров частиц (содержание целевой фракции 1-10 мкм не менее 91%).

2. Установлено, что существенное влияние на размер микрочастиц Fe-COOH оказывают такие параметры, как начальные концентрации реагентов, а также скорость подачи восстанавливающего агента (NaBH_4). При отклонении начальных концентраций от стехиометрии и уменьшении скорости подачи NaBH_4 (до 8,6 мл/мин) происходит снижение содержания целевой фракции Fe-COOH (1-10 мкм) до $82,7 \pm 0,4\%$ и $83,0 \pm 0,2\%$, соответственно.

3. Определена емкость загрузки доксорубицина – 0,9 мг/мг Fe-CS, размер частиц конъюгата Fe-CS-ДОКС ($91,8 \pm 0,29\%$), разработаны и валидированы методики количественного определения натрия трифосфата (спектрофотометрия в видимой области), а также бензойной кислоты, хитозана и доксорубицина (ВЭЖХ-УФ) при их совместном присутствии. Установлено количественное содержание всех компонентов конъюгата: железо- $16,69 \pm 0,04$; доксорубицин – $38,30 \pm 0,54$; бензойная кислота – $17,52 \pm 0,28$; натрия трифосфат – $19,16 \pm 0,09$; хитозан – $8,34 \pm 0,21$.

4. Определены показатели качества лиофилизата для приготовления суспензии для внутривенного введения «Конъюгат Fe-CS-ДОКС», которые включены в проект НД.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАНОСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИРОКЧАСТИЦ Fe-CS-ДОКС

Как отмечено в пункте 1.1. литературного обзора, для применения системы доставки в терапии и диагностике, необходимо, чтобы носитель, помимо способности связывать и переносить лекарственное средство, обладал контрастирующей активностью. Помимо этого, для достижения максимальной эффективности необходима чувствительность используемой СДЛС как к внутренним, так и к внешним стимулам. В данной главе представлены результаты изучения контрастных свойств разработанного носителя Fe-CS в МРТ исследовании, а также результаты изучения высвобождения доксорубина из конъюгата Fe-CS-ДОКС под воздействием различных стимулов (рН и УЗ излучение).

4.1. Высвобождение доксорубина под воздействием внешних и внутренних факторов среды

4.1.1. Влияние рН среды на высвобождение доксорубина

Изучение кинетики высвобождения ДОКС проводили при значениях рН равных 3,3; 5,5 и 7,4 по методике, описанной в разделе 2.6. (рисунок 31).

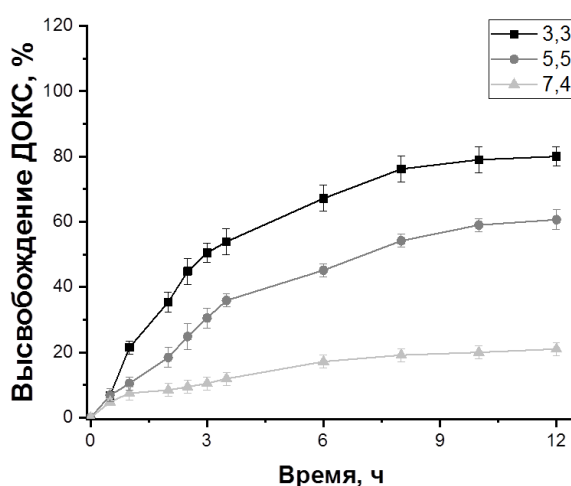


Рисунок 31 – График высвобождения доксорубина из конъюгата Fe-CS-ДОКС

При значении рН равном 3,3 более 50% полезной загрузки высвобождалось через 3 часа, затем, следовало значительное снижение интенсивности данного процесса (67% через 6 часов), вызванное постепенным уменьшением разности концентраций доксорубицина в системе Fe-CS-ДОКС и среде высвобождения, а максимальное количество высвободившегося ЛС составляло 80% за 12 часов. При увеличении рН до 5,5 наблюдалось снижение интенсивности высвобождения терапевтического агента. В результате, через 3 часа, количество высвободившегося доксорубицина составило 30,5 %. Далее, как и при более низком значении рН наблюдалось характерное снижение скорости высвобождения терапевтического агента (45 % через 6 часов). По завершении эксперимента, суммарное количество высвободившегося доксорубицина составило 61 %. Дальнейшее увеличение рН до 7,4 приводило к существенному снижению интенсивности высвобождения (10,5 % полезной загрузки за 3 часа), что в свою очередь подтверждает высокую стабильность разработанной системы. Максимальное количество высвободившегося при данных условиях доксорубицина составляло 21 % за 12 часов.

Столь существенное влияние данного параметра на интенсивность высвобождения доксорубицина может быть вызвано ослаблением электростатических взаимодействий между компонентами системы Fe-CS-ДОКС. Молекулы хитозана, благодаря наличию свободных аминогрупп, несут положительный заряд, вследствие чего, обеспечивается их взаимодействие с отрицательно-заряженными трифосфат-ионами. Таким образом, конъюгация ДОКС осуществляется в ходе его взаимодействия с образовавшимся отрицательно заряженным комплексом Fe-CS-ТФН.

При рН 3,3 происходит протонирование остатков трифосфорной кислоты, что приводит к их переходу из ионизированного состояния в нейтральное и, предположительно, вызывает ослабление электростатических взаимодействий между компонентами системы с последующим высвобождением полезной загрузки. Снижение интенсивности высвобождения доксорубицина при более высоких значениях рН (5,5), в свою очередь, обуславливается более низкой

степенью протонирования остатков трифосфорной кислоты при данных условиях. Таким образом, предложенный механизм высвобождения ЛС обуславливает высокую стабильность конъюгата при нейтральных значениях рН (7,4).

4.1.2. Влияние УЗ излучения низкой частоты на высвобождение доксорубина

Изучение кинетики высвобождения доксорубина под воздействием низкочастотного УЗ излучения так же проводили при значениях рН равных 3,3; 5,5 и 7,4 по модифицированной методике [195]: В три отдельные пробирки помещали навески конъюгата Fe-CS-ДОКС массой 10 мг, далее в каждую пробирку добавляли по 20 мл фосфатного буферного раствора с соответствующим значением рН (3,3; 5,5; 7,4). Плотно закрытые пробирки помещали в инкубатор и проводили процесс при постоянном перемешивании 100 об/мин и температуре 37 °С в течение 12 часов. Через установленные промежутки времени каждый образец вносили в ультразвуковую ванну и подвергали воздействию УЗ поля с частотой 75 кГц и удельной мощностью 2 Вт/см² в течение 30 секунд. Далее, образцы центрифугировали при 2000 об/мин в течение 5 минут и отбирали пробы среды высвобождения в объеме 2,0 мл. Отобранный объем среды замещали эквивалентным объемом свежего фосфатного буферного раствора с соответствующим значением рН и продолжали процесс. Концентрацию высвободившегося доксорубина в пробе определяли по калибровочному графику методом УФ-спектроскопии при длине волны 480 нм. График высвобождения представлен на рисунке 32.

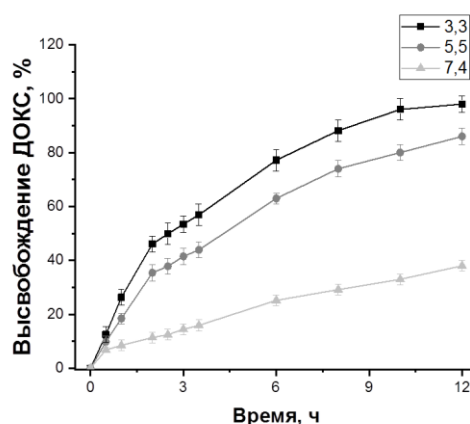


Рисунок 32 – График высвобождения доксорубина из конъюгата Fe-CS-ДОКС

В ходе эксперимента установлено существенное влияние данного стимула на интенсивность высвобождения ДОКС вне зависимости от pH среды. Так, при pH равных 3,3 и 5,5 показано значительное увеличение интенсивности высвобождения, в результате чего, общее количество высвободившегося доксорубина через 12 часов составляло 98 и 86 %, соответственно. В обоих случаях, наибольшее воздействие УЗ излучения на кинетику высвобождения ДОКС наблюдалось после значительного снижения его содержания в исследуемом конъюгате. Ультразвуковое излучение так же оказывало стимулирующее воздействие на интенсивность высвобождения полезной загрузки при нейтральном значении pH (7,4), однако, при данных условиях, наблюдался плавный профиль уменьшения содержания доксорубина в конъюгате Fe-CS-ДОКС, что свидетельствует о высокой стабильности разработанной системы.

Увеличение интенсивности высвобождения доксорубина под воздействием УЗ поля можно объяснить за счет растяжения полимерной цепи хитозана, вызванного возникающим градиентом сдвига за счет образования кавитационных пузырьков, что в свою очередь облегчает взаимодействие загруженного доксорубина с окружающей средой и, соответственно, усиливает его высвобождение.

Помимо воздействия ультразвука на ковалентно-присоединенную часть конъюгата (хитозан), он также оказывает влияние на электростатически связанные компоненты (ДОКС, ТФН). Поскольку электростатические связи обладают меньшей прочностью по сравнению с ковалентными, они в большей степени подвержены растяжению и разрыву под воздействием возникающего градиента сдвига, что в свою очередь, приводит к интенсивному высвобождению полезной загрузки.

Таким образом, полученные в ходе проведенных экспериментов результаты подтверждают чувствительность разработанной системы Fe-CS-ДОКС к воздействию внешних (УЗ-излучение) и внутренних (pH) стимулов.

4.2. Изучение контрастных свойств микрочастиц Fe-CS

Определение контрастных свойств полученной системы проводили в МРТ-исследовании с использованием T1 и T2 последовательностей, с использованием принципов, описанных в работе [198] (рисунок 33-34). Результаты оценки контрастных свойств носителя Fe-CS представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Результаты экспериментов по оценке контрастных свойств носителя Fe-CS в T1 и T2 режимах.

Исследуемая область/орган	Индекс усиления T1 и T2-взв. МРТ - изображения, как среднее \pm ошибка среднего	
	T1-последовательность	T2-последовательность
Периферия опухоли	1,39 \pm 0,06 (p<0,01)	0,65 \pm 0,07 (p<0,005)
Паренхима печени	2,07 \pm 0,21 (p<0,001)	0,32 \pm 0,09 (p<0,0002)
Паренхима селезенки	1,78 \pm 0,17 (p<0,001)	0,81 \pm 0,04 (p<0,05)

Достоверность изменения p – по сравнению с исходным «доконтрастным» значением.

В ходе эксперимента в T1-взвешенном режиме с подавлением изображения жировой ткани, установлено выраженное усиление изображения в печени и селезенке, а также по периферии перевитой опухоли. При исследовании контрастных свойств микрочастиц Fe-CS в T2-взвешенном режиме наблюдалось выраженное подавление изображения в области печени, селезенки и опухоли, что так же подтверждает накопление микрочастиц в этих органах.

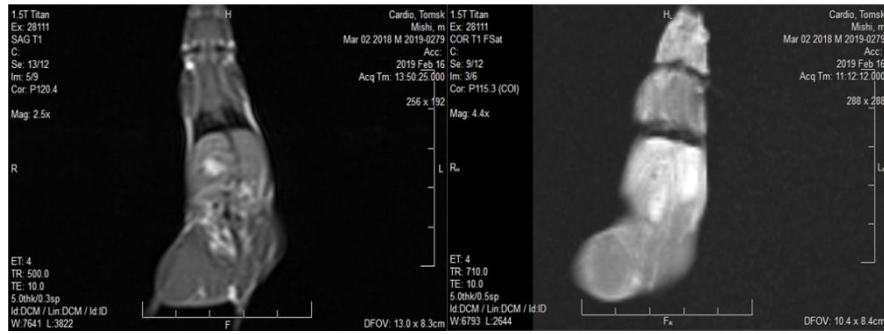


Рисунок 33 – T1-взвешенное изображение до и после введения микрочастиц Fe-CS. Фронтальный срез.

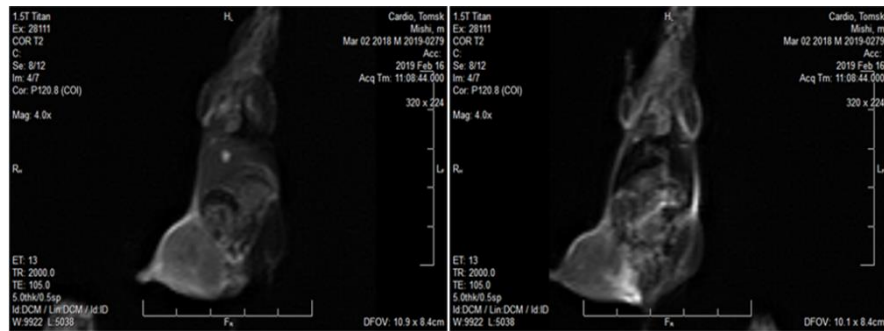


Рисунок 34 – T2-взвешенное изображение до и после введения микрочастиц Fe-CS. Фронтальный срез.

Таким образом, в ходе проведенных экспериментов, подтверждены контрастные свойства разработанных микрочастиц Fe-CS, а также их избирательное накопление в опухоли, печени и селезенке.

Выводы по главе 4

1. Изучено влияние pH среды, на интенсивность высвобождения доксорубина из конъюгата Fe-CS-ДОКС. Установлено, что исследуемая система обладает высокой стабильностью при нейтральном значении pH (21 % за 12 часов), а также возможностью интенсивного высвобождения полезной загрузки при pH 3,3 (80 % за 12 часов) и 5,5 (61 % за 12 часов).

2. Подтверждена высокая чувствительность исследуемой системы к ультразвуковому излучению низкой частоты. При воздействии ультразвука наблюдалось существенное увеличение количества высвобождаемого доксорубина при «кислых значениях» pH (98 и 86 % при pH 3,3 и 5,5, соответственно).

3. При изучении контрастных свойств носителя Fe-CS в МРТ-исследовании, установлено выраженное усиление изображения в T1 и подавление в T2 взвешенных режимах в области печени и селезенки, а также по периферии опухоли, что так же свидетельствует об избирательном накоплении микрочастиц в данных органах.

ВЫВОДЫ

1. Установлены оптимальные параметры синтеза микрочастиц железа ноль-валентного: концентрация FeCl_3 – 0,15 моль/л; NaBH_4 – 0,45 моль/л; 4-КБДТ – 47 ммоль/л; время стабилизации, 40 минут; время образования частиц 10 минут; скорость подачи NaBH_4 – 15 мл/мин.

2. Определены оптимальные параметры модификации микрочастиц Fe^0 и синтеза конъюгата Fe-CS-ДОКС: концентрация EDC и NHS – 0,28 моль/л; концентрация CS – 1,0 мг/мл; время модификации – 1,0 час; время присоединения хитозана – 12 часов; молекулярная масса хитозана – 190-310 кДа; концентрация ТФН и ДОКС – 1,0 мг/мл; время конъюгации ТФН и ДОКС – 30 минут; значение pH – 5,5.

3. Определено влияние параметров (pH среды и ультразвукового излучения) на скорость и степень высвобождения доксорубина из системы Fe-CS-ДОКС. Подтверждена высокая стабильность исследуемой системы при нейтральном значении pH (21 % за 12 часов), а также возможность интенсивного высвобождения полезной загрузки при pH 3,3 (80 % за 12 часов) и 5,5 (61 % за 12 часов). Ультразвуковое излучение низкой частоты оказывает существенное влияние на конъюгат, значительно увеличивая высвобождение доксорубина при кислых значениях pH (98 и 86 % при pH 3,3 и 5,5, соответственно за 12 часов).

4. Полученные микрочастицы проявляют выраженные контрастные свойства при МРТ исследовании в T1 и T2-взвешенных режимах, а также специфически накапливаются в области печени ($\text{ИУ}_{(T1/T2)} = 2,07 \pm 0,21 / 0,32 \pm 0,09$), селезенки ($\text{ИУ}_{(T1/T2)} = 1,78 \pm 0,17 / 0,81 \pm 0,04$) и по периферии опухоли ($\text{ИУ}_{(T1/T2)} = 1,39 \pm 0,06 / 0,65 \pm 0,07$), что обуславливает возможность их применения в качестве МРТ-контрастного средства при диагностике солидных опухолей.

5. Разработан алгоритм подготовки проб для количественного определения железа методом гравиметрии, натрия трифосфата методом спектрофотометрии, а также доксорубина, бензойной кислоты и хитозана методом ВЭЖХ-УФ при совместном присутствии всех компонентов конъюгата. По разработанным методикам установлено количественное содержание всех

компонентов в составе конъюгата Fe-CS-ДОКС (Fe – $16,69 \pm 0,04\%$; натрия трифосфат – $19,15 \pm 0,09\%$; доксорубин – $38,30 \pm 0,29\%$; бензойная кислота – $17,52 \pm 0,14\%$; хитозан – $8,34 \pm 0,21\%$). Проведена валидация разработанной ВЭЖХ методики количественного определения доксорубина, хитозана и бензойной кислоты в образцах лекарственного средства (лиофилизат для приготовления суспензии для внутривенного введения), результаты которой подтверждают возможность ее применения в фармацевтическом анализе разработанной СДЛС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В имеющейся на сегодняшний день литературе, представлено множество способов синтеза микро- и наночастиц ноль-валентного железа для создания тераностических СДЛС на их основе. Однако, высокая токсичность реагентов и побочных продуктов синтеза, остаются основными недостатками данной группы методов. Более того, разработка методик контроля качества, для обеспечения безопасного и эффективного применения СДЛС в клинической практике так же является актуальной задачей.

Таким образом, представленный в диссертационном исследовании метод одnoreакторного синтеза СДЛС на основе микрочастиц ноль-валентного железа (Fe-CS-ДОКС), а также разработанные методики анализа представляют несомненный научно-практический интерес и могут найти применение при разработке, производстве и контроле качества новых тераностических СДЛС.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- СДЛС – система доставки лекарственных средств;
- УЗ – ультразвуковое излучение;
- МРТ – магнитно-резонансная томография;
- ХТС – химиотерапевтические лекарственные средства;
- КТ – компьютерная томография;
- ТС – тераностическое средство;
- УФ – ультрафиолетовое излучение;
- ИК – инфракрасное излучение;
- ЛС – лекарственное средство;
- УНТ – углеродные нанотрубки;
- МНК – мезопористые наночастицы кремния;
- КВТ – квантовые точки;
- МЧ – магнитные частицы;
- ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид;
- DLC – емкости загрузки терапевтического агента;
- ГФ – государственная фармакопея;
- ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография;
- 4-КБДТ – 4-карбоксибензилдiazония тозилат;
- NHS – N-гидроксисукцинимид;
- EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида гидрохлорид;
- CS – хитозан;
- ДОКС – доксорубицин;
- ТФН – натрия трифосфат;
- ТФУ – трифторуксусная кислота;
- ФМОК (FMOC-Cl) – 9-флуоренилметоксикарбонила гидрохлорид;
- ДОКС-АГ – доксорубицинон;
- α GluN (β GluN) – глюкозамин;
- ЭДТУК – этилендиаминтетрауксусная кислота;
- ВА – бензойная кислота;

АЦН – ацетонитрил;

ИУ – индекс усиления;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu, F.S. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy-A quick review / F.S. Liu // *J. Obstet. Gynecol.* – 2009. – № 48. – P. 239-244.
2. Wang, D. Biodegradable core-shell dual-metal-organic-frameworks nanotheranostic agent for multiple imaging guided combination cancer therapy / D. Wang, J. Zhou, R. Shi, H. Wu, R. Chen, B. Duan, G. Xia, P. Xu, H. Wang, S. Zhou, C. Wang, H. Wang, Z. Guo, Q. Chen // *Theranostics.* – 2017. – № 7 (18). – P. 4605-4617.
3. Jain, R.K. Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors / R.K. Jain // *Nat.Rev.Clin.Oncol.* – 2010. – № 7 (11). – P. 653-664.
4. Palumbo, M.O. Systemic cancer therapy: achievements and challenges that lie ahead / M.O. Palumbo, P. Kavan, W.H. Miller Jr., L. Panasci, S. Assouline, N. Johnson, V. Cohen, F. Patenaude, M. Pollak, R.T. Jagoe, G. Batist // *Front. Pharmacol.* – 2013. – № 4 (57). – P. 1-9.
5. Prasanna, N.R. Novel Delivery Systems in Cancer Chemotherapy / N.R. Prasanna, C. Triveni, R. Soumya, B.V. Ramana, G. Nagarajan // *Research & Reviews in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* – 2013. – № 2(1). – P. 8-19.
6. Hu, Q. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems / Q. Hu, W. Sun, C. Wang, Z. Gu // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2016. – № 98. – P. 19-34.
7. Peer, D. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy / D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer // *Nat. Nanotechnol.* – 2007. – № 2. – P. 751-760.
8. Farokhzad, O.C. Impact of nanotechnology on drug delivery / O.C. Farokhzad, R. Langer // *ACS Nano.* – 2009. – № 3. – P. 16-20.
9. Kuo, C.Y. Self-assembly behaviors of thermal- and pH-sensitive magnetic nanocarriers for stimuli-triggered release / C.Y. Kuo, T.Y. Liu, A. Hardiansyah, C.F. Lee, M.S. Wang, W.Y. Chiu // *Nanoscale Res. Lett.* – 2014. – № 9. – P. 520-531.
10. Klibanov, A.L. Ultrasound-triggered release of materials entrapped in microbubble-liposome constructs: a tool for targeted drug delivery /

A.L. Klibanov, T.I. Shevchenko, B.I. Raju, R. Seip, C.T. Chin // *J. Controlled Release*. – 2010. – №148. – P. 13-17.

11. Ди Мартино, А. Разработка и свойства нового носителя доксорубина на основе поверхностно-модифицированных микрочастиц ноль-валентного железа с высокой эффективностью инкапсуляции и возможностью его контролируемого высвобождения / А. Ди Мартино, С.С. Власов, А.М. Гурьев, М.С. Юсубов, П.С. Постников, М.В. Белоусов // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2019. – №2(18). – С. 69-79.

12. Polyak, B. Magnetic targeting for site-specific drug delivery: applications and clinical potential / B. Polyak, G. Friedman // *J. Expert opinion on drug delivery*. – 2009. – № 1(6). – P. 53-70.

13. Mc Ateer, M.A. In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide / M.A. Mc Ateer, N.R. Sibson, C. von Zur Muhlen, J.E. Schneider, A.S. Lowe, N. Warrick, K.M. Channon, D.C. Anthony, R.P. Choudhury // *J. Nature medicine*. – 2007. – № 13(10). – P. 1253-1258.

14. Briley-Saebo, K. Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging / K. Briley-Saebo, A. Bjornerud, D. Grant, H. Ahlstrom, T. Berg, G.M. Kindberg // *Cell Tissue Res*. – 2004. – № 316. – P. 315-323.

15. Chen, X. *Cancer Theranostics* / X. Chen, S. Wong. – San Diego: Imprint of Elsevier, – 2014. – 544 p.

16. Scholar, E. *Alkylating Agents* / E. Scholar // *The curated reference collection in Biomedical Sciences* – 2007. – P. 1-4.

17. Aberer, W. Azathioprine in the treatment of pemphigus vulgaris / W. Aberer, E. C. Wolff-Schreiner, G. Stingl., K. Wolff // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 1987. – № 16. – P. 527-533.

18. Grumezescu, A. M. *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems* / A.M. Grumezescu. – Amsterdam: Imprint of Elsevier, – 2017. – 514 p.

19. Ezoe, S. Secondary Leukemia Associated with the Anti-Cancer Agent Etoposide a Topoisomerase II Inhibitor / S. Ezoe // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2012. – № 9. – P. 2444-2453.
20. Mc Grogan, B.T. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer / B.T. Mc Grogan, B. Gilmartin, D. N. Carney, A. Mc Cann // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008. – № 1785(2). – P. 96-132.
21. Theek, B. The Theranostic Path to Personalized Nanomedicine / B. Theek, L.Y. Rizzo, J. Ehling, F. Kiessling, T. Lammers // *Clin Transl. Imaging*. – 2014. – № 2(1). – P. 66-76.
22. Lammers, T. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice / T. Lammers, W.E. Hennink, G. Storm // *British Journal of Cancer*. – 2008. – № 99(3). – P. 392-397.
23. Каприн, А.Д. Актуальные вопросы медикаментозной терапии гормонорезистентного и метастатического рака предстательной железы / А.Д. Каприн, Р.А. Гафанов, М.Х. Шаипов, А.В. Шестаков, А.В. Меских // *Медицинский академический журнал*. – 2010. – № 1(10). – С. 77-85.
24. Лермонтова, С.А. Новые перспективные агенты оптической тераностики онкологических заболеваний на основе порфиразиновых макроциклов / С.А. Лермонтова, И.С. Григорьев, Н.Н. Пескова, Е.Ю. Ладилина, И.В. Балалаева, Л.Г. Клапшина, В.П. Боярский // *Журнал общей химии*. – 2017. – № 3(87). – С. 474-480.
25. Palekar-Shanbhag, P. Theranostics for Cancer Therapy / P. Palekar- Shanbhag, S. V. Jog, M. M. Chogale, S. S. Gaikwad // *Curr. Drug Deliv*. – 2013. – № 10(3). – P. 357 – 362.
26. Чернов, В.И. Радионуклидная тераностика злокачественных образований / В.И. Чернов, О.Д. Брагина, И.Г. Синилкин, А.А. Медведева, Р.В. Зельчан // *Вестник рентгенологии и радиологии*. – 2016. – № 5(97). – С. 306-313.
27. Prasanna, N. R. Novel Delivery Systems in Cancer Chemotherapy / N.R. Prasanna, C. Triveni, R. Soumya, B.V. Ramana, G. Nagarajan // *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – №2. – P. 8-19.

28. Bangham, A.D. Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids / A.D. Bangham, M.M. Standish, C. Watkins // *J. Mol. Biol.* – 1965. – №13. – P. 238-252.
29. Langer, R. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules / R. Langer, J. Folkman // *Nature.* – 1976. – № 263. – P. 797-800.
30. Lee, C.C. Designing dendrimers for biological applications / C.C. Lee, J.A. MacKay, J.M.J. Frechet, F.C. Szoka // *Nature biotechnology.* – 2005. – № 12(23). – P. 1517-1526.
31. Li, Z. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives / Z. Li, S. Tan, S. Li, Q. Shen, K. Wang // *Oncol. Rep.* – 2017 - № 38(2). – P. 611-624.
32. Immordino, M.L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential / M.L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel // *Int J Nanomedicine.* – 2006. – №1(3). – P. 297-315.
33. James, N.D. Liposomal doxorubicin (Doxil): An effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS / N.D. James, R.J. Coker, D. Tomlinson, J.R.W. Harris, M. Gompels, A.J. Pinching, J.S.W. Stewart // *Clinical Oncology.* – 1994. – № 6(5). – P. 294-296.
34. Batist, G. Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer / G. Batist, G. Ramakrishnan, C.S. Rao, A. Chandrasekharan, J. Gutheil, T. Guthrie, P. Shah, A. Khojasteh, M.K. Nair, K. Hoelzer, K. Tkaczuk, Y.C. Park, L.W. Lee // *J Clin Oncol.* – 2001. – № 19(5). – P. 1444-1454.
35. Green, M.R. Abraxane a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer / M. R. Green, G. M. Manikhas, S. Orlov, B. Afanasyev, A. M. Makhson, P. Bhar, M. J. Hawkins // *Annals of Oncology.* – 2006. – № 17. – P. 1263-1268.
36. Miele, E. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI 007) in the treatment of breast cancer / E. Miele, G.P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, S. Tomao // *Int J Nanomedicine.* – 2009. – № 4. – P. 99-105.

37. Kamaly, N. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation / N. Kamaly, Z. Xiao, P.M. Valencia, A. F. Radovic-Moreno, O. C. Farokhzad // *Chem Soc Rev.* – 2012. – № 41(7). – P. 2971-3010.
38. Guo, X. Polymer-Based Drug Delivery Systems for Cancer Treatment / X. Guo, L. Wang, X. Wei, S. Zhou // *Journal of polymer science, part A: Polymer chemistry.* – 2016. – № 54. – P. 3525-3550.
39. Estrella, V. Acidity generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion / V. Estrella, T. Chen, M. Lloyd, J. Wojtkowiak, H.H. Cornell, A. Ibrahim-Hashim, K. Bailey, Y. Balagurunathan, J.M. Rothberg, B.F. Sloane, J. Johnson, R.A. Gatenby, R.J. Gillies // *Cancer Res.* – 2012. – № 73(5). – P. 1524-1535.
40. Vaupel, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review / P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff // *Cancer Res.* – 1989. – № 49(23). – P. 6449-6465.
41. Куликов, В.А. Метаболизм раковой клетки как терапевтическая мишень / В.А. Куликов, Л.Е. Беляева // *Вестник витебского государственного медицинского университета.* – 2016. – № 6(15). – С.7-20.
42. Kamada, H. Design of a pH-Sensitive Polymeric Carrier for Drug Release and Its Application in Cancer Therapy / H. Kamada, Y. Tsutsumi, Y. Yoshioka, Y. Yamamoto, H. Kodaira, S. Tsunoda, T. Okamoto, Y. Mukai, H. Shibata, S. Nakagawa, T. Mayumi // *Clinical Cancer Research.* – 2004. – № 10. – P. 2545-2550.
43. Ge, Y. Nanomedicine: Principles of Nanomedicine / Y. Ge, S. Li, S. Wang, R. Moore. – New York: Springer Science Business Media, 2014. – 413 p.
44. Gillies, E.R. Stimuli-Responsive Supramolecular Assemblies of Linear-Dendritic Copolymers / E.R. Gillies, T.B. Jonsson, J.M.J. Frechet // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – № 126. – P. 11936-11943.
45. Li, J. Possibility of active targeting to tumor by local hyperthermia with temperature-sensitive nanoparticles / J. Li, B. Wang, P. Liu // *Medical Hypotheses* – 2008. – № 71. – P. 249-251.
46. Karimi, M. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems / M. Karimi, A. Ghasemi, P.S. Zangabad, R. Rahighi, S.M. Moosavi Basri,

- H. Mirshekarig, M. Amiri, Z. Shafaei Pishabad, A. Aslani, M. Bozorgomid, D. Ghosh, A. Beyzavi, A. Vaseghi, A. R. Aref, L. Haghani, S. Bahrami, M.R. Hamblin // *Chem. Soc. Rev.* – 2016. – № 45(5). – P. 1457-1501.
47. Sun, Y. Disassemblable micelles based on reduction-degradable amphiphilic graft copolymers for intracellular delivery of doxorubicin / Y. Sun, X. Yan, T. Yuan, J. Liang, Y. Fan, Z. Gu, X. Zhang // *Biomaterials.* – 2010. – № 31. – P. 7124-7131.
48. Linsley, C.S. Recent advances in light-responsive on-demand drug-delivery systems / C.S Linsley, B.M. Wu // *Ther. Deliv.* – 2017. – № 8(2). – P. 89-107.
49. Jiang, J. Polymer Micelles Stabilization on Demand through Reversible Photo-Cross-Linking / J. Jiang, B. Qi, M. Lepage, Y. Zhao // *Macromolecules.* – 2007. – № 40. – P. 790-792.
50. Alatorre-Meda, M. UV and Near-IR Triggered Release from Polymeric Micelles and Nanoparticles / M. Alatorre-Meda, C. Alvarez-Lorenzo, B.A. Concheiro, P. Taboada // *RSC Smart Materials.* – 2013. – № 1(1). – P. 304-348.
51. Mura, S. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery / S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur // *Nature materials.* – 2013. – № 12. – P. 991-1003.
52. Yan, Q. Voltage-Responsive Vesicles Based on Orthogonal Assembly of Two Homopolymers / Q. Yan, J. Yuan, Z. Cai, Y. Xin, Y. Kang, Y. Yin // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – № 132. – P. 9268-9270.
53. Gea, J. Drug Release from Electric Field Responsive Nanoparticles / J. Gea, E. Neofytoub, T.J. Cahill, R.E. Beyguib, R.N. Zarea // *ACS Nano.* – 2012. – № 6(1). P. 227-233.
54. Servant, A. Graphene-Based Electroresponsive Scaffolds as Polymeric Implants for On-Demand Drug Delivery / A. Servant, V. Leon, D. Jasim, L. Methven, P. Limousin, E.V. Fernandez-Pacheco, M. Prato, K. Kostarelos // *Adv. Healthcare Mater.* – 2014. – № 3. – P. 1334-1343.
55. Ghosn, M.G. Effect of Temperature on Permeation of Low Density Lipoprotein Particles through Human Carotid Artery Tissues / M.G. Ghosn, M. Leba, A. Vijayananda, P. Rezaee, J.D. Morrisett, K. V. Larin // *J. Biophotonics.* – 2009. – № 2(10). – P. 573-580.

56. Louguet, S. Thermoresponsive polymer brush-functionalized magnetic manganese nanoparticles for remotely triggered drug release / S. Louguet, B. Rousseau, R. Epherre, N. Guidolin, G. Goglio, S. Mornet, E. Duguet, S. Lecommandoux, C. Schatz // *Polym. Chem.* – 2012. – № 3. – P. 1408-1417.
57. Badr, G. Increased Susceptibility to Apoptosis and Growth Arrest of Human Breast Cancer Cells Treated by a Snake Venom-Loaded Silica Nanoparticles / G. Badr, D. Sayed, D. Maximous, A.O. Mohamed, M. Gul // *Cell Physiol. Biochem.* – 2014. – № 34. – P. 1640-1651.
58. Wahajuddin, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplateforms as drug carriers / M. Wahajuddin, S. Arora // *Int. J. Nanomedicine.* – 2012. – № 7. – P. 3445-3471.
59. Yang, H.W. Self-protecting core-shell magnetic nanoparticles for targeted, traceable, long half-life delivery of BCNU to gliomas / H.W. Yang, M.Y. Hua, H.L. Liu, C.Y. Huang, R.Y. Tsai, Y.J. Lu, J.Y. Chen, H.J. Tang, H.Y. Hsien, Y.S. Chang, T.C. Yen, P.Y. Chen, K. C. Wei // *Biomaterials.* – № 32. – 2011. – P. 6523-6532.
60. Paulusse, J.M.J. Ultrasound in Polymer Chemistry: Revival of an Established Technique / J.M.J. Paulusse, R. P. Sijbesma // *Inc. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* – 2006. – № 44. – P. 5445-5453.
61. Schroeder, A. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors / A. Schroeder, R. Honen, K. Turjeman, A. Gabizon, J. Kost, Y. Barenholz // *Journal of Controlled Release.* – 2009. – № 137. – P. 63-68.
62. Kheiriloom, A. Copper-doxorubicin as a nanoparticle cargo retains efficacy with minimal toxicity / A. Kheiriloom, L.M. Mahakian, C.Y. Lai, H.A. Lindfors, J.W. Seo, E.E. Paoli, K. D. Watson, E.M. Haynam, E.S. Ingham, L. Xing, R.H. Cheng, A.D. Borowsky, R.D. Cardiff, K.W. Ferrara // *Mol. Pharm.* – 2010. – № 7(6). – P. 1948-1958.
63. Unger, E.C. Acoustically active lipospheres containing paclitaxel: a new therapeutic ultrasound contrast agent / E.C. Unger, T.P. McCreery, R.H. Sweitzer, V.E. Caldwell, Y. Wu // *Invest. Radiol.* – 1998. – № 33(12). – P. 886-892.
64. Sirsi, S. State-of-the-Art Materials for Ultrasound-Triggered Drug Delivery / S. Sirsi, M. Borden // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2014. – № 72. – P. 3-14.

