WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN2305-2066

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

ХИМИЯ | pharmtech & ingredients | АНАЛИТИКА ЭКСПО

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

ФБУ «ГИЛС и НП»

Многофункциональные
РЕАКТОРЫ СЕРИИ CR

Промышленное производство субстанций по стандартам GMP

стр. 28

büchiglasuster
switzerland
Pilot Plant and Reactor Systems

В НОМЕРЕ:

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СВОЙСТВА ГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ДЕТОНАЦИОННЫХ НАНОАЛМАЗОВ КАК СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ОРГАНИЧЕСКИХ НИТРАТОВ

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕКАРСТВЕННОЙ АЛЛЕРГИЕЙ «КОКТЕЙЛЬНЫМ» МЕТОДОМ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ

ДАУНСТРИМ ПРОЦЕСС ОЧИСТКИ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТА АНОМАЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ СУБСТАНЦИИ ИНСУЛИНА

РОЛЬ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ: РЕГУЛЯТОРНЫЕ И МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

№ 3 (16) АВГУСТ 2016

Summum bonum medicinae sanitas

WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Учредитель
Группа компаний «Фармконтракт»
ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

Директор журнала
Залеских О.В.

Редакционная коллегия
Главный редактор:
Шохин И.Е., к.фарм.н.
info@pharmjournal.ru

Редактор раздела «Фармацевтическая технология и нанотехнологии»:
Демина Н.Б., проф., д.фарм.н.

Редактор раздела «Биотехнология»:
Гусаров Д.А., к.х.н.

Редактор раздела «Аналитические методики и методы контроля»:
Медведев Ю.В., к.фарм.н.

Редактор раздела «Эффективность и безопасность лекарственных средств»:
Малашенко Е.А., к.фарм.н.

Редактор раздела «Регуляторные вопросы»:
Василенко И.А., проф., д.х.н.

Русинов В.Л., чл.-корр. РАН, д.х.н.
Белоусов М.В., проф., д.фарм.м.
Емшанова С.В., д.фарм.н.
Князев А.С., доц., д.х.н.
Леонидов Н.Б., проф., д.биол.н.
Макеев О.Г., проф., д.м.н.
Попов В.В., проф., д.м.н.
Сливкин А.И., проф., д.фарм.н.
Станишевский Я.М., проф., д.х.н.
Смехова И.Е., д.фарм.н.
Сысуев Б.Б., доц., д.фарм.н.
Чучалин В.С., д.фарм.н.
Аммур Ю.И., к.биол.н.

Кулинич Ю.И., к.фарм.н.
Мустафин Р.И., к.фарм.н.
Павлов В.М., к.фарм.н.
Павлова Л.А., к.фарм.н.
Палеева М.А., к.фарм.н.
Смирнов В.В., к.фарм.н.
Ташлицкий В.Н., к.х.н.
Хуторянский В., проф. (Великобритания)
Боян Салия (Сербия)
Книттер Х.-Ю. (Германия)
Поль Смит (Великобритания)

Выпускающий редактор:
Дорина Е.А., к.п.н.
info@pharmjournal.ru

Дизайн-концепция:
Григорьев В.А.
Михайлова Н.С.
info@phct-media.ru

Редактор-корректор:
Троицкая Е.Н.

Адрес редакции
Россия, 115516, Москва,
ул. Промышленная, д. 11/3, оф. 419
+7 (495) 720 42 20
info@pharmjournal.ru
www.pharmjournal.ru

Отпечатано в типографии
ООО «Юнион Принт»
Россия, 603022, Н. Новгород,
ул. Окский съезд, 2

Ответственность за опубликованные материалы несут авторы

Свидетельство о регистрации СМИ:
ПИ №ФС77-60744 от 11 февраля 2015 г. выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

ISSN 2305-2066

Журнал зарегистрирован в Российском индексе научного цитирования (РИНЦ)
Тираж 40000 экземпляров
Журнал выходит один раз в квартал
Подписной индекс в каталоге «Пресса России» 57964
Цена свободная

Founder
«Pharmcontract» Group of Companies
I.M. Sechenov First Moscow State Medical Universisy
Siberian State Medical University

При поддержке
ФБУ «ГИЛС и НП»

Journal director
Zaleskikh O.V.

Editorial board
Editor-in-chief:
Shohin I.E., PhD
info@pharmjournal.ru

Editor of «Pharmaceutical Technology and Nanotechnology» part:
Diomina N.B., prof., PhD

Editor of «Biotechnology» part:
Gusarov D.A., PhD

Editor of «Analytical and Quality Control Methods» part:
Medvedev Y.V., PhD

Editor of «Drug Products Efficacy and Safety» part:
Malashenko E.A., PhD

Editor of «Regulatory Issues» part:
Vasilenko I.A., prof., PhD

Rusinov V.L., RAS c.-m., PhD
Belousov M.V., prof., PhD
Emshanova S.V., PhD
Knyazev A.S., as.prof., PhD
Leonidov N.B., prof., PhD
Makeev O.G., prof., PhD
Popov V.V., prof., PhD
Slivkin A.I., prof., PhD
Stanishevskiy Ya.M., prof., PhD
Smekhova I.E., PhD
Sysuev B.B., as.prof., PhD
Chuchalin V.S., PhD
Ammur Yu.I., PhD

Kulinich J.I., PhD
Moustafine R.I., PhD
Pavlov V.M., PhD
Pavlova L.A., PhD
Paleeva M.A., PhD
Smirnov V.V., PhD
Tashlitskiy V.N., PhD
Khutoryanskiy V., prof., PhD (UK)
Bojan Calija, as.prof., PhD (Serbia)
Knitter H.-J. (Germany)
Paul Smith (UK)

Commissioning Editor:
Dorina E.A., PhD
info@pharmjournal.ru

Design concept:
Grigoriev V.A.
Mikhaylova N.S.
info@phct-media.ru

Corrector:
Troitskaya E.N.

Media registration certificate:
ПИ №ФС77-60744, February 11, 2015, given by Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom, Information Technologies and Mass Communications (ROSKOMNADZOR)

ISSN 2305-2066

Journal is registered in Russian index of scientific citation
Circulation: 40000 copies
A peer-reviewed quarterly journal
Index listing «The Russian Press» 57964
Free Price

Editorial office address
11/3, office 419, Promyshlennaya str.,
115516, Moscow, Russia
+7 (495) 720 42 20
info@pharmjournal.ru
www.pharmjournal.ru

Printing office
Union Print LLC
2, Okskiy s`ezd,
603022, N. Novgorod, Russia

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Научно-производственный рецензируемый журнал
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Содержание

Contents

От редакции	6	**Introduction**
Мероприятия	8	**Events**
Экспертное мнение	28	**Expert Opinion**
Контрактное производство	34	**Contract Drug Manufacturing**
Раздел «Фармацевтическая технология и нанотехнологии»		**«Pharmaceutical Technology and Nanotechnology» part**
Секция «Современные технологии создания лекарственных форм»		***«Modern Technology of Creating Dosage Forms» section***
Панкрушева Т.А., Ерофеева Л.Н., Орлова Т.В., Курилова О.О., Чекмарева М.С.	38	*Pankrusheva T.A., Erofeeva L.N., Orlova T.V., Kurilova O.O., Chekmareva M.S.*
НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ СУППОЗИТОРИЕВ		SCIENTIFIC-METHODICAL APPROACHES AND RESULTS OF THE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF SUPPOSITORIES
Махотина М.В., Сысуев Б.Б., Петров А.Ю., Емельянова И.В.	44	*Makhotina M.V., Sysuev B.B., Petrov A.U., Emelyanova I.V.*
ИССЛЕДОВАНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОРИГИНАЛЬНОЙ ОСНОВЫ ТИЗОЛЬ-ГЕЛЯ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ЕГО ОСНОВЕ ПО МАНУАЛЬНЫМ ПРОПИСЯМ		STUDY OF RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ORIGINAL BASIS TIZOL GEL AND MEDICINAL COMPOSITIONS ON THIS BASIS IN MANUAL RECIPES
Домнина Ю.М., Кедик С.А., Суслов В.В., Шняк Е.А.	48	*Domnina Y.M., Kedik S.A., Suslov V.V., Shnyak E.A.*
РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ КАРБОМЕРОВ ACRYPOL 974P И CADPOL 980		DEVELOPMENT AND STUDY OF THE CHARACTERISTICS OF OPHTHALMIC GELS BASED ON CARBOMER ACRYPOL 974P AND CADPOL 980
Трофимов С.В.	52	*Trofimov S.V.*
ВЛИЯНИЕ ГИДРОКСИЭТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ГЛИБЕНКЛАМИДА ИЗ ТАБЛЕТОК ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ		EFFECT OF HYDROXYETHYLCELLULOSE ON THE RELEASE OF GLIBENCLAMIDE FROM SUSTAINED RELEASE TABLETS
Секция «Нанотехнологии»		***«Nanotechnology» section***
Яковлев Р.Ю., Кулакова И.И., Бадун Г.А., Лисичкин Г.В., Валуева А.В. , Селезенев Н.Г., Леонидов Н.Б.	60	*Yakovlev R.Y., Kulakova I.I., Badun G.A., Lisichkin G.V., Valueva A.V., Selezenev N.G., Leonidov N.B.*
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СВОЙСТВА ГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ДЕТОНАЦИОННЫХ НАНОАЛМАЗОВ КАК СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ		PHYSICAL-CHEMICAL PRINCIPLES OF THE PREPARATION OF HYBRID MATERIALS ON THE BASIS OF DETONATION NANODIAMONDS AS A NEW GENERATION DRUG DELIVERY SYSTEMS AND THEIR PROPERTIES
Секция «Лекарственные средства из природного сырья»		***«Drug from Natural Raw Materials» section***
Кедик С.А., Панов А.В., Тюкова В.С., Золотарева М.С.	68	*Kedik S.A., Panov A.V., Tyukova V.S., Zolotareva M.S.*
ЦИКЛОДЕКСТРИНЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ (ОБЗОР)		CYCLODEXTRINS AND THEIR APPLICATION IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY (REVIEW)

Секция «Биофармация»

Смолл У. **76**

СТРАТЕГИЯ СОЗДАНИЯ РЕЦЕПТУР С УЛУЧШЕННОЙ БИОДОСТУПНОСТЬЮ

Секция «Технологический контроль лекарственных форм»

Егорова С.Н., Мцариашвили М.Р., Севодин В.А., Гармонов С.Ю. **82**

АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА СИРОПА АМБРОКСОЛА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Раздел «Биотехнология»

Гусаров Д.А. **88**

ДАУНСТРИМ-ПРОЦЕСС ОЧИСТКИ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Раздел «Аналитические методики и методы контроля»

Секция «Контроль качества химико-фармацевтических препаратов»

Харитонов Ю.Я., Черкасова О.Г., Завадский С.П., Цыбусов С.Н., Краснюк (мл) И.И., Григорьева В.Ю.. **100**

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА МАГНИТНЫХ НАПОЛНИТЕЛЕЙ ДЛЯ МАГНИТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Осипов А.С., Нечаева Е.Б., Трухачёва Л.А. **108**

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ОРГАНИЧЕСКИХ НИТРАТОВ

Рымашевская А.Ю., Дубоделова Е.В., Горжанов В.В. **112**

КОМПЛЕКСНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Эпштейн Н.А. **118**

О СТРЕССОВЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ ПРИ РАЗРАБОТКЕ / УСОВЕРШЕНСТВОВАНИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК И ТЕХНОЛОГИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ И ПРЕПАРАТОВ

Чапленко А.А., Моногарова О.В., Осколок К.В., Чапленко С.А. **134**

СОРБЦИОННО-ЦВЕТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ЛЕКАРСТВЕННОЙ СУБСТАНЦИИ ТЕТРАЦИКЛИНА ГИДРОХЛОРИДА И В РАСТВОРЕ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ ЦИАНОКОБАЛАМИНА

«Biopharmacy» section

Small W. **76**

FORMULATION STRATEGIES FOR ENHANCED TOPICAL BIOAVAILABILITY

«In-process Quality Control» section

Egorova S.N., Mtsariashvili M.R., Sevodin V.A., Garmonov S.Yu. **82**

ANALYSIS OF QUALITY INDICATORS AND PARAMETRS OF SYRUP AMBROXOL PRODUCTION USING STATISTICAL METHODS

«Biotechnology» part

Gusarov D.A. **88**

DOWNSTREAM PROCESS OF BIOPHARMACEUTICALS

«Analytical and Quality Control Methods» part

«Quality Control of Chemical Drug Products» section

Kharitonov Yu.Ya., Cherkasova O.G., Zavadskiy S.P., Tsybusov S.N., Krasnyuk (jr) I.I., Grigorjeva V.Yu. **100**

QUALITY CONTROL OF MAGNETIC FILLERS FOR MAGNETIC FORMULATIONS

Osipov A.S., Nechaeva E.B., Truhacheva L.A. **108**

APPLICATION OF HYDROPHYILIC INTERACTIONS LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR ORGANIC NITRATE ANALYSIS

Rumascheuskaia A.U., Dubodelova K.V., Gorzhanov V.V. **112**

DETERMINATION OF WATER-SOLUBLE VITAMINS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Epshtein N.A. **118**

ABOUT STRESS EXPERIMENTS BY DEVELOPING / IMPROVING ANALYTICAL METHODS AND TECHNOLOGY OF DRUG SUBSTANCES AND MEDICINES

Chaplenko A.A., Monogarova O.V., Oskolok K.V., Chaplenko S.A. **134**

SORPTION-CHROMATICITY DETERMINATION OF ACTIVE INGREDIENTS IN DRUG SUBSTANCE TETRACYCLINE HYDROCHLORIDE AND IN CYANOCOBALAMIN SOLUTION FOR INJECTION

Научно-производственный рецензируемый журнал
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Секция «Биологические методы анализа» ***«Biological Assays» section***

Косман В.М., Крышень К.Л., Крышень А.А., Гаврилин М.В., Пожарицкая О.Н., Макарова М.Н. **138** *Kosman V.M., Kryshen K.L., Kryshen A.A., Gavrilin M.V., Pozharitskaya O.N., Makarova M.N*

ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТА «АНОМАЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ» ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ СУБСТАНЦИИ ИНСУЛИНА

ABNORMAL TOXICITY TEST VALIDATION FOR INSULIN SUBSTANCE STANDARDISATION

Секция «Контроль качества лекарственного растительного сырья» ***«Quality Control of Herbal Drug Products» section***

Крылов Н.Н., Компанцева Е.В. **146** *Krylov N.N.,Kompantseva E.V.*

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИОННАЯ ОЦЕНКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТАБЛЕТКАХ НООТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION OF TOTAL FLAVONOIDS ASSAY IN TABLETS WITH NOOTROPIC ACTION

Раздел «Эффективность и безопасность лекарственных средств» — *«Drug Products Efficacy and Safety» part*

Секция «Кинетика растворения» ***«Dissolution Profile Test» section***

Шадрин А.А., Флисюк Е.В., Смехова И.Е. **152** *Shadrin A.A., Flisyuk E.V., Smekhova I.E.*

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ РАМИПРИЛА И ЛЕРКАНИДИПИНА ИЗ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

DISSOLUTION PROFILE STUDIES FOR RAMIPRIL AND LERCANIDIPINE FIXED-DOSE COMBINATION

Львова А.А., Болдина Ю.Е., Шохин И.Е., Комаров Т.Н., Меньшикова Л.А., Медведев Ю.В. **158** *Lvova A.A., Boldina Yu.E., Shohin I.E., Komarov T.N., Menshikova L.A., Medvedev Yu.V.*

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ (ДЕПАКИН® ХРОНО)

DISSOLUTION PROFILE STUDY FOR EXTENDED RELEASE VALPROIC ACID DOSAGE FORM (DEPAKINE® CHRONO)

Секция «Доклинические исследования» ***«Preclinical Trials» section***

Шедько В.В., Гущин Я.А., Мужикян А.А., Макарова М.Н. **162** *Shedko V.V., Ya.A. Gushchin, Muzhikyan A.A., Makarova M.N.*

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО АРХИВА

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF HISTOLOGIC ARCHIVE

Ламанова Н.В., Баринов В.А., Рудько Е.А., Малинин А.В. **166** *Lamanova N.V., Barinov V.A., Rud'ko E.A., Malinin A.V.*

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВОЙ МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ АЛКОГОЛЯ

THE STUDY OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF NEW MULTICOMPONENT SYSTEM AT THE TOXIC EFFECT OF ALCOHOL

Секция «Клинические исследования» ***«Clinical Trials» section***

Егоренков Е.А., Смирнов В.В., Мясникова Т.Н., Романова Т.С. **170** *Egorenkov E.A., Smirnov V.V., Myasnikova T.N., Romanova T.S.*

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕКАРСТВЕННОЙ АЛЛЕРГИЕЙ «КОКТЕЙЛЬНЫМ» МЕТОДОМ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ

METABOLIC ACTIVITY STUDY IN PEOPLE WITH DRUG ALLERGY USING «COCKTAIL» PHENOTYPING METHOD

Секция «Биоаналитические методики»

Комаров Т.Н., Медведев Ю.В., Шохин И.Е., Болдина Ю.Е., Львова А.А., Мельников Е.С., Фишер Е.Н., Иванов Р.В., Максвитис Р.Й. **174**

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОКСИФЛОКСАЦИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

«Bioanalytical Methods» section

Komarov T.N. , Medvedev Yu.V., Shohin I.E., Boldina Yu.E., Lvova A.A., Melnikov E.S., Fisher E.N., Ivanov R.V., Maksvitis R.J.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF MOXIFLOXACIN DETERMINATION IN HUMAN PLASMA BY HPLC-UV METHOD

Раздел «Регуляторные вопросы»

Леонтьев Д.А., Подпружников Ю.В., Воловик Н.В. **180**

РОЛЬ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ: РЕГУЛЯТОРНЫЕ И МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

«Regulatory Issues» part

Leontiev D.A., Podpruzhnikov Y.V., Volovyk N.V.

THE ROLE OF REFERENCE STANDARDS IN QUALITY ASSURANCE FOR MEDICINES: REGULATORY AND METROLOGICAL ASPECTS

Ибрагимова Г.Я., Гайсаров А.Х., Насыров Р.В. **190**

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕЕСТРА ТИПОВЫХ ИНСТРУКЦИЙ ВЗАИМОЗАМЕНЯЕМЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЦЕЛЯХ УЛУЧШЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА

Ibragimova G.Ia., Gaisarov A.Kh., Nasyrov R.V.

THE PROSPECTS OF THE USING OF THE REGISTER OF THE STANDARD LABELS OF THE INTERCHANGEABLE MEDICINES TO IMPROVE OF DRUG SUPPLY OF PEDIATRIC PATIENTS

Наркевич И.А., Немятых О.Д., Басакина И.И., Сиукаева Д.Д. **194**

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

Narkevich I.A., Nemyatykh O.D., Basakina I.I., Siukaeva D.D.

PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF DRUGS FOR PEDIATRIC PRACTICE: FUNDAMENTAL BASES AND SPECIFIC FEATURES

Подпружников Ю.В., Шестаков В.Н. **202**

ОБЗОР, ХАРАКТЕРИСТИКА И АНАЛИЗ ПОСЛЕДНИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТРЕБОВАНИЯХ GMP

Podpruznikov Yu.V., Shestakov V.N.

REVIEW, CHARACTERISTICS AND ANALYSIS OF THE LAST CHANGES IN THE GMP REQUIREMENTS

Раздел «История фармации»

Гузев К.С. **220**

ГАЛЕН И ЕГО ЗНАНИЯ В ОБЛАСТИ ЛЕКАРСТВОВЕДЕНИЯ

«History of Pharmacy» part

Guzev K.S.

GALEN AND HIS KNOWLEDGE IN THE FIELD OF PHARMACOLOGY

Публикации партнеров **226** ***Partner Publications***

Мнение специалиста **298** ***Spesialist's Opinion***

ОТ РЕДАКЦИИ

Указом Президента Российской Федерации от 7 июля 2011 г. № 899 «Об утверждении приоритетных направлений развития науки, технологий и техники в Российской Федерации и перечня критических технологий Российской Федерации» российская фармацевтическая промышленность была включена в перечень стратегически значимых и начала развиваться бурными темпами. Как отметил на заседании правительственной комиссии по импортозамещению в фармацевтической и медицинской промышленности (08.07.2016 г.) премьер-министр Российской Федерации Д.А. Медведев, объем производства российских лекарственных средств за последние 5-6 лет вырос в денежном выражении приблизительно в 2,5 раза. В целом же рост фармацевтической промышленности в 2015 г. достиг 24%: «Это, наверное, вообще самый высокий рост в промышленности, достигнутый в условиях экономического кризиса». По данным Минпромторга России, производство отечественных препаратов в натуральном выражении в 2015 году увеличилось на 9%, а за первое полугодие 2016 года – еще на 9%: «Доля российских лекарств на рынке за полтора года увеличилась с 24 до 28,5%. При этом объем импорта сократился на 8,5%» [цит. по Д.В. Мантуров]. Данные показатели оказались достигнуты, в том числе и благодаря принятию в период 2011–2016 гг. ряда программ, призванных стимулировать производство лекарственных препаратов на территории Российской Федерации:

- Федеральная целевая программа «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» утверждена Постановлением Правительства Российской Федерации № 91 от 17 февраля 2011 г.
- Федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (постановление Правительства Российской Федерации от 21.05.2013 № 426).
- Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года (приказ Минпромторга России от 23.10.2009 № 956).
- Стратегия инновационного развития Российской Федерации на период до 2020 года, утвержденная распоряжением Правительства Российской Федерации от 8 декабря 2011 г. № 2227-р.
- Стратегия лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года» (приказ Минздрава России от 13.02.2013 № 66).
- Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года, утвержденная Правительством Российской Федерации 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8.
- Государственная программа Российской Федерации «Развитие здравоохранения», утвержденная постановлением Правительства Российской Федерации от 15 апреля 2014 г. № 294.
- Государственная программа Российской Федерации «Развитие науки и технологий» на 2013–2020 годы, утвержденная постановлением Правительства Российской Федерации от 15 апреля 2014 г. № 301.
- Государственная программа Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013–2020 годы, утвержденная постановлением Правительства Российской Федерации от 15 апреля 2014 г. № 305.
- Государственная программа Российской Федерации «Развитие промышленности и повышение ее конкурентоспособности», утвержденная постановлением Правительства Российской Федерации от 15 апреля 2014 г. № 328.
- Постановление Правительства Российской Федерации от 01.10.2015 № 1045 «Об утверждении Правил предоставления субсидий из федерального бюджета российским организациям на возмещение части затрат на реализацию проектов по организации и проведению клинических исследований лекарственных препаратов в рамках подпрограммы «Развитие производства лекарственных средств».
- Постановление Правительства Российской Федерации от 30 декабря 2015 г. № 1503 «Об утверждении правил предоставления субсидий из федерального бюджета российским организациям на возмещение части затрат на реализацию проектов по разработке схожих по фармакотерапевтическому действию и улучшенных аналогов инновационных лекарственных препаратов».
- Постановление Правительства Российской Федерации от 30.12.2015 № 1518 «О внесении изменений в государственную программу Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013–2020 годы». Данные изменения предусматривают субсидии

на возмещение части затрат российских компаний на реализацию проектов по организации производства лекарственных средств и организации и проведению клинических исследований лекарственных препаратов.

- План мероприятий («дорожная карта») «Развитие биотехнологий и генной инженерии», утвержденный распоряжением Правительства Российской Федерации от 18 июля 2013 г. № 1247-р.
- План мероприятий («дорожная карта») «Развитие разработки и производства современных иммунобиологических лекарственных препаратов для медицинского применения» (утверждена Правительством Российской Федерации 22.06.2015)…

Перечень нормативных правовых актов, а также подзаконных актов, регламентирующих развитие фармацевтической промышленности России обширен и многообразен. Благодаря им за последние два с половиной года в России открыто порядка 70 площадок, производящих лекарственные препараты. Среди этих площадок достаточно много предприятий, производящих не просто препараты на поздних стадиях или выпускающих готовые лекарственные формы, но и осуществляющих синтез фармацевтических субстанций. Последнему направлению сегодня уделяется все больше внимания. Например, еще в феврале 2016 г. Минпромторгом России были разработаны изменения в Правила предоставления субсидий из федерального бюджета российским организациям на компенсацию части затрат, понесенных при реализации проектов по организации лекарственных средств и (или) производства фармацевтических субстанций, в рамках подпрограммы «Развитие производства лекарственных средств» государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013–2020 годы. Согласно данным изменениям, предусмотрена возможность субсидирования проектов организации производства нескольких фармацевтических субстанций в рамках одного договора о предоставлении субсидий, что упрощает учет подлежащих субсидированию платежей по договорам лизинга оборудования, используемого для производства сразу нескольких фармацевтических субстанций. Для расчета показателя по получению выручки от реализации фармацевтической субстанции за 3 года с даты начала ее выпуска в размере, не менее чем в 5 раз превышающем размер предоставленной субсидии, учитывается суммарная выручка от реализации всех лекарственных средств (фармацевтических субстанций или лекарственных препаратов на основе фармацевтических субстанций). По сути, субсидии предоставляются не в форме финансового обеспечения, а в виде возмещения фактически понесенных затрат. В результате производители фармацевтических субстанций начинают осуществлять поиск партнеров, частных инвесторов или задействовать механизмы контрактного производства. Последний механизм становится все более популярен среди производителей фармацевтической продукции. Именно поэтому в ставшей уже традиционной для нашего журнала рубрике «Экспертное мнение» мы приводим материал о специфике контрактного производства, некоторых практических аспектах его внедрения в России [С. 34–37].

В том случае, если компания-производитель лекарственных препаратов принимает решение о самостоятельном производстве фармацевтической субстанции, перед ней встает проблема выбора соответствующего типа оборудования для производственного участка. О том, как граммотно это сделать и избежать всех возможных подводных камней, наши эксперты подготовили материал, представленный на С. 28–33.

В представленном Вашему вниманию номере мы также публикуем очередной материал о последних изменениях в требованиях GMP, которые учитываются при проведении аудита предприятия [С. 202–218].

Так сложилось, что до сегодняшнего выпуска на страницах нашего издания крайне редко публиковался материал о лекарственных препаратах для педиатрии – в этом номере мы постарались сделать подборку статей о самых актуальных аспектах стадии R&D данных продуктов и лекарственного обеспечения пациентов детского возраста [статьи Г.Я. Ибрагимова и соавт. на С. 190-193 и И.А. Наркевич и соавт. на С. 194–201].

Среди новинок номера, который Вы держите в руках, стоит отметить рубрику «Мнение специалиста» [С. 298–300]. В этом разделе мы планируем и дальше публиковать блиц-интервью, рассуждения и комментарии специалистов фармацевтических компаний по вопросам, тесно связанным и крайне важным при разработке и производстве лекарственных средств, но которым традиционно уделяется мало внимания.

Мы надеемся, что новый выпуск журнала *«Разработка и регистрация лекарственный средств»*, входящего в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК для публикации основных научных результатов на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, будет интересен Вам, наши дорогие читатели, и каждый из Вас найдет на его страницах материалы, которые помогут в Вашей каждодневной работе.

РОССИЙСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2016

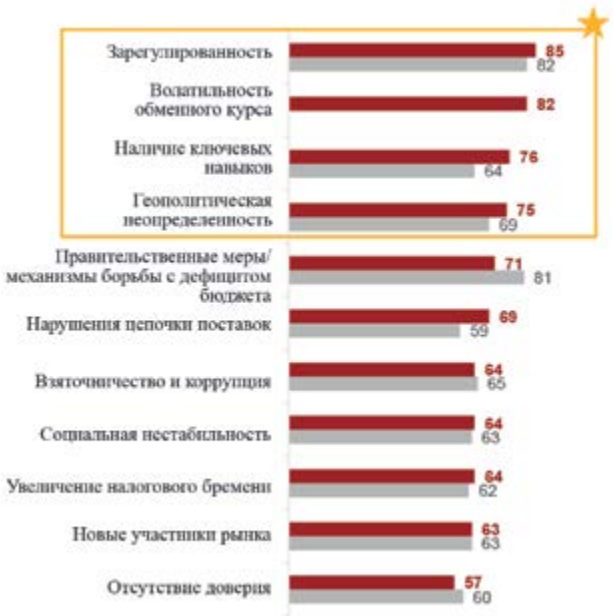
По традиции в середине мая на берегах Невы Институт Адама Смита собрал международных и российских производителей фармацевтической продукции, дистрибьюторов и руководителей розничных сетей. В этом году участники международного форума сконцентрировали внимание на вопросах и темах, находящихся в центре обсуждения ведущих игроков сектора, регуляторных структур, государственных и отраслевых экспертов, ученых и ассоциаций, отраслевых СМИ. Благодаря обсуждению самых значимых вопросов, стоящих перед фармацевтической промышленностью, мероприятие на протяжении многих лет сохраняет позиции крупнейшей независимой конференции, а организаторы всегда предлагают стратегическую программу, составленную на основе тщательного изучения профессиональных мнений руководителей фармкомпаний.

Ежегодный форум Института Адама Смита 2016 года проходил в немного непривычном формате: первые два дня мероприятия составил основной форум, а 18 мая организаторы предложили участникам формат тематических конференций, которые составлялись по отраслевым интересам – для GMов фармацевтических производств и маркетологов, отвечающих за вывод продуктов на российский рынок.

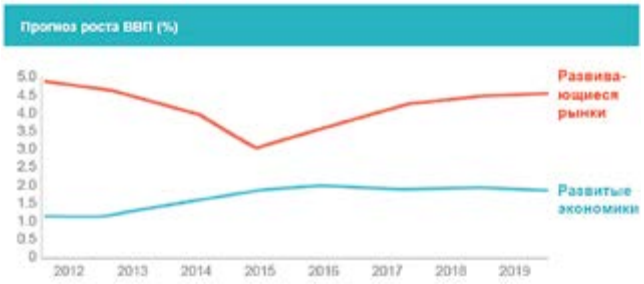
Одним из ключевых лейтмотивов форума 2016 года стала современная экономическая ситуация, так называемая новая нормальность. Состоянию рынка и оценке инвестиционного климата в России была посвящена открывающая сессия, которая не только собрала GMов, но и привлекла внимание представителей Всемирного банка, Высшей школы экономики, Евразийского банка развития и Евразийской экономической комиссии. Открывая сессию и форум, старший партнер Macro-Advisory Ltd **Крис Вифер** представил взгляд иностранных консультантов по ведению бизнеса в России на происходящие в стране изменения. В частности, спикер отметил, что, несмотря на то, что российская экономика второй год находится в рецессии, экономическое самочувствие большинства компаний и государства в целом значительно лучше, чем ожидалось. Более того, **Крис Вифер** видит новые драйверы хоть и для медленного, но роста экономики страны на протяжении последующих 5–8 лет. Среди таких драйверов – локализация производственных площадок и система преференций для национальных производителей. В то же время спикер призвал представителей государственного сектора не увлекаться чрезмерно данным механизмом, поскольку поддержка ограниченного круга предприятий в условиях искусственного закрытия рынка (ограничения для проникновения определенных товаров на российский рынок) может негативно сказаться на развитии промышленности и качестве производимой продукции, подорвать ее конкурентоспособность. Напротив, при поддержке представителей бизнес-структур следует учитывать такой фактор, как ориентация их продукции на экспорт. Среди потенциальных драйверов роста экономики директор Центра интеграционных исследований Евразийского банка развития **Евгений Винокуров** выделил рынок ЕАЭС. При этом старший вице-президент по России, СНГ и странам Юго-Восточной Европы STADA Arzneimittel AG, генеральный директор АО «Нижфарм» **Дмитрий Ефимов** озвучил ожидания большинства фармацевтических производителей, что «к концу 2016 года единый рынок заработает». Спикер убежден, что российская фармотрасль по-прежнему сохраняет свою привлекательность для инвесторов: рынок входит в десятку крупнейших в мире несмотря

на отставание от развитых стран по среднедушевому потреблению лекарств. Для повышения инвестиционной привлекательности российского рынка **Дмитрий Ефимов** предлагает предпринять ряд развивать контрактное производство, которому «мешает ограничение по производству на одной площадке лекарства с одним МНН, но с разными торговыми наименованиями», разработать и принять новую методику регулирования цен, и «в России должен заработать инспекторат GMP, когда действительно будет проверена вся отрасль, когда будут отозваны лицензии у тех, кто не готов работать в условиях GMP». Управляющий партнер, руководитель региона Россия и СНГ A.T. Kearney **Пер Кристиан Хонг**, завершая экономическую сессию форума, поддержал предыдущего докладчика в вопросе привлечения инвесторов в Россию. Спикер убежден, что привлекать инвесторов в Россию трудно, но «инвестировать в российскую фармотрасль можно и нужно, так как это крупный рынок, правительство страны демонстрирует стремление к улучшению здоровья населения». Для этого м-р **Хонг** предлагает «компаниям, работающим здесь, научиться работать в новых условиях, быть готовыми к тому, что их ожидания по выручке могут не оправдаться».

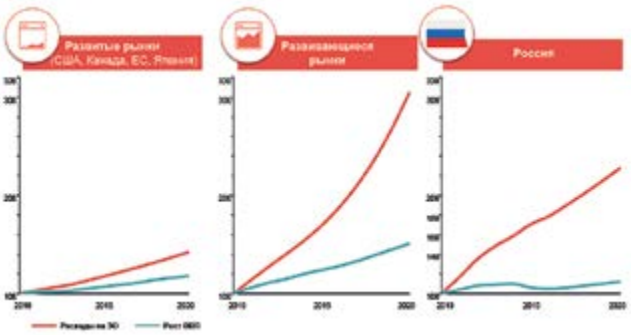
Сессия ключевых презентаций также касалась экономической составляющей развития отечественного фармрынка. Руководители и генеральные директора компаний обсуждали различные оценки рисков и точки зрения на потенциальные возможности роста экономики в ближайшем будущем. Со специальными докладами выступили руководитель практики по оказанию услуг компаниям фармацевтической отрасли Великобритании PwC **Джо Писани** и президент по развивающимся рынкам Takeda Pharmaceuticals **Джилс Платфорд**. **Джо Писани** представила сводный анализ ключевых угроз, которые видят руководители фармпредприятий:

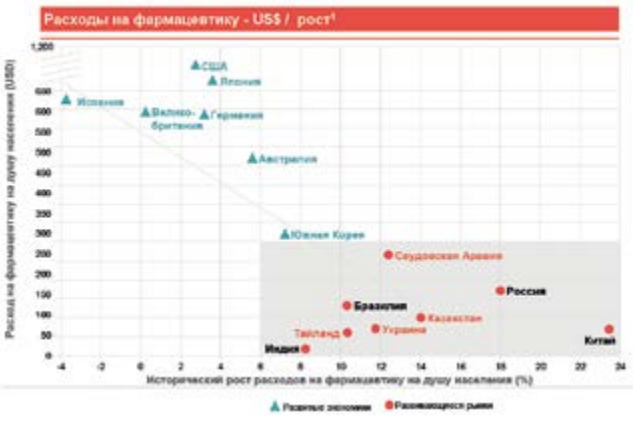


Джилс Платфорд поделилась опытом создания эффективной, основанной на партнерстве с государством бизнес-модели, отвечающей потребностям страны в кратко- и долгосрочной перспективе на растущих рынках. В частности, спикер отметила, что, несмотря на циклический спад на развивающихся рынках, прогноз роста по ним существенно превышает аналогичный прогноз в отношении развитых экономик.



Более того, расходы на здравоохранение в данном сегменте будут превышать рост ВВП.





Таким образом, по мнению г-жи **Платфорд**, фармацевтическим компаниям стоит серьезно пересмотреть свою позицию в области развивающихся рынков с учетом данных тенденций, а также локализации производства и их R&D-потенциала.

Представители фармацевтических компаний «Р-Фарм» и «Санофи Россия» в ходе специального ди-

алога *«Роль бизнеса и государства: стратегии поиска инноваций через партнерство»* еще раз подчеркнули инвестиционную привлекательность российского фармрынка, а также поделились опытом работы на международных рынках в части процедуры регистрации и вывода препарата на рынок. Как отметил профессор политической экономики и социологии Оксфордского университета **Дэвид Сталкер**, введение меры жесткой экономии в Европе привело к большому сокращению расходов на систему здравоохранения, в том числе на фармацевтические препараты, что в результате существенно ухудшило доступ к продуктам и услугам сектора здравоохранения и повлекло за собой ухудшение состояния здоровья нации. Сегодня все больше обсуждаются преимущества и доказательства экономической выгоды от инвестирования в здравоохранение, которые базируются на применении фискальных мультипликаторов. Альтернативная политика управления в интересах роста и развития сектора может стимулировать восстановление и укрепление здоровья населения даже в условиях сурового фискального климата. Именно поэтому компаниям, работающим на российском рынке, следует учитывать влияние экономической ситуации на систему здравоохранения в стране, о чем говорили в рамках сессии ключевых докладов спикеры форума, а также топ-менеджмент фармацевтических компаний в ходе дискуссии генеральных директоров. По итогам дискуссии *«Каким образом фармацевтические компании могут способствовать созданию устойчивой модели здравоохранения в России?»* участники пришли к единому мнению, что потребность в обеспечении пациентов как препаратами, так и медицинскими услугами, несмотря на нестабильность экономики, только растет. С учетом того, что нынешняя модель здравоохранения находится в стадии становления, ведущие игроки рынка должны найти способы и механизмы для создания модели здравоохранения, которая будет способствовать эффективному решению задач обеспечения неудовлетворенных потребностей пациентов. При этом компаниям не следует искать возможности для роста бизнеса в линейной плоскости роста рынка.

Наибольший интерес участников форума традиционно вызвала сессия *«Открытый диалог с регуляторами»*, в рамках которой представители профильных органов власти и отраслевых ассоциаций обсудили ключевые этапы реализации стратегий «Фарма-2020» и «Фарма-2030», вопросы конкуренции, ценообразования и патентной защиты. Так, директор департамента лекарственного обеспечения и регулирования обращения медицинских изделий Минздрава России **Елена Максимкина** отметила: «Министерству здравоохранения хотелось бы понимать, какие лекарственные препараты уже не обращаются на рынке… Сегодня наша главная цель – в условиях ограниченных ресурсов удовлетворить неограниченные человеческие потребности. Тема доступности стала особенно актуальной. Мне очень понравилась норма, которую сейчас

ввели у себя американские коллеги для повышения доступности лекарств. Они обязали компании уведомлять FDA о выводе препарата с рынка. Думаю, нам тоже надо внести такие изменения». При этом представитель Минздрава России считает необходимым, чтобы компании-производители уведомляли министерство не только о прекращении обращения препарата на рынке, но и о причине: «Министерству необходимо знать, что именно случилось с тем или иным лекарственным препаратом, чтобы понимать, возможно ли его заменить, какие действия в связи с этим предпринять, а также более оперативно и полно отвечать на письма граждан, которых в прошлом году поступило в департамент около 20 тысяч».

Заместитель начальника отдела координации формирования общих рынков лекарственных средств и медицинских изделий Департамента технического регулирования и аккредитации ЕЭК **Дмитрий Рождественский** рассказал участникам сессии и гостям форума о текущем состоянии дел в области регулирования фармацевтического рынка ЕАЭС, в том числе о готовности стран-членов союза к переходу на единые принципы и стандарты GxP. Более подробно о юридических аспектах, связанных с обращением лекарственных препаратов на едином рынке ЕАЭС, с позиции их влияния на деятельность компаний-производителей рассказал старший юрист Baker&McKenzie **Владимир Ефремов**.

В ходе специальных выступлений заместитель генерального директора по стратегическому развитию АО «Национальная иммунобиологическая компания» **Ксения Андреева** и вице-президент по фармацевтическим операциям «НоваМедика» **Михаил Гетьман** представили данные по развитию в России производства лекарственных препаратов в условиях полного цикла и потенциале интеграции отечественных R&D в международную цепочку разработок фармацевтической продукции. «В условиях ослабления национальной валюты зависимость от импорта готовых лекарственных форм и импортной продукции может привести к резкому росту цен, – считает **Ксения Андреева**. – В то же время капитальные и эксплуатационные затраты снизились, что повышает привлекательность местного производства». При этом российские производители лекарственных препаратов имеют высокие перспективы для выхода на международные рынки.

Представители аналитических агентств в ходе сессии *«Существуют ли возможности для роста – где и за счет чего?»* продемонстрировали данные проведенных исследований факторов роста рынка, сдерживающих факторов, соотношения ВВП и затрат на здравоохранение. По данным IMS Health Russia and CIS, российский фармацевтический рынок вырос в 2015 г. на 10% за счет увеличения цены на ОНЛС и региональные льготные программы, а в первом квартале 2016 г. рост фармрынка в стоимостном выражении составил 4%. Таким образом, тенденции падения объема продаж практически нивелированы. Долгосрочный прогноз IMS Health Russia and CIS в области развития отечественного рынка лекарственных средств предполагает ежегодный прирост на 7,1% до 2020 г. Согласно аналитическим исследованиям DSM Group средний рост фармацевтического рынка России за последние пять лет находится в районе 11% (в рублевом выражении). В то же время реальный оборот в сегменте розничной торговли в 2015 г. достиг минимума, схожего с ситуацией 45-летней давности! Так, в упаковках рынок упал до уровня 2006–2007 гг. При этом с рынка исчезают жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты из сегмента дешевых.

Рисунок 1. Динамика потребления лекарственных средств в млн упаковок

Подводя итоги, генеральный директор DSM Group **Сергей Шуляк** подчеркнул, что исследование его аналитического агентства демонстрирует отрицательный прирост рынка лекарственных препаратов по итогам первого квартала 2016 г.: –10% в рублях и –14% в упаковках.

В краткосрочной перспективе по итогам года рост фармацевтического рынка России, по словам **Сергея Шуляка**, может составить 5–7% (рисунки 2–3).

Управляющий директор AlphaRM **Анна Ермолаева** представила исследование сегмента аптечных сетей, на долю которых в розничной реализации лекарственных препаратов приходится основной доход. Согласно этому исследованию, в условиях снижения покупательной способности потребителей ожидается их переориентация на более дешевые аналоги или дженерики.

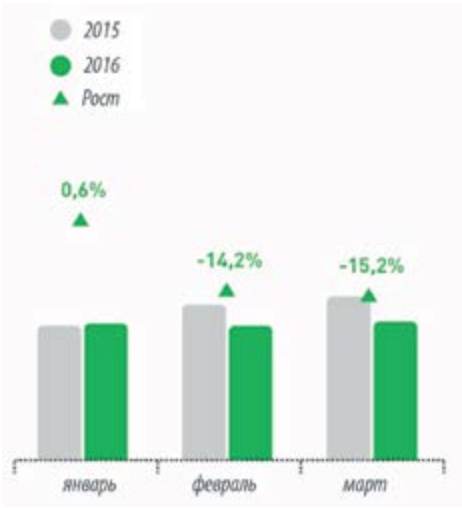


Рисунок 2. Динамика розничного рынка в рублях

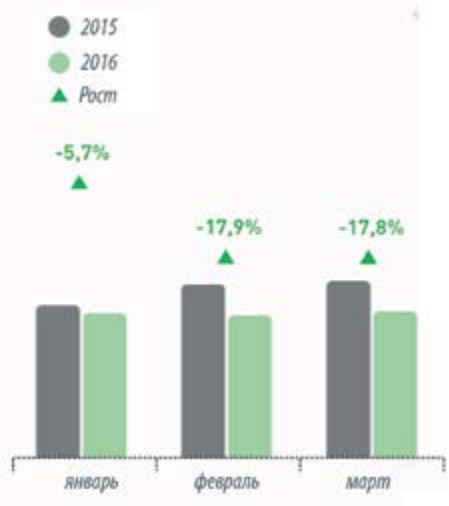


Рисунок 3. Динамика розничного рынка в упаковках

Директор Aston Consulting **Игорь Петрушин** выступил с пессимистичной оценкой потенциала российского фармрынка к росту: отрицательный рост основных экономических показателей не оставляет никаких драйверов роста для рынка.

Несмотря на различные оценки и диаметрально противоположные прогнозы представителей консалтинговых структур относительно будущего российского фармрынка, представители компаний-производителей видят перспективы и тенденции к реализации позитивного сценария. Такой подход обуславливает и некоторое изменение сектора M&A в России, на который оказывает влияние экономический климат, интерес зарубежных инвесторов к покупке успешных брендов, влияние локализации на этот интерес. Среди ключевых факторов успеха для сделок M&A в российском фармацевтическом секторе управляющий парт-

нер BIC Securities **Андрей Задорнов** выделяет ряд последних операций, таких как приобретение портфеля брендов и приобретение производственных мощностей (Aqualor, Makiz Pharm и Stada, Akhrikhin и Polpharma); мотивационные факторы, стимулирующие потенциальных покупателей (налоговое законодательство, локализация производства пользующихся наибольшим спросом на рынке продуктов); вопросы, влияющие на сделки M&A (аудит-счета по МСФО, совместимость стандартов GMP, устаревшие производственные мощности и т.д.), а также степень структурированности сделки.

Второй день международного форума был посвящен ключевым вопросам в области дистрибьюции. В ходе специальной сессии-дискуссии *«Система мониторинга движения лекарственных препаратов от производителя до потребителя»* представители компаний-производителей обменялись опытом работы с импортерами, а представитель СПФО рассказала о специфике данного процесса в области маркировки.

Основные положения ФГИС МДЛП:

N	Название сервиса	Описание сервиса	Получатели сервиса
1.	Формирование идентификаторов производителей	Отправка из ФГИС МДЛП уникальных идентификаторов производителей	Производители ЛП
2.	Установление соответствия данных ИК с ГРЛС	Отправка из ФГИС МДЛП реквизитов регистрационного удостоверения на ЛП по запросу производителя	Производители ЛП
3.	Регистрация ИК	Отправка в ФГИС МДЛП сведений о произведенных ЛП (сообщение о готовности ЛП к гражданскому обороту)	Производители ЛП
4.	Регистрация ГК на ЛП (связывание ИК и ГК)	Отправка в ФГИС МДЛП информации о ГК и перечне ИК, которые были помещены в транспортную упаковку.	- Производители ЛП; - Организации оптовой торговли; - Организации розничной торговли; - Мед.организации
5.	Движение ЛП	Получение и отправка в ФГИС МДЛП соответствующих данных о движении ЛП	- Минздрав России; - Росздравнадзор; - Производители ЛП; - Организации оптовой торговли; - Аптечные орг-ции; - Мед. организации; - Орг-ции, осуществляющие уничтожение ЛП

Исполнительный директор СПФО **Лилия Титова** подробно остановилась на двухмерных штрих-кодах (Q-кодах), которые планируются к использованию в большинстве стран, то есть производители лекарственных средств не будут ограничены в экспорте продукции. В то же время штрих-коды не являются универсальным средством: наиболее эффективно выступают метки RFID, которые позволяют считывать информацию на дальнем расстоянии. Не решен также и ряд проблем, препятствующих оперативному внедрению концепции маркировки:

– не ясны цифровые показатели влияния внедрения маркировки на снижение уровня фальсифицированных лекарственных препаратов;

– не просчитан объем инвестиций со стороны российских и зарубежных производителей, дистрибьюторов, аптек. Так, для оснащения одной производственной линии понадобится 80–250 тыс. евро;

– не проработаны сроки заказа, поставки и монтажа оборудования для нанесения маркировки исходя из возможностей и планов производителей соответствующего оборудования с учетом масштабности проекта;

– не проработана оценка того, как отразится маркировка на стоимости лекарственных препаратов, в том числе недорогих;

– не до конца выяснена целесообразность вовлечения дистрибьюторов в процесс дополнительной маркировки.

Среди дополнительных неучтенных рисков **Лилия Викторовна** выделила расширение границ обращения лекарственных средств в рамках ЕАЭС и возможность введения параллельного импорта. Подводя итоги, спикер подчеркнула, что при выборе системы маркировки следует учитывать совместимость кодов с системами, которые выберет большинство стран, чтобы это не стало дополнительным препятствием для экспорта или импорта продукции.

Анализируя существующие бизнес-процессы на рынке дистрибьюции, участники одноименной сессии отметили, что на сегодняшний день практически отсутствует универсальная бизнес-модель по созданию эффективной дистрибьюции в период высокой волатильности рынка. Так, директор The Thompson Consulting Group LLC **Дуглас Томпсон** считает необходимым придерживаться следующих принципов эффективной дистрибьюции:

1. Иметь мужество говорить «Да».
2. Сосредоточиться на, казалось бы, на первый взгляд незначительных вещах.
3. Технология не превосходит культуру: при прочих равных возможностях бизнес предпочитают вести с хорошо знакомыми людьми.
4. Что может быть лучше, чем конкурентная цена?
5. Умение делегировать полномочия – целое искусство.
6. У вас есть только одно наследие, и это не цена, а человеческий капитал.

Генеральный директор ЦВ «Протек» **Дмитрий Погребинский** формулу эффективности видит следующим образом.

В основе эффективности лежит оптимизация затрат. Эта формула является ключевым принципом работы ЦВ «Протек» с 2006 г. Спикер солидарен с **Дугласом Томпсоном** в том, что «технологии – не главное, главное – люди, которые их используют». Директор по развитию фармацевтического логистического оператора Santens Logistic Group LLC **Дмитрий Ледянкин** ключом к успеху и эффективности дистрибьюции считает консолидацию усилий.

О консолидации говорили и представители аптечных сетей в рамках сессии *«Фармацевтическая розница»*. Так, генеральный директор «Неофарм» **Евгений Нифантьев** обратил внимание коллег на такое понятие, как «злокачественная консолидация»: «Лидерство – это не только высокие обороты. Это то, когда весь рынок должен смотреть на лидера и понимать, что он является примером. Так вот, готовы ли мы к тому, что для нас примером будут являться информационные войны и отказ от исполнения обязательств при покупках других аптечных сетей? У меня такое ощущение, что рынок может не выдержать еще пару таких сетей-консолидаторов. И то, что мы с вами строили 25 лет, может быстро рухнуть, а участники этого рынка окончательно потеряют доверие друг к другу. На нашем рынке появилось такое понятие, как злокачественная консолидация. Консолидация, в принципе, это хороший и правильный процесс. Но при ней должны соблюдаться некие правила. Если они не будут соблюдаться, то будут надуваться мыльные пузыри. Я хотел бы вам напомнить жизненный цикл любого мыльного пузыря: сначала он надувается, потом по нему идут красивые разводы, а потом он лопается. Давайте попробуем представить, что будет с нашим рынком, если из единичного случая это перейдет в систему и превратится в такую недобросовестную консолидацию? Думаю, что может последовать системный кризис в отрасли, а производители будут поддерживать таких консолидаторов и убивать сложившуюся систему дистрибьюции. Сейчас на рынке сложилась такая ситуация: неважно, как ты управляешь своей аптечной сетью. Важно то, сколько у тебя аптек, какая доля у тебя в регионе, и если она высока, то производители могут простить тебе любые долги, которые возникли у тебя перед ними. Один из фармпроизводителей отметил, что он не может не работать с аптечной сетью, у которой 40% рынка. Я думаю, что продукция любого крупного производителя — востребованная, брендированная. Думаю, если люди не нашли лекарства в одной аптеке, они обязательно найдут его в другой. У нас не только такого рода угрозы. За последние полтора года усилилось давление со стороны продуктовых сетей на тему того, чтобы ввести безрецептурные лекарственные препараты в продуктовые сети. Они хотят это сделать, не лицензируя свои точки. А это 40% объема аптечных продаж и более половины маржи аптек, которые могут быть выведены из аптечных сетей. Это тоже может стать серьезным вызовом для рынка и серьезной проблемой».

Директор «Алоэ», входящей в группу компаний «БСС», **Наталья Самарина** представила результаты положительной консолидации усилий магазинов из сегмента FMCG и аптечных сетей, а ее коллеги рассказали о тенденциях ухода конечных потребителей лекарственных средств в сектор интернет-покупок.

Не обошли вниманием участники основных сессий форума и вопрос системы возмещения, в рамках которого обменялись опытом внедрения различных моделей систем возмещения. Консолидировав ключевые моменты докладчиков сессии, исполнительный директор ассоциации фармацевтических компаний «Фармацевтические инновации»/«Инфарма» **Вадим Кукава** предложил в качестве пилотной модель, которая включает:

– лекарственное покрытие, предполагающее всеобщее лекарственное возмещение на условии дифференцированных соплатежей;

– регулирование цен на возмещаемые лекарственные средства, позволяющее осуществить переход от регулирования предельных цен производителей к установлению предельных цен возмещения путем переговоров с производителем для инновационных лекарственных средств и за счет снижения цены после истечения срока патента;

– регулирование торговой наценки за счет установления единой торговой наценки для каждого МНН и ограничения предельного размера торговой наценки;

– ежегодный пересмотр цен возмещения на лекарственные препараты.

Таким образом, предлагаемая модель будет существенно отличаться от действующей сегодня (рисунок 4).

В то же время новая модель системы возмещения приведет к увеличению в 2,5 раза числа пациентов, получающих необходимое лечение без госпитализации, и позволит сократить до 30% число госпитализаций, что обеспечит снижение расходов в госпитальном сегменте на 85 млрд руб. уже в первый год реализации программы.

Рисунок 4. Основные отличия текущей и будущей моделей ЛО

Еще одной темой, связанной с системой лекарственного обеспечения и системой здравоохранения в целом, стал вопрос внедрения пациент-центрированной модели в России, базирующейся на следующих принципах, ориентированных на пациентов.

1. Уважение.
2. Выбор и расширение прав и возможностей.
3. Вовлечение пациентов в разработку политики здравоохранения.
4. Доступность и поддержка.
5. Информация.

«Основой ориентированной на пациента работы системы здравоохранения является то, что она должна быть экономически эффективной для удовлетворения потребностей пациентов с учетом их мнения и предпочтения» [выдержка из International Alliance of Patients' Organizations (IAPO, 2006). «Declaration on Patient-Centred Healthcare». Retrieved 13 December 2011].

Участники сессии «*Patient centricity по-русски: а надо ли считать пациентов?*» едины во мнении, что, помимо растущего значения роли пациента как ключевого участника в процессе лечения, в том числе благодаря способности и желанию платить за лечение, существует ряд других причин, почему стратегия ориентированности на пациента для международных компаний стала приоритетной.

В рамках сессии юристов представители юридических компаний и юридических департаментов фармацевтических компаний обсудили нормативные изменения, касающиеся отрасли, которые были приняты в 2015 г.: GMP, закупки с правилом «третий лишний», усиление административной ответственности, юридические механизмы в области локализации, эксклюзивность данных.

Участники тематической конференции, посвященной фармацевтическому производству в России обменялись опытом развития фармкластеров в регионах, обсудили возможность и перспективы обеспечения независимости России в производстве медицинской продукции, создание конкурентоспособного продукта с экспортным потенциалом и тенденции в развитии контрактного производства.

Представители региональных органов власти не просто рассказали о ходе внедрения на их территории кластерных программ, но и постарались привлечь новых резидентов за счет преимуществ, которые имеют резиденты кластеров, особых экономических зон и индустриальных парков. Так, в Тюменской области уже сегодня функционируют такие предприятия фармацевтической и медицинской промышленности, как ООО «Фармасинтез – Тюмень», ОАО «Тюменский химико-фармацевтический завод», ОАО «Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов», ООО «МИМ», ФГУП «Протезно-ортопедическое предприятие». Среди производственных резидентов Ярославской области – TAKEDA, японская компания «Киорин Фармасьютикал», «Р-Фарм», TEVA, компания AbbVie, «Ярославская фармацевтическая фабрика», «Ростовская фармацевтическая фабрика». Говоря о привлекательности интеграции производственных площадок в успешно функционирующие кластеры, представители региона отмечали высокий кадровый потенциал: и в Тюмени, и в Ярославле действует трехстороннее соглашение между руководством региона, вузами и компаниями, что позволяет готовить необходимые предприятиям высококвалифицированные кадры.

Особый интерес участники тематической конференции проявили к выступлению директора ФБУ «ГИЛС и НП» **Владислава Шестакова**, который рассказал о регулировании и государственной поддержке фармацевтических производителей, привел информацию о данных итогов инспектирования как российских, так и зарубежных площадок, наиболее типичных нарушениях, наблюдаемых инспекторами у обеих сторон.

Участники дискуссионной сессии, посвященной обеспечению независимости России в производстве медицинской продукции, рассмотрели элементы, необходимые для дальнейшего стимулирования отечественного фармацевтического производства, обсудили последствия внедрения механизмов импортозамещения и совершенствования системы ценового регулирования. В частности, генеральный директор производственного комплекса ООО «Форт» **Павел Вандышев** убежден, что механизм государственного регулирования цен на ЖНВЛП в его нынешнем виде требует доработки и тщательного надзора за правоприменительной практикой. В качестве альтер-

нативы спикер предлагает либерализацию и упрощение механизма перерегистрации предельных отпускных цен на препараты списка ЖНВЛП. Данная модель предполагает:

- отмену верхней границы в виде максимальной цены на аналогичный препарат (по торговому названию, МНН, дозировке и т.п.) при перерегистрации цены на препарат в условии документального подтверждения затрат на производство препарата, в частности при росте затрат в результате изменения курса рубля;
- уведомительный порядок повышения предельной отпускной цены на величину коэффициента инфляции. Соответствующий коэффициент должен рассчитываться и устанавливаться Минздравом России на базе показателей инфляции, заложенных в федеральном бюджете;
- переработку методики расчета предельных отпускных цен на препараты списка ЖНВЛП с целью учета затрат, понесенных в процессе разработки препарата, действующего на конкретную мишень, вместо учета затрат в отношении одного химического вещества;
- необходимость применения методик расчета максимальной цены государственного контракта в зависимости от конъюнктуры рынка;
- необходимость внедрения иных, рыночных, механизмов сдерживания затрат на лекарственные средства взамен прямого государственного регулирования.

Руководитель группы по оказанию юридических услуг компаниям фармацевтической отрасли PwC Legal **Андрей Одабашян** также уделил внимание вопросу цен на лекарственные средства в контексте локализации фармпроизводств. Подробное изложение позиции PwC Legal представлено на страницах журнала *«Разработка и регистрация лекарственных средств»* № 1(14) 2016.

Вторая часть тематической конференции *«Фармацевтическое производство в России: поддержка, перспективы, партнерства»* была посвящена обмену опытом топ-менеджмента крупнейших фармацевтических компаний в области диверсификации и расширения существующих видов деятельности за счет развития контрактного производства.

Завершилась конференция интерактивным обсуждением представителей консалтинговых агентств, отраслевых СМИ и фармацевтических компаний вопросов в сфере поиска новых механизмов развития собственных брендов и конкурентоспособного продукта с экспортным потенциалом.

Параллельно с конференцией для фармацевтических производителей на площадке форума проходила еще одна тематическая конференция *«Маркетинговые стратегии и цифровые коммуникации: лучшие практики»*. Руководители маркетинговых подразделений фармацевтических компаний обсудили усиление роли цифровых технологий и возможности коммерциализации Digital. Особый интерес вызвала дискуссия на тему *«Чего не хватает стратегическому маркетингу сегодня?»* Для ответа на вынесенный на обсуждение вопрос участники постарались определить, насколько эффективного работает сейчас классический (традиционный, привычный) маркетинг, что является объектом приложения стратегического маркетинга в кризисный период, нужна ли его перезагрузка и где искать драйверы роста: снаружи или извне. В поисках ответа на поставленные вопросы управляющий директор Ipson Healthcare **Олег Фельдман** представил краткую историю развития рынка маркетинговых услуг в фармацевтической отрасли. По словам спикера, период 1991–2000 гг. можно описать как время, когда отсутствовала конкуренция: использовались привычные каналы коммуникаций, старые портфели с постоянным добавлением новых продуктов. 2000–2005 гг. ознаменовались развитием инструмента SF, нелимитированными форматами и объемами коммуникаций с целевыми аудиториями. Это время описывается как период, когда все четко знали «Who is who?» и работали в своих сегментах. В 2005–2009 гг. ОНЛС становится формальным стимулом развития рынка, в этот период происходит стремительный рост размеров SFs с параллельными усилиями контроля SFE. Начиная с 2009 г. государство становится важным игроком, диктующим правила, что ведет к существенному регулированию отрасли, истощению привычных каналов коммуникаций при иллюзии эффективности прямого переноса foreign marketing, возникает избыточная конкуренция. В этих условиях перед маркетологами остро стоит необходимость разрабатывать свои подходы, оптимизированные для текущей стадии развития рынка, имея в виду прежде всего кризис и неминуемую реструктуризацию рынка. Как показали последующие сессии, соблазн просто перенести апробированные на зарубежных рынках механизмы типа МКМ (мультиканальный маркетинг) и многоканального маркетинга, Digital и иные возможности web media не приносит ожидаемых результатов – маркетологи должны учитывать потребности целевой аудитории и внешние факторы, оказывающие серьезное влияние на ее предпочтение.

В заключение все участники отметили, что ежегодный фармацевтический форум, организуемый институтом Адама Смита на берегах Невы, – крупнейшее международное мероприятие для всех участников рынка, которые имеют возможность обсудить идеи, обменяться лучшими практиками и поделиться своим мнением о будущем фармацевтической индустрии России с известными международными экспертами и представителями профильных органов власти. Именно поэтому на протяжении многих лет научно-производственный рецензируемый журнал *«Разработка и регистрация лекарственных средств»* оказывает информационную поддержку форуму и приводит выдержки из наиболее актуальных и интересных нашим читателям докладов.

VI МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ФИЗТЕХБИО»

24–28 мая 2016 года на площадке биофармкластера «Северный» прошло ежегодное и самое большое для Московской области мероприятие в области life sciences. Выставка-конференция «ФизтехБио» – площадка для дискуссий, взаимодействия представителей науки и индустрии, кооперации российской университетской фундаментальной и прикладной науки с отечественными и зарубежными партнерами. Здесь представители научного сообщества делятся новейшими достижениями в области «живых систем», топ-менеджеры и руководители профильных министерств и ведомств обсуждают проблемы и перспективы развития отечественной промышленности в данном направлении, возможности внедрения российских исследований и технологий в систему здравоохранения. Ежегодно в фокусе конференции оказываются темы, сформулированные самой индустрией и мировыми трендами.

Ежегодная майская выставка-конференция «ФизтехБио» в шестой раз собрала на территории биофармкластера «Северный» выдающихся ученых и экспертов в области life sciences со всего мира, топ-менеджеров фармацевтических и медицинских, биотехнологических компаний, представителей профильных министерств, правительства Москвы и Московской области, других регионов, а также территориальных кластеров. В последние годы участники конференции основное внимание уделяют возможностям для междисциплинарных исследований, проектам на стыке математики и биологии, физики и химии, робототехники и медицины, механизмам ускоренного внедрения разработок в промышленность. Ключевой темой 2016 года стали передовые онкологические исследования. Так, основу научной программы конференции составили сессии 21-го Международного симпозиума им. Чарльза Хайдельбергера, в рамках которого врачи и исследователи из России, США, Великобритании, Норвегии, Германии и Израиля представили результаты последних исследований в области диагностики и профилактики онкологических заболеваний, молекулярных механизмов канцерогенеза, нейроонкологии, биологических аспектов рака, вирусной и раковой химиотерапии.

Чарльз Хайдельбергер – бывший президент Американской ассоциации по изучению рака, член Национальной академии наук США, выдающийся ученый в области химиотерапии рака и канцерогенеза. Значительную часть своего состояния Чарльз Хайдельбергер завещал на развитие науки, благодаря чему онкологические симпозиумы с участием выдающихся мировых ученых ежегодно проводятся в разных странах мира.

Высокую роль выставки-конференции «ФизтехБио», проведение которой запланировано на весенний семестр каждого года, отметил заместитель министра образования и науки Российской Федерации **Александр Повалко**: «Важно, что у нас существуют и развиваются проекты, нацеленные на здоровье и долголетие человека, и нам крайне важно продолжать работу в этом направлении. Это вопросы и фармакологии, и разработки медицинской техники, и трансляционной медицины, фундаментальных исследований». Приветствие участникам выставки-конференции направил и руководитель Росздравнадзора **Михаил Мурашко**, в котором отметил особую роль биологического и медицинского направления в МФТИ.

Научная программа конференции, помимо параллельных научных сессий по различным направлениям в сфере life sciences, предусматривает проведение круглых столов по вопросам государственного регулирования фармацевтической и медицинской промышленности. В частности, Министерство образования и науки Российской Федерации организовало один из круглых столов конференции, в рамках которого провело заседание рабочей группы «Фарма-2020». Специалисты группы представили данные о реализации мероприятий федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» в области проведения доклинических исследований инновационных лекарственных средств и разработки новых образовательных программ, образовательных модулей для профильных высших и средних специальных учебных заведений. Еще один круглый стол был посвящен теме *«Инновационные кластеры Московской области»*. Здесь представители территориальных кластеров – особых экономических зон Пущино, «Дубна», «ФИЗТЕХ-XXI» – и правительства Московской области отчитались о текущем состоянии проектов участников кластеров и обсудили перспективы сотрудничества в сфере проведения совместных образовательных мероприятий, подготовки кадров в области доклинических и клинических исследований, организации производства лекарственных средств по стандартам GMP, GLP и GCP.

Завершилась конференция питч-сессией стартапов, где молодые ученые из Москвы, Санкт-Петербурга, Ульяновска, Чебоксар, Волгограда, Тюмени и Владимирской области представили междисциплинарные проекты в области «живых систем»: фармацевтики, медицинской техники, агробиотехнологий и нейротехнологий. Экспертное жюри присудило победу представителям МГУ (проект «Инновационный препарат для таргетной терапии колоректального рака»), МФТИ («Разработка и организация серийного производства отечественного «Терапевтического аппарата оксигенации») и НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой («Иммунотерапия нового поколения в онкологии»). Как отметили эксперты, при оценке проектов ключевыми показателями были конкурентные преимущества, степень проработки бизнес-модели, команда проекта, возможность его реализации и технологическая инновационность.

Конференция «ФизтехБио» – площадка, на которой подводят итоги научного года, встречаются мировые специалисты-биотехнологи, фармацевты и медики. По словам организаторов, это место для диалога науки и индустрии: на площадке МФТИ проходит не только конференция, но и выставка, на которой фармацевтические, биотехнологические компании и компании, специализирующиеся на медицинском приборостроении, представляют обширную экспозицию своих достижений. Крупнейшие отраслевые СМИ также не обходят стороной международную выставку-конференцию. В частности, третий год подряд научно-производственный рецензируемый журнал *«Разработка и регистрация лекарственных средств»* не просто оказывает информационную поддержку мероприятия, но и предоставляет специалистам из других регионов России возможность познакомиться на выставочной экспозиции журнала с актуальными и востребованными профессиональным сообществом научными новинками.

Александр Повалко

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ, РОССИЯ И ЕАЭС

1–3 июня 2016 года компания Fleming провела в Москве ежегодную конференцию для представителей ведущих фармацевтических компаний России и стран ЕАЭС, посвященную актуальным вопросам в сфере обеспечения качества. Представители топ-менеджмента ведущих фармкомпаний выразили свои взгляды на важность вопросов качества для развития бизнеса, поделились практическим опытом решения насущных задач, стоящих перед отраслью. Специально приглашенные спикеры из европейских компаний и ассоциаций рассказали об успешных подходах к построению системы качества, валидации процессов и управлению обучением персонала. Заключительный день конференции проходил в формате тематического семинара и был посвящен современной практике внедрения принципов GxP в сфере производства и дистрибьюции лекарственных препаратов.

Тема трехдневной конференции Fleming, по словам организаторов, была сформулирована именно таким образом не случайно: «Тема обеспечения качества в фармацевтическом производстве интересна, но также и трудна из-за скорости развития отрасли и числа нововведений… Критично важно быть в курсе последних регуляторных и организационных новшеств в области качества». В этой связи первая дискуссионная панель конференции была посвящена роли процесса обеспечения качества в развитии бизнеса.

Сегодня производитель фармацевтической продукции не может вывести продукт ни на один рынок стран-членов Европейского союза, не предоставив подтверждение, что этот продукт произведен по стандарту GMP. Поэтому на предприятии/производстве, выпускающем ориентированную на экспорт продукцию, должна быть распространена культура качества, а GMP-репутация самой компании не вызывать сомнений. Немаловажным аспектом в этом вопросе является участие представителей национального инспектората в инспектировании зарубежных площадок и допуск иностранных инспекторов на производственные объекты этого государства. О том, как данное правило выполняется в России, рассказали руководители СПФО и АРФП. Представители «Берлин-Фарма» и «Ново Нордиск» поделились опытом внедрения единых стандартов на всех производственных площадках компаний (GMP и системы качества) вне зависимости от страны локализации.

Менеджер по качеству и регулированию бизнеса «Джонсон & Джонсон» **Михаил Хазарчук** сделал вступительную презентацию по вопросам обеспечения требований GMP в рамках ЕАЭС. Свой доклад спикер начал с экскурса в историю создания и внедрения правил GMP. По словам **Михаила Хазарчука**, вопрос становления Good Manufacturing Practice стоит начинать

не с момента первой редакции правил, а значительно раньше: с публикации в 1905 г. книги А. Синклера «Джунгли», после которой в 1906 г. был принят Federal Food & Drug Act, вводящий в оборот понятие «фальсифицированный продукт» (adulterated). В России (в то время в СССР) о необходимости внедрения правил GMP ВОЗ заговорили в 1970 г. (статья в «Химико-фармацевтическом журнале» № 11). В 1974 г. было создано упрощенное руководство по GMP – РТМ 64-7-81-74. В дальнейшем до 2004 г. никаких изменений по вопросу внедрения на фармацевтическом производстве стандартов надлежащей практики не происходило, именно в 2004 г. опубликован ГОСТ Р 52249–2004. Утверждение правил организации производства и контроля качества лекарственных средств, как мы знаем, состоялось только в 2013 г. В их основу были положены документы GMP ЕС. Несмотря на то, что Россия присоединилась к международному контролю соблюдения правил GMP относительно недавно, международный опыт организации такого контроля представляется крайне интересным для имплементации на рынок ЕАЭС. Первый шаг к взаимному признанию результатов инспектирования по GMP был заложен резолюцией ассамблеи ВОЗ № 22/50 в 1969 г., которая не просто рекомендовала принять и внедрить на территории свыше 100 стран утвержденные правила, но и участвовать в Системе (схеме) сертификации лекарственных средств в международной торговле. На сегодняшний день параллельно существуют две организации по фармацевтическим инспекциям. Их принципиальные отличия **Михаил Хазарчук** постарался представить в виде схемы (рисунок 1).

При этом общие требования к системе качества фармацевтических инспекторатов государств-членов Европейского экономического союза (PIC/S PI 002-3 «Recommendation on Quality System Requirements for Pharmaceutical Inspectorates») закрепляют единую программу фармацевтической инспекции, форму бланка сертификата соответствия, контрольный лист, форму инспекционного отчета и порядок обеспечения проведения совместных фармацевтических инспекций. В то же время руководство по качеству инспектората определяется национальным регулированием, а статус инспектора и квалификационные требования определяются национальным законодательством государств-членов.

Рисунок 2. Проведение GMP-инспекций

Говоря о евразийской модели GMP-инспекций, спикер напомнил, что государства евразийского пространства придерживаются правил регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения (Приказ № 170), которые закрепляют следующие положения:

- Производство лекарственных средств должно соответствовать требованиям надлежащей производственной практики Союза.

Рисунок 1. Отличие организаций по фармацевтическим инспекциям

- Соответствие требованиям надлежащей производственной практики Союза предполагает и соответствие производственной площадки (производственных площадок), осуществляющей производство готовой лекарственной формы и выпускающий контроль качества лекарственного препарата.

Российская система организации подтверждения соответствия правилам надлежащей производственной практики иностранной площадки осуществляется посредством инспектирования производственных площадок инспекторами ФБУ «ГИЛС и НП»

В условиях подготовки российской фармпромышленности к переходу на единый рынок ЕАЭС перед отечественной системой инспектирования возникает вопрос о необходимости решения таких задач, как гармонизация принципов работы инспектората с требованиями ЕАЭС, принятие риск-ориентированного подхода при планировании инспекций, членство в ведущих международных организациях (ICH, PIC/S), взаимное признание результатов инспекций и открытость результатов инспектирования.

Вопросы обеспечения качества в рамках ЕАЭС участники конференции продолжили обсуждать в рамках панельной дискуссии, посвященной тенденциям в этом направлении: векторы развития регулирования обеспечения качества лекарственных средств в рамках правил GxP, гармонизация евразийского и национального законодательств в отношении регулирования качества до 2026 г., организация взаимодействия субъектов обращения лекарственных средств и контрольно-надзорных органов по вопросам контроля качества фармацевтической продукции.

Далее по программе конференции независимый эксперт в области регуляторных отношений Российской Федерации, СНГ, ЕАЭС **Анна Солтицкая** и заместитель генерального директора, директор по регистрации «Материа Медика Холдинга» **Елена Ганкина** провели сопрезентацию, посвященную регистрационному досье на лекарственный препарат. Подробно с докладом **А. Салтицкой** о правилах регистрации лекарственных средств в рамках единого рынка ЕАЭС, требованиях к документам по качеству и производственным документам в CTD и приведении досье на лекарственные препараты, зарегистрированные до 31 декабря 2015 г., в соответствие с правилами ЕАЭС до 2025 г. вы можете ознакомиться на страницах научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» № 3(12). **Елена Ганкина** в своем докладе сосредоточилась на вопросах, связанных с валидацией и адаптацией документов по производству и качеству к формату CTD: взаимодействие производства, отдела качества и отдела подготовки документации для регистрации. При подготовке модуля 3 регистрационного досье необходимо учитывать некоторые аспекты.

- Документы по технологии, валидации и контролю качества надо специально адаптировать для целей создания регистрационного досье.
- Важно обеспечить достаточную, но не чрезмерную детализацию в регистрационном досье.
- При внесении изменений в модуль 3 адекватно заявлять характер вносимых изменений.
- Регистрационное досье обязательно должно согласовываться внутри предприятия сотрудниками отделов регистрации, качества, технологического и других.

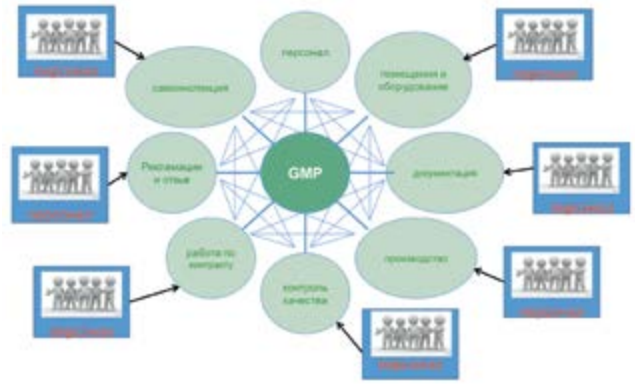
Подводя итоги, спикер отметила, что завод и отдел регистрации одинаково заинтересованы в тесном сотрудничестве на всех этапах подготовки модуля 3, а

Рисунок 3. Инспектирование одной иностранной площадки

также при обсуждении необходимости любых изменений, ведь согласованность и продуманность действий – залог успешной регистрации продукта, с одной стороны, и успешной инспекции – с другой.

Директор направления «Производство и качество» компании Itelligence **Владимир Таболин** представил участникам конференции лучшие практики автоматизации бизнес-процессов фармацевтического предприятия в соответствии со стандартом GMP, уделив особое внимание преимуществам реализации электронного досье на серию. Так, автоматизация процессов позволяет оперативно получить/предоставить/проверить информацию о партиях СиМ (наличие, статус), производимых продуктах, оперативные сведения о продажах и рентабельности продукта по всем каналам сбыта, а также осуществить полную прослеживаемость движения партий продукта (ГП, ПП) и СиМ, интегрированное планирование и провести оптимизацию производственных затрат и логистики.

Представители департаментов по качеству «Нанолек» и «Берлин-Фарма» привели примеры из практики разработки и внедрения на своих предприятиях стратегии обеспечения качества через построение культуры GMP.



Директор департамента управления качеством «Нанолек» Светлана Шабалова убеждена, что важным аспектом в формировании GMP на предприятии выступают понимание, стратегия, подход и поддержка со стороны высшего руководства: «...Понимание того, что от наличия и правильно функционирующей системы качества на предприятии зависит качество выпускаемой продукции, а также репутация и финансовое состояние компании. Стратегия в формировании целей по качеству, планов по качеству. Подход к поэтапному выстраиванию / улучшению системы качества (процессов / элементов СМК). Поддержка департамента качества, ответственного за создание и внедрение внутренних законов GMP на предприятии».

Основываясь на практическом опыте внедрения стратегии обеспечения качества через культуру GMP, спикер выделила следующие сложности, с которыми может столкнуться директор по качеству.

1. Отсутствие роли руководства в построении СМК (отсутствие понимания, стратегии, подхода и поддержки).
2. Недооценка подготовки к построению культуры GMP (отсутствие планирования действий/задач/целей, отсутствие четкого разграничения обязанностей).
3. Формальный подход к разработке доклинических исследований.
4. Формальный подход к системе обучения.
5. Формальный подход к системе самоинспекций.
6. Отсутствие заинтересованности персонала / вовлеченности в процессы СМК, а следовательно, отсутствие мотивации.

Руководитель отдела обеспечения качества «Байер» Ольга Анохина считает, что «GMP – это культура качества, философия и идеология фармацевтического производства. Понять, принять и внедрить все элементы GMP является необходимым условием обеспечения безопасности, идентичности и эффективности производимых лекарственных средств». В этой связи внедрение GMP на российских предприятиях становится ключевым преимуществом для иностранных

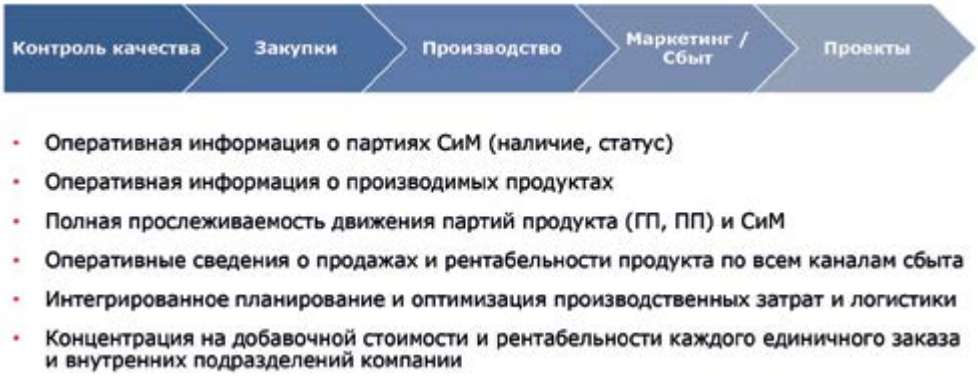


Рисунок 4. **Автоматизация процессов производства и качества в соответствии с требованиями стандарта GMP**

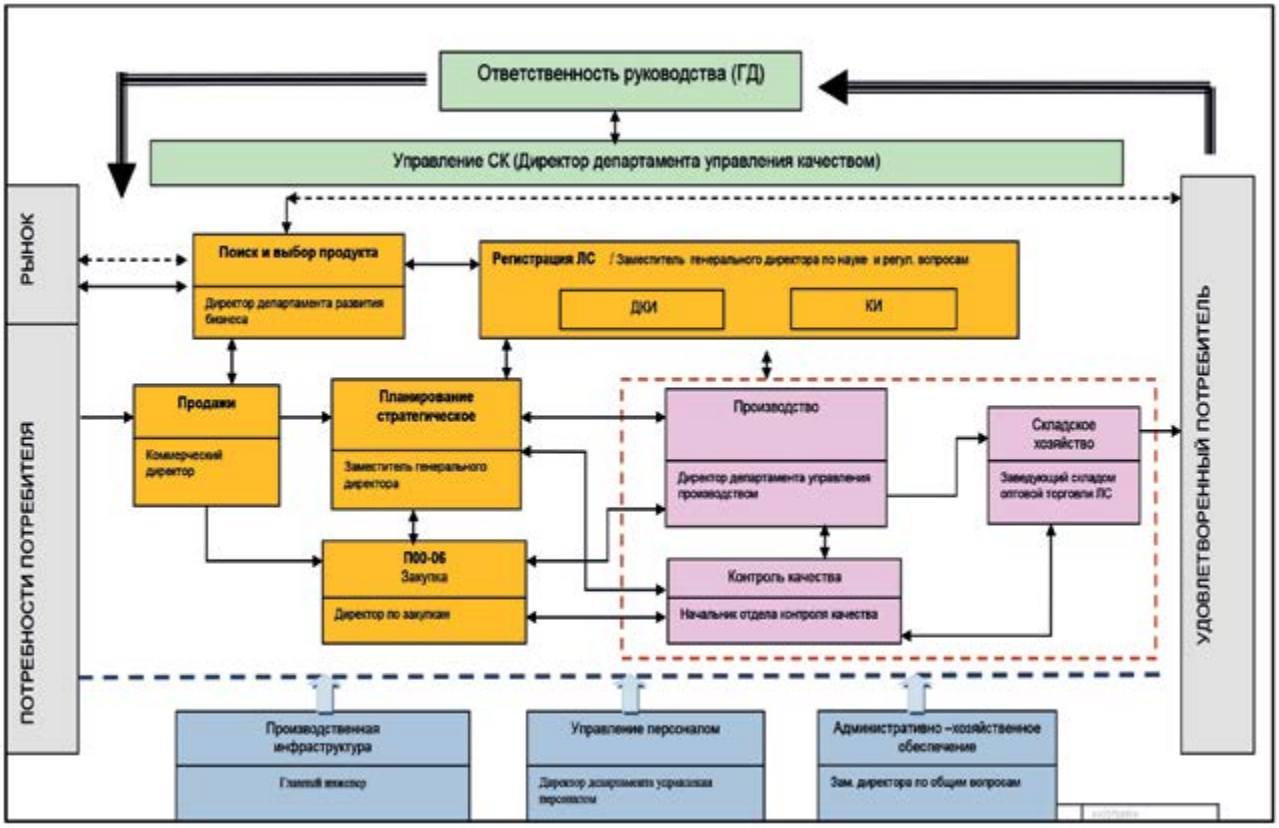


Рисунок 5. Культура GMP. Процессная модель системы управления ООО «Нанолек»

компаний при локализации производства. Делясь опытом внедрения GMP на предприятиях «Байер», спикер подробно рассказала о каждом из шагов, которые они проходили.

- Принятие философии GMP на уровне топ-менеджмента компании.
- Проведение обучения персонала и обеспечение выполнения процедур.
- Установление персональной ответственности.
- Четкая и понятная система документирования (обеспечить data integrity – целостность данных).
- Квалификация производственных помещений и валидация процессов.
- Управление отклонениями и изменениями.
- Разработка и внедрение процедуры.

Говоря о системе документирования, **Ольга Анохина** отметила преимущества внедренного в «Байер» принципа ALCOA.

- **Attributable:** известно, кто создал и/или заполнил документ (подпись, дата).
- **Legible and permanent:** понятные, четкие и неизменяемые (контролируемые стандартные формы).
- **Contemporaneous:** своевременные записи, сделанные в момент проведения операции, временные записки и переписывание недопустимы.
- **Original:** оригинальные, контроль использования копий.
- **Accurate:** данные точные и полные, недопустимо уничтожение исходных документов.

Практические вопросы обеспечения качества фармацевтических препаратов продолжили рассматривать в рамках серии докладов, посвященных вопросам локализации. Так, вице-президент по производственной деятельности и качеству «Петровакс Фарм» **Павел Носырев** рассказал о практических аспектах организации контрактного производства, выделив среди плюсов стабильный доход предприятия, равномерную загруженность производства и внедрение современных технологий, методов контроля. В то же время такое производство имеет и некоторые недостатки: низкая доходность по сравнению с возможной на собственных продуктах, необходимость четко планировать производство и жестко соблюдать графики, отсутствие гибкости, а высокий уровень требований контрактодателя заставляет прилагать много усилий, чтобы соответствовать.

При локалилизации немаловажную роль играет соглашение о качестве, о котором говорила руководитель службы качества компании «Тева» **Гаянэ Богданова**. Соглашение о качестве определяет роль и ответственность каждой из сторон в том, чтобы придерживаться GMP-стандартов производства и поставки, а значит, должно включать все аспекты проекта, которые влияют на подлинность, качество, безопасность, эффективность и чистоту продукта:

- Ответственность / Responsibilities.
- Qualified Person.
- Контроль за изменениями / Change Management.
- Валидация / Validation.
- CAPA
- Документация / Documentation.
- Отклонения / Deviations.
- Аналитика / Analytical Activities.
- Переработка серий / Batch reprocessing.
- Хранение, дистрибуция, транспортировка / Storage and distribution including transportation.
- Несоответствие спецификации / Out of specifications.
- Обзор качества продукта / Product Quality Review.
- Контроль процесса производства / In process controls.
- Программа изучения стабильности / Stability program.
- Квалификация вендоров / Vendor Qualification.
- Внутренние аудиты / Self-Inspection.
- Управление рисками / Risk Management.
- Управление поставщиками / Supplier Management.
- Аналитический и технологический трансфер / Analytical and Technology Transfer.
- Аудиты и инспекции / Audits and Inspections.

Все эти аспекты позволяют не просто подготовить надежное соглашение о качестве, но и организовать эффективное взаимодействие с GxP-партнерами.

Второй день конференции ***«Обеспечение качества в фармацевтическом производстве»*** был посвящен вопросам управления рисками, оптимизации и эффективности, а также системе обучения персонала.

Директор компании Asociation Forumm Auditorias (AFA) **Эдуард Кайон** представил современный европейский подход к валидации процесса с точки зрения влияния концепций ICH Q8 и Q11 на процесс валидации. Понимая валидацию как процесс демонстрации и документального подтверждения и то, что данная процедура работает эффективно, мы подразумеваем, что в результате создания документальных свидетельств, которые предоставляют гарантии высокого уровня, некий процесс будет постоянно производить продукт, учитывая все его предопределенные особенности и качественные характеристики. Более того, сюда включается способность производить постоянный продукт по спецификациям (используя один и тот же производственный процесс), а также производство трех серий, соответствующих требованиям качества. Как отметил спикер, в течение многих лет валидация процесса была частью бюрократических процедур, не обеспечивая каких-либо дополнительных преимуществ. Данный подход базировался на производстве в промышленных масштабах. С внедрением ICH Q8, Q9, Q10 валидация процесса стала включать в себя следующие элементы: качество через разработку, управление рисками и ФСК (фармацевтическую систему качества). В результате сегодня валидация процесса – это сбор и оценка данных от стадии разработки процесса до коммерческого производства, которые обеспечивают научное подтверждение того, что процесс осуществляет постоянное получение качественных продуктов. В трактовке EMA – документальное подтверждение того, что процесс, происходящий в заданных параметрах, может обеспечивать эффективное и воспроизводимое производство медицинских продуктов, отвечающих предопределенным требованиям и качественным характеристикам. Таким образом, как резюмировал **Эдуард Кайон**, валидация процесса в современном понимании фармпроизводителя – это что-то большее, чем просто три хороших серии; деятельность жизненного цикла продукта и текущая деятельность; путь от разработки технологий до промышленного производства; параметры и диапазоны процесса, основанные на опыте, а также развитие процесса; квалификация оборудования как можно больше соответствует реальному рутинному использованию.

Говоря об организации валидации технологического процесса в компании, эксперт в вопросах качества и GMP-стандартов (из Украины) **Елена Зимина** дала такое определение валидации процесса: «Документальное подтверждение способности процесса, функционирующего в пределах заданных параметров, обеспечивать эффективное и воспроизводимое производство лекарственного средства, соответствующего утвержденным спецификациям». То есть ее область применения охватывает все новые процессы (первичная валидация), процессы после внесения изменений (валидация по процедуре «Контроль изменений»), поддержание валидированного состояния в течение всего жизненного цикла препарата (текущая верификация процесса), процессы при передаче технологии с одного производственного участка на другой. Рас-

смотрев первичные виды валидации (перспективная, сопутствующая и ретроспективная), спикер сформулировала общие требования к валидации:

- надежный процесс разработки препарата;
- планирование валидационной деятельности на основании информации о процессе, полученной в ходе исследований по разработке;
- соответствие размера валидируемых серий промышленному размеру серий;
- производство валидируемых серий осуществляется в условиях запланированного «наихудшего случая»;
- перед началом производства валидационных серий проводят квалификацию инженерных систем и оборудования, валидацию методов анализа, квалификацию/утверждение поставщиков исходного сырья и материалов, обучение персонала, проводящего валидацию и утверждение документации.

Елена Зимина напомнила, что протокол валидации должен включать:

1. Краткое описание процесса и ссылки на утвержденную инструкцию по производству.
2. Функции и ответственность персонала.
3. Перечень критических показателей качества продукции (CQA/КПК).
4. Перечень критических параметров процесса (CPP/КПП) и соответствующие допустимые пределы.
5. Краткое описание других (некритических) показателей и параметров, подлежащих исследованию или мониторингу в ходе валидации (с указанием причин их включения).
6. Перечень используемых помещений и оборудования с указанием сведений об их калибровке (включая измерительное, контрольное, регистрирующее оборудование).
7. Перечень аналитических методик и статус их валидации.
8. Предлагаемые точки контроля в процессе производства и критерии приемлемости (включая причины выбора каждого этапа контроля).
9. При необходимости дополнительные испытания вместе с критериями приемлемости.
10. План отбора проб и его обоснование.
11. Методы регистрации и оценки результатов.
12. Процесс выпуска и сертификации серий.

На основе полученных данных готовится отчет о валидации, содержащий данные анализа качества серий препарата, протоколов производства серий и выводы относительно воспроизводимости процесса и качества препарата, а также рекомендации относительно необходимости оптимизации параметров процесса, объема последующего мониторинга и контроля процесса, промежуточной, нерасфасованной и готовой продукции, необходимости внесения соответствующих изменений в инструкцию по производству и спецификации, уменьшения объема физико-химического контроля промежуточной и готовой продукции (при отсутствии отклонений в производстве), переноса результатов контроля нерасфасованной продукции в сертификат анализа готовой продукции, объема последующего контроля микробиологической чистоты готовой продукции и окружающей среды производства, последующей ревалидации технологического процесса и действий в случае внесения изменений в технологический процесс.

Говоря о новых подходах к валидации технологического процесса, **Елена Зимина** представила основные таргеты непрерывной верификации процесса. Данное направление предусматривает применение для разработки препаратов системного подхода, основанного на:

а) определении КПК препарата;

б) установлении влияния и взаимосвязи показателей качества исходного сырья/материалов и параметров процесса с КПК препарата с помощью «планирования эксперимента» (использование большого количества переменных в одном эксперименте);

в) определении КПК исходного сырья/материалов и КПП (которые оказывают влияние на КПК препарата);

г) определении и понимании всех источников вариабельности (это позволяет переносить контроль на предыдущие этапы и осуществлять выпуск ГЛС в реальном времени, а также компенсировать вариабельность сырья путем адаптации параметров процесса);

д) установлении диапазонов КПК исходного сырья и материалов и КПП (в рамках которых качество ГЛС гарантировано);

ж) использование инструментов процессно-аналитической технологии (PAT) (с соответствующим контролем с прямой и обратной связью);

з) использование научного подхода (включение в разработку имеющихся научных данных, знаний, полученных в процессе разработки и производственного опыта, управления рисками, управления знаниями на протяжении жизненного цикла препарата);

и) определение и обоснование стратегии контроля.

Таким образом, новый подход выступает альтернативой традиционной валидации процесса и предполагает непрерывный мониторинг и оценку

эффективности производственного процесса, осуществление валидации процесса в течение жизненного цикла препарата. Он обеспечивает качество препарата за счет стратегии контроля и ее регулярной оценки. Регулировка технологического процесса проводится в рамках «пространства проектных параметров», а в качестве методов контроля применяются PAT и статистический анализ (содействующие постоянной верификации процесса). При этом возможно проведение контроля inline, online или atline и осуществление мониторинга эффективности процессов и качества препаратов в каждой серии. При необходимости возможно смещение контроля качества на предыдущие этапы (с возможностью испытаний ГЛС при выпуске в реальном времени). За счет выполнения предупреждающих действий и постоянного усовершенствования процесса и препарата возможно управлять и жизненным циклом. Среди преимуществ системного подхода к разработке и валидации процесса можно выделить стабильность качества препарата, которая обусловлена взаимодействием объективной вариабельности исходного сырья и соответствующей вариабельностью значений рабочих параметров процесса в рамках пространства проектных параметров:

- исходное сырье × параметры = препарат,
- вариабельность × вариабельность = **константа**.

Еще одним новым подходом к валидации технологического процесса является гибридный подход. Он предусматривает использование либо традиционного подхода к валидации процессов, либо постоянной верификации процессов для различных этапов процесса производства. Как правило, данный подход применяется к полностью изученным препаратам и процессам при наличии опыта производства препарата и данных за длительный период времени либо после внесения изменений или в рамках текущей верификации процесса (даже если первичная валидация была проведена посредством традиционного подхода). При таком подходе определение количества серий для валидации зависит от степени использования постоянной верификации процессов. Из недостатков гибридного подхода **Елена Зимина** отметила применение только традиционного подхода к валидации процесса для критических стадий нестандартных процессов (если изначально к ним не был применен подход постоянной верификации процессов).

В ходе поиска путей оптимизации и эффективности производства участники конференции познакомились с методологией всеобщего производительного обслуживания оборудования (TPM), которую представил LEAN-менеджер «Санофи Авентис Восток» **Евгений Чистяков**.

О европейской практике в области стоимости качества рассказала директор по процессам и качеству продукции «Белупо, лекарства и косметика» из Хорватии **Ленка Францискович.** Спикер убеждена, что главная цель измерения стоимости качества – совершенствование процессов, которые позволят сократить расходы. В этой связи затраты на качество, которые в среднем составляют 10–30% от продаж или 25–40% от оперативных расходов, следует рассматривать с разных сторон.

Рисунок 6. Место TPM в создании предприятия мирового уровня

- Затраты на качество в целом, включающие в себя все мероприятия, направленные на достижение высокого качества.
- Затраты, вызванные низким качеством, которые покрывают его выявление и коррекцию.
- Затраты на содержание отдела управления качеством.

Тема оптимизации затрат была продолжена в ходе доклада заместителя генерального директора по качеству компании «Генериум» **Вячеслава Крауклиса**, который рассказал о правилах выбора и квалификации альтернативного поставщика сырья. Глобальный директор по продажам Werum IT Solutions **Ларс Хорнунг** представил участникам конференции возможности его компании в области организации электронного учета партий на фармацевтическом производстве.

Завершилась конференция ***«Обеспечение качества в фармацевтическом производстве»*** всегда актуальной для фармацевтических компаний темой – организация эффективной системы обучения.

В целом ежегодная конференция Fleming для фармацевтического сообщества, по словам гостей и участников, – это серьезная партнерская площадка, на которой собираются эксперты и специалисты рынка, представители регуляторных органов для обмена ноу-хау и определения вектора развития регулирования обеспечения качества крайне востребованных среди населения продуктов.

WORLD TRADE CENTER MOSCOW

2–3 ноября 2016 г.
Москва,
Конгресс-центр ЦМТ

ФАРММЕДОБРАЩЕНИЕ 2016

XVIII ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ В СФЕРЕ ОБРАЩЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

ФармМедОбращение 2016

Включено в План научно-практических мероприятий Министерства здравоохранения Российской Федерации на 2016 год (Приказ № 275 от 28 апреля 2016г.)

В ПРОГРАММЕ КОНФЕРЕНЦИИ

Пленарное заседание

Секционные заседания

- Контроль качества лекарственных средств в Российской Федерации и на пространстве ЕАЭС. Современные вызовы и актуальные решения
- Фармаконадзор и государственный контроль проведения клинических исследований в Российской Федерации и ЕАЭС
- Экспертиза и регистрация лекарственных средств. Регистрация лекарственных средств в ЕАЭС
- Современные требования действующего законодательства к контролю и обращению наркотических средств и психотропных веществ и их прекурсоров, культивированию наркосодержащих растений на территории Российской Федерации. Структура паллиативной помощи и порядок ее организации в Российской Федерации
- Актуальные вопросы контроля и надзора в сфере обращения лекарственных средств
- Обеспечение лекарственными препаратами для медицинского применения. Планирование. Эффективные закупки. Управление товарными запасами. Формулярная система
- Стандарты GMP как ключевой элемент обеспечения качества производства лекарственных средств
- Программное обеспечение для медицинской и фармацевтической деятельности
- Регистрация медицинских изделий в свете нового законодательства в Российской Федерации и ЕАЭС
- Контроль за обращением медицинских изделий
- Имплантируемые медицинские изделия

Круглые столы

- Внедрение системы прослеживаемости медицинской продукции в Российской Федерации
- Регулирование в сфере обращения биомедицинских клеточных продуктов
- Фармацевтическая дистрибьюция. Аптечные сети. Актуальный опыт и передовые технологии. Надлежащая дистрибьюторская практика на пространстве ЕАЭС
- Технологические аспекты фармацевтического производства, влияющие на качество лекарственных средств. Управление рисками для качества
- Фармацевтические кадры. Современные потребности и актуальные решения

Тренинг ВОЗ по тренд-анализу для сотрудников лабораторных комплексов Росздравнадзора

В РАБОТЕ КОНФЕРЕНЦИИ ПРИМУТ УЧАСТИЕ

Представители федеральных и региональных органов законодательной и исполнительной власти Российской Федерации, профильных зарубежных регуляторных органов и международных организаций, научно-исследовательских и общественных организаций, профессиональных ассоциаций, оптовых и розничных организаций и производителей медицинской продукции

Для сотрудников региональных органов управления здравоохранением предусмотрено участие без оплаты организационного взноса (необходимо официальное письмо об участии, подробная информация на сайте www.fru.ru)

Дополнительная информация на сайте www.fru.ru и по тел.: (495) 359-06-42, 359-53-38, e-mail: fru@fru.ru, skype: fru2012

Обращаем Ваше внимание, что Оргкомитет конференции оставляет за собой право вносить изменения в программу и состав докладчиков

ХИМИЯ

ХИМИЧЕСКАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ И НАУКА

2016

19–22.09

ЭКСПОЦЕНТР

19-я международная выставка химической промышленности и науки

- **Зеленая химия**
- **Индустрия пластмасс**
- **Химмаш. Насосы**
- **Хим-Лаб-Аналит**
- **Салон защиты от коррозии «КОРРУС»**

www.chemistry-expo.ru

Организатор: АО «Экспоцентр»

При поддержке:

- Министерства промышленности и торговли РФ
- Российского Союза химиков
- ОАО «НИИТЭХИМ»
- Российского химического общества им. Д.И. Менделеева
- Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
- РХТУ им. Д.И. Менделеева

Под патронатом Торгово-промышленной палаты РФ

Россия, Москва, ЦВК «Экспоцентр»

Реклама

12+

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ СИНТЕЗА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ: ТРУДНОСТИ ВЫБОРА

На итоговом заседании коллегии Министерства промышленности и торговли Российской Федерации министр Денис Мантуров представил сводный доклад об итогах развития отечественной промышленности в 2015 г., а также обозначил цели и задачи, которые стоят перед министерством в 2016 году. Так, в прошлом году в рамках государственной поддержки отечественной фармпромышленности Фондом развития промышленности были одобрены для финансирования 5 проектов с общим размером займов 2,1 млрд руб. Три из них связаны с производством фармацевтических субстанций (производство фармсубстанций для выпуска пептидных и белковых препаратов; фармсубстанций для лечения онкологических заболеваний; фармсубстанций для лекарств от туберкулеза и рака). Помимо этого, из средств федерального бюджета было выделено 199,8 млн руб. на реализацию проектов по организации производства субстанций (противоопухолевые средства, аутоиммунные заболевания). Финансирование рассчитано на 2015–2017 годы. Помимо прямого финансирования производства российских фармсубстанций, в 2015 г. был принят ряд нормативно-правовых актов, призванных стимулировать отечественное производство данных продуктов (в форме субсидий и преференций отечественным производителям): постановление Правительства Российской Федерации от 01.10.2015 № 1047 «Об утверждении Правил предоставления

субсидий из федерального бюджета российским организациям на компенсацию части затрат, понесенных при реализации проектов по организации лекарственных средств и (или) производства фармацевтических субстанций, в рамках подпрограммы «Развитие производства лекарственных средств» государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013–2020 годы». Активное развитие отечественной промышленности в данном направлении является одной из приоритетных задач 2016 г. В частности, Денис Мантуров выделил такие приоритетные направления, как формирование дополнительных преференций для производителей лекарственных препаратов на всех стадиях производства, включая синтез фармацевтической субстанции, при государственных закупках и создание до-полнительных мер поддержки для производителей фармацевтических субстанций. В этой связи перед российскими заводами возникает вопрос, лежащий не только в плоскости R&D-продукта, но и в сфере технологического оснащения производства, изменения производственных мощностей. А значит, предприятия сталкиваются с трудным выбором: какое оборудование выбрать для организации промышленного производства субстанций. В прошлом номере мы представили материал о специфике модернизации фармацевтической промышленности России, в котором президент ГК «Фармконтракт» Сергей Быковский рассказал о преимуществах комплексного подхода при организации фармпроизводства «под ключ» силами одного исполнителя, затронув мимоходом специфику создания технологической линии по синтезу субстанций. [Экспертное мнение. Модернизация фармацевтической промышленности // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 2(15). С. 8–13.] Для развития более узкой темы о правилах выбора оборудования для синтеза фармацевтических субстанций, ключевых моментах, на которые стоит обратить внимание, мы попросили подготовить материал вице-президента ГК «Фармконтракт», к.х.н. Оксану Якименко.

В последние годы в фармацевтической промышленности нашей страны выявилась устойчивая тенденция к развитию не только методов получения готовых лекарственных форм (ГЛФ), но и к реализации процессов получения субстанций. Для многих специалистов, работающих над созданием технологии синтеза субстанции в лаборатории и масштабированием процесса в условиях производства, остро стоит проблема подбора оборудования, с одной стороны способного в полном объёме обеспечить решение задачи, с другой – соответствующего всем требованиям современной фармацевтической отрасли.

До недавнего времени большинство отечественных производителей лекарств обходили вопросы, связанные с получением фармацевтических субстанций, ограничиваясь производством готовых форм. Такой подход был обусловлен доступностью и относительно высоким качеством субстанций, поставляемых из стран Юго-Восточной Азии. Тем не менее в последние годы ситуация начала меняться, что связано как с политикой государства, стремящегося стимулировать создание производств полного цикла, локализованных в России, особыми требованиями к входному контролю субстанций, так и с повышением курсов мировых валют, отразившимся на закупочных ценах на сырьё.

Следствием приоритетной политики в области организации производства фармацевтических субстанций на территории Российской Федерации стало как развитие технологий получения субстанций, так и резко возросший спрос на оборудование, используемое для процессов фармацевтической химии и изготовленное в соответствии с требованиями GMP: химических реакторов, разнообразных смесителей, систем фильтрации, сушки, центрифугирования и CIP-очистки, а также сопутствующего оборудования.

На протяжении последних лет специалисты ведущего химико-фармацевтического холдинга России ГК «Фармконтракт» осуществляли поставку десятков решений, успешно функционирующих на производствах во всех регионах России. За это время мы имели возможность отследить тенденции в области решений для фармацевтической химии и оценить различные подходы к комплектованию производств оборудова-

нием, применяемым нашими заказчиками. В результате нам удалось сформулировать некоторые правила подбора оптимальных решений, которые основаны не только на нашем личном опыте, но и на опыте наших уважаемых заказчиков – исследователей и технологов фармацевтических производств.

ПРЕИМУЩЕСТВА КОМПЛЕКСНОГО ПОДХОДА

Как правило, специалист, которому поручена задача по созданию с нуля производства субстанции или модернизации/масштабирования уже имеющейся технологий встаёт перед нелёгким выбором: решать задачу самостоятельно, закупая у десятков поставщиков отдельные комплектующие, либо привлекать в статусе генерального подрядчика компанию-поставщика, предлагающую услуги своих технологов, для комплексного оснащения. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества.

Так, очевидно, что опытный технолог, имеющий большой опыт работы на оборудовании и прекрасно осведомлённый о всех особенностях процесса, чётко представляет себе, что именно и как он будет делать в цехе, а также какие аппараты и приборы наилучшим образом впишутся в производственную линию. Разумеется, какими бы компетентными ни были технологи и менеджеры компании-поставщика в теории, их опыт применительно к конкретному процессу гораздо более скромен, нежели опыт специалиста, годами оттачивающего своё мастерство на реальном производстве.

В то же время технический специалист, работающий в области продаж совместно с инженерами компаний-производителей, обладает широким спектром знаний не только об ассортименте имеющихся на рынке изделий и характеристиках того или иного оборудования, но и об удачных или неудачных примерах его использования. Постоянное общение с заказчиками даёт нам возможность получить крайне важную выборку данных, позволяющих обходить стороной низкокачественное или неоправданно дорогое оборудование, подбирая оптимальные по соотношению цена/качество решения.

Мой личный опыт показывает, что даже многие квалифицированные технологи, чей опыт работы на реальном производстве значительно превышает мой собственный, не всегда знают о наличии на рынке нужных им решений. В результате, подбирая оборудование, они опираются исключительно на техническую спецификацию, что зачастую приводит к выбору изделий с неадекватно высокой стоимостью, имеющих посредственное качество исполнения. Также на моей памяти были случаи, когда доверчивость и неосведомлённость о реальном положении дел на рынке приводила к тому, что заказчики становились жертвой недобросовестных поставщиков и не получали закупленное оборудование вовсе или получали не полный комплект документации для валидации.

Рисунок 1. Установка на базе реактора CR30 производства BuchiGlasUster (Швейцария), укомплектованная насосами, весовым модулем, термостатом и системой автоматизированного управления

Поэтому оптимальным, с моей точки зрения, подходом к комплектованию производства субстанции является подход комплексный, при котором технолог заказчика работает в тесном контакте со специалистом крупной компании-поставщика, осуществляющей и проектирование технологической линии. При совместной работе над технологической схемой и перечнем закупаемого оборудования технолог-производственник может дать исчерпывающую информацию обо всех тонкостях процесса, а технолог с опытом работы в области продаж поможет укомплектовать производство качественными комплектующими, имеющими приемлемую стоимость.

Ещё одним аргументом в пользу сотрудничества с крупной компанией является хорошо развитая логистика таких поставщиков, обеспеченная многолетним опытом поставок самого разнообразного оборудования, производимого в разных странах.

Наконец, большой оборот финансовых средств и тесное многолетнее общение с производителями позволяет крупной компании предложить оптимальные условия оплаты, а также обеспечить значительные скидки при комплексной закупке оборудования, что приводит в конечном итоге к существенной экономии средств заказчика. [Более подробная информация об этом была приведена на странице 13 нашего издания в № 2(15) за май 2016 г.]

ВЫБОР ПРОИЗВОДИТЕЛЯ. ЭКОНОМИЯ И КАЧЕСТВО

Как известно, клиент всегда прав, поэтому для любого поставщика при выборе производителя мнение заказчика является определяющим. По моему опыту, большинство заказчиков склоняется ближе к одному из полярных утверждений: «надо купить дорогое, но качественное оборудование, чтобы на десятилетия закрыть вопрос» либо «нужно взять максимально дешёвые решения, которые быстрее окупят свою стоимость, а потом купить ещё, если что-то сломается».

Оба подхода, несомненно, имеют право на жизнь, в связи с чем мы в ГК «Фармконтракт» стремимся для каждого типа решений предложить минимум двух производителей, чьё оборудование относится к разным ценовым категориям.

В то же время при поисках компромисса между достойными эксплуатационными свойствами изделия и приемлемой стоимостью важно понимать границы, при выходе за которые экономия оборачивается серьёзными проблемами и в конечном итоге полностью нивелируется дополнительными финансовыми потерями, неожиданными для заказчика.

Начнём с того, что оборудование для получения субстанции в нашей стране практически всегда работает в комбинации с решением для производства соответствующей ГЛФ, общая стоимость которого в большинстве случаев существенно выше. Не меньшие деньги заказчик вкладывает в комплекс оборудования для подготовки воды и воздуха, а также в организацию чистых помещений, где происходит финальная очистка и упаковывается готовый продукт. При этом установка, производящая субстанцию, находится в начале технологической цепочки, и, следовательно, при её отказе и длительном простое всё прочее оборудование не будет использоваться, примеры чего не раз приходилось наблюдать. Столь же неприятная ситуация возникает и при получении на стадии синтеза субстанции продукта ненадлежащего качества, например вследствие попадания в реакционную массу следов смазки, частиц уплотнений или при контакте с продуктами коррозии.

Эти и другие подводные камни ждут любого, кто рассчитывает уложиться в минимальный бюджет, продумывая комплектацию своего будущего производства.

Говоря о разнице между оборудованием премиум-класса и бюджетными аналогами, необходимо рассмотреть вопрос с нескольких сторон.

Конструкция

Отличия в конструкции оборудования разных ценовых категорий, как правило, выражены в разных комплектующих, выполняющих одну и ту же функцию. Например, оборудование бюджетного класса обычно оснащается простейшей запорной арматурой (дисковый затвор, шаровой кран), в то время, как более дорогие изделия, предназначенные для фармотрасли, комплектуются седельными или мембранными клапанами. В отдельных случаях дешёвые изделия имеют застойные зоны, что противоречит требованиям GMP. Такие же застойные зоны приходилось наблюдать в точках присоединения элементов трубопровод-

ной обвязки дешёвых реакторов, где использовались коннекторы, неплотно прилегающие друг к другу и не обеспечивающие герметичность.

Аппараты с мешалками европейского производства комплектуются в большинстве случаев одинарным или двойным торцевым уплотнением вала известных поставщиков, соответствующим требованиям FDA и снабжённым эффективной системой предотвращения осевых биений, в то время как бюджетные аналоги чаще комплектуются дешёвыми сальниковыми уплотнениями (рисунок 2), подверженными разрушению, что способствует загрязнению продукта и частым простоям оборудования.

Ещё одним отличием является качество обработки поверхности и сварных швов, которое в дорогом оборудовании подтверждается специальными сертификатами сварки и шлифовки, необходимыми при валидации процесса. Недорогие реакторы (в особенности китайского производства) часто имеют шероховатую поверхность, свидетельствующую о ручной шлифовке без каких-либо документов, а также необработанные сварные швы (рисунок 4).

Рисунок 2. Точка присоединения вентиля, имеющая компенсатор, с ярко выраженной застойной зоной (слева) и коннектор BuchiFlex, соответствующий требованиям GMP

Рисунок 3. Сухое двойное уплотнение RWD20 реактора BuchiGlasUster, соответствующее FDA (слева), и дешёвое уплотнение с компенсацией биений за счёт вставки из резинового шланга

Рисунок 4. Обработка металла и сварных швов бюджетного (слева) аппарата и реактора Patent (Венгрия)

Материалы

Разница в используемых при изготовлении оборудования материалах между реакторами различных поставщиков – один из главных факторов, которые надо учитывать при выборе оборудования. Известны случаи, когда расположенные в одном помещении и используемые для одного и того же процесса аппараты и мембраны, выполненные из стали (как было заявлено) идентичных марок, демонстрировали совершенно разную устойчивость к коррозии.

Следует помнить, что для фармацевтических производств пригодны только особым образом сертифицированные материалы, качество которых подтверждается соответствующими документами.

Безопасность

Системы безопасности дорогих современных реакторов, обеспечивающие предохранение сосуда от превышения давления (разрывные мембраны), производятся ведущими поставщиками и дают практически стопроцентную гарантию безопасной работы, в то время, как на дешёвых аналогах устройства безопасности обычно отсутствуют или имеют простейшую конструкцию, не гарантирующую полную безопасность.

Особое внимание следует обратить на оборудование, предназначенное для работы во взрывоопасных зонах, где в атмосфере помещения могут возникать опасные концентрации паров ЛВЖ. В этом случае всё оборудование должно соответствовать требованиям взрывозащиты и иметь сертификат соответствия техническому регламенту Таможенного союза (ТР-ТС 012-2011). Данный документ зачастую не предоставляется поставщиками оборудования, и его наличие необходимо оговаривать с поставщиком заранее, т.к. получение его в будущем будет сопряжено с рядом сложностей, займёт не один месяц и обойдётся заказчику в весьма солидную сумму.

Документация

В последние годы в нашей стране наблюдается ужесточение требований к документации, поставляемой совместно с оборудованием, используемым для синтеза субстанций. Переход к стандартам Good Manufacturing Practice (GMP) диктует необходимость наличия сертификатов на материал (для металличе-

INOXPA

INSTALLATION QUALIFICATION
FERMENTER 250L

Doc. n°: IQ- INO00282-250
Form: 3
Page 1 of 2

FORM 3

CERTIFICATION OF QUALIFICATION TEST INSTRUMENTS

Objective:
Documenting what kind of instrumentation was used for the qualification test and make sure that it is within the validity period of adjustment.

Method of execution:
Check the type the brand and model of each instrument to be used for qualifying and check the certificates of the same tools the calibration date.

Acceptance criteria:
The date of the instruments used to perform the qualification test shall within the period of validity of the calibration

Data recording:
Complete the section below.
Any shortcomings or differences found during the inspection will be reported in Form No. 10 annexed.

Рисунок 5. Пример одной из страниц протокола IQ реактора из нержавеющей стали Inoxpa (Испания)

ских деталей, контактирующих с продуктом), сертификатов происхождения материалов уплотнений, квалификационных документов (IQ/OQ), протоколов приёмочных испытаний (FAT/SAT) и множества специфических документов, подтверждающих характеристики изделий либо квалификацию специалистов. В отличие от европейских производителей, уже знакомых с таким подходом и поставляющих соответствующие документы поставляются вместе с любым изделием в фармацевтическом исполнении, производители бюджетного оборудования во многих случаях не имеют необходимого комплекта документации либо предоставляют сертификаты, оформленные с нарушениями и не соответствующие предъявляемым к ним требованиям.

Столь же важным является наличие сертификатов первичной поверки средств измерения, входящих в комплект изделия, которое по законам Российской Федерации является обязательным.

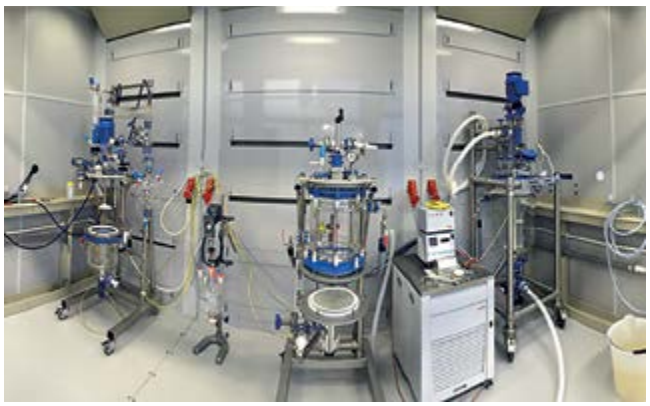
Используемые европейскими производителями датчики, поставляемые такими компаниями, как Mettler Toledo и Endress+Hauser, в большинстве своём внесены в реестр СИ и соответствуют этому требованию, в то время как производители из Юго-Восточного региона чаще всего используют датчики местного производства, внесение которых в реестр требует значительного времени и капиталовложений.

Оборудование и заказчик

Подводя итоги краткого обзора типичных проблем, с которыми сталкивается заказчик при выборе между бюджетным и дорогим оборудованием применительно к синтезу АФИ, хочу отметить, что имеются примеры успешной работы не только на оборудовании премиум-класса, но и на вполне бюджетных аппаратах отечественного производства или производства компаