

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-115-122>
УДК 543.544; 577.114; 665.372; 547.922



Оригинальная статья / Research article

Разработка методики хроматографического анализа вспомогательных веществ в липосомальной лекарственной форме фотосенсибилизатора тетра-3-фенилтио-фталоцианина гидроксиалюминия

С. В. Антонова¹✉, С. В. Колячкина¹, А. В. Ланцова², Л. Л. Николаева², Е. В. Санарова²

¹ ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ВГНКИ), 123022, Россия, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина), 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

✉ Контактное лицо: Антонова Светлана Владимировна. E-mail: antonovasvetlanavladimirovna@gmail.com

ORCID: С. В. Антонова – <https://orcid.org/0000-0003-0886-4578>; С. В. Колячкина – <https://orcid.org/0000-0001-5523-171X>; А. В. Ланцова – <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>; Л. Л. Николаева – <https://orcid.org/0000-0001-8003-8241>; Е. В. Санарова – <https://orcid.org/0000-0002-5592-5137>.

Статья поступила: 20.01.2022

Статья принята в печать: 30.01.2023

Статья опубликована: 24.02.2023

Резюме

Введение. В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России разработана липосомальная лекарственная форма ФС тетра-3-фенилтио-фталоцианина гидроксиалюминия (ТФГА), для которой необходимо было разработать простую, точную и легко воспроизводимую методику количественного определения основного действующего вещества и вспомогательных веществ в составе лекарственного средства. В качестве такой методики была выбрана высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ).

Цель. Разработка хроматографических методик количественного определения вспомогательных веществ в липосомальной лекарственной форме ФС ТФГА и для определения подлинности.

Материалы и методы. Определение веществ проводили методом ВЭТСХ с последующей хроматоденситометрией. Для проведения анализа использовали субстанцию ТФГА (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия), плацебо лиофилизированной липосомальной формы без ТФГА в составе (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), яичный фосфатидилхолин (96 %, CAS № 97281-44-2, EPC, Lipoid GmbH, Германия), холестерин (≥99 %, CAS № C8667, Sigma-Aldrich, Япония), сахарозу (ч.д.а., ООО ТД «ХИММЕД», Россия) и различные органические растворители.

Результаты и обсуждение. После проведения серий собственных экспериментов была выбрана подвижная фаза для проведения ВЭТСХ-анализа: изопропанол : 25%-й водный аммиак (80:20 об/об), при этом время разделения составило 20–25 мин ($l = 75$ мм), $t = 20$ °С. Для визуализации пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина выбрали 5%-й раствор фосфорномолибденовой кислоты. Устойчивость стандартных образцов была подтверждена на серии предвалидационных исследований. Проведена валидация методики.

Заключение. Для количественного определения сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в новой липосомальной лекарственной форме выбран метод ВЭТСХ с хроматоденситометрией, который позволяет идентифицировать сразу все три компонента в составе лекарственной формы. Проведена валидация методики.

Ключевые слова: методы анализа, высокоэффективная тонкослойная хроматография, липосомы, фосфатидилхолин, холестерин

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. С. В. Антонова, С. В. Колячкина придумали и разработали эксперимент, участвовали в обработке данных. А. В. Ланцова, Л. Л. Николаева, Е. В. Санарова синтезировали образцы. Все авторы участвовали в обсуждении результатов, участвовали в написании текста статьи.

Для цитирования: Антонова С. В., Колячкина С. В., Ланцова А. В., Николаева Л. Л., Санарова Е. В. Разработка методики хроматографического анализа вспомогательных веществ в липосомальной лекарственной форме фотосенсибилизатора тетра-3-фенилтио-фталоцианина гидроксиалюминия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):115–122. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-115-122>

Development of a Technique for Chromatographic Analysis of Excipients in a Liposomal Dosage Form of a Photosensitizer Tetra-3-phenylthio-phthalocyanine Hydroxyaluminium

Svetlana V. Antonova¹✉, Svetlana V. Kolyachkina¹, Anna V. Lantsova², Lyudmila L. Nikolaeva², Ekaterina V. Sanarova²

¹ The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality (VGNKI), 5, Zvenigorodskoe shosse, Moscow, 123022, Russia

² FSBI "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin", 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia

✉ Corresponding author: Svetlana V. Antonova. E-mail: antonovasvetlanavladimirovna@gmail.com

© Антонова С. В., Колячкина С. В., Ланцова А. В., Николаева Л. Л., Санарова Е. В., 2023

© Antonova S. V., Kolyachkina S. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Sanarova E. V., 2023

ORCID: Svetlana V. Antonova – <https://orcid.org/0000-0003-0886-4578>; Svetlana V. Kolyachkina – <https://orcid.org/0000-0001-5523-171X>;
Anna V. Lantsova – <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>; Lyudmila L. Nikolaeva – <https://orcid.org/0000-0001-8003-8241>;
Ekaterina V. Sanarova – <https://orcid.org/0000-0002-5592-5137>.

Received: 20.01.2022 Revised: 30.01.2023 Published: 24.02.2023

Abstract

Introduction. The Laboratory of Drug Formulation Development at the N. N. National Medical Research Center of Oncology developed a liposomal dosage form of FS tetra-3-phenylthio-phthalocyanine hydroxyluminide (TPHA) for which a simple, accurate and easily reproducible method of quantitative determination of the main active substance and excipients in the drug product was needed. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) was chosen as such a technique.

Aim. The aim of this work was to develop chromatographic methods for the quantitative determination of excipients in a liposomal dosage form of a tetra-3-phenylthiophthalocyanine hydroxyluminium (TPHA).

Materials and methods. Determination of substances was carried out by the method of high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) followed by TLC-densitometry. Substance TPHA 98 % (Federal State Unitary Enterprise "SSC "NIOPIK", Russia), placebo lyophilized liposomal form without TFHA in the composition (FSBI "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin" of the Ministry of Health of Russia), egg phosphatidylcholine (96 %, CAS № 97281-44-2, EPC Lipoid, Germany), cholesterol (≥99 %, CAS № C8667, Sigma-Aldrich, Japan), sucrose analytical grade (CHIMMED, Russia) and various organic solvents.

Results and discussion. The selected mobile phase for HPTLC analysis: isopropanol: ammonia 25 % aqueous 80:20, separation time was 20–25 min ($l = 75\text{mm}$), $t = 20^\circ\text{C}$. To visualize the spots of sucrose, phosphatidylcholine, and cholesterol, a 5 % solution of phosphomolybdic acid was chosen. The stability of the standard samples was confirmed on a series of prevalidation studies. Validation of the methodology was carried out.

Conclusion. For quantitative determination of sucrose, phosphatidylcholine and cholesterol in a new liposomal dosage form, the method of HPTLC with TLC-densitometry was chosen, which allows identifying all three components in the dosage form simultaneously. The method was validated.

Keywords: methods of analysis, high-performance thin-layer chromatography, liposomes, phosphatidylcholine, cholesterol

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Svetlana V. Antonova, Svetlana V. Kolyachkina invented and developed an experiment, participated in data processing. Anna V. Lantsov, Lyudmila L. Nikolaeva, Ekaterina V. Sanarova synthesized samples. All authors participated in the discussion of the results, participated in the writing of the text of the article.

For citation: Antonova S. V., Kolyachkina S. V., Lantsova A. V., Nikolaeva L. L., Sanarova E. V. Development of a technique for chromatographic analysis of excipients in a liposomal dosage form of a photosensitizer tetra-3-phenylthio-phthalocyanine hydroxyluminium. *Drug development & registration*. 2023;12(1):115–122. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-115-122>

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания остаются одной из основных причин смертности как в мире¹, так и в России. В связи с этим совершенствование химиотерапии опухолей в самостоятельном или в адъювантном режиме является актуальным направлением для повышения эффективности лечения онкологических заболеваний [1].

Одним из наиболее перспективных направлений лечения рака является фотодинамическая терапия (ФДТ), при которой светом воздействуют на введенные в опухоль молекулы фотосенсибилизатора (ФС), что приводит к фотохимическому повреждению опухолевых клеток [2–4].

Ныне существующие ФС имеют недостаточную глубину фотодинамического воздействия и невысокую селективность накопления в опухоли, поэтому создание ФС с высокой селективностью накопления, за счет направленной доставки ФС, и поглощением в спектральной области 710–740 нм, где собственное

поглощение биологических тканей незначительно, является актуальным. ФДТ с использованием такого ФС обеспечит возможность эффективного разрушения опухолевого узла на глубину, по крайней мере, до 1 см [4].

Одним из эффективных ФС, отвечающий данным требованиям, является представитель группы фталоцианинов – ТФГА, на основе которого в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России была разработана лиофилизированная липосомальная лекарственная форма и проведены ее доклинические исследования эффективности и безопасности. В качестве вспомогательных компонентов лекарственной формы использовали фосфатидилхолин, холестерин и сахарозу [5, 6].

Важной частью при создании лекарственного препарата является разработка простых, точных и легко воспроизводимых методик количественного определения вспомогательных веществ. Лекарственная форма, которая является объектом исследования, представляет собой сложную композицию, содержащую действующее вещество ФС – тетра-3-фенилтио-фталоцианина гидроксалиуминий (ТФГА), а также липиды: фосфатидилхолин и холестерин, и в качестве криопротектора сахарозу. Вследствие этого

¹ Cancer. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Accessed: 25.11.2022.

непосредственное определение даже одного компонента в лекарственной форме каким-либо спектральным аналитическим методом (спектрофотометрией, флуоресцентной спектроскопией и т. д.) не позволяет получить достоверных результатов. При использовании хроматографических методов, как правило, удается добиться разделения и количественного определения компонентов. В настоящее время для анализа сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в основном используются высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и капиллярный электрофорез (КЭ). Выбор того или иного метода определяется конкретной задачей, стоящей перед исследователем [7, 8].

