

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-2-113-118>
УДК 615.074; 543.545; 615.456.4; 535.361



Оригинальная статья/Research article

Оптимизация методов оценки степени включения доксорубина в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA)

Т. С. Ковшова^{1,2*}, Н. С. Осипова², А. С. Фортунa³, Ю. В. Ермоленко²,
О. О. Максименко², В. Ю. Балабаньян¹, С. Э. Гельперина²

1 – Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, ГСП-1, Ленинские Горы, д. 1
2 – Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева (РХТУ им. Д. И. Менделеева), 125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, д. 9
3 – Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС» (НИТУ «МИСиС»), 119049, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, д. 4

*Контактное лицо: Ковшова Татьяна Сергеевна. E-mail: kovshova.tatyana.nanofarm@gmail.com

Статья получена: 06.04.2020. Статья принята к печати: 25.05.2020

Резюме

Введение. Одним из важных физико-химических параметров лекарственных форм на основе наночастиц является степень включения лекарственного вещества (ЛВ) в наночастицы (НЧ). Выбор адекватного метода для оценки этого параметра, в том числе метода разделения свободной и связанной с носителем фракций ЛВ является важной задачей, при решении которой необходимо учитывать особенности конкретной наносомальной лекарственной формы (НЛФ).

Цель. Оптимизация методов оценки степени включения ЛВ в НЧ на примере НЛФ доксорубина на основе НЧ сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA-Dox НЧ).

Материалы и методы. PLGA-Dox НЧ были получены методом «двойных эмульсий» (вода/масло/вода) при различных значениях pH внешней водной фазы (7,4/6,4). Размер и распределение частиц по размерам (PDI) определяли методами фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для оценки степени включения доксорубина НЧ отделяли методами центрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации. Эффективность отделения НЧ методом центрифугирования оценивали по содержанию PLGA в супернатанте методом капиллярного электрофореза (КЭФ).

Результаты и обсуждение. Средний гидродинамический диаметр НЧ PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 в воде (ФКС) составил 103 ± 10 нм и 141 ± 8 нм соответственно. По данным ПЭМ размер полученных НЧ составил в среднем 50 ± 16 нм. Степень включения доксорубина, определенная при отделении наночастиц центрифугированием при ускорении $48254 \times g$, составила $78,9 \pm 1,8$ % для PLGA-Dox/6,4 НЧ и $91,5 \pm 0,9$ % для PLGA-Dox/7,4 НЧ, при этом содержание PLGA в супернатанте не превышало 5 %. Меньшее ускорение обеспечивало неполное осаждение НЧ и занижение степени включения. Метод ультрафильтрации (NMWL 50 и 100 кДа) также позволил достоверно определить степень включения, при этом сорбция доксорубина не превышала 4 %. В то же время отделение НЧ методом гель-фильтрации привело к значительной десорбции доксорубина с поверхности НЧ за счет создания условий значительного разбавления.

Заключение. Для определения степени включения доксорубина в PLGA-Dox НЧ наилучшим образом подходит метод центрифугирования (оптимальным является ускорение $48254 \times g$) и метод ультрафильтрации при использовании мембранных фильтров с диаметром пор 50 и 100 кДа.

Ключевые слова: наночастицы, PLGA, доксорубин, степень включения, ультрафильтрация, центрифугирование, гель-фильтрация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Т. С. Ковшова и Н. С. Осипова осуществляли получение и физико-химический анализ наночастиц. А. С. Фортунa проводила анализ размеров НЧ методом ПЭМ. Ю. В. Ермоленко разработала методику определения PLGA в образцах PLGA-Dox НЧ (КЭФ). О. О. Максименко и С. Э. Гельперина разработали и оптимизировали метод получения наночастиц, нагруженных доксорубином. В. Ю. Балабаньян осуществлял общее руководство проектом. Все авторы принимали участие в анализе данных и обсуждении результатов.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-015-00276. Авторы выражают благодарность компаниям Evonik Nutrition & Care GmbH и CPN Pharma b.v. за предоставленный образец полимера Resomer® 502H.

Для цитирования: Ковшова Т. С., Осипова Н. С., Фортунa А. С., Ермоленко Ю. В., Максименко О. О., Балабаньян В. Ю., Гельперина С. Э. Оптимизация методов оценки степени включения доксорубина в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020; 9(2): 113–118.