65. Ding, C. Recent Advances in Stimuli-Responsive Release Function Drug Delivery Systems for Tumor Treatment / C. Ding, L. Tong, J. Feng, J. Fu // *Molecules*. – 2016. – № 21. – P. 1715-1745.
66. Шанская, А.И. Липосомы - перспективная форма лекарственных препаратов / А.И. Шанская, С.М. Пучкова, Т.Е. Яковлева // *Медицина Экстремальных Ситуаций*. – 2011. – № 3(37). – С. 100-104.
67. Водовозова, Е.Л. Липосомы как нано-носители липидных конъюгатов противоопухолевых агентов мелфалана и метотрексата / Е.Л. Водовозова, Н.Р. Кузнецова, В.А. Кадыков, С.С. Хуцянь, Г.П. Гаенко, Ю.Г. Молотковский // *Российские нанотехнологии*. – 2008. – № 3-4(3). – С. 162-172.
68. Gabizon, A. A. Pros and Cons of the Liposome Platform in Cancer Drug Targeting / A.A. Gabizon, H. Shmeeda, S. Zalipsky // *Journal of liposome research*. – 2006. – № 16. – P. 175-183.
69. Bozzuto, G. Liposomes as nanomedical devices / G. Bozzuto, A. Molinari // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – №10. – P. 975-999.
70. Быстрова, А.В. Карбосилановые дендримеры с функциональным внешним слоем в качестве основы для получения нанопористых метилсилсесквиоксановых пленок / А.В. Быстрова, Е.В. Паршина, Е.А. Татарина, М.И. Бузин, Л.А. Озерина, А.Н. Озерин, А.М. Музафаров // *Российские нанотехнологии*. – 2007. – № 1(2). – С. 83-89.
71. Gillies, E.R. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery / E.R. Gillies, J.M.J.Frechet // *Drug Discov Today*. – 2005. – № 10(1). – P. 35-43.
72. Kesharwani, P. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery / P. Kesharwani, K. Jain, N.K. Jain // *Progress in Polymer Science*. – 2014. – № 39. – P. 268-307.
73. Chen, H.T. Cytotoxicity, Hemolysis, and Acute in Vivo Toxicity of Dendrimers Based on Melamine, Candidate Vehicles for Drug Delivery / H.T. Chen, M.F. Neerman, A.R. Parrish, E. E. Simanek // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – № 126. – P. 10044-10048.
74. Мартынова, Е.У. Наночастицы: перспективы использования в медицине и ветеринарии / Е.У. Мартынова, Е.Н. Козлов, Д.В. Муха // *Успехи Современной Биологии*. – 2012. – № 5(132). – С. 435-447.

75. Alexander-Bryant, A.A. Bioengineering Strategies for Designing Targeted Cancer Therapies / A.A. Alexander-Bryant, W.S. Vanden Berg-Foels, X. Wen // *Adv. Cancer Res.* – 2013. – № 118. – P. 1-59.
76. Lu, Y. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs / Y. Lu, K. Park // *Int. J. Pharm.* – 2013. – № 453(1). – P. 198-214.
77. Зернов, А.Л. Микрокапсулы из поли(3-Гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения белка / А.Л. Зернов, Е.А. Иванов, Т.К. Макхина, В.Л. Мишкина, Г.А. Бонартсева, Ж.В. Гажва, В.М. Рябова, С.И. Иванов, О.В. Самсонова, А.В. Феофанов, К.В. Шаитан, А.П. Бонарцев., А.В. Волков, А.А. Мураев // *Современные технологии в медицине.* – 2015. – № 4(7). – С. 50-57.
78. Иноземцев, А.С. Полые микросферы – эффективный наполнитель для высокопрочных легких бетонов / А.С. Иноземцев, Е.В. Королев // *Промышленное и гражданское строительство.* – 2013. – № 10. – С. 80-83.
79. Trana, V.T. Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? / V.T. Trana, J.P. Benoita, M.C. Venier-Julienne // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2011. – № 407. – P. 1-11.
80. Chen, S. Inorganic Nanomaterials as Carriers for Drug Delivery / S. Chen, X. Hao, X. Liang, Q. Zhang, C. Zhang, G. Zhou, S. Shen, G. Jia, J. Zhang // *Journal of Biomedical Nanotechnology.* – 2016. – № 12. – P. 1-27.
81. Price, D.N. In Vivo Pulmonary Delivery and Magnetic-Targeting of Dry Powder Nano-in-Microparticles / D.N. Price, L.R. Stromberg, N.K. Kunda, P. Muttill // *Mol. Pharmaceutics.* – 2017. – № 14. – P. 4741-4750.
82. Vangijzegem, T. Magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery: applications and characteristics / T. Vangijzegem, D. Stanicki, S. Laurent // *Expert Opinion on Drug Delivery.* – 2019. – № 16(1). – P. 69-78.
83. Постнов, В.Н. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов / В.Н. Постнов, Е.Б. Наумышева, Д.В. Королев, М.М. Галагудза // *Биотехносфера.* – 2013. – № 6(30). – С.16-27.

84. Daniel, M.C. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology / M.C. Daniel, D. Astruc // *Chem. Rev.* – 2004. – № 104. – P. 293-346.
85. Tan, W. Bionanotechnology Based on Silica Nanoparticles / W. Tan, K. Wang, X. He, X.J. Zhao, T. Drake, L. Wang, R.P. Bagwe // *Medicinal Research Reviews* – 2004. – № 5(24). – P. 621-638.
86. Васильева, С.В. Наночастицы диоксида кремния как средство доставки производных нуклеотидов в клетки млекопитающих / С.В. Васильева, В.Н. Сильников, Д.А. Стеценко // *Современные тенденции развития науки и технологий.* – 2016. – № 10-3. – С. 67-70.
87. Zhang, W. The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies / W. Zhang, Z. Zhang, Y. Zhang // *Nanoscale Research Letters.* – 2011. – № 6. – P. 555-577.
88. Qiu, S. Synthesis and characterization of magnetic polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel microspheres for embolization of blood vessel / S.Qiu, N.J. Ge, D.K. Sun, S. Zhao, J.F. Sun, Z.B. Guo, K. Hu, N. Gu // *IEEE Trans Biomed Eng.* – 2016. – № 63(4). – P. 730-736.
89. Mody, V.V. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor / V.V. Mody, A. Cox, S. Shah, A. Singh, W. Bevins, H. Parihar // *Appl Nanosci.* – 2014. – № 4. – P. 385-392.
90. Alvarez-Lorenzo, C. Materials for Drug Delivery. Volume 2 / C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro. – RSC Publishing, – 2013. – 393 p.
91. Libutti, S.K. Phase I and Pharmacokinetic Studies of CYT-6091, a Novel PEGylated Colloidal Gold-rhTNF Nanomedicine / S.K. Libutti, G.F. Paciotti, A.A. Byrnes, H.R. Alexander Jr., W.E. Gannon, M. Walker, G.D. Seidel, N. Yuldasheva, L. Tamarkin // *Clin Cancer Res.* – 2010. – № 16(24). – P. 6139-6149.
92. Benezra, M. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma / M. Benezra, O. Penate-Medina, P.B. Zanzonico, D. Schaer, H. Ow, A. Burns, E. De Stanchina, V. Longo, E. Herz, S. Iyer, J. Wolchok,

- S.M. Larson, U. Wiesner, M.S. Bradbury // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2011. – №7(121). – P. 2768-2780.
93. Tiwari, G. Drug delivery systems: An updated review / G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S.K Bannerjee // *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. – 2012. – № 2(1). – P. 1-11.
94. Din, F. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors / F. Din, W. Aman, I. Ullah, O.S. Qureshi, O. Mustapha, S. Shafique, A. Zeb // *Int. J. Nanomedicine*. – 2017. – № 12. – P. 7291-7309.
95. Lijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon / S. Lijima // *Nature*. – 1991. – № 354. – P. 1-3.
96. Голохваст, К.С. Изучение влияния многослойных углеродных нанотрубок при пероральном введении в течение 6 суток на желудочно-кишечный тракт и почки мышей линии СВА / К.С. Голохваст, В.В. Чайка, Л.В. Кузнецов, К.В. Елумеева, М.И. Кусайкин, А.М. Захаренко, Н.Н. Киселев, А.М. Паничев, Г.В. Рева, В.В. Усов, И.В. Рева, Т. Ямамото, А.Н. Гульков // *Бюллетень Экспериментальной биологии и медицины*. – 2013. – № 6 (155). – С. 753-757.
97. Pramanik, M. Single-walled carbon nanotubes as a multimodal thermoacoustic and photoacoustic contrast agent / M. Pramanik, M. Swierczewska, D. Green, B. Sitharaman, L.V. Wang // *J. Biomed. Opt.* – 2009. – № 14(3). – P. 1-15.
98. Robinson, J.T. High Performance In Vivo Near-IR ($>1 \mu\text{m}$) Imaging and Photothermal Cancer Therapy with Carbon Nanotubes / J.T. Robinson, K. Welsher, S.M. Tabakman, S.P. Sherlock, H. Wang, R. Luong, H. Dai // *Nano Res.* – 2010. – № 3(11). – P. 779-793.
99. Liu, X. Optimization of surface chemistry on single-walled carbon nanotubes for in vivo photothermal ablation of tumors / X. Liu, H. Tao, K. Yang, S. Zhang, S.T. Lee, Z. Liu // *Biomaterials*. – 2011. – № 32. – P. 144-151.
100. Eatemadi, A. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications / A. Eatemadi, H. Daraee, H. Karimkhanloo, M. Kouhi, N. Zarghami, A. Akbarzadeh, M. Abasi, Y. Hanifehpour, S.W. Joo // *Nanoscale Research Letters*. – 2014. – № 9. – P. 393-406.

101. Pitroda, J. A Critical Review on Carbon Nanotubes / J. Pitroda, S.K.D. Bansri Jethwa // *International Journal of Constructive Research in Civil Engineering (IJCRCE)*. – 2016. – № 2(5). – P. 36-42.
102. Bianco, A. Opportunities and challenges of carbon-based nanomaterials for cancer therapy / A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato // *Expert Opin. Drug Deliv.* – 2008. – № 5(3). – P. 331-342.
103. Mamaeva, V. Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances / V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Lindén // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – № 65. – P. 689-702.
104. Slowing, I.I. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers / I.I. Slowing, J.L. Vivero-Escoto, C.W. Wu, V.S.Y. Lin // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2008. – № 60. – P. 1278-1288.
105. Fikai, A. Nanostructures for Cancer Therapy / A. Fikai, A.M. Grumezescu. – Amsterdam: Imprint of Elsevier, – 2017. – 920 p.
106. Lee, C.H. Intracellular pH-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticles for the Controlled Release of Anticancer Chemotherapeutics / C.H.Lee, S.H. Cheng, I.P. Huang, J.S. Souris, C.S. Yang, C.Y. Mou, L.W. Lo // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2010. – № 49. – P. 8214-8219.
107. Murray, C. B. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites / C.B. Murray, D.J. Noms, M.G. Bawendi // *J. Am. Chem. Soc.* – 1993. – № 115. – P. 8706-8715.
108. Walling, M.A. Quantum Dots for Live Cell and In Vivo Imaging / M.A. Walling, J.A. Novak, J.R.E. Shepard // *Int. J. Mol. Sci.* – 2009. – № 10. – P. 441-491.
109. Mitra, A. Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices / A. Mitra, K. Cholkar, A. Mandal. – Amsterdam: Imprint of Elsevier, 2017. – 416 p.
110. Ho, Y.P. Quantum dot-based theranostics / Y.P. Ho, K.W. Leong // *Nanoscale*. – 2010. – № 2(1). – P. 60-68.

111. Wu, W. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies / W. Wu, Q. He, C. Jiang // *Nanoscale Res Lett.* – 2008. – №3. – P. 397-415.
112. Шевцов, М.А. Магнитные наночастицы в диагностике и терапии злокачественных опухолей головного мозга / М.А. Шевцов, Л.Ю. Яковлева, Б.П. Николаев // *Лучевая диагностика и терапия.* – 2013. – № 3(4). – С. 29-39.
113. Liang, P.C. Doxorubicin-modified magnetic nanoparticles as a drug delivery system for magnetic resonance imaging-monitoring magnet-enhancing tumor chemotherapy / P.C. Liang, Y.C. Chen, C.F. Chiang, L.R. Mo, S.Y. Wei, W.Y. Hsieh, W.L. Lin // *Int. J. Nanomedicine.* – 2016. – № 11. – P. 2021-2037.
114. Cazares-Cortes, E. Magnetic Nanoparticles Create Hot Spots in Polymer Matrix for Controlled Drug Release / E. Cazares-Cortes, M. Nerantzaki, J. Fresnais, C. Wilhelm, N. Griffete, C. Ménager // *Nanomaterials.* – 2018. – № 8. – P. 850-861.
115. Chang, D. Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations / D. Chang, M. Lim, J.A.C.M. Goos, R. Qiao, Y.Y. Ng, F.M. Mansfeld, M. Jackson, T.P. Davis, M. Kavallaris // *Front Pharmacol.* – 2018. – № 9. – P. 831-851.
116. Tu, C. Activatable T1 and T2 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents / C. Tu, E.A. Osborne, A.Y. Louie // *Annals of Biomedical Engineering.* – 2011. – № 4(39). – P. 1335-1348.
117. Lacroix, L.M. Magnetic Nanoparticles as Both Imaging Probes and Therapeutic Agents / L.M. Lacroix, D. Ho, S. Sun // *Current Topics in Medicinal Chemistry.* – 2010. – № 10. – P. 1184-1197.
118. Gornati, R. Zerovalent Fe, Co and Ni nanoparticle toxicity evaluated on SKOV-3 and U87 cell lines / R. Gornati, E. Pedretti, F. Rossi, F. Cappellini, M. Zanella, I. Olivato, E. Sabbioni, G. Bernardini // *J. Appl. Toxicol.* – 2016. – № 36. – P. 385-393.
119. Sciallero, C. Magnetic resonance and ultrasound contrast imaging of polymer-shelled microbubbles loaded with iron oxide nanoparticles / C. Sciallero, L. Balbi, G. Paradossi, A. Trucco // *Soc. Open. Sci.* – 2016. – № 3. P. 1-14.
120. Fernandez-Fernandez, A. Theranostic applications of nanomaterials in cancer: Drug delivery, image-guided therapy and multifunctional platforms / A. Fernandez-

- Fernandez, R. Manchanda, A.J. McGoron // *Appl. Biochem Biotechnol.* – 2011. – № 165(7-8). – P. 1628-1651.
121. Suryanarayana, C. Mechanical alloying and milling / C. Suryanarayana // *Progress in Materials Science.* – 2001. – № 46. – P. 1-184.
122. Lu, H.J. Mechanism, Synthesis and Modification of Nano Zerovalent Iron in Water Treatment / H.J. Lu, J.K. Wang, S. Ferguson, T. Wang, Y. Bao, H.X. Hao // *Nanoscale.* – 2016. – № 8. – P. 9962-9975.
123. Yu, X. Materials, Processes, and Facile Manufacturing for Bioresorbable Electronics: A Review / X. Yu, W. Shou, B.K. Mahajan, X. Huang, H. Pan // *Adv. Mater.* – 2018. – № 30(28). – P. 1-27.
124. Hahn, H. Gas phase synthesis of nanocrystalline materials / H. Hahn // *Nanostructured Materials.* – 1997. – № 9. – P. 3-12.
125. Huyen, N.T.T. Preparation and characterization of zerovalent iron nanoparticles / N.T.T. Huyen, N.H. Nhung, L. Thanh, P.D. Khanh, T.D. Lam, H.A. Son // *Vietnam Journal of Chemistry.* – 2018. – № 56(2). – P. 226-230.
126. Prasad, M.N.V. Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation / Prasad, M.N.V. P. J. de Campos Favas, S. K. Maiti. – Amsterdam: Imprint of Elsevier, 2018. – 730 p.
127. Петкевич, А.В. Формирование композитов, содержащих железо / А.В. Петкевич, А.В. Абакшонок, В.Е. Агабеков, А.Н. Еремин, Т.В. Семашко, Р.В. Михайлова // *Журнал общей химии.* – 2016. – № 10(86). – С. 1738-1747.
128. Lide, D.R. CRC Handbook of Chemistry and Physics 88th edition / D.R. Lide. – Boca Roca: Taylor and Francis Inc., 2007. – 2640 p.
129. Wang, C.B. Synthesizing Nanoscale Iron Particles for Rapid and Complete Dechlorination of TCE and PCBs / C.B. Wang, W.X. Zhang // *Environ. Sci. Technol.* – 1997. – № 31(7). – P. 2154-2156.
130. Syrkin, V.G. Preparation of iron powder by the thermal decomposition of iron pentacarbonyl / V.G. Syrkin // *Poroshkovaya Metallurgiya.* – 1964. – № 3(21). – P. 75-84.