Для количественного определения сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в липосомальной лекарственной форме ТФГА был выбран метод ВЭТСХ, в связи с тем, что в выбранных условиях анализа появляется возможность количественного определения сразу трех компонентов лекарственной формы. Кроме того, метод ВЭТСХ также обладает рядом очевидных достоинств: не требует высокоочищенных реактивов, прост в исполнении, дает возможность одновременного количественного определения более 20 образцов, имеет прямое детектирование на слое сорбента.

Целью нашей работы была разработка хроматографических методик количественного определения вспомогательных веществ в липосомальной лекарственной форме ТФГА и для определения подлинности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы и оборудование. Субстанция ТФГА (98 %, ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия), лиофилизированная липосомальная форма ТФГА (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), плацебо лиофилизированной липосомальной формы без ТФГА в составе (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), яичный фосфатидилхолин (96 %, CAS № 97281-44-2, ФХ, EPC, Lipoid GmbH, Германия), холестерин (≥ 99 %, CAS № C8667, Sigma-Aldrich, Япония), сахароза (ч.д.а., CAS № 57-50-1, ООО ТД «ХИММЕД», Россия), хлороформ (х.ч., CAS № 67-66-3, ООО ТД «ХИММЕД», Россия), метанол (о.с.ч., CAS № 67-56-1, ООО ТД «ХИММЕД», Россия), 25%-й водный аммиак (CAS № 1336-21-6, PanReac, Испания), изопропанол (CAS № 67-63-0, Scharlau, Испания), фосфорномолибденовая кислота (ч.д.а., CAS № 51429-74-4, ООО «ГРАНХИМ», Россия), фильтрующая насадка: диаметр пор 0,45 мкм, диаметр мембраны 15 мм, политетрафторэтилен (PTFE), Minisart® SRP 15 (Sartorius AG, Германия), пластинки Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ, 10 × 15 см (АО «Сорбполимер», Россия), пластинки хроматографические НPTLC Silica gel 60 F₂₅₄ размером 10 × 20 см (Merck KGaA, Германия), микрошприц «Газохром 101» (ООО «Манометр», Россия), стеклянная

камера, 22,5 × 29 × 16 см (ООО «НТЦ «Ленхром», Россия), кювета для проявления пластин методом погружения (ООО «НТЦ «Ленхром», Россия), автоматический аппликатор TLC Sampler 4 (ATS 4) и сканирующий денситометр TLC Scanner 3 с программным обеспечением winCATS ver. 1.4.2 (CAMAG AG, Швейцария).

Методика анализа. Для анализа сахарозы экстракцию из флакона с лиофилизированной липосомальной формой ТФГА проводили дистиллированной водой; для анализа фосфатидилхолина и холестерина – хлороформом. Готовили стандартные растворы сахарозы в концентрациях от 50 до 2200 мг/л в дистиллированной воде и стандартные растворы фосфатидилхолина и холестерина в концентрациях от 150 до 1000 мг/л в хлороформе. Экстракты и стандартные растворы перед анализом фильтровали через шприцевые фильтры PTFE с диаметром пор с 0,45 мкм. ТСХ пластинки перед началом анализа промывали смесью хлороформа и метанола (50:50 об/об) и сушили в течение 30 мин при 110–115 °С. Растворы стандартных образцов, и экстракты липосомальной лекарственной формы наносили на пластинки объемом 2 мкл с помощью автоматического аппликатора или микрошприца. Хроматографию осуществляли восходящим методом в стеклянной камере при комнатной температуре. В качестве подвижной фазы использовали смесь изопропанола и 25%-го водного аммиака (80:20 об/об), время насыщения камеры составляло 20 мин. Длина пробега элюента составляла 7,5 см. Для визуализации пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина использовали обработку хроматограммы 5%-м спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты, с последующим прогреванием хроматограммы при температуре 180 °С в течение 2 мин. Количественное определение сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина осуществляли на сканирующем денситометре при длине волны 700 нм и размером щели 2,00 × 0,2 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее с помощью метода ТСХ проводилось полуколичественное определение сахарозы и лецитина в липосомальной лекарственной форме ТФГА. Причем для разделения сахарозы и фосфатидилхолина использовали разные подвижные фазы и стандартные пластинки Sorbfil [5, 6].

ТСХ пластинки Kieselgel 60 (Merck KGaA, Германия) и пластинки Sorbfil имеют различную «химию поверхности» активного слоя, поэтому рекомендованные ранее подвижные фазы были неэффективны для одновременного количественного определения сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в липосомальной лекарственной формы ТФГА. С помощью модели «Призма» [8] нами была подобрана подвижная фаза, имеющая следующий компонентный состав: изопропанол – 25 % водный аммиак (80:20 об/об), при этом время разделения составило 20–25 мин ($l = 75$ мм), $t = 20$ °С.

Для визуализации пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина на хроматограмме необходима обработка хроматограмм раствором обнаруживающего реагента. Были проанализированы возможности использования ряда визуализирующих реагентов для обнаружения пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина такие как: хлорид железа (III), медь сернистая и фосфорномолибденовая кислота. Обнаруживающие реагенты наносились на хроматограмму методом погружения, время экспозиции 3 сек. с последующим прогреванием хроматограммы.