Optimization of Methods for Determination of the Encapsulation Efficiency of Doxorubicin in the Nanoparticles Based on Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)

Tatyana S. Kovshova^{1,2*}, Nadezhda S. Osipova², Anastasiya S. Fortuna³, Yulia V. Ermolenko²,
Olga O. Maksimenko², Vadim Yu. Balabanyan¹, Svetlana E. Gelperina²

1 – M. V. Lomonosov Moscow State University, GSP-1, 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia
2 – D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 9, Miusskaya Sq., Moscow, 125047, Russia
3 – National University of Science and Technology «MIIS», 4, Leninskiy prospekt, Moscow, 119049, Russia

*Corresponding author: Tatyana S. Kovshova. E-mail: kovshova.tatyana.nanofarm@gmail.com

Received: 06.04.2020. Accepted: 25.05.2020

© Ковшова Т. С., Осипова Н. С., Фортунa А. С., Ермоленко Ю. В., Максименко О. О., Балабаньян В. Ю., Гельперина С. Э., 2020

© Kovshova T. S., Osipova N. S., Fortuna A. S., Ermolenko Yu. V., Maksimenko O. O., Balabanyan V. Yu., Gelperina S. E., 2020

Abstract

Introduction. Drug encapsulation efficiency (EE) is the important parameter of the nanoparticle-based drug formulations. Generally, the methods for evaluation of the EE are based on separation of the free and NP-bound fractions of the drug; however, applicability of these methods for a particulate formulation needs careful consideration.

Aim. The purpose of the study was to optimize the procedure for evaluation of the EE for a nanoparticle-based drug formulation taking doxorubicin loaded in the PLGA nanoparticles (PLGA-Dox NP) as a model formulation.

Materials and methods. The PLGA-Dox NP were prepared by a «double emulsion» method at pH of the external aqueous phase of 7.4 or 6.4. The NP size and size distribution (PDI) were determined by photon correlation spectroscopy (PCS) and transmission electron microscopy (TEM). For the EE evaluation of doxorubicin, the NP were separated by centrifugation, ultrafiltration, or gel filtration. The efficiency of NP separation by the centrifugation method was evaluated by the PLGA content in the supernatant by capillary electrophoresis (CZE).

Results and discussion. The average hydrodynamic diameter of the PLGA-Dox/7.4 and PLGA-Dox/6.4 NP (FCS) was 103 ± 10 nm and 141 ± 8 nm, respectively. According to the TEM data, the main fraction of the NP averaged 50 ± 16 nm. The EE of doxorubicin, determined after the NP separation by centrifugation at $48254 \times g$, was 78.9 ± 1.8 % for the PLGA-Dox/6.4 and 91.5 ± 0.9 % for the PLGA-Dox/7.4 NP with the residual PLGA content in the supernatant of ~ 5 %. At lower acceleration the NP separation was incomplete leading to underestimation of the EE. Also, the ultrafiltration method using the filters with the NMWL of 50 and 100 kDa enabled the reliable NP separation with the minimal doxorubicin adsorption on the filter (<4 %). Separation of the NP by gel filtration led to the underestimation of the EE due to considerable desorption of doxorubicin from the NP surface.

Conclusion. The optimal analytical procedures for evaluation of the EE of doxorubicin in the PLGA NP are based on the NP separation by centrifugation at $48254 \times g$ and ultrafiltration using filters with NMWL of 50 and 100 kDa.

Keywords: nanoparticles, PLGA, doxorubicin, encapsulation efficiency, ultrafiltration, ultracentrifugation, gel filtration.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. Tatyana S. Kovshova and Nadezhda S. Osipova carried out the preparation and physicochemical analysis of nanoparticles. Anastasiya S. Fortuna analyzed the size of the NP by TEM. Yulia V. Ermolenko developed a method for determining PLGA in PLGA-Dox NP (CZE). Olga O. Maksimenko and Svetlana E. Gelperina developed and optimized a method for preparation of doxorubicin-loaded NP. Vadim Yu. Balabanyan carried out general project management. All authors participated in data analysis and discussion of the results.

Acknowledgment. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research as part of research project No. 20-015-00276. The authors are grateful to Evonik Nutrition & Care GmbH and CPH Pharma b.v. for the provided polymer sample Resomer® 502H.

For citation: Kovshova T. S., Osipova N. S., Fortuna A. S., Ermolenko Yu. V., Maksimenko O. O., Balabanyan V. Yu., Gelperina S. E. Optimization of methods for determination of the encapsulation efficiency of doxorubicin in the nanoparticles based on poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA). *Drug development & registration*. 2020; 9(2): 113–118.

ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы (НЧ) – коллоидные полимерные частицы размером от 10 до 1000 нм, в которых активное вещество включено и/или адсорбировано на поверхности, на протяжении более 40 лет активно исследуются в качестве систем доставки лекарственных веществ (ЛВ). Физико-химические свойства НЧ, используемых в качестве носителей ЛВ, такие как размер и заряд поверхности, а также степень включения ЛВ и профиль его высвобождения из НЧ, оказывают влияние на эффективность и безопасность наноразмерной лекарственной формы (НЛФ). Изучение этих свойств требует применения особых методов анализа. В частности, для определения степени включения ЛВ в носитель (липосомы, полимерные НЧ) необходимо отделение носителя, содержащего включенное ЛВ, от свободного (не связанного с носителем) ЛВ с последующим анализом «свободной» фракции ЛВ и оценкой фракции (косвенной или прямой), связанной с носителем. Для отделения НЧ можно использовать методы центрифугирования, ультрафильтрации или гель-фильтрации, при этом выбор метода зависит от особенности конкретной НЛФ [1–4]. В частности, важным параметром, определяющим пригодность метода, является эффективность отделения НЧ от дисперсионной среды, поскольку неполное отделение НЧ может привести к неточным (заниженным) оценкам степени включения.

Цель настоящего исследования – оптимизация методов оценки степени включения ЛВ в НЧ на примере НЛФ доксорубина на основе НЧ сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA-Dox НЧ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение PLGA-Dox НЧ

Наночастицы PLGA, нагруженные доксорубином (PLGA-Dox НЧ), получали методом «двойных эмульсий» ($W_1/O/W_2$), как описано в опубликованных ранее работах авторов [5]. Первичную эмульсию (W_1/O) получали путем эмульгирования внутренней водной фазы (W_1), представляющей собой раствор доксорубина гидрохлорида (Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals, Hong Kong, China) в 0,001 н соляной кислоте, с раствором PLGA (Resomer® 502H, D,L-лактид/гликолид = 50:50 моль/моль; молекулярная масса 7–17 кДа, Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия) в дихлорметане (х.ч., Химмед, Россия) при помощи гомогенизатора (Ultra-Turrax T 18 Basic, IKA, Германия) в течение 1 минуты при 23600 об/мин. Соотношение доксорубин : PLGA составило 1:10 в/в, соотношение объемов водной (W_1) и органической фаз 2:3. Для получения двойной эмульсии ($W_1/O/W_2$) первичную эмульсию диспергировали в 5-кратном объеме 1 % водного раствора поливинилового спирта (ПВС, 9–10 кДа, Sigma-Aldrich, Германия) в фосфатно-солевом буфере (PBS,

ПанЭко, Россия) при pH 6,4 или 7,4 с помощью Ultra-Turrax T 18 (2 мин, 23600 об/мин), а затем подвергали гомогенизации под высоким давлением (15000 psi, 3 минуты; Microfluidizer M-110P, Microfluidics, США). Органический растворитель удаляли под вакуумом, полученную наносуспensionцию фильтровали через стеклянный фильтр, добавляли маннит (5 % м/о) в качестве криопротектора и разливали во флаконы по 1,5 мл. После лиофилизации (Alpha 2-4 LSCplus, Martin Christ GmbH, Германия) образцы хранили в холодильнике при температуре +4–5 °С.

Изучение физико-химических параметров PLGA-Dox НЧ

Средний гидродинамический диаметр частиц и распределение частиц по размерам (PDI) определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии (ФКС), дзета-потенциал поверхности НЧ – методом микроэлектрофореза (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Великобритания) при разведении суспензии НЧ в воде Milli-Q до концентрации 0,2 мг/мл по полимеру (угол 173°, +25 °С, n = 4). Размер и морфологию НЧ оценивали также при помощи просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ, микроскоп JEOL JEM-1400, Япония); контрастирующий агент – 1 % раствор уранила ацетата. Содержание полимера в PLGA-Dox определяли методом капиллярного электрофореза (КЭФ, Капель-105M, Lumex, Россия) с программным обеспечением Elforun® (Lumex, Россия), как описано в [6]. Для этого во флакон с лиофилизатом НЧ добавляли 2 мл 1,0 н раствора NaOH; смесь инкубировали 24 ч при +37 °С при перемешивании (200 об/мин). Гидролизат разбавляли в 1000 раз водой Milli-Q и определяли содержание полимера по количеству молочной кислоты, образующейся в результате гидролиза. Общее содержание доксорубина в PLGA-Dox НЧ определяли спектрофотометрически (Shimadzu UV-1800, Япония) при $\lambda_{\max} = 480$ нм после растворения лиофилизата НЧ в ДМСО (0,00–50 мкг/мл; r = 0,9995). Для определения каждого показателя проводили 3 параллельных измерения (n = 3).