131. Баранчиков, А.Е. Сонохимический синтез неорганических материалов / А.Е. Баранчиков, В.К. Иванов, Ю.Д. Третьяков // Успехи химии. – 2007. – № 2(76). – С. 147-168.
132. Sun, H. Nano-FeO Encapsulated in Microcarbon Spheres: Synthesis, Characterization, and Environmental Applications / H. Sun, G. Zhou, S. Liu, H.M. Ang, M. O'Tade, S. Wang // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2012. – № 4. – P. 6235-6241.
133. Seip, C.T. The fabrication and organization of self-assembled metallic nanoparticles formed in reverse micelles / C.T. Seip, C.J. O'Connor // Nano Structured Materials. – 1999. – № 12. – P. 183-186.
134. Chen, S.S. A new method to produce nanoscale iron for nitrate removal / S.S. Chen, H.D. Hsu, C.W. Li // Journal of Nanoparticle Research. – 2004. – № 6. – P. 639-647.
135. Schutze, A. The Atmospheric-Pressure Plasma Jet: A Review and Comparison to Other Plasma Sources / A. Schutze, J.Y. Jeong, S.E. Babayan, J. Park, G.S. Selwyn, R.F. Hicks // IEEE Transactions on Plasma Science. – 1998. – № 26(6). – P. 1685-1694.
136. Iza, F. Microplasmas: Sources, Particle Kinetics, and Biomedical Applications / F. Iza, G.J. Kim, S.M. Lee, J.K. Lee, J.L. Walsh, Y.T. Zhang, M.G. Kong // Plasma Process. Polym. – 2008. – № 5. – P. 322-344.
137. Ulrich, A. Microplasma Generation of Iron Microparticles for 3-D Manufacturing / A. Ulrich, W. Clower, C.G. Wilson // Journal of microelectromechanical systems. – 2018. – № 1(27). – P. 25-28.
138. Gal, M. Anomalous Coating of Iron Microparticles by Ni-Co Layers in the 3D Stirred Heterogeneous System: Impedance Study / M. Gal, R. Orinakova, H.D. Wiemhofer, P. Chovan, A. Krajnikova, J. Hives. // Journal of the electrochemical society. – 2009. – № 156(11). – P. 462-468.
139. Heaney, D.F. Handbook of Metal Injection Molding / D.F. Heaney. – Cambridge: Woodhead Publishing, 2012. – 604 p.
140. Hamill, J. Water Atomized Fine Powder Technology / J. Hamill, C. Schade, N. Myers // Proceedings of Powder Metallurgy World Congress. – 2000. – P. 367-370.
141. Zhang, L. Energy Technology 2017: Carbon Dioxide Management and Other Technologies / L. Zhang, J. Drelich, N.R. Neelameggham, D.P. Guillen, N. Haque,

J. Zhu, Z. Sun, T. Wang, J.A. Howarter, F. Tesfaye, S. Ikhmayies, E. Olivetti, M.W. Kennedy. – New York: Springer International Publishing, 2017. – 499 p.

142. Hoag, G.E. Degradation of bromothymol blue by ‘greener’ nano-scale zero-valent iron synthesized using tea polyphenols / G.E. Hoag, J.B. Collins, J.L. Holcomb, J.R. Hoag, M.N. Nadagouda, R.S. Varm // *J. Mater. Chem.* – 2009. – № 19. – P. 8671-8677.

143. Huang, L. Green synthesis of iron nanoparticles by various tea extracts: Comparative study of the reactivity / L. Huang, X. Weng, Z. Chen, M. Megharaj, R. Naidu // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2014. – № 130. – P. 295-301.

144. Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers / A. Ulman // *Chem. Rev.* – 1996. – № 96. – P. 1533-1554.

145. Schulz-Dobrick, M. Surfactant-Free Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles / M. Schulz-Dobrick, K.V. Sarathy, M. Jansen // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – № 127. – P. 12816-12817.

146. Ramirez, E. Influence of organic ligands on the stabilization of palladium nanoparticles / E. Ramirez, S. Jansat, K. Philippot, P. Lecante, M. Gomez, A.M. Masdeu-Bultor, B. Chaudret // *Journal of Organometallic Chemistry.* – 2004. – № 689. – P. 4601-4610.

147. Chehimi, M.M. Modification of Nano - objects by Aryl Diazonium Salts Aryl Diazonium Salts: New Coupling Agents in Polymer and Surface Science / M.M. Chehimi. – Weinheim: Wiley-VCH, 2012. – 356 p.

148. Guselnikova, O.A. The convenient preparation of stable aryl-coated zerovalent iron nanoparticles / O.A. Guselnikova, A.I. Galanov, A.K. Gutakovskii, P.S. Postnikov // *Beilstein J. Nanotechnol.* – 2015. – № 6. – P. 1192-1198.

149. Neouze, M.A. Surface Modification and Functionalization of Metal and Metal Oxide Nanoparticles by Organic Ligands / M.A. Neouze, U. Schubert // *Monatsh. Chem.* – 2008. – № 139. – P. 183-195.

150. Lv, S. Doxorubicin-loaded amphiphilic polypeptide-based nanoparticles as an efficient drug delivery system for cancer therapy / S. Lv, M. Li, Z. Tang, W. Song, H. Sun, H. Liu, X. Chen // *Acta Biomater.* – 2013. – № 9. – P. 9330-9342.
151. Lee, C.S. Doxorubicin-loaded oligonucleotide conjugated gold nanoparticles: a promising in vivo drug delivery system for colorectal cancer therapy / C.S. Lee, H. Kim, J. Yu, S.H. Yu, S. Ban, S. Oh, D. Jeong, J. Im, M.J. Baek, T.H. Kim // *Eur. J. Med. Chem.* – 2017. – №142 (15). – P. 416-423.
152. Huang, G. Chitosan and its derivatives as vehicles for drug delivery / G. Huang, Y. Liu, L. Chen // *Drug Delivery.* – 2017. – № 24(S1). – P. 108-113.
153. Palazon, F. Carbodiimide/NHS Derivatization of COOH-Terminated SAMs: Activation or Byproduct Formation? / F. Palazon, C.M. Benavides, D. Leonard, E. Souteyrand, Y. Chevotot, J.P. Cloarec // *Langmuir.* – 2014. – № 30. – P. 4545-4550.
154. Yan, Q. EDC/NHS activation mechanism of polymethacrylic acid: anhydride versus NHS-ester / Q. Yan, H.N. Zheng, C. Jiang, K. Li, S.J. Xiao // *RSC Adv.* – 2015. – №5. – P. 69939-69947.
155. Wang, C. Different EDC/NHS Activation Mechanisms between PAA and PMAA Brushes and the Following Amidation Reactions / C. Wang, Q. Yan, H.B. Liu, X.H. Zhou, S.J. Xiao // *Langmuir.* – 2011. – № 27. – P. 12058-12068.
156. Liu, C. Sodium tripolyphosphate (TPP) crosslinked chitosan membranes and application in humic acid removal / C. Liu, R. Bai, L. Nan // *Proceedings of the Annual Meeting paper.* – 2004. – P. 394a.
157. Szymanska, E. Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications / E. Szymanska, K. Winnicka // *Mar. Drugs.* – 2015. – № 13. – P. 1819-1846.
158. Государственная Фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс] - 14-е изд. – Том I. – Москва, 2018. – Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>.
159. Danaei, M. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems / M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari // *Pharmaceutics.* – 2018. – № 10(57). – P. 1-17.

160. Dhangar, K.R. Review Article Impurity Profiling of Drugs towards Safety and Efficacy: Theory and Practice / K.R. Dhangar, R.B. Jagtap, S.J. Surana, A.A. Shirkhedkar // *J. Chil. Chem. Soc.* – 2017. – № 2(62). – P. 1-15.
161. Tucker, R.M. Single-Injection HPLC Method for Rapid Analysis of a Combination Drug Delivery System / R.M. Tucker, B.W. Parcher, E.F. Jones, T.A. Desai // *AAPS PharmSciTech.* – 2012. – № 2(13). – P. 1-6.
162. Коростелев, П.П. Титриметрический и гравиметрический анализ в металлургии / П.П. Коростелев. – Москва: Металлургия, 1985. – 320 с.
163. Daiziel, J.A.W. The Gravimetric Determination of Iron the Homogeneous Precipitation of the Tris (2-thiopyridine-N-oxide) - Iron(III) Complex / J.A.W. Daiziel, M. Thompson // *AnaZyst.* – 1964. – № 89. – P. 707-712.
164. Зимонина, Д.В. Определение железа в поверхностных и питьевых водах Красноярского региона методами вольтамперометрии / Д.В. Зимонина, Г.В. Бурмакина, Л.Г. Бондарева, А.М. Жижаева, А.И. Рубайлоа // *Журнал сибирского федерального университета.* – 2012. – № 5(2). – С. 198-208.
165. Кузяков, Н.Ю. Фотометрическое определение хрома(III) и железа(III) с помощью трилона Б / Н.Ю. Кузяков, В.А. Вешняков, Ю.Г. Хабаров, Е.А. Скрипников // *Бутлеровские Сообщения.* – 2017. – 12(52). – С. 10-18.
166. Liang, J. Potentiometric titration for the high precision determination of active components in six types of chemical disinfectants / J. Liang, J. Zhu, L. Gong, X. Liu, B. Wang // *PLoS One.* – 2018. – № 13(9). – P. 1-13.
167. Siddiqui, M.R. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review / M.R. Siddiqui, Z.A. AlOthman, N.Rahman // *Arabian Journal of Chemistry.* – 2017. – № 10. – P. 1409-1421.
168. Harris, D.C. Quantitative Chemical Analysis / D.C. Harris. – New York: W.H. Freeman, 2015. – 792 p.
169. Deshpande, G.R. Quantitative determination of residual phosphate and phosphite in bisphosphonates by ion exchange chromatography using conductivity detection / G.R. Deshpande, B.M. Rao, T. Rama Sowjanya, N. Someswararao // *Rasayan J. Chem.* – 2009. – № 1(2). – P. 87-95.

170. Heitkemper, D.T. Determination of tripolyphosphate and related hydrolysis products in processed shrimp / D.T. Heitkemper, L.A. Kaine, D.S. Jackson, K.A. Wolnik // Proceedings of the 18th Annual Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas. – 1993. – P. 92-100.
171. Khanmohammadi, M. Simultaneous Determination of Sodium Tripolyphosphate, Sodium Sulfate and Linear Alkylbenzenesulfonate in Washing Powder by Attenuated Total Reflectance: Fourier Transform Infrared Spectrometry / M. Khanmohammadi, A. Kargosha, B. Garmarudi // J. Surfact. Deterg. – 2007. – № 10. – P. 81-86.
172. Sinha, B.C. A Titrimetric Method for the Determination of Phosphate / B.C. Sinha, S.D. Gupta, S. Kumar // Analyst. – 1968. – № 93. – P. 409-412.
173. Corbridge, D.E.C. Phosphorus: Chemistry, Biochemistry and Technology / D.E.C. Corbridge. – Boca Raton: CRC Press, 2013. – 1473 p.
174. Larionova, N.I. Colorimetric assay of chitosan in presence of proteins and polyelectrolytes by using o-phthalaldehyde / N.I. Larionova, D.K. Zubaerova, D.T. Guranda, M.A. Pechyonkin, N.G. Balabushevich // Carbohydrate Polymers. – 2009. – № 75. – P. 724-727.
175. Abdou, E.S. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources / E.S. Abdou, K.S.A. Nagy, M.Z. Elsabee // Bioresource Technology. – 2008. – № 99. – P. 1359-1367.
176. Yan, X. Chitosan analysis using acid hydrolysis and HPLC/UV / X. Yan, H.M. Evenocheck // Carbohydrate Polymers. – 2012. – № 87. – P. 1774-1778.
177. Gupta, V. D. Quantitative Determination of Benzoic Acid and Salicylic Acid in Ointments by High-pressure Liquid Chromatography / V.D. Gupta // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1977. – № 1(66). – P. 110-111.
178. Бехтерев, В.Н. Определение консервантов в пищевых жировых композициях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с экстракционным вымораживанием / В.Н. Бехтерев, Е.А. Кабина, И.В. Мищенко // Прикладная аналитическая химия. – 2014. – № 1(11). – С. 10-14.

179. Sastry, C.S. Determination of doxorubicin hydrochloride by visible spectrophotometry / C.S.P. Sastry, J.S. Lingeswara Rao // *Talanta*. – 1996. – № 43. – P. 1827-1835.
180. Wei, G. Improved HPLC method for doxorubicin quantification in rat plasma to study the pharmacokinetics of micelle-encapsulated and liposome-encapsulated doxorubicin formulations / G. Wei, S. Xiao, D. Si, C. Liu // *Biomed. Chromatogr.* – 2008. – № 22. – P. 1252-1258.
181. N'cho, J.S. Review of Physicochemical-Based Diagnostic Techniques for Assessing Insulation Condition in Aged Transformers / J.S. N'cho, I. Fofana, Y. Hadjadj, A. Beroual // *Energies*. – 2016. – № 9(5). – P. 1-29.
182. Caballero, B. *The Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition Second Edition* / B. Caballero. – New York: Academic Press, 2003. – 6000 p.
183. Yan, X. Chitosan analysis using acid hydrolysis and HPLC/UV / X. Yan, H.M. Evenocheck // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – № 87. – P. 1774-1778.
184. Liang, Z. Determination of the nutraceutical, glucosamine hydrochloride, in raw materials, dosage forms and plasma using pre-column derivatization with ultraviolet HPLC / Z. Liang, J. Leslie, A. Adebawale, M. Ashraf, N.D. Eddington // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 1999. – № 20. – P. 807-814.
185. Frazier, S.B. The Quantification of Glycosaminoglycans: A Comparison of HPLC, Carbazole, and Alcian Blue Methods / S.B. Frazier, K.A. Roodhouse, D.E. Hourcade, L. Zhang // *Open Glycoscience*. – 2008. – № 1. – P. 31-39.
186. Ali, B.Z. Comparison of active ingredient consistency of some brand and generically available glucosamine products in Iranian pharmacies / B.Z. Ali, K. Mina sadat // *Intern. Med.* – 2016. – № 6(5). – P. 1-5.
187. Hasinoff, B.B. Oxyradical production results from the Fe³⁺-doxorubicin complex undergoing self-reduction by its α -ketol group / B.B. Hasinoff // *Biochem. cell biol.* – 1990. – № 68. – P. 1331-1336.
188. Mjos, K.D. Iron(III)-binding of the anticancer agents doxorubicin and vosaroxin / K.D. Mjos, J.F. Cawthray, G. Jamieson, J.A. Fox, C. Orviga // *Dalton Transactions*. – 2015. – № 44. – P. 2348-2358.

189. Lim, J.K. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering / J.K. Lim, S.P. Yeap, H.X. Che, S.C. Low // *Nanoscale Research Letters*. – 2013. – № 8. – P. 1-14.
190. Румянцев, В. Гранулометрический анализ с помощью лазерных анализаторов серии sald компании Shimadzu / В. Румянцев // *Аналитика*. – 2013. – № 6(13). – С. 60-62.
191. Robson, A.L. Advantages and Limitations of Current Imaging Techniques for Characterizing Liposome Morphology / A.L. Robson, P.C. Dastoor, J. Flynn, W. Palmer, A. Martin, D.W. Smith, A. Woldu, S. Hua // *Front. Pharmacol.* – 2018. № 9(80). – P. 1-8.
192. Tomaszewska, E. Detection Limits of DLS and UV-Vis Spectroscopy in Characterization of Polydisperse Nanoparticles Colloids / E. Tomaszewska, K. Soliwoda, K. Kadziola, B. Tkacz-Szczesna, G. Celichowski, M. Cichomski, W. Szmaja, J. Grobelny // *Journal of Nanomaterials*. – 2013. – № 60. – P. 1-11.
193. Li, G. *Nano-Inspired Biosensors for Protein Assay with Clinical Applications* / G. Li. – Amsterdam: Elsevier, 2019. – 378 p.
194. Власов, С.С. Оценка влияния параметров синтеза на размер магнитных микрочастиц Fe(0) / С.С. Власов, М.С. Юсубов, С.В. Кривошеков, Е.А. Безверхняя, Е.В. Свиридова, П.С. Постников, М.В. Белоусов // *Медицинский вестник Башкортостана*. – 2019. – № 1(79). – С. 53-59.
195. Власов, С.С. Изучение кинетики высвобождения доксорубицина под воздействием ультразвукового излучения при различных значениях рН из носителя на основе микрочастиц Fe(0) / С.С. Власов, А. Ди Мартино, М.С. Юсубов, А.М. Гурьев, С.В. Кривошеков, Е.В. Свиридова, П.С. Постников, М.В. Белоусов // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2019. – № 5. – С. 15-19.
196. Di Martino, A. Organic-inorganic hybrid nanoparticles controlled delivery system for anticancer drugs / A. Di Martino, O.A. Guselnikova, M.E. Trusova, P.S. Postnikov, V. Sedlarik // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2017. – № 526(1–2). – P. 380-390.

197. Кривошеков, С.В. Валидация методики количественного определения гексафторида серы в новом контрастном препарате методом газовой хроматографии / С.В. Кривошеков, М.С. Ларькина, С.С. Власов, Л.А. Дрыгунова, А.М. Гурьев, М.В. Белоусов, М.С. Юсубов // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – № 3(51). – С. 41-44.
198. Власов, С.С. Визуальная оценка органного распределения коллоидных микрочастиц железа 12-18 мкм при магнитно-резонансной-томографии у мышей с перевитыми опухолями Льюиса / С.С. Власов, М.В. Белоусов, М.Г. Данилец, И.В. Мильто, О.И. Беличенко, В.Ю. Усов // Вестник новых медицинских технологий. – 2019. – № 3(26). – С. 85-89.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Регистрационное удостоверение № _____

Дата регистрации «__» _____ 20__ г.

ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России
634050, Томская область, г. Томск, Московский тракт, д. 2
(наименование юридического лица, на имя которого выдано регистрационное удостоверение, адрес)

ПРОЕКТ НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

(номер)

Конъюгат Fe-CS-ДОКС

торговое наименование лекарственного средства

международное непатентованное наименование

лиофилизат для приготовления суспензии для внутривенного введения, 100 мг

лекарственная форма, дозировка

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФГБОУ ВО СибГМУ, Россия

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

ФГБОУ ВО СибГМУ, Россия

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)

ФГБОУ ВО СибГМУ, Россия

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

ФГБОУ ВО СибГМУ, Россия

СПЕЦИФИКАЦИЯ
на препарат «Конъюгат Fe-CS-DOX»,
лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг,
ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный	По внешнему виду препарат должен соответствовать требованиям ГФ XIV, ОФС .1.4.1.0007.15 «Лекарственные формы для парентерального применения». Порошок черного цвета или почти черного цвета.
Подлинность	ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО доксорубицина (раздел «Количественное определение»)
Бактериальные эндотоксины	ГФ XIV, метод В	Не более 175 ЕЭ/г
Стерильность	ГФ XIV	Препарат должен быть стерильным
Размер частиц	ГФ XIV, метод лазерной дифракции	Фракции 1,0-10,0 мкм не менее 90 %; не должно быть частиц более 15 мкм
Количественное определение		
-железо	ГФ XIV, гравиметрия	15,85 – 17,52 мг
- бензойная кислота	ВЭЖХ	16,62 – 18,38 мг
- хитозан	ВЭЖХ	7,88 – 8,72 мг
-натрия трифосфат	ГФ XIV, спектрофотометрия	18,20 – 20,12 мг
- доксорубицин	ВЭЖХ	36,38 – 40,22 мг
Упаковка	По 100 мг препарата в пенициллиновые флаконы. По 5 флаконов в упаковку контурную пластиковую (поддон). По 1, 2 контурные ячейковые упаковки вместе с инструкцией по применению помещают в пачку из картона.	
Маркировка	В соответствии с требованиями НД	

Хранение	В сухом защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С
Срок годности	2 года

Состав на 1 мл

Действующее вещество:

Доксорубицин – 38,30 мг

Вспомогательные вещества:

Железо - 16,685 мг

Натрия трифосфат – 19,16 мг

Бензойная кислота – 17,50 мг

Хитозан – 8,30 мг

Описание. По внешнему виду препарат должен соответствовать требованиям ГФ XIV, ОФС .1.4.1.0007.15 «Лекарственные формы для парентерального применения». Порошок черного цвета или почти черного цвета.

Подлинность. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО доксорубицина (раздел «Количественное определение»)

Бактериальные эндотоксины. Предельное содержание бактериальных эндотоксинов не более 175 ЕЭ/мл. Испытание проводят в соответствии с ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины», методом В. Максимальное разведение (МДР) – 1:5000.

Стерильность. Препарат должен быть стерильным. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIV, ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность».

Размер частиц (посторонние примеси).

Испытание проводят в соответствии с ГФ XIV, методом лазерной дифракции. Навеску анализируемых микрочастиц массой 50 мг суспендировать в 50 мл дистиллированной воды в течение 5 минут, далее, аликвоту полученной суспензии объемом 1,0 мл перенести в диспергатор лазерного дифрактометра для проведения измерений.

Настройка параметров системы:

- обсчет данных с использованием теории Ми для несферических частиц и универсальной модели анализа;

- показатель преломления материала ($n=2,86$);

- дисперсант: вода ($n=1,33$);

- длительность измерений: красный и синий свет – Фон: 10 секунд; Образец: 10 секунд;
- количество измерений: 5;
- ослабление сигнала лазера 10 %.

Количественное определение.

Железо.

Точную навеску образца 0,3 г помещают в химический стакан на 50 мл. Далее, добавляют 20 мл концентрированной (~ 12 М) HCl. Полученную смесь нагревают до 70 °С при постоянном перемешивании до полного растворения навески. Далее, добавляют 5 мл 6 М HNO₃ и продолжают нагревание еще 10 минут. По окончании процесса, смесь охлаждают до комнатной температуры, переносят в стакан на 400 мл, прибавляют 100 мл воды очищенной и добавляют 3 М раствор NH₄OH при постоянном перемешивании до достижения pH 7,5-7,9 (потенциометрически) и снова нагревают смесь в течение 5 минут. После, осадок отфильтровывают через беззольный фильтр (синяя лента), промывая стакан и осадок на фильтре горячим 1 % раствором NH₄NO₃. Промывку осадка осуществляют до отрицательной пробы на хлорид-ион с использованием 0,1 М AgNO₃. По окончании процесса, фильтр с осадком переносят в тигель, предварительно доведенный до постоянной массы. Далее, тигель с осадком помещают в муфельный шкаф и сжигают образец в течение 1 часа при температуре 900 °С. По окончании процесса, тигель извлекают из муфельного шкафа и охлаждают на воздухе в течение 30 минут, затем переносят в эксикатор для полного остывания. Полученный осадок взвешивают на аналитических весах, расчет количества Fe(0) производят по следующей формуле:

$$\%Fe(0) \text{ в образце} = \frac{\left(\frac{112 \cdot m(\text{осадка, г})}{160}\right)}{m(\text{навески})} \times 100\%$$

112 – удвоенная молекулярная масса Fe⁰;

160 – молекулярная масса Fe₂O₃;

m (осадка) – масса образовавшегося осадка Fe₂O₃, грамм;

m (навески) – масса навески Fe-CS-ДОКС;

Бензойная кислота.

Определение проводят методом ВЭЖХ, как описано в разделе «Доксорубицин». Расчет содержания бензойной кислоты (мг) проводят по формуле:

$$BA = \frac{S_x \times m_0}{S_1}$$

где, S_x – площадь пика бензойной кислоты на хроматограмме испытуемого раствора;

S₁ – площадь пика на хроматограмме стандартного раствора бензойной кислоты;

m₀ – масса бензойной кислоты, взятой для приготовления стандартного раствора.

Хитозан

Определение проводят методом ВЭЖХ, как описано в разделе «Доксорубицин». Расчет содержания хитозана проводят по формуле:

$$CS = \frac{S_y \times m_1}{S_2}$$

где, S_y – сумма площадей пиков ФМОС-производных глюкозамина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_2 – площадь пика на хроматограмме стандартного раствора хитозана;

m_0 – масса хитозана, взятого для приготовления стандартного раствора.

Доксорубицин*Хроматографические условия*

Объем вводимой пробы: 20 мкл

После выхода хроматографа на режим, хроматографируют растворы в указанной последовательности:

Образец	Количество инъекций
Растворитель	1 раз
Раствор стандартного образца доксорубицина	3 раза
Раствор стандартного образца бензойной кислоты	3 раза
Раствор стандартного образца хитозана	3 раза
Испытуемый раствор	2 раза

На хроматограммах испытуемого раствора и растворов стандартных образцов интегрируют основной пик.

Относительное от заявленного содержание доксорубицина в препарате рассчитывают по формуле:

$$DOX = \frac{S \times m_2}{S_3}$$

S – площадь пика ФМОС-производного доксорубицина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_3 – площадь пика на хроматограмме стандартного раствора доксорубицина;

m_0 – масса доксорубицина, взятого для приготовления стандартного раствора.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографируют раствор для пригодности хроматографической системы и раствора стандартного образца доксорубицина, получая не менее 5 хроматограмм.

Результаты считаются достоверными при выполнении всех нижеперечисленных условий:

- относительное стандартное отклонение площади основного пика (доксорубицина) на хроматограммах раствора стандартного образца составляет не более 2,0 %;
- относительное стандартное отклонение времени удерживания основного пика на хроматограммах раствора стандартного образца составляет не более 2,0 %;
- эффективность колонки, рассчитанная по пику доксорубицина на хроматограмме раствора стандартного образца доксорубицина, составляет не менее 3 000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика доксорубицина на хроматограмме раствора стандартного образца доксорубицина не менее 0,6 и не более 2,5.
- разрешение между пиками на хроматограмме для проверки пригодности хроматографической системы не менее 2.

Содержание доксорубицина должно быть от 95 до 105 % от заявленного.

Натрия трифосфат

Приготовление испытуемого раствора. Суспензию микрочастиц объемом 5 мл с концентрацией 1 мг/мл помещают в ампулу и добавляют 5 мл 4 М трифторуксусной кислоты. Далее, ампулу запаивали и проводили гидролиз в термостате при температуре 100-105 °С в течение 10 минут. Смесь переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при об/мин в течение 5 минут. Далее, 2,0 мл полученного супернатанта помещают в мерную колбу на 25 мл и добавляют 10 мл ацетатного буферного раствора (рН 4,1), 2,5 мл 1 % раствора аммония молибдата в серной кислоте и 2,5 мл 1 % раствора аскорбиновой кислоты. Смесь доводят до метки ацетатным буферным раствором и интенсивно перемешивают. Через 10 минут проводят измерение оптической плотности раствора относительно контрольного раствора при длине волны 740 нм. Расчет концентрации осуществляют с использованием калибровочного графика, построенного по стандартным растворам фосфат-ионов.

Упаковка. По 100 мг препарата в пенициллиновые флаконы.

По 5 флаконов в упаковку контурную пластиковую (поддон).

По 1, 2 контурные ячейковые упаковки вместе с инструкцией по применению помещают в пачку из картона.

Групповая упаковка и транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90.

Маркировка. 1) Первичная упаковка. На флаконе способом глубокой печати или способом струйной, или электрокаплеструйной печати указывают наименование препарата, массу в миллиграммах, номер серии, срок годности: «до xx xx»; или на флакон наклеивают самоклеящуюся этикетку.

На этикетке, наклеиваемой на флакон, указывают наименование предприятия-производителя, его товарный знак, наименование препарата, массу в миллиграммах, номер серии, срок годности: «до xx xx».

2) Вторичная упаковка. На фольге контурной ячейковой упаковки указывают наименование предприятия-производителя, его товарный знак, наименование препарата, лекарственную форму, массу в миллиграммах, номер серии, срок годности.

На этикетке групповой упаковки в пачке указывают наименование предприятия-производителя, его товарный знак и адрес, телефон, факс, электронный адрес, наименование препарата, международное непатентованное наименование, лекарственную форму, массу в миллиграммах, состав, количество флаконов в упаковке, «Стерильно», условия отпуска, условия хранения, «Применять по назначению врача», «Хранить в недоступном для детей месте», «Противоопухолевый препарат», номер регистрационного удостоверения, номер серии, срок годности, штриховой код.

На этикетке групповой упаковки дополнительно указывают количество упаковок в групповой таре.

Хранение. В защищенном от света месте при температуре не выше 8 °С

Срок годности. 2 года.

Минздрав России

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)
Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050
Телефон (3822) 53 04 23;
Факс (3822) 53 33 09
e-mail: office@ssmu.ru
http://www.ssmu.ru

ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251
ИНН 7018013613 КПП 701701001

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
А.Г. Мирошниченко



02.09. 2019

№ _____
На № _____ от _____

АКТ

внедрения в учебный процесс кафедры фармацевтического анализа результатов диссертационной работы Власова Сергея Сергеевича на тему «Синтез и контроль качества системы доставки доксорубина на основе микрочастиц Fe(0)», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя – заведующего кафедрой фармацевтического анализа, д-ра фарм. наук Белоусова М.В. и членов: доцента кафедры фармацевтического анализа, канд. фарм. наук Кадыровой Т.В., доцента кафедры фармацевтического анализа, канд. фарм. наук Ларькиной М.С. удостоверяем, что предложенная Власовым С.С. в проекте нормативной документации методика количественного определения доксорубина, хитозана и бензойной кислоты методом ВЭЖХ-УФ при их совместном присутствии в конъюгате Fe-CS-ДОКС внедрена и используется в процессе обучения ординаторов кафедры фармацевтического анализа в разделе «Хроматографические методы анализа».

Председатель
заведующий кафедрой фармацевтического анализа,
д-р. фарм. наук

М.В. Белоусов

Члены комиссии
доцент кафедры фармацевтического анализа
канд. фарм. наук

Т.В. Кадырова

доцент кафедры фармацевтического анализа
канд. фарм. наук

М.С. Ларькина



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: Методики количественного определения доксорубина, хитозана и бензойной кислоты методом ВЭЖХ-УФ при их совместном присутствии в конъюгате Fe-CS-ДОКС.

Кем предложен: заведующим кафедрой фармацевтического анализа ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» М.В. Белоусовым, заведующим лабораторией контроля качества Центра внедрения технологий центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» С.В. Кривошековым и аспирантом Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий НИ «Томский политехнический университет» С.С. Власовым.

Источник информации: проект нормативной документации «Конъюгат Fe-CS-ДОКС».

Место внедрения: кафедра фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Новосибирская обл., г. Новосибирск, Красный проспект, 52).

Цель внедрения: использование предлагаемых методик в учебном процессе аспирантов и ординаторов, дипломников (ВКР) кафедры фармацевтической химии.

Ответственный за внедрение: заведующий кафедрой фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Е.А. Ивановская.

Результаты внедрения: предложенные в проекте нормативной документации «Конъюгат Fe-CS-ДОКС» методики количественного определения доксорубина, хитозана и бензойной кислоты методом ВЭЖХ-УФ при их совместном присутствии в конъюгате Fe-CS-ДОКС используются в процессе обучения ординаторов кафедры фармацевтической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации в разделе «Хроматографические методы анализа».

Члены комиссии:

1. Терентьева С.В. д.фарм.н., каф. фармацевтической химии
2. Лигостаев А.В. к.фарм.н., доцент кафедры
3. Пашкова Л.В. ст.преподаватель кафедры

Ответственный за внедрение:

заведующий кафедрой фармацевтической химии
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России,
д. фарм. н., профессор





"УТВЕРЖДАЮ"
 Проректор по учебной работе
 ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
 Цыглин А.А.

2019 г.
 "26" августа

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: Методика количественного определения натрия трифосфата в конъюгате Fe-CS-ДОКС.

Кем предложен: заведующим кафедрой фармацевтического анализа ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации М.В. Белоусовым, заведующим лабораторией контроля качества Центра внедрения технологий центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации С.В. Кривошековым и аспирантом Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий НИ «Томский политехнический университет» С.С. Власовым.

Источник информации: проект нормативной документации «Конъюгат Fe-CS-ДОКС».

Место внедрения: кафедра фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (450008, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3).



Цель внедрения: использование предлагаемой методики в учебном процессе аспирантов кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии.

Ответственный за внедрение: заведующий кафедрой фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации Ф.А. Халиуллин.

Результаты внедрения: предложенная в проекте нормативной документации методика количественного определения натрия трифосфата в конъюгате Fe-CS-ДОКС включена в практические занятия учебного плана аспирантов кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ответственный за внедрение:
 заведующий кафедрой фармацевтической химии с
 курсами аналитической и токсикологической химии
 ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России,
 д. фарм. н., профессор

Ф.А. Халиуллин

ЛАБОРАТОРИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА Центр внедрения технологий Центральная научно-исследовательская лаборатория ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России		Стр. 1 из 41	
ПРОТОКОЛ ВАЛИДАЦИИ		Ф-ЦВТ-ЖК-010-16	
		Версия №: Копия №	
Объект валидации	Методика анализа количественного определения хитозана, доксорубицина и бензойной кислоты		
Дата начала валидации	«29» 04 2019 г.	Дата окончания валидации	«14» 05 2019 г.
	Должность	Ф. И. О.	Подпись: Дата:
Валидировал	Лаборант ЦВТ	Власов С.С.	 15.05.19
Проверил	м.н.с. ЦНИЛ	Кривошеков С.В.	 15.05.19
Утвердил	Руководитель ЦВТ	Гурьев А.М.	 15.05.19

634050 Россия, Томская область, г. Томск
 Московский тракт 2, стр. 18
 тел. +7 (3822) 901-101 #1863

Протокол № 2 от 15 мая 2019 г

Томск – 2019

1.Нормативные документы

ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 Общие требования компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений

РМГ 76-2004 Государственная система обеспечения единства измерений. Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа.

РМГ 29-99 Государственная система обеспечения единства измерений. Метрология. Основные термины и определения.

ГОСТ Р 52361-2005 Контроль объекта аналитический. Термины и определения.

ISO 3534-1:1993 Statistics-Vocabulary and symbol – Part 1: Statistical methods. Terms and definitions.

ГОСТ Р ИСО 5725-1 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения

ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»

2. Термины и определения

Валидация - документированное подтверждение соответствия оборудования, условий производства, технологического процесса, качества полупродукта и готового продукта действующим регламентам и/или требованиям нормативной документации.

Воспроизводимость – прецизионность в условиях воспроизводимости.

Методика аналитического контроля – документированная совокупность операций и правил проведения аналитического контроля конкретных объектов.

Повторяемость результатов измерений – прецизионность в условиях повторяемости.

Правильность – степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений, к принятому опорному значению

Предел обнаружения – наименьшее содержание аналита, при котором он может быть обнаружен по данной методике анализа вещества или материала с заданной доверительной вероятностью.

Предел определения – наименьшее содержание аналита, которое может быть количественно определено с помощью данной методики анализа вещества или материала с установленным значением характеристик погрешности или неопределенности.

Прецизионность – степень близости друг к другу независимых результатов единичного анализа (результатов анализа), полученных в конкретных установленных условиях.

Средство измерений – техническое средство, предназначенное для измерений, имеющее нормированные метрологические характеристики, воспроизводящее и (или) хранящее единицу физической величины, размер которой принимают неизменным (в пределах установленной погрешности) в течение известного интервала времени.

Условия воспроизводимости – условия, при которых результаты измерений получают одним и тем же методом, на идентичных объектах испытаний, в разных лабораториях, разными операторами с использованием различного оборудования.

Условия повторяемости – условия, при которых независимые результаты измерений получают одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени.

3. Порядок проведения валидации

3.1. Условия получения экспериментальных данных:

- средства измерений, используемые для проведения измерений, должны быть поверены в установленном порядке;
- измерения проводятся в соответствии с предварительно разработанной документированной процедурой анализа (методикой).

3.2. Оценка селективности

Производится анализ 6 проб матрицы (различных проб растворителя) в соответствии с документированной процедурой анализа. Методика считается селективной, если аналитический сигнал от матрицы, полученный на времени выхода аналита, не превышает аналитический сигнал аналита, полученного для предела определения (LOD).

3.3. Определение линейности градуировочной зависимости

В соответствии с документированной процедурой осуществляется анализ (определение аналитического сигнала) образцов для градуировки. Каждый градуировочный образец анализируется не менее 3 раз.

После получения результатов, градуировочная зависимость интерполируется уравнением прямой, с помощью линейного метода наименьших квадратов (МНК). Приводятся параметры линейной зависимости и коэффициент аппроксимации.

Приводят расчетное значение концентраций для градуировочных растворов, полученное путем подстановки среднего значения хроматографического пика для каждого раствора в уравнение градуировочной зависимости. Данные приводят по форме таблицы 1.

Таблица 1 – Форма представления результатов эксперимента для оценки показателя линейности

Концентрация, мг/мл	Среднее значение сигнала, ед.изм.

Методика считается удовлетворяющей требованиям линейности, если для не менее чем 75 % градуировочных образцов, величина относительного расхождения расчетной и заложенной концентрации, не превышает 15 % (20% для LQC). Не удовлетворяющие условию градуировочные образцы должны быть исключены из расчета, а уравнение градуировочной зависимости перерасчитано.

3.4. Определение предела обнаружения

В качестве предела обнаружения (LOD) принимают значение равное $3 \times \beta$, где β – отношение сигнал/шум на хроматограмме холостого образца.

3.5. Установление показателей прецизионности

Для определения используется не менее 4 образцов для валидации.

В качестве характеристики повторяемости принимается коэффициент вариации (КВ) результатов измерений, полученных в условия повторяемости (σ_r). Критерий приемлемости 5 %.

В качестве характеристики воспроизводимости принимается коэффициент вариации результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости (σ_R). Критерий приемлемости 10 %.

В качестве характеристики точности принимается относительное отклонение полученного результата от номинального значения, выраженное в процентах. Критерий приемлемости 95 – 105 %.

4. Методика хроматографического определения показателей качества

4.1. Перечень СИ:

- Жидкостной хроматограф Ultimate 3000 (Thermo, США) (или аналогичный), оснащенный ультрафиолетовым детектором
- Весы аналитические GR-120 (или аналогичные) с пределом погрешности взвешивания 0,1 мг

4.2. Приготовление калибровочных растворов

4.2.1. Приготовление калибровочных растворов доксорубина

Для построения градуировочного графика готовят серию из 6 растворов доксорубина с концентрациями 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 мг/мл и проводят пробоподготовку в соответствии с методикой.

- Калибровочный раствор 1 (**КР1**). Навеску доксорубина массой 50,0 мг помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и растворяют в смеси соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. Полученный раствор доводят до метки тем же растворителем. ($C_{\text{ДОКС}} = 0,5$ мг/мл).
- Калибровочный раствор 2 (**КР2**). Аликвоту раствора **КР1** объемом 20,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки смесью соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. ($C_{\text{ДОКС}} = 0,2$ мг/мл).
- Калибровочный раствор 3 (**КР3**). Аликвоту раствора **КР2** объемом 25,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки смесью соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. ($C_{\text{ДОКС}} = 0,1$ мг/мл).
- Калибровочный раствор 4 (**КР4**). Аликвоту раствора **КР3** объемом 25,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки смесью соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. ($C_{\text{ДОКС}} = 0,05$ мг/мл).
- Калибровочный раствор 5 (**КР5**). Аликвоту раствора **КР4** объемом 20,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки смесью соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. ($C_{\text{ДОКС}} = 0,02$ мг/мл).
- Калибровочный раствор 6 (**КР6**). Аликвоту раствора **КР5** объемом 25,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки смесью соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. ($C_{\text{ДОКС}} = 0,01$ мг/мл).

4.2.2. Приготовление калибровочных растворов глюкозамина

Для построения градуировочного графика готовят серию из 5 растворов глюкозамина с концентрациями 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 мг/мл и проводят пробоподготовку в соответствии с методикой.

Калибровочный раствор 1 (**КР1**). Навеску глюкозамина массой 50,0 мг помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и растворяют в смеси соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. Полученный раствор доводят до метки тем же растворителем. ($C_{ГА} = 0,5$ мг/мл).

- Калибровочный раствор 2 (**КР2**). Аликвоту раствора **КР1** объемом 20,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки смесью соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. ($C_{ГА} = 0,2$ мг/мл).

- Калибровочный раствор 3 (**КР3**). Аликвоту раствора **КР2** объемом 25,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки смесью соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. ($C_{ГА} = 0,1$ мг/мл).

- Калибровочный раствор 4 (**КР4**). Аликвоту раствора **КР3** объемом 25,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки смесью соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. ($C_{ГА} = 0,05$ мг/мл).

- Калибровочный раствор 5 (**КР5**). Аликвоту раствора **КР4** объемом 20,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки смесью соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. ($C_{ГА} = 0,02$ мг/мл).

- Калибровочный раствор 6 (**КР6**). Аликвоту раствора **КР5** объемом 25,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки смесью соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. ($C_{ГА} = 0,01$ мг/мл).

4.2.3. Приготовление калибровочных растворов бензойной кислоты

Для построения градуировочного графика готовят серию из 6 растворов бензойной кислоты с концентрациями 0,002; 0,008; 0,01; 0,04; 0,08; 0,1 мг/мл и проводят пробоподготовку в соответствии с описанной методикой.

- Калибровочный раствор 1 (**КР1**). Навеску бензойной кислоты массой 25,0 мг помещают в мерную колбу на 250 мл и растворяют в подвижной фазе. Полученный раствор доводят до метки тем же растворителем ($C_{БК} = 0,1$ мг/мл).

- Калибровочный раствор 2 (**КР2**). Аликвоту раствора **КР1** объемом 40,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки подвижной фазе. ($C_{БК} = 0,08$ мг/мл).

- Калибровочный раствор 3 (**КР3**). Аликвоту раствора **КР2** объемом 25,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки подвижной фазе. ($C_{\text{БК}}=0,04$ мг/мл).
- Калибровочный раствор 4 (**КР4**). Аликвоту раствора **КР3** объемом 25,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки подвижной фазе. ($C_{\text{БК}}=0,01$ мг/мл).
- Калибровочный раствор 5 (**КР5**). Аликвоту раствора **КР4** объемом 40,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки подвижной фазе. ($C_{\text{БК}}=0,008$ мг/мл).
- Калибровочный раствор 6 (**КР6**). Аликвоту раствора **КР5** объемом 12,5 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки подвижной фазе. ($C_{\text{БК}}=0,002$ мг/мл).

4.3. Методика подготовки проб

Навеску конъюгата, массой 600 мг помещают в ампулу и смешивают с 10 мл раствора соляной (10 М) и трифторуксусной кислот (4 М) в соотношении 1:1. Далее, запаянную ампулу помещают в термостат при температуре 105 °С и проводят растворение в течение 4 часов. Затем, полученную смесь остужают до комнатной температуры. Аликвоту в объеме 3 мл помещают в мерную колбу на 50 мл, добавляют 30 мл водного раствора натрия тетрабората с концентрацией 12,6 % и 3 мл раствора 2 М ЭДТА. Полученный раствор до метки с использованием боратного буфера рН 7,0. Для дериватизации аликвоту гидролизата объемом 1,0 мл смешивают с 10 мл раствора 9-флуоренилметоксикарбонила гидрохлорида в ацетонитриле с концентрацией 10 мг/мл. Полученную смесь оставляют при комнатной температуре на 4 часа без перемешивания. Затем, в образец вносят 3 мл подвижной фазы (0,05 % ТФУ/АЦН, 1:1) и проводят хроматографический анализ.

При подготовке калибровочных образцов в ампулу помещают аликвоту 10 мл калибровочного раствора, а далее поступают так же, как с испытуемым раствором.

4.4. Проведение анализа

Хроматографические условия

Колонка: 25 × 0,46 см, LunaC18(2), 5 мкм, Phenomenex

Допускается использование альтернативной колонки, удовлетворяющей требованиям пригодности хроматографической системы.

ПФ Элюент А: 0,05 % ТФУ в воде. Элюент Б: 0,05 % ТФУ в ацетонитриле

Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Температура колонки + 40 °С

Детектор: УФ-спектрофотометрический или диодно-матричный, 265 нм.

Объем пробы: 20 мкл

Время регистрации хроматограмм: 30 мин.

4.5. Линейность

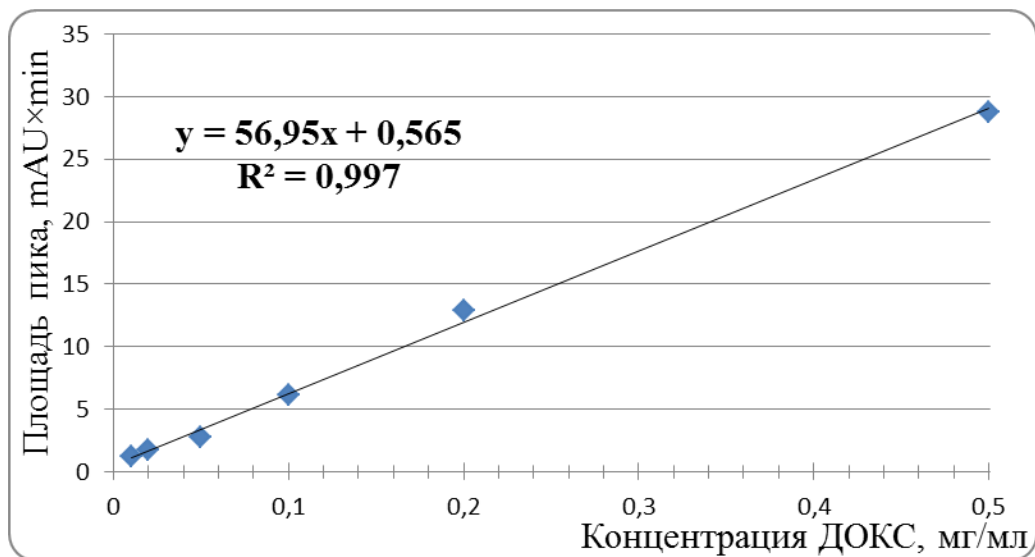


Рисунок 1 – График зависимости площади пика доксорубицинона от его концентраций в анализируемых растворах

Из графика зависимости следует, что методика обладает линейностью в исследуемом диапазоне 0,1 – 0,5 мг/мл и характеризуется коэффициентом корреляции $R^2 = 0,997$

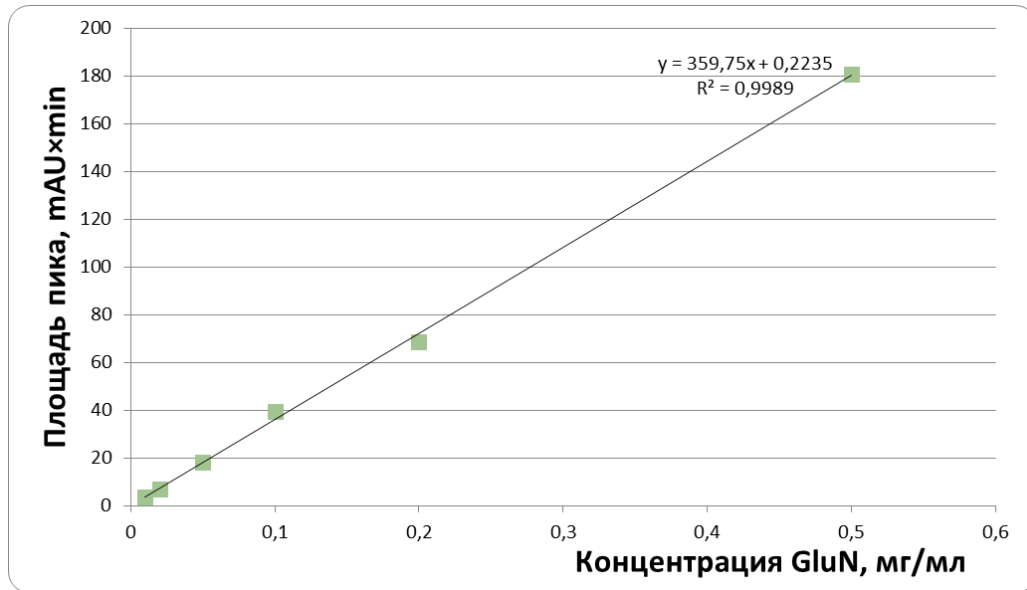


Рисунок 2 – График зависимости площади пика глюкозамина от его концентраций в анализируемых растворах

Из графика зависимости следует, что методика обладает линейностью в исследуемом диапазоне 0,1 – 0,5 мг/мл и характеризуется коэффициентом корреляции $R^2 = 0,999$

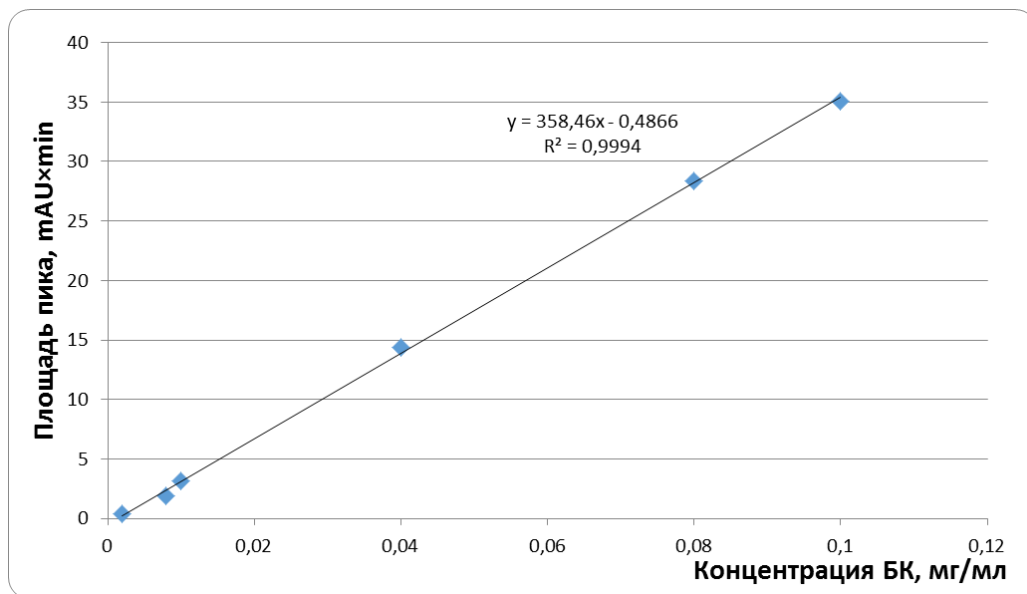


Рисунок 3 – График зависимости площади пика бензойной кислоты от его концентраций в анализируемых растворах

Из графика зависимости следует, что методика обладает линейностью в исследуемом диапазоне 0,002 – 0,1 мг/мл и характеризуется коэффициентом корреляции $R^2 = 0,999$

Таблица 2 – Таблица данных по определению линейности

Концентрация, мг/мл	Площадь пика анализируемого компонента	Площадь пика анализируемого компонента	Площадь пика анализируемого компонента	Среднее значение площадей пиков
Доксорубин				
0,01	1,11	1,19	1,27	1,19
0,02	1,81	1,79	1,65	1,75
0,05	2,85	2,75	2,77	2,79
0,1	6,22	6,15	6,14	6,17
0,2	12,77	12,82	12,96	12,85
0,5	28,89	28,71	28,68	28,76
Глюкозамин				
0,01	3,66	3,41	3,46	3,51
0,02	7,16	6,98	7,01	7,05
0,05	17,95	18,18	18,32	18,15
0,1	39,45	39,77	39,64	39,62
0,2	69,15	68,95	68,30	68,8
0,5	180,62	180,81	180,94	180,79
Бензойная кислота				
0,002	0,42	0,35	0,28	0,35
0,008	1,89	1,81	1,91	1,87
0,01	3,05	3,14	3,17	3,12
0,04	14,14	14,39	14,49	14,34
0,08	28,49	28,28	28,4	28,39
0,1	34,78	35,11	35,23	35,04

4.6. Селективность

Для подтверждения специфичности методики проводили хроматографический анализ 3 серий образцов микрочастиц ноль-валентного железа без поверхностной модификации (Fe(0)), Fe-COOH и Fe-CS (не содержащих доксорубин). Полученные результаты (рисунок 3, 4, 5) подтверждают специфичность методики при количественном определении доксорубина, хитозана и бензойной кислоты.