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что все три компонента: сахароза, фосфатидилхолин и холестерин проявляются под воздействием всех трех обнаруживающих реагентов. Но интенсивность окрашивания после обработки спиртовым раствором хлорида железа (III) пятен холестерина и фосфатидилхолина недостаточно высокая для количественного анализа.

После обработки водным раствором меди сернистой фронт растворителя интенсивно окрашивался и мешал количественному анализу.

После обработки 5%-м спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты пятна сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина интенсивны и имеют компактные формы (рисунок 1).

Основываясь на полученных экспериментальных данных, для работы был выбран 5%-й спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты с последующим нагревом при 180 °С в течение 2 мин. После проведения цветной реакции осуществляли сканиро-

вание и количественную обработку хроматограмм с помощью сканирующего денситометра TLC Scanner 3 и программным обеспечением winCATS при длине волны 700 нм.

Для доказательства устойчивости стандартных растворов сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в растворе и на слое силикагеля были проведены следующие предвалидационные тесты [9, 10]:

1. После двумерного элюирования стандартных растворов сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина стандарты дают только одно пятно.
2. Проведена хроматография одних и тех же стандартных растворов сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина (при температуре хранения 5–10 °С) в интервале от 5 до 720 мин. Установлено, что сахароза, фосфатидилхолин и холестерин элюируются одним пятном, и интенсивность этих пятен не изменяется. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что сахароза, фосфатидилхолин и холестерин устойчивы в растворах более 720 мин (при температуре хранения 5–10 °С).
3. Пластинки, с нанесенными пробами сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина выдерживались при комнатной температуре 20–25 °С в незащищенном от света месте в интервале от 5 до 180 мин, после чего проводилось элюирование этих пластинок. Показано, что при этом сахароза, фосфатидилхолин и холестерин элюируются одним пятном и интенсивность этих пятен не изменяется. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что сахароза, фосфатидилхолин и хо-

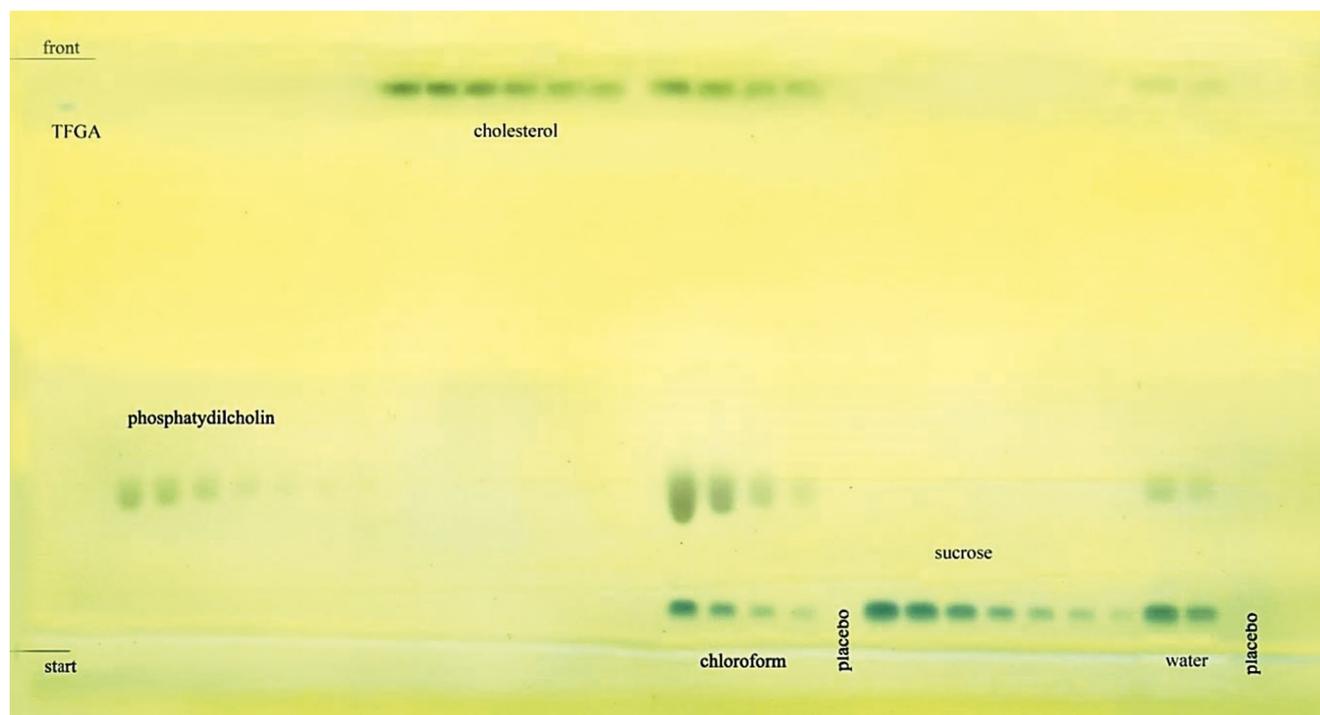


Рисунок 1. Хроматограмма после обработки 5%-м спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты

Figure 1. Chromatogram after treatment with 5 % alcohol solution of phosphor-molybdenum acid

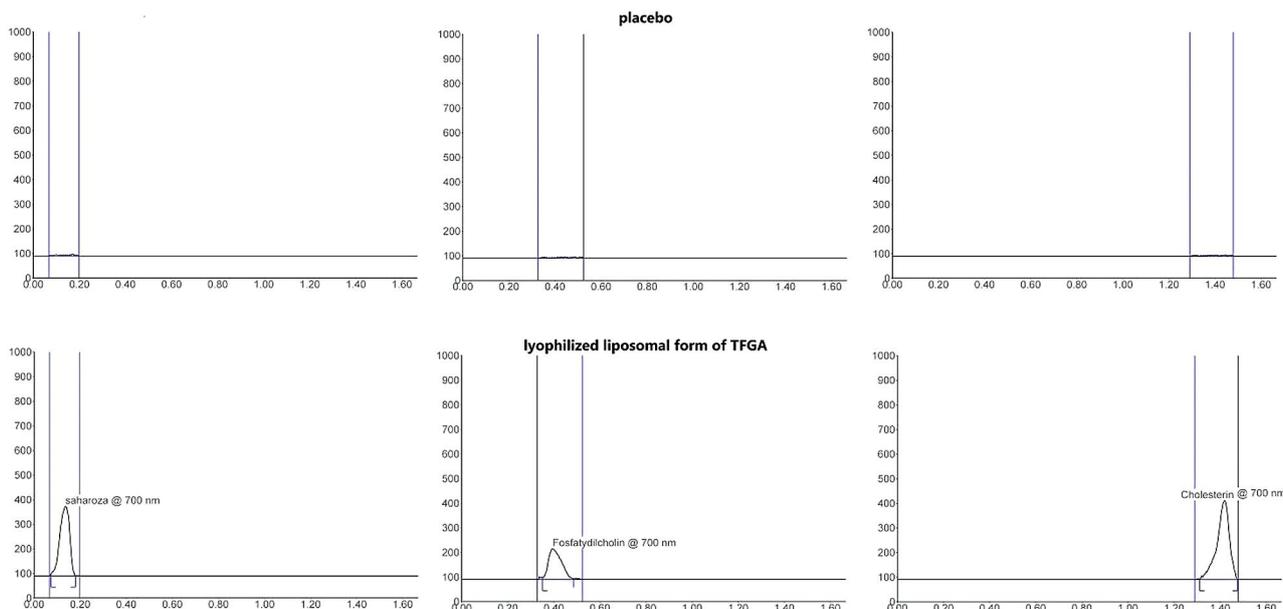


Рисунок 2. Хроматограммы экстрактов плацебо и лиофилизированной липосомальной формы ТФГА

Figure 2. Chromatograms of placebo extracts and lyophilized liposomal form of TFGA

лестерин устойчивы на тонких слоях целлюлозы в течение 180 мин. до элюирования.

4. Пластинки, с нанесенными пробами сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина элюировали, обрабатывали 5%-м спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты и проявляли при температуре 180 °С в течение 2 мин. Перед денситометрией пластинки выдерживались в лабораторном помещении, при комнатной температуре 20–25 °С в защищенном от света месте в интервале от 5 до 720 мин. При этом интенсивность пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина не изменялась. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что пятна сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина после элюирования и обработки пластинки устойчивы на тонких слоях целлюлозы после выдерживания в темном месте и комнатной температуре от 5 до 720 мин.

Полученные таким образом экспериментальные данные свидетельствуют о том, что сахароза, фосфатидилхолин и холестерин не подвергаются деградации в условиях проведения эксперимента.

Разработанная ВЭТСХ-методика была валидирована [9, 10]:

1. Подтверждена специфичность: отсутствуют наложения на пики сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина со стороны пиков плацебо (рисунок 2).
2. Предел количественного определения был определен для сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина как концентрация, дающая сигнал в 10 раз больше, чем уровень шума базовой линии и при-

нят: для сахарозы 250 мг/л; для фосфатидилхолина 350 мг/л; для холестерина 350 мг/л.

3. Линейность была подтверждена по 6 точкам: для фосфатидилхолина в интервале от 350 до 1000 мг/л, для холестерина от 350 до 1000 мг/л и сахарозы от 250 до 2200 мг/л. Интегрирование проведено по площадям пиков по уравнению полинома второго порядка Michaelis-Menten 2 [11], и рассчитаны коэффициенты стандартного остаточного отклонения (SDV)¹: Для сахарозы: SDV = 3,48; для фосфатидилхолина: SDV = 1,69; для холестерина: SDV = 1,36. Коэффициенты стандартного остаточного отклонения исследуемых вспомогательных веществ менее 10 (рисунок 3).
4. Подтверждена правильность метода на модельных смесях, путем добавления известного количества сахарозы (Suc), фосфатидилхолина (Ph) и холестерина (Ch) по 350, 500 и 750 мг/г в плацебо. Правильность среднего значения результатов в трипликатах находится в диапазоне от 90 до 110 % (таблица 1).
5. Повторяемость проверена на шести повторных нанесениях модельной смеси плацебо с добавлением сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина в концентрации 500 мг/л. Среднее квадратичное отклонение площадей пиков (RSD) для сахарозы RSD = 2,8 %, фосфатидилхолина RSD = 3,1 %, холестерина RSD = 3,6 %.