Определение степени включения доксорубина в PLGA-Dox НЧ

Степень включения доксорубина в PLGA-Dox НЧ оценивали путем отделения фракции НЧ от свободного доксорубина методами центрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации.

Метод центрифугирования

Леофилизат НЧ ресуспендировали в 1,5 мл дистиллированной воды, НЧ отделяли центрифугированием с использованием различных режимов: 1) на центрифуге Eppendorf 5804R (Германия), ускорение 15000xg, 30 мин при +18 °С; 2) на ультрацентрифуге Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, США), ускорение 20000xg/30000xg/48254xg/75000xg/100000xg, 30 мин при

+5 °С. Объем центрифугируемой суспензии и отбираемой аликвоты супернатанта для анализа составляли в первом случае 0,5 и 0,05 мл, во втором – 1 и 0,2 мл соответственно. Концентрацию свободного доксорубина в супернатанте определяли спектрофотометрически с использованием калибровочной кривой в воде (0,00–52,50 мкг/мл; r = 0,9979). Степень включения доксорубина рассчитывали как отношение (%) разницы содержания общего и свободного доксорубина к его общему содержанию в образце:

$$\text{Степень включения (\%)} = \frac{(C_{\text{общ.}} - C_{\text{свобод.}})}{C_{\text{общ.}}} \times 100 \%. \quad (1)$$

Для оценки эффективности осаждения НЧ содержание PLGA в супернатантах определяли методом КЭФ после щелочного гидролиза, как описано выше. Для этого к 100 мкл неразбавленного супернатанта прибавляли 10 мкл 1,0 н раствора NaOH, инкубировали 24 ч при +37 °С. Перед анализом смесь разбавляли в 100 раз водой Milli-Q. Остаточное содержание НЧ в супернатанте после центрифугирования рассчитывали, как отношение (%) содержания PLGA в супернатанте к его общему содержанию в образце. Все измерения выполняли параллельно с использованием 6 флаконов образца каждой серии PLGA-Dox НЧ.

Метод ультрафильтрации

Леофилизированные НЧ ресуспендировали в 1,5 мл дистиллированной воды, далее 500 мкл суспензии помещали в предварительно промытые водой фильтры Amicon® Ultra-0,5 (Millipore) из восстановленной целлюлозы с размером пор 10, 30, 50 и 100 кДа (NMWL) и центрифугировали (Eppendorf 5804R, 15000xg, 30 мин, +25 °С). Концентрацию доксорубина в фильтрате и степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox НЧ рассчитывали как описано выше (n = 6). Контрольный раствор доксорубина гидрохлорида с концентрацией 1,0 мг/мл подвергали ультрафильтрации в тех же условиях (n = 6) для оценки степени сорбции на фильтрах (%).

Метод гель-фильтрации

Для оценки степени включения свободный доксорубин отделяли методом гель-фильтрации (Sephadex® G25, GE Healthcare, Швеция; колонка 32 × 110 мм, объем геля ~70 мл). Для оценки влияния объема анализируемого образца на качество разделения на колонку наносили образцы сконцентрированной в 2 раза суспензии НЧ объемом 2–3 мл или 10–12 мл; фракцию «отмытых» от свободного доксорубина НЧ (10–15 мл) собирали и лиофильно высушивали. Степень включения (%) рассчитывали как отношение нагрузки доксорубина в НЧ после и до отделения фракции свободного доксорубина:

$$\text{Нагрузка} = \text{Доксорубин} [\text{мг}] / \text{PLGA} [\text{мг}] \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{Степень включения (\%)} = \\ = (\text{нагрузка}_{\text{отмытые}} / \text{нагрузка}_{\text{неотмытые}}) \times 100 \%. \quad (3) \end{aligned}$$