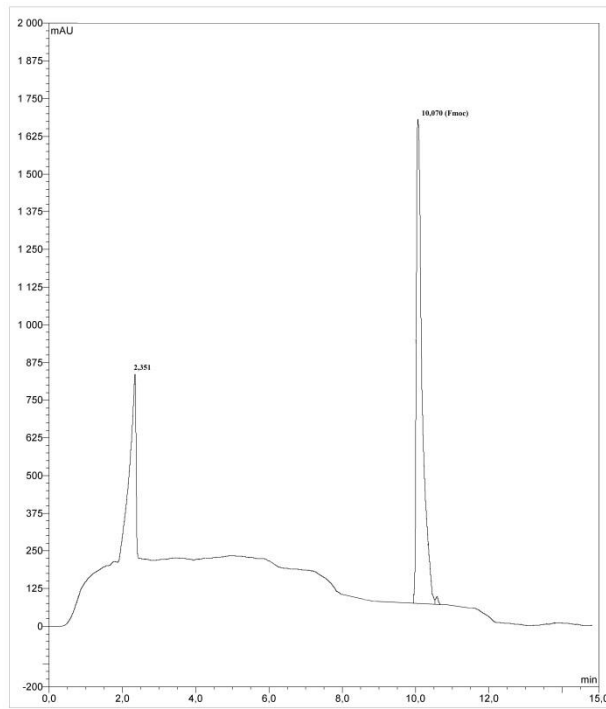


Рисунок 3 – Хроматограмма микрочастиц Fe(0) без поверхностной модификации

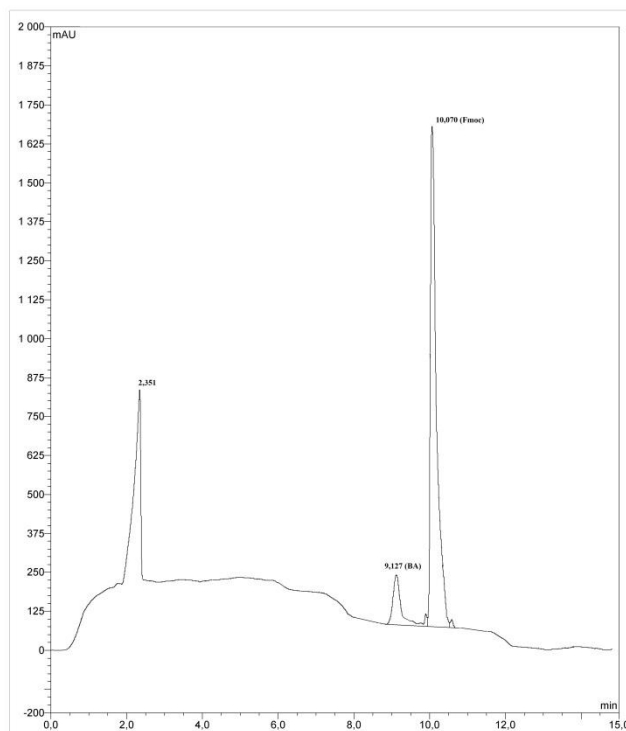


Рисунок 4 – Хроматограмма микрочастиц Fe-COOH

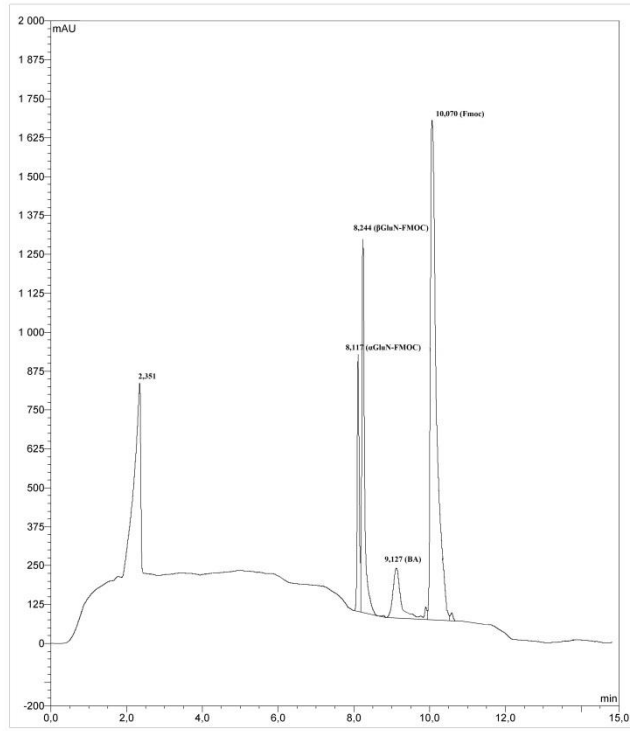


Рисунок 5 – Хроматограмма микрочастиц Fe-CS

4.7. Прецизионность методики

Прецизионность в условиях повторяемости

Таблица 3 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях повторяемости на уровне содержания доксорубина 80 %

N	S _i	С _{номинал} , мг/мл	C _i , мг/мл	C _{ср} , мг/мл	C _i - C _{ср}	(C _i - C _{ср}) ²	Σ(C _i - C _{ср}) ²	S _x	Δ	Сходимость (σ _r), %
1	4,769	0,08	0,073819	0,076	0,0021809	4,76 × 10 ⁻⁶	2,96 × 10 ⁻⁵	0,00099389	0,002554	3,19
2	4,887		0,075891		0,000109	1,19 × 10 ⁻⁸				
3	4,989		0,077682		0,001682	2,83 × 10 ⁻⁶				
4	4,989		0,077682		0,001682	2,83 × 10 ⁻⁶				
5	4,992		0,077735		0,001735	3,01 × 10 ⁻⁶				
6	4,664		0,071975		0,004025	1,62 × 10 ⁻⁵				

S_i, mAU*min – величина площади пика на i-ой хроматограмме;

C_i, мкг/мл – найденная концентрация из калибровочной зависимости;

C_{ср}, мкг/мл – среднее значение концентрации, найденное в образцах;

S_x – среднее квадратичное отклонение, вычисляемое $S_x = \sqrt{\frac{\sum(C_i - C_{ср})^2}{n(n-1)}}$;

Δ – доверительный интервал;

Сходимость, % - степень близости полученных результатов друг к другу;

σ_r = 3,19%

Δ = 0,002554 мг/мл

Таблица 4 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях повторяемости на уровне содержания доксорубина 100 %

N	S _i	C _{нормал} , МГ/МЛ	C _i , МГ/МЛ	C _{ср} , МГ/МЛ	C _i - C _{ср}	(C _i - C _{ср}) ²	Σ(C _i - C _{ср}) ²	S _x	Δ	Сходимость (σ), %
1	6,166	0,1	0,098349	0,0986	0,00025057	6,23×10 ⁻⁸	1,77913×10 ⁻⁶	0,00024352	0,000626	0,60
2	6,187		0,098718		0,00011817	1,41×10 ⁻⁸				
3	6,222		0,099333		0,00073275	5,37×10 ⁻⁷				
4	6,144		0,097963		0,00063687	4,06×10 ⁻⁷				
5	6,155		0,098156		0,00044372	1,97×10 ⁻⁷				
6	6,223		0,09935		0,00075031	5,63×10 ⁻⁷				

σ_r = 0,60%

Δ = 0,000626 МГ/МЛ

Таблица 5 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях повторяемости на уровне содержания доксорубина 120 %

N	S _i	С _{нормал} , мг/мл	C _i , мг/мл	С _{ср} , мг/мл	C _i - C _{ср}	(C _i - C _{ср}) ²	Σ(C _i - C _{ср}) ²	S _x	Δ	Сходимость (σ _r), %
1	7,255	0,12	0,117471	0,1196	0,0021285	4,53×10 ⁻⁶	3,80218×10 ⁻⁵	0,00112579	0,002893	2,30
2	7,328		0,118753		0,000847	7,17×10 ⁻⁷				
3	7,619		0,123863		0,004263	1,82×10 ⁻⁵				
4	7,514		0,122019		0,002419	5,85×10 ⁻⁶				
5	7,209		0,116664		0,002936	8,62×10 ⁻⁶				
6	7,356		0,119245		0,000355	1,26×10 ⁻⁷				

σ_r = 2,30%

Δ = 0,002893 мг/мл

Таблица 6 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях повторяемости на уровне содержания глюкозамина 80 %

Z	S _i	C _{нормаль} , мг/мл	C _i , мг/мл	C _{ср} , мг/мл	C _i - C _{ср}	(C _i - C _{ср}) ²	Σ(C _i - C _{ср}) ²	S _x	Δ	Сходимость (σ _r), %
1	6,256	0,016	0,016769	0,0159	0,000868589	7,54×10 ⁻⁷	1,24×10 ⁻⁶	0,00020313	0,000522	3,12
2	6,009		0,016082		0,00018200	3,31×10 ⁻⁸				
3	5,877		0,015715		0,00018492	3,2×10 ⁻⁸				
4	5,721		0,015281		0,00061856	3,82×10 ⁻⁷				
5	5,992		0,016035		0,00013475	1,81×10 ⁻⁸				
6	5,899		0,015776		0,00012377	1,53×10 ⁻⁸				

$$\sigma_r = 3,12\%$$

$$\Delta = 0,000522 \text{ мг/мл}$$

Таблица 7 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях повторяемости на уровне содержания глюкозамина 100 %

N	S _i	C _{номинал} , мг/мл	C _i , мг/мл	C _{ср} , мг/мл	C _i - C _{ср}	(C _i - C _{ср}) ²	Σ(C _i - C _{ср}) ²	S _x	Δ	Сходимость (σ), %
1	7,161	0,02	0,019281	0,01936	-7,855×10 ⁻⁵	6,17×10 ⁻⁹	1,24×10 ⁻⁶	0,00020313	0,000522	2,57
2	6,982		0,018781		0,00057890	3,35×10 ⁻⁷				
3	7,013		0,018864		0,00049551	2,46×10 ⁻⁷				
4	7,225		0,019462		0,00010213	1,04×10 ⁻⁸				
5	7,445		0,020074		0,00071366	5,09×10 ⁻⁷				
6	7,318		0,019721		0,00036064	1,30×10 ⁻⁷				

$$\sigma_r = 2,57\%$$

$$\Delta = 0,000522 \text{ мг/мл}$$

Таблица 8 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях повторяемости на уровне содержания глюкозамина 120 %

N	S _i	Случайный, мг/мл	C _i , мг/мл	С _{ср.} , мг/мл	C _i - C _{ср.}	(C _i - C _{ср.}) ²	Σ(C _i - C _{ср.}) ²	S _x	Δ	Сходимость (σ _r), %
1	8,574	0,024	0,023212	0,0236	0,000388047	1,51×10 ⁻⁷	1,64×10 ⁻⁶	0,0002336	0,0006	2,41
2	8,974		0,024324		0,00072384	5,24×10 ⁻⁷				
3	8,651		0,023426		0,00017401	3,03×10 ⁻⁸				
4	8,612		0,023318		0,00028242	7,98×10 ⁻⁸				
5	8,574		0,023212		0,00038805	1,51×10 ⁻⁷				
6	9,015		0,024438		0,00083780	7,02×10 ⁻⁷				

$$\sigma_r = 2,41\%$$

$$\Delta = 0,0006 \text{ мг/мл}$$

Таблица 9 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях повторяемости на уровне содержания бензойной кислоты 80 %

N	S _i	C _{номинал} , МГ/МЛ	C _i , МГ/МЛ	C _{ср} , МГ/МЛ	C _i - C _{ср}	(C _i - C _{ср}) ²	Σ(C _i - C _{ср}) ²	S _x	Δ	Сходимость (σ _r), %
1	13,952	0,036	0,037565	0,0366	0,000964582	9,30×10 ⁻⁷	2,1×10 ⁻⁶	0,00026589	0,000683	1,78
2	13,817		0,037188		0,00058797	3,46×10 ⁻⁷				
3	13,395		0,036011		0,00058929	3,47×10 ⁻⁷				
4	13,455		0,036178		0,00042191	1,78×10 ⁻⁷				
5	13,412		0,036058		0,00054186	2,94×10 ⁻⁷				
6	13,664		0,036761		0,00016115	2,60×10 ⁻⁸				

σ_r = 1,78%

Δ = 0,000683 МГ/МЛ

Таблица 10 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях повторяемости на уровне содержания бензойной кислоты 100 %

N	S _i	C _{номинал} , мг/мл	C _i , мг/мл	C _{ср} , мг/мл	C _i - C _{ср}	(C _i - C _{ср}) ²	Σ(C _i - C _{ср}) ²	S _x	Δ	Сходимость (σ _r), %
1	16,235	0,045	0,043933	0,048	0,00866507	7,51×10 ⁻⁷	2,62×10 ⁻⁶	0,00029548	0,000759	1,62
2	16,451		0,044536		0,00026393	6,97×10 ⁻⁸				
3	16,888		0,045755		0,00095518	9,12×10 ⁻⁷				
4	16,759		0,045395		0,00059530	3,54×10 ⁻⁷				
5	16,665		0,045133		0,00033307	1,11×10 ⁻⁷				
6	16,313		0,044151		0,00064891	4,21×10 ⁻⁷				

σ_r = 1,62%

Δ = 0,000759 мг/мл

Таблица 11 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях повторяемости на уровне содержания бензойной кислоты 120 %

N	S _i	С _{номинал} , мг/мл	C _i , мг/мл	С _{ср} , мг/мл	C _i - C _{ср}	(C _i - C _{ср}) ²	Σ(C _i - C _{ср}) ²	S _x	Δ	Сходимость (σ _r), %
1	19,535	0,054	0,05314	0,0537	0,000560459	3,14×10 ⁻⁷	1,33*10 ⁻⁶	0,00021054	0,000541	0,96
2	19,666		0,053505		0,00019501	3,80×10 ⁻⁸				
3	19,902		0,054163		0,00046337	2,15×10 ⁻⁷				
4	19,557		0,053201		0,00049909	2,49×10 ⁻⁷				
5	19,992		0,054414		0,00071444	5,10×10 ⁻⁷				
6	19,715		0,053642		5,83×10 ⁻⁵	3,40×10 ⁻⁹				
<p>σ_r = 0,96% Δ = 0,000541 мг/мл</p>										

Прецизионность в условиях воспроизводимости

Таблица 12 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях воспроизводимости на уровне содержания доксорубицина 80 %

N	1			2			C_{cp} МГ/МЛ	S_{ml}	G	$G_{tab}(m=2;f=2)$	S_{cp}	CO (S), МГ/МЛ	Сходимость (σ_R), %
s	C_i МГ/МЛ	C_i МГ/МЛ	C_i МГ/МЛ	C_i МГ/МЛ	C_i МГ/МЛ	C_i МГ/МЛ							
4,769	0,073819	4,887	0,075891	4,989	0,077682	0,076		0,001933221	0,5432	0,9750	0,000729	0,001785	2,38
4,889	0,075926	4,804	0,074434	4,704	0,072678	0,074		0,00162601					

$$\sigma_R = 2,38\%$$

$$\Delta = 0,001873 \text{ МГ/МЛ}$$

Таблица 13 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях воспроизводимости на уровне содержания доксорубина 100 %

N	1			2			
S	6,166	6,187	6,222	6,142	6,153	6,182	
C_i мг/мл	0,098349	0,098718	0,099333	0,097928	0,098121	0,09863	
C_{cp} мг/мл	0,0988			0,0982			
S_{ml}	0,000496754			0,000362844			
G	0,5779			0,5779			
$G_{tab}(m=2;f=2)$	0,9750			0,9750			
S_{cp}	0,000298			0,000298			
CO (S), мг/мл	0,0005			0,0005			
Сходимость (σ_R), %	0,51			0,51			

$\sigma_R = 0,51\%$

$\Delta = 0,000767$ мг/мл

Таблица 14 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях воспроизводимости на уровне содержания доксорубина 120 %

N		1			2			C _{ср} МГ/МЛ	S _{мл}	G	G _{таб(m=2;f=2)}	S _{ср}	CO (S), МГ/МЛ	Сходимость (σ _R), %
	s						C _i МГ/МЛ							
		7,459	7,311	7,516	7,619	7,328	7,255							
		0,121054	0,118455	0,122054	0,123863	0,118753	0,117471							
		0,121			0,12									
		0,001857993			0,003381439									
		0,6454			0,9750									
		0,00101			0,002455									
		2,05												

σ_R = 2,05%

Δ = 0,002595 МГ/МЛ

Таблица 15 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях воспроизводимости на уровне содержания глюкозамина 80 %

N		1			2			C _{ср} мг/мл	S _{ml}	G	G _{таб} (m=2;f=2)	S _{ср}	CO (S), мг/мл	Сходимость (σ _R), %		
s		5,877	6,009	6,256	5,754	5,992	5,921								C _i мг/мл	C _{ср} мг/мл
		0,015373	0,016035	0,015837	0,015715	0,016082	0,016769	0,0157	0,0162	0,000339637	0,000534777	0,612	0,9750	0,000193	0,000468	2,94

σ_R = 2,94%

Δ = 0,000497 мг/мл

Таблица 16 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях воспроизводимости на уровне содержания глюкозамина 100 %

N	1			2			
S							
C_i мг/мл							
C_{cp} мг/мл	0,0189						
S_{ml}	0,000265909						
G	0,8751						
$G_{tab}(m=2;f=2)$	0,9750						
S_{cp}	0,000235						
CO (S), мг/мл	0,000575						
Сходимость (σ_r), %	2,95						
	7,398	7,415	7,425	7,013	6,982	7,161	
	0,019943	0,01999	0,020018	0,018873	0,018787	0,019284	
	0,02						
	$3,79 \times 10^{-5}$						

$\sigma_r = 2,95\%$

$\Delta = 0,000603$ мг/мл

Таблица 17 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях воспроизводимости на уровне содержания глюкозамина 120 %

N	1			2			C_i мг/мл	C_{cp} мг/мл	S_{ml}	G	$G_{tab}(m=2;f=2)$	S_{cp}	CO (S), мг/мл	Сходимость (σ_R), %
s	8,574	8,974	8,651	8,752	8,574	8,915								
			0,023426	0,023707	0,023212	0,02416								
			0,024324					0,0237						
									0,000589947					
										0,5544				
											0,9750			
												0,000196		
													0,000479	
														2,02

$\sigma_r = 2,02\%$

$\Delta = 0,000504$ мг/мл

Таблица 18 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях воспроизводимости на уровне содержания бензойной кислоты 80 %

N		1			2			C _i МГ/МЛ	C _{ср} МГ/МЛ	S _{ml}	G	G _{таб} (m=2;f=2)	S _{ср}	CO (S), МГ/МЛ	Сходимость (σ _R), %
s															
		13,664	13,512	13,575											
		0,036761	0,036337	0,036513											
								0,0365	0,0369						
										0,000213049	0,000810584				
										0,7919					
											0,9750				
												0,000233			
													0,00057		
														1,55	

σ_r = 1,55%

Δ = 0,000599 МГ/МЛ

Таблица 19 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях воспроизводимости на уровне содержания бензойной кислоты 100 %

N		1			2			C _i мг/мл	C _{ср} мг/мл	S _{мл}	G	G _{таб} (m=2;f=2)	S _{ср}	CO (S), мг/мл	Сходимость (σ _r), %
s															
		19,902	19,666	19,535			0,05314								
		19,497	19,666	19,535			0,05314								
		19,882	19,666	19,535			0,05314								
		19,835	19,666	19,535			0,05314								
		0,053976	0,053505	0,05314			0,05314								
		0,054108	0,053505	0,05314			0,05314								
		0,053034	0,053505	0,05314			0,05314								
		0,0537	0,0536	0,0536			0,0536								
		0,000585926	0,000518849	0,000518849			0,000518849								
		0,5304	0,5304	0,5304			0,5304								
		0,9750	0,9750	0,9750			0,9750								
		0,000205	0,000205	0,000205			0,000205								
		0,000498	0,000498	0,000498			0,000498								
		0,93	0,93	0,93			0,93								

σ_r = 0,93%

Δ = 0,000526 мг/мл

Таблица 20 – Статистическая обработка результатов прецизионности в условиях воспроизводимости на уровне содержания бензойной кислоты 120 %

N	1			2			C _{ср} мг/мл	S _{ml}	G	G _{таб} (m=2;f=2)	S _{ср}	CO (S), мг/мл	Сходимость (σ _r), %
s	C _i мг/мл	C _{ср} мг/мл	C _i мг/мл	C _{ср} мг/мл	C _i мг/мл								
	16,235	0,043933	16,888	0,045755	16,743	0,045351	0,0447	0,000928066	0,6698	0,9750	0,000273	0,000665	1,49
	16,451	0,044536	16,645	0,045077	16,423	0,044458	0,0449	0,000457388					

σ_r = 1,49%

Δ = 0,000701 мг/мл

4.6. Правильность и точность

Таблица 21– Результаты определения правильности и точности на уровне содержания доксорубина 80%

	$C_{\text{номинал}}$	S	C_i	$C_{\text{ср}}$	СО, мг/мл	Правильность, %	Точность, %
1	0,08	4,888	0,075909	0,0780	0,002646581	97,53	94,89
2		4,887	0,075891				94,86
3		4,989	0,077682				97,10
4		4,989	0,077682				97,10
5		4,992	0,077735				97,17
6		4,859	0,075399				94,25
7		4,998	0,07784				97,30
8		5,287	0,082915				103,64
9		4,989	0,077682				97,10
10		5,287	0,082915				103,64
11		4,912	0,07633				95,41
12		4,812	0,074574				93,22
13		4,969	0,077331				96,66
14		5,253	0,082318				102,90
15		5,089	0,079438				99,30
16		4,939	0,076804				96,01
17		4,911	0,076313				95,39
18		5,257	0,082388				102,99
19		4,899	0,076102				95,13
20		4,987	0,077647				97,06
21		5,111	0,079824				99,78
22		5,287	0,082915				103,64
23		5,187	0,081159				101,45
24		4,864	0,075487				94,36
25		4,839	0,075048				93,81
26		4,823	0,074767				93,46
27		4,914	0,076365				95,46
28		4,898	0,076084				95,11
29		4,985	0,077612				97,01
30		5,152	0,080544				100,68

Таблица 22– Результаты определения правильности и точности на уровне содержания доксорубицина 100%

	$S_{\text{номинал}}$	S	C_i	$C_{\text{ср}}$	СО, мг/мл	Правильность, %	Точность, %
1	0,1	6,166	0,098349	0,0988	0,00086822	98,76	98,35
2		6,187	0,098718				98,72
3		6,222	0,099333				99,33
4		6,144	0,097963				97,96
5		6,155	0,098156				98,16
6		6,223	0,09935				99,35
7		6,366	0,101861				101,86
8		6,187	0,098718				98,72
9		6,222	0,099333				99,33
10		6,278	0,100316				100,32
11		6,155	0,098156				98,16
12		6,232	0,099508				99,51
13		6,166	0,098349				98,35
14		6,187	0,098718				98,72
15		6,211	0,09914				99,14
16		6,144	0,097963				97,96
17		6,128	0,097682				97,68
18		6,223	0,09935				99,35
19		6,176	0,098525				98,53
20		6,187	0,098718				98,72
21		6,203	0,098999				99,00
22		6,144	0,097963				97,96
23		6,155	0,098156				98,16
24		6,223	0,09935				99,35
25		6,166	0,098349				98,35
26		6,187	0,098718				98,72
27		6,219	0,09928				99,28
28		6,144	0,097963				97,96
29		6,155	0,098156				98,16
30		6,123	0,097594				97,59

Таблица 23– Результаты определения правильности и точности на уровне содержания доксорубицина 120%

	$S_{\text{номинал}}$	S	C_i	$C_{\text{ср}}$	СО, мг/мл	Правильность, %	Точность, %
1	0,12	7,255	0,117471466	0,1194	0,002511	99,48	97,89
2		7,328	0,118753292				98,96
3		7,619	0,123863038				103,22
4		7,514	0,122019315				101,68
5		7,209	0,11666374				97,22
6		7,356	0,119244952				99,37
7		7,235	0,117120281				97,60
8		7,388	0,119806848				99,84
9		7,619	0,123863038				103,22
10		7,514	0,122019315				101,68
11		7,215	0,116769096				97,31
12		7,456	0,121000878				100,83
13		7,298	0,118226514				98,52
14		7,328	0,118753292				98,96
15		7,119	0,115083406				95,90
16		7,398	0,119982441				99,99
17		7,209	0,11666374				97,22
18		7,356	0,119244952				99,37
19		7,255	0,117471466				97,89
20		7,328	0,118753292				98,96
21		7,605	0,123617208				103,01
22		7,451	0,120913082				100,76
23		7,211	0,116698859				97,25
24		7,365	0,119402985				99,50
25		7,245	0,117295874				97,75
26		7,328	0,118753292				98,96
27		7,619	0,123863038				103,22
28		7,545	0,122563652				102,14
29		7,204	0,116575944				97,15
30		7,337	0,118911326				99,09

Таблица 24– Результаты определения правильности и точности на уровне содержания глюкозамина 80%

	$C_{\text{номинал}}$	S	C_i	$C_{\text{ср}}$	СО, мг/мл	Правильность, %	Точность, %
1	0,016	6,256	0,016769	0,0159	0,000396102	99,37	104,80
2		6,009	0,016082				100,51
3		5,877	0,015715				98,22
4		5,721	0,015281				95,51
5		5,992	0,016035				100,22
6		5,899	0,015776				98,60
7		6,057	0,016215				101,35
8		6,009	0,016082				100,51
9		5,802	0,015507				96,92
10		5,795	0,015487				96,79
11		5,987	0,016021				100,13
12		5,901	0,015782				98,64
13		6,155	0,016488				103,05
14		6,011	0,016088				100,55
15		5,875	0,01571				98,18
16		5,723	0,015287				95,54
17		5,996	0,016046				100,29
18		5,887	0,015743				98,39
19		6,117	0,016382				102,39
20		6,014	0,016096				100,60
21		5,887	0,015743				98,39
22		5,718	0,015273				95,46
23		5,988	0,016024				100,15
24		5,891	0,015754				98,46
25		6,257	0,016771				104,82
26		6,009	0,016082				100,51
27		5,866	0,015685				98,03
28		5,723	0,015287				95,54
29		5,993	0,016038				100,23
30		5,883	0,015732				98,32

Таблица 25– Результаты определения правильности и точности на уровне содержания глюкозамина 100%

	$C_{\text{номинал}}$	S	C_i	$C_{\text{ср}}$	CO, мг/мл	Правильность, %	Точность, %
1	0,02	7,261	0,019562	0,0196	0,000330275	98,17	97,81
2		7,381	0,019896				99,48
3		7,412	0,019982				99,91
4		7,225	0,019462				97,31
5		7,445	0,020074				100,37
6		7,318	0,019721				98,60
7		7,162	0,019287				96,44
8		7,413	0,019985				99,92
9		7,013	0,018873				94,36
10		7,225	0,019462				97,31
11		7,444	0,020071				100,35
12		7,317	0,019718				98,59
13		7,16	0,019281				96,41
14		7,338	0,019776				98,88
15		7,313	0,019707				98,53
16		7,225	0,019462				97,31
17		7,445	0,020074				100,37
18		7,318	0,019721				98,60
19		7,163	0,01929				96,45
20		7,223	0,019457				97,28
21		7,016	0,018881				94,41
22		7,225	0,019462				97,31
23		7,445	0,020074				100,37
24		7,318	0,019721				98,60
25		7,168	0,019304				96,52
26		7,333	0,019762				98,81
27		7,312	0,019704				98,52
28		7,225	0,019462				97,31
29		7,445	0,020074				100,37
30		7,318	0,019721				98,60

Таблица 26– Результаты определения правильности и точности на уровне содержания глюкозамина 120%

	$S_{\text{номинал}}$	S	C_i	$C_{\text{ср}}$	СО, мг/мл	Правильность, %	Точность, %
1	0,024	8,894	0,024101459	0,0238	0,00045	99,36	100,42
2		8,974	0,024323836				101,35
3		8,951	0,024259903				101,08
4		8,891	0,02409312				100,39
5		8,774	0,023767894				99,03
6		9,015	0,024437804				101,82
7		8,774	0,023767894				99,03
8		8,974	0,024323836				101,35
9		8,751	0,023703961				98,77
10		8,682	0,023512161				97,97
11		8,772	0,023762335				99,01
12		9,015	0,024437804				101,82
13		8,653	0,02343155				97,63
14		8,974	0,024323836				101,35
15		8,651	0,02342599				97,61
16		8,644	0,023406532				97,53
17		8,599	0,023281445				97,01
18		8,993	0,02437665				101,57
19		8,574	0,023211953				96,72
20		8,974	0,024323836				101,35
21		8,651	0,02342599				97,61
22		8,612	0,023317582				97,16
23		8,574	0,023211953				96,72
24		9,001	0,024398888				101,66
25		8,674	0,023489924				97,87
26		8,974	0,024323836				101,35
27		8,651	0,02342599				97,61
28		8,612	0,023317582				97,16
29		8,799	0,023837387				99,32
30		8,997	0,024387769				101,62

Таблица 25– Результаты определения правильности и точности на уровне содержания бензойной кислоты 80%

	$S_{\text{номинал}}$	S	C_i	$C_{\text{ср}}$	СО, мг/мл	Правильность, %	Точность, %
1	0,036	13,402	0,03603	0,0357	0,000273517	99,10	100,08
2		13,416	0,036069				100,19
3		13,395	0,036011				100,03
4		13,455	0,036178				100,49
5		13,111	0,035218				97,83
6		13,368	0,035935				99,82
7		13,258	0,035629				98,97
8		13,332	0,035835				99,54
9		13,343	0,035866				99,63
10		13,198	0,035461				98,50
11		13,201	0,03547				98,53
12		13,224	0,035534				98,70
13		13,232	0,035556				98,77
14		13,225	0,035536				98,71
15		13,199	0,035464				98,51
16		13,256	0,035623				98,95
17		13,312	0,035779				99,39
18		13,264	0,035645				99,01
19		13,358	0,035907				99,74
20		13,237	0,03557				98,81
21		13,195	0,035453				98,48
22		13,187	0,03543				98,42
23		13,212	0,0355				98,61
24		13,164	0,035366				98,24
25		13,311	0,035776				99,38
26		13,252	0,035612				98,92
27		13,395	0,036011				100,03
28		13,455	0,036178				100,49
29		13,112	0,035221				97,84
30		13,164	0,035366				98,24

Таблица 26– Результаты определения правильности и точности на уровне содержания бензойной кислоты 100%

	$C_{\text{номинал}}$	S	C_i	$C_{\text{ср}}$	СО, мг/мл	Правильность, %	Точность, %
1	0,045	16,313	0,044151	0,0447	0,000487621	99,29	98,11
2		16,452	0,044539				98,98
3		16,881	0,045736				101,63
4		16,761	0,045401				100,89
5		16,655	0,045105				100,23
6		16,345	0,04424				98,31
7		16,235	0,043933				97,63
8		16,459	0,044558				99,02
9		16,688	0,045197				100,44
10		16,601	0,044955				99,90
11		16,665	0,045133				100,30
12		16,313	0,044151				98,11
13		16,436	0,044494				98,88
14		16,402	0,044399				98,67
15		16,774	0,045437				100,97
16		16,659	0,045116				100,26
17		16,556	0,044829				99,62
18		16,327	0,04419				98,20
19		16,291	0,04409				97,98
20		16,427	0,044469				98,82
21		16,497	0,044664				99,25
22		16,577	0,044888				99,75
23		16,445	0,044519				98,93
24		16,213	0,043872				97,49
25		16,236	0,043936				97,64
26		16,486	0,044634				99,19
27		16,598	0,044946				99,88
28		16,659	0,045116				100,26
29		16,625	0,045021				100,05
30		16,513	0,044709				99,35

Таблица 27– Результаты определения правильности и точности на уровне содержания бензойной кислоты 120%

	$C_{\text{номинал}}$	S	C_i	$C_{\text{ср}}$	CO, мг/мл	Правильность, %	Точность, %
1	0,054	19,576	0,05325392	0,0537	0,000413	99,36	98,62
2		19,608	0,05334319				98,78
3		19,876	0,054090833				100,17
4		19,657	0,053479886				99,04
5		19,982	0,054386542				100,72
6		19,715	0,053641689				99,34
7		19,546	0,053170228				98,46
8		19,554	0,053192546				98,50
9		19,777	0,053814652				99,66
10		19,598	0,053315293				98,73
11		19,892	0,054135468				100,25
12		19,787	0,053842549				99,71
13		19,579	0,053262289				98,63
14		19,623	0,053385036				98,86
15		19,812	0,053912291				99,84
16		19,657	0,053479886				99,04
17		19,902	0,054163366				100,30
18		19,727	0,053675166				99,40
19		19,518	0,053092116				98,32
20		19,572	0,053242761				98,60
21		19,828	0,053956927				99,92
22		19,757	0,053758857				99,55
23		19,992	0,05441444				100,77
24		19,683	0,053552419				99,17
25		19,555	0,053195336				98,51
26		19,632	0,053410143				98,91
27		19,902	0,054163366				100,30
28		19,557	0,053200915				98,52
29		19,993	0,054417229				100,77
30		19,755	0,053753278				99,54

6. Заключение

Метрологические характеристики методики количественного определения доксорубина, хитозана и бензойной кислоты, определенные в эксперименте, удовлетворяют требованиям, предъявляемым к методикам в фармацевтическом анализе:

- методика определения доксорубина, глюкозамина и бензойной кислоты методом ВЭЖХ-УФ - методика селективна, диапазон линейности – **0,01 – 0,5 мг/мл** (доксорубин и глюкозамин) и **0,002 – 0,1 мг/мл** (бензойная кислота);
- повторяемость – **0,60 – 3,19%** (доксорубин); **2,41 – 3,12%** (глюкозамин); **0,96 – 1,78%** (бензойная кислота);
- воспроизводимость – **0,51 – 2,38%** (доксорубин); **2,02 – 2,95%** (глюкозамин); **0,93 – 1,55%** (бензойная кислота);
- правильность – **97,53 – 99,48%** (доксорубин); **98,17 – 99,37%** (глюкозамин); **99,10 – 99,36%** (бензойная кислота);

Методики количественного определения доксорубина, хитозана и бензойной кислоты, признаны валидными и могут быть использованы для проведения контроля качества конъюгата Fe-CS-ДОКС.