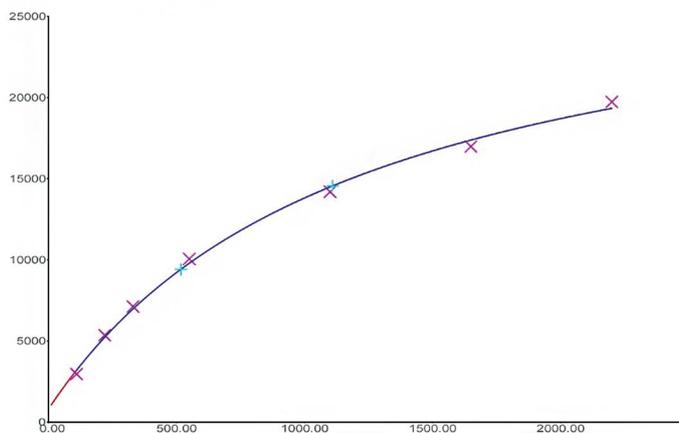
¹ Calibration – visionCATS 2.5 documentation. Available at: http://hptlcmethods.cloudapp.net/205/method_analysis_file/evaluation/calib/calib.html#calibration-function-view. Accessed: 25.11.2022.

winCATS Planar Chromatography Manager

Substance: saharoza @ 700 nm

Regression via area: Michaelis-Menten 2 $Y = 757.7 + (2.868e+004 * X) / (1205 + X)$

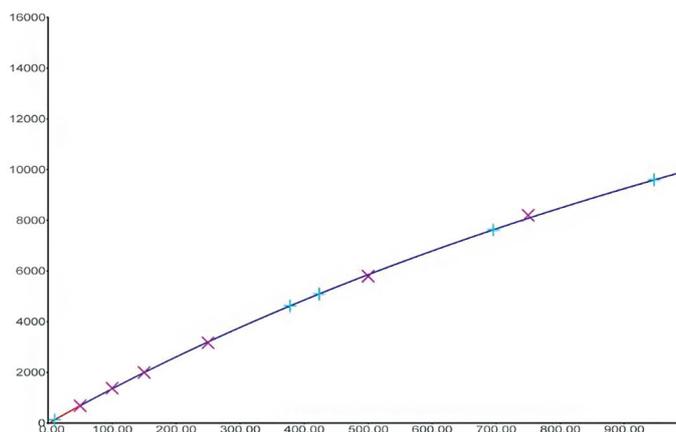
sdv = 3.48



Substance: Fosfatidilcholin @ 700 nm

Regression via area: Michaelis-Menten 2 $Y = -33.62 + (3.34e+004 * X) / (2347 + X)$

sdv = 1.69



Substance: Cholesterin @ 700 nm

Regression via area: Michaelis-Menten 2 $Y = 1.27e+004 + (1.511e+004 * X) / (360.6 + X)$

sdv = 1.36

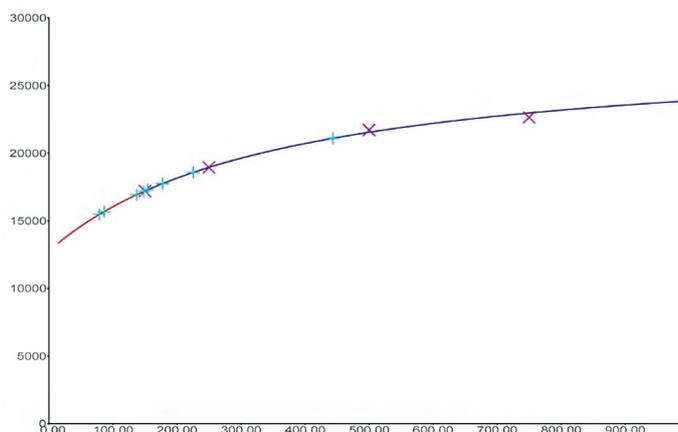


Рисунок 3. Калибровочные кривые сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина

Figure 3. Calibration curves for sucrose, phosphatidylcholine and cholesterol

Таблица 1. Анализ вспомогательных веществ (сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина) в модельных смесях

Table 1. Analysis of adjuvants (sucrose, phosphatidylcholine and cholesterol) in model mixtures