Отделение свободной фракции доксорубина от НЧ методом гель-фильтрации в обоих случаях проводили в двукратной повторности для оценки сходимости; содержание доксорубина и PLGA в «отмытых» НЧ определяли для трех параллельных образцов.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета анализа данных Statsoft Statistica 10. Для статистического анализа физико-химических данных использовали t-критерий Стьюдента; статистический уровень значимости $p < 0,05$. Полученные результаты представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение (sd), при этом указано число параллельных измерений (n).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекула доксорубина обладает амфифильными свойствами, поэтому его растворимость зависит от pH: при понижении pH фосфатно-солевого буфера до 6,4 происходит смещение ионного равновесия амфифильной молекулы доксорубина в сторону образования катионов с протонированной аминогруппой, обладающих большей растворимостью в воде и меньшим сродством к гидрофобной матрице PLGA [7]. Соответственно, мы предположили, что путем варьирования pH внешней водной фазы двойной эмульсии (1 % раствор ПБС в PBS; pH 6,4 или 7,4) можно получить НЧ с разной степенью включения. В таблице 1 приведены усредненные значения параметров PLGA-Dox/6,4 и PLGA-Dox/7,4 НЧ (3 серии каждого типа). До лиофилизации гидродинамический диаметр обоих типов НЧ составлял 90–100 нм, однако после лиофилизации в суспензии PLGA-Dox/6,4 НЧ появлялись микроагрегаты (3–5 мкм), фракция которых составила от 3 до 6 %; с учетом микронной фракции средний гидродинамический диаметр PLGA-Dox/6,4 НЧ составил 141 ± 8 нм. Размеры НЧ, определенные с помощью ПЭМ, были значительно меньше и составляли в среднем 50 ± 16 нм (рисунок 1). Средний размер НЧ, измеренный методом ФКС, представляет собой гидродинамический диаметр наночастицы, при этом он теоретически должен превышать размер, определенный методом ПЭМ, так как в первом случае учитывается размер гидратной оболочки вокруг НЧ [8]. Поскольку полученные наночастицы PLGA-Dox/6,4 и PLGA-Dox/6,4 имеют отрицательный дзета-потенциал поверхности, величина гидратной оболочки вносит существенный вклад в величину среднего размера, определенного методом ФКС.

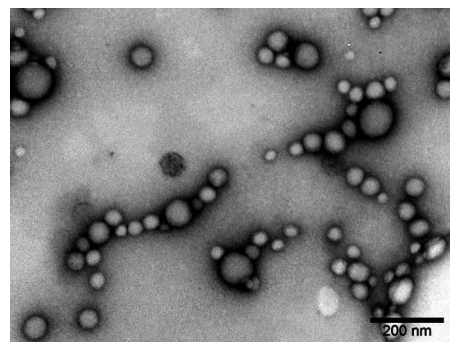


Рисунок 1. Электронная микрофотография PLGA-Dox/7,4 наночастиц (просвечивающий электронный микроскоп JEOL JEM-1400, Япония); контрастирующий агент 1 % раствор уранила ацетата

Figure 1. Electron micrograph of PLGA-Dox/7,4 nanoparticles (transmission electron microscope JEOL JEM-1400, Japan); contrasting agent 1 % uranyl acetate solution

Как было отмечено выше, для определения включения ЛВ в НЧ необходимо отделение его несвязанной (свободной) фракции. Для выявления оптимального метода отделения НЧ в данном исследовании сравнивали методы центрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации. В опыте использовали репрезентативные серии НЛФ: PLGA-Dox/7,4* и PLGA-Dox/6,4*, имеющие средний гидродинамический диаметр 98 ± 3 нм (дзета-потенциал $-10,90 \pm 0,27$ мВ) и 142 ± 2 нм (дзета-потенциал $-4,79 \pm 0,33$ мВ) соответственно.

Как и предполагалось, PLGA-Dox/7,4* НЧ характеризуются более высокой степенью включения доксорубина по сравнению с PLGA-Dox/6,4*. При отделении НЧ методом центрифугирования основным фактором, оказывающим влияние на результат анализа, является ускорение. Как видно из рисунка 2, степень включения возрастает с увеличением ускорения, что связано с неполным осаждением НЧ при низком ускорении и, как следствие, завышенным содержанием доксорубина, определяемым в супернатанте.

В среднем содержание PLGA в супернатанте при низком ускорении ($15000 \times g$, $+18^\circ\text{C}$) составляет более 20 % от исходного ($27,2 \pm 0,9$ % для PLGA-Dox/7,4* и $21,2 \pm 1,6$ % для PLGA-Dox/6,4* соответственно), а при увеличении ускорения до $48254 \times g$ снижается до значений менее 5 % ($5,0 \pm 0,3$ % для PLGA-Dox/7,4* и $4,0 \pm 0,1$ % для PLGA-Dox/6,4* соответственно). При этом в первом случае наблюдается занижение степени включения доксорубина по сравнению со значениями, полученными при ускорении $48254 \times g$: $79,9 \pm 1,1$ % vs $92,6 \pm 0,6$ % ($p < 0,05$) для PLGA-Dox/7,4* и $63,7 \pm 2,5$ %

Таблица 1. Физико-химические параметры наночастиц, нагруженных доксорубином (PLGA-Dox, n = 3, среднее $\pm$ sd)

Table 1. Physicochemical parameters of the nanoparticles loaded with doxorubicin (PLGA-Dox, n = 3, average $\pm$ sd)