Внесенная концентрация, мг/л Applied concentration, mg/l	Найденное значение, мг/л Found value, mg/l			Правильность, % (Accuracy, %)			Правильность, Среднее значение, % Accuracy, average value, %		
	Suc	Ph	Ch	Suc	Ph	Ch	Suc	Ph	Ch
350	344	353	347	97,60	101,20	98,80	97,60 ± 0,8	100,27 ± 0,8	98,67 ± 0,8
	339	348	344	95,60	99,20	97,60			
	349	351	349	99,60	100,40	99,60			
500	489	512	491	97,80	102,40	98,20	98,93 ± 0,8	100,93 ± 0,8	99,27 ± 0,8
	498	497	496	99,60	99,40	99,20			
	497	505	502	99,40	101,00	100,40			
750	746	746	742	99,47	99,47	98,93	99,87 ± 0,8	99,82 ± 0,8	99,78 ± 0,8
	747	748	755	99,60	99,73	100,67			
	754	752	748	100,53	100,27	99,73			

6. Разработанная ВЭТСХ-методика была апробирована при определении вспомогательных веществ на трех сериях лиофилизированной липосомальной формы ТФГА. Пробоподготовка и анализ были проведены в разные дни в 5 повторениях, затем вычисляли среднее значение содержания сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина во флаконе лиофилизата и среднее квадратичное отклонение (RSD, %). За окончательный результат анализа принимали среднее арифметическое пяти параллельных определений (см. таблицу 1).

Расчет производили по формуле:

$$C = (C_{\text{ТСХ}} \cdot V) / 1000 = \text{мг/флаконе},$$

где C – концентрация вспомогательного вещества, мг/флаконе; $C_{\text{ТСХ}}$ – концентрация вспомогательного вещества в экстракте лиофилизированной липосомальной формы ТФГА, полученная по результатам анализа ВЭТСХ (соответственно калибровочной кривой), мг/л; V – объем растворителя, взятого для экстракции лиофилизированной липосомальной формы ТФГА во флаконе, мл; 1000 – коэффициент пересчета

Как видно по данным таблицы 2 разница между средними результатами составляет менее 10 %, а RSD для всех веществ не превышает 10 %.

Устойчивость хроматографической процедуры была продемонстрирована путем изменения следующих критических параметров метода:

1. Было проведено исследование зависимости селективности разделения сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина от величины объемного содержания изопропанола, входящего в состав подвижной фазы. Было установлено, что величины ΔR_f пятен сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина практически не изменяются ($\Delta R_f (\pm 0,05, n = 3, P 0,95)$) в интервале содержания изопропанола от 77,5 до 82,0 % v/v.
2. Температура элюирования в интервале от 20 до 35 °C и время насыщения камеры от 20 до 120 минут также не оказывают влияния на величины ΔR_f ($\pm 0,05, n = 3, P 0,95$) сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина.
3. Использование ТСХ пластинок различных партий также не вызывает изменений селективности разделения.

Таблица 2. Анализ вспомогательных веществ (сахарозы, фосфатидилхолина и холестерина) в лиофилизированной липосомальной форме ТФГА

Table 2. Analysis of adjuvants (sucrose, phosphatidylcholine and cholesterol) in lyophilized liposomal form of TFA

№ пробы № Sample	Концентрация вспомогательного вещества, мг/флаконе Concentration of the auxiliary substance, mg/vial					
	Suc		Ph		Ch	
	1-й день 1st day	2-й день 2st day	1-й день 1st day	2-й день 2st day	1-й день 1st day	2-й день 2st day
1	582	612	289	307	34	35
2	588	582	309	302	36	37
3	618	588	305	289	37	34
4	612	582	287	290	38	37
5	576	624	296	296	33	38
Среднее Average	595,2	597,6	297,2	296,8	35,6	36,2
RSD, %	7,6	7,2	6,8	5,7	5,9	6,3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липосомальная лекарственная форма фотосенсибилизатора тетра-3-фенилтио-фталоцианина гидроксиалюминия содержит в своем составе несколько вспомогательных компонентов. Для оценки их количественного содержания в составе лекарственной формы выбран метод ВЭТСХ с хроматодезитометрией. Разработанная на его основе методика позволяет идентифицировать сразу все три компонента в составе лекарственной формы (сахароза, фосфатидил-холин, холестерин), методика валидирована.