Тип НЧ	Содержание доксорубина, мг/флакон	Содержание PLGA, мг/флакон	Размер, нм	PDI	Дзета-потенциал, мВ
PLGA-Dox/7,4	$1,67 \pm 0,06$	$15,55 \pm 2,16$	103 ± 10	$0,149 \pm 0,007$	$-10,61 \pm 0,80$
PLGA-Dox/6,4	$1,67 \pm 0,02$	$16,68 \pm 0,08$	141 ± 8	$0,272 \pm 0,071$	$-7,03 \pm 1,95$

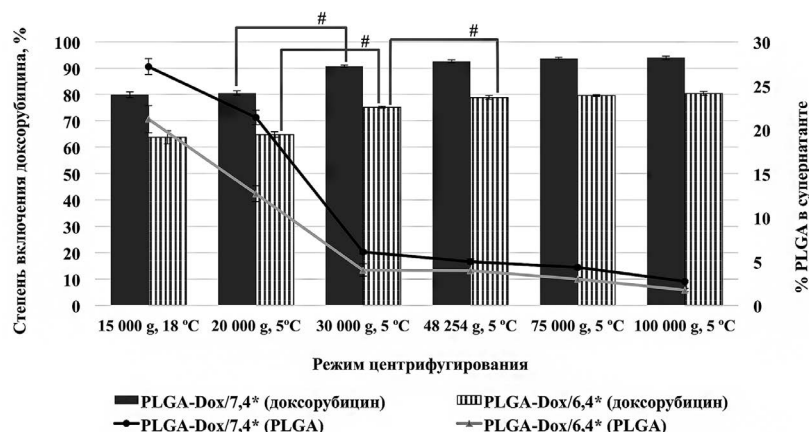


Рисунок 2. Влияние режима центрифугирования на степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox/7.4* и PLGA-Dox/6.4* наночастицы и эффективность осаждения наночастиц по содержанию PLGA (%) в супернатанте (n = 6, среднее $\pm$ sd); # – p < 0,05

Figure 2. Influence of centrifugation parameters on encapsulation efficiency of doxorubicin (%) in PLGA-Dox/7.4* and PLGA-Dox/6.4* nanoparticles and the efficiency of nanoparticles separation by PLGA content (%) in the supernatant (n = 6, average $\pm$ sd); # – p < 0,05

vs $78,9 \pm 0,7$ % (p < 0,05) для PLGA-Dox/6,4* соответственно. Отметим, что осаждение PLGA-Dox/6,4* происходит эффективнее, чем PLGA-Dox/7,4* при любом режиме центрифугирования (p < 0,05); возможно, это происходит из-за склонности этих НЧ к агрегации. Статистически значимые различия (p < 0,05) между значениями степени включения и содержания PLGA в супернатантах наблюдаются при центрифугировании с ускорением 30000xg и менее (15000xg и 20000xg) для обоих типов НЧ. Помимо этого, для PLGA-Dox/6,4* НЧ также отмечены статистически значимые различия между значениями степени включения при центрифугировании с ускорением 30000xg и 48254xg (p < 0,05). Таким образом, необходимым и достаточным для эффективного осаждения НЧ обоих типов является ускорение 48254xg: в этом случае остаточное содержание PLGA в супернатанте не превышает 5 % от исходного. В то же время для осаждения основной массы НЧ (более 90 %) приемлемым является ускорение более 30000xg. В отличие от липосом аналогичного размера (около 100 нм), для осаждения которых методом центрифугирования требуется длительное время (10–20 часов) и ускорение более 200000xg ввиду близкой плотности частиц и окружающей среды [2], твердые коллоидные частицы PLGA-Dox могут быть эффективно отделены от свободной фракции доксорубина за короткое время.

При использовании метода ультрафильтрации для отделения НЧ от свободной фракции ЛВ важным фактором, влияющим на результат анализа, является сорбция свободного ЛВ на мембране. В таблице 2 приведены значения степени включения доксорубина в НЧ PLGA-Dox/7,4* и PLGA-Dox/6,4* при отделении НЧ методом ультрафильтрации на фильтрах с разным диаметром пор. При использовании фильтров Amicon® Ultra-0,5 (Millipore) с диаметром пор 50 и 100 кДа сорбция доксорубина на фильтрах составила $3,5 \pm 0,5$ % и $1,9 \pm 0,5$ % соответственно (p < 0,05). При использовании фильтров с диаметром пор 10 и 30 кДа заметно

занижение содержания свободного доксорубина в супернатанте, и, следовательно, некоторое завышение степени включения доксорубина в НЧ в связи с более значительной сорбцией на фильтрах ($17,6 \pm 0,8$ % и $7,7 \pm 0,7$ % соответственно). При этом полимер в фильтрах даже в случае фильтров с NMWL 100 кДа (КЭФ) содержался в следовых количествах (менее 1 %), соответствующих содержанию водорастворимой фракции PLGA в НЧ. Таким образом, PLGA-Dox НЧ эффективно отделяются при ультрафильтрации, в отличие от липосом размером 100 нм, для которых отмечено прохождение через фильтры с аналогичным NMWL ввиду большей пластичности [2]. По-видимому, в отличие от центрифугирования при низких значениях ускорения, метод ультрафильтрации позволяет отделить наиболее мелкие НЧ, которые остаются в супернатанте. Таким образом, в данном случае метод ультрафильтрации при использовании фильтров с минимальной сорбцией (NMWL 50 или 100 кДа) может заменить метод центрифугирования при отсутствии в аналитической лаборатории высокоскоростной центрифуги (с ускорением более 30000xg).

Таблица 2. Степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox при отделении НЧ методом ультрафильтрации (n = 6)

Table 2. Encapsulation efficiency of doxorubicin (%) in the separation of nanoparticles by ultrafiltration (n = 6)

Тип НЧ	Amicon® Ultra-0,5 (Millipore), NMWL			
	10 кДа	30 кДа	50 кДа	100 кДа
PLGA-Dox/7,4*	93,7 $\pm$ 0,6	93,2 $\pm$ 0,6	92,0 $\pm$ 0,4	91,8 $\pm$ 0,2
PLGA-Dox/6,4*	83,2 $\pm$ 0,2	77,5 $\pm$ 0,3	76,7 $\pm$ 0,4	76,4 $\pm$ 0,1

Помимо центрифугирования и ультрафильтрации, гель-фильтрация также широко используется для разделения свободного ЛВ и НЧ: НЧ быстро проходят сквозь гель, а свободное ЛВ удерживается в порах геля. Однако в отличие от первых двух методов, для которых степень включения оценивали косвенно

но по уравнению (1), используя значения содержания свободного доксорубина в супернатанте или фильтрате после отделения НЧ, в случае гель-фильтрации степень включения рассчитывали напрямую как отношение между нагрузкой доксорубина в НЧ после отделения свободной фракции на колонке и в исходных НЧ. Для оценки влияния отношения объема образца к объему геля на эффективность разделения свободного доксорубина и НЧ на колонку, заполненную гелем Sephadex® G25, наносили образцы с различным соотношением объемов суспензии НЧ и геля: при соотношении 1:23–35 о/о были получены «отмытые» НЧ PLGA-Dox/7,4*G25(1) и PLGA-Dox/6,4*G25(1), при соотношении 1:5,8–7 о/о – «отмытые» НЧ PLGA-Dox/7,4*G25(2) и PLGA-Dox/6,4*G25(2). При этом рассчитывали отношение массы доксорубина к массе PLGA в образце (нагрузка) в «отмытых» и исходных НЧ (2). Степень включения, определенная как отношение нагрузки доксорубина в «отмытых» НЧ к аналогичному показателю в исходных НЧ, рассчитанная по уравнению (3), была значительно ниже, чем рассчитанная косвенным методом по уравнению (1) при отделении НЧ методами центрифугирования и ультрафильтрации (таблица 3). По всей видимости, при таком способе отделения НЧ при взаимодействии пробы с сорбентом создаются условия значительного разбавления, что приводит к существенному вымыванию доксорубина с поверхности PLGA НЧ. При этом 5-кратное увеличение отношения объема наносимой пробы к объему колонки существенно сказалось на значении степени включения для НЧ, полученных при pH 6,4.

Таблица 3. Степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox при отделении НЧ методом гель-фильтрации, (n = 6)

Table 3. Encapsulation efficiency of doxorubicin (%) in the separation of nanoparticles by gel filtration (n = 6)

Образец	Содержание доксорубина (мг/флакон)	Содержание PLGA (мг/флакон)	Степень включения доксорубина, %
PLGA-Dox/7,4*	1,71 ± 0,05	17,02 ± 0,96	–
PLGA-Dox/7,4*G25(1)	0,333 ± 0,010	4,50 ± 0,02	73,8 ± 2,0
PLGA-Dox/7,4*G25(2)	0,73 ± 0,01	9,82 ± 0,04	74,3 ± 2,0
PLGA-Dox/6,4*	1,67 ± 0,03	17,00 ± 0,57	–
PLGA-Dox/6,4*G25(1)	0,045 ± 0,002	2,12 ± 0,01	21,6 ± 0,4
PLGA-Dox/6,4*G25(2)	0,16 ± 0,01	5,90 ± 0,07	27,6 ± 0,5

Как отмечено выше, в случае НЧ, полученных при pH 6,4, доксорубин обладает большей растворимостью в воде и меньшим сродством к гидрофобной матрице PLGA. Вероятно, в этих НЧ доксорубин находится в основном на поверхности и в приповерхностном слое; в условиях значительного разбавления (гель-фильтрация) ~80 % доксорубина десорбируется с поверхности PLGA-Dox/6,4 НЧ и только 20 % остается связанным с НЧ и будет высвобождаться только в процессе их деградации. В отличие от липосом, пред-

ставляющих собой замкнутый наноконтейнер с липидной оболочкой, для которых гель-фильтрация является обычным методом разделения свободного и инкапсулированного ЛВ [9], степень включения ЛВ в PLGA НЧ в большей степени зависит от градиента концентраций ЛВ в среде, поскольку в такой системе существует равновесие между адсорбцией и десорбцией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для определения степени включения доксорубина в PLGA НЧ наилучшим образом подходит метод центрифугирования при ускорении > 30000xg. Оптимальным является ускорение 48254xg: степень включения доксорубина составила 78,9 ± 1,8 % для PLGA-Dox/6,4 НЧ и 91,5 ± 0,9 % для PLGA-Dox/7,4 НЧ (усредненные значения степени включения доксорубина в НЧ для трех серий каждого типа). Меньшее ускорение приводит к неполному осаждению НЧ и занижению степени включения. Достоверно определять степень включения доксорубина в НЧ можно также методом ультрафильтрации при использовании фильтров с NMWL 50 и 100 кДа. При использовании метода гель-фильтрации происходит значительная десорбция доксорубина с поверхности и приповерхностного слоя НЧ, что приводит к занижению степени включения. Тем не менее, метод гель-фильтрации в данном случае позволяет оценить сколько доксорубина находится внутри матрицы или прочно с ней связано.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Liu Z., Zhu Y. Y., Li Z. Y., Ning S. Q. Evaluation of the efficacy of paxitaxel with curcumin combination in ovarian cancer cells. *Oncol Lett.* 2016; 12(5): 3944–3948. DOI: 10.3892/ol.2016.5192.
- Wallace S. J., Li J., Nation R. L., Boyd B. J. Drug release from nanomedicines: selection of appropriate encapsulation and release methodology. *Drug Deliv Transl Res.* 2012; 2 (4): 284–292. DOI: 10.1007/s13346-012-0064-4.
- Beck P., Scherer D., Kreuter J. Separation of drug-loaded nanoparticles from free drug by gel filtration. *J Microencapsul.* 1990; 7(4): 491–496. DOI: 10.3109/02652049009040471.
- Zheng Y., Wu Y., Yang W., Wang C., Fu S., Shen X. Preparation, characterization, and drug release in vitro of chitosan-glycyrrhetic acid nanoparticles. *J Pharm Sci.* 2006; 95 (1): 181–191. DOI: 10.1002/jps.20399.
- Maksimenko O., Malinovskaya J., Shipulo E., Osipova N., Razzhivina V., Arantseva D., Yarovaya O., Mostovaya U., Khalansky A., Fedoseeva V., Alekseeva A., Vanchugova L., Gorshkova M., Kovalenko E., Balabanyan V., Melnikov P., Baklaushv V., Chekhonin V., Kreuter J., Gelperina S. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *Int J Pharm.* 2019; 572: 118733. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118733.
- Kumskova N., Ermolenko Y., Osipova N., Semyonkin A., Kildeeva N., Gorshkova M., Kovalskii A., Kovshova T., Tarasov V., Kreuter J., Maksimenko O., Gelperina S. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release. *J Microencapsul.* 2020; 3(37): 283–295. DOI: 10.1080/02652048.2020.1729885.
- Fölöp Z., Gref R., Löftsson T. A permeation method for detection of self-aggregation of doxorubicin in aqueous environment. *Int J Pharm.* 2013; 454(1): 559–561. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.06.058.
- Booth A., Vogel V., Schubert D., Kreuter J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 57(2): 369–375. DOI: 10.1016/S0939-6411(03)00193-0.
- Ruysschaert T., Marque A., Duteyrat J. L., Lesieur S., Winterhalter M., Fournier D. Liposome retention in size exclusion chromatography. *BMC biotechnol.* 2005; 5(1): 11. DOI: 10.1186/1472-6750-5-11.