ЛИТЕРАТУРА

1. Переводчикова Н. И., Горбунова В. А. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. М.: Практическая медицина; 2018. 688 с.
2. Meerovich G. A., Romanishkin I. D., Loschenov V. B., Akhlyustina E. V., Tiganova I. G., Tolordava E. R., Philipova N. I., Zhizhimo-va Y. S., Romanova Y. M., Gintsburg A. L., Lukyanets E. A., Makarova E. A., Yuzhakova O. A. Novel polycationic photosensitizers for antibacterial photodynamic therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019;1282:1–19. DOI: 10.1007/5584_2019_431.
3. Meerovich I., Dash A. K., Nichols M. G. Low-intensity light-induced drug release from a dual delivery system comprising of a drug loaded liposome and a photosensitive conjugate. *Journal of Drug Targeting*. 2020;28(6):655–667. DOI: 10.1080/1061186X.2019.1710838.
4. Ozog D. M., Rkein A. M., Fabi S. G., Gold M. H., Goldman M. P., Lowe N. J., Martin G. M., Munavalli G. S. Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide. *Dermatologic Surgery*. 2016;42(7):804–827. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000800.
5. Sanarova E., Meerovich I., Lantsova A., Kotova E., Shprakh Z., Polozkova A., Orlova O., Borisova L., Smirnova Z., Oborotova N., Baryshnikov A., Meerovich G., Lukyanets E. Thiosens liposomal dosage form technology development and photodynamic efficiency assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2014;24(4):315–319. DOI: 10.1016/S1773-2247(14)50068-8.
6. Lantsova A. V., Olefir Yu. V., Bunyatyan N. D., Sanarova E. V., Orlova O. L., Dmitrieva M. V., Polozkova A. P., Oborotova N. A., Ogai M. A., Khadzhieva Z. D., Nikolaeva L. L., Kompantsev D. V., Shevchenko A. M., Prokof'ev A. B. Validation of a Method for Assay of Excipients in Liposomal Medicinal Formulations of the Photosensitizer Lipophthalocyan. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;53(10):986–990. DOI: 10.1007/s11094-020-02110-4.
7. Тринеева О. В. Разработка теоретических подходов к определению основных групп биологически активных веществ лекарственного растительного сырья методом ТСХ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):69–79. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79.
8. Красиков В. Д. Основы планарной хроматографии. СПб.: Химиздат; 2005. 232 с.
9. Renger B., Vegh Z., Ferenczi-Fodor K. Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods. *J. Chromatogr. A*. 2011;1218:2712–2721. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.059.
10. Spangenberg B., Poole C. F., Weins C. Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey. *Chromatographia*. 2011;73:823.
11. Ebel S., Alert D., Schaefer U. Calibration in TLC/HPTLC using the Michaelis-Menten function. *Chromatographia*. 1984;18(1)23–27. DOI: 10.1007/BF02279459.

REFERENCES

1. Perevodchikova N. I., Gorbunova V. A. Guidelines for chemotherapy of tumor diseases. Moscow: Practical medicine; 2018. 688 p. (In Russ.)
2. Meerovich G. A., Romanishkin I. D., Loschenov V. B., Akhlyustina E. V., Tiganova I. G., Tolordava E. R., Philipova N. I., Zhizhimo-va Y. S., Romanova Y. M., Gintsburg A. L., Lukyanets E. A., Makarova E. A., Yuzhakova O. A. Novel polycationic photosensitizers for

- antibacterial photodynamic therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019;1282:1–19. DOI: 10.1007/5584_2019_431.
3. Meerovich I., Dash A. K., Nichols M. G. Low-intensity light-induced drug release from a dual delivery system comprising of a drug loaded liposome and a photosensitive conjugate. *Journal of Drug Targeting*. 2020;28(6):655–667. DOI: 10.1080/1061186X.2019.1710838.
4. Ozog D. M., Rkein A. M., Fabi S. G., Gold M. H., Goldman M. P., Lowe N. J., Martin G. M., Munavalli G. S. Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide. *Dermatologic Surgery*. 2016;42(7):804–827. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000800.
5. Sanarova E., Meerovich I., Lantsova A., Kotova E., Shprakh Z., Polozkova A., Orlova O., Borisova L., Smirnova Z., Oborotova N., Baryshnikov A., Meerovich G., Lukyanets E. Thiosens liposomal dosage form technology development and photodynamic efficiency assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2014;24(4):315–319. DOI: 10.1016/S1773-2247(14)50068-8.
6. Lantsova A. V., Olefir Yu. V., Bunyatyan N. D., Sanarova E. V., Orlova O. L., Dmitrieva M. V., Polozkova A. P., Oborotova N. A., Ogai M. A., Khadzhieva Z. D., Nikolaeva L. L., Kompantsev D. V., Shevchenko A. M., Prokof'ev A. B. Validation of a Method for Assay of Excipients in Liposomal Medicinal Formulations of the Photosensitizer Lipophthalocyan. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020;53(10):986–990. DOI: 10.1007/s11094-020-02110-4.
7. Тринеева О. В. Development of Theoretical Approaches to Determination of the Main Groups of Biologically Active Substances of Medicinal Plant Raw Materials by TLC Method. *Drug development & registration*. 2021;10(2):69–79. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-69-79.
8. Красиков В. Д. Fundamentals of planar chromatography. St. Petersburg: Himizdat; 2005. 232 p. (In Russ.)
9. Renger B., Vegh Z., Ferenczi-Fodor K. Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods. *J. Chromatogr. A*. 2011;1218:2712–2721. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.01.059.
10. Spangenberg B., Poole C. F., Weins C. Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey. *Chromatographia*. 2011;73:823.
11. Ebel S., Alert D., Schaefer U. Calibration in TLC/HPTLC using the Michaelis-Menten function. *Chromatographia*. 1984;18(1)23–27. DOI: 10.1007/BF02279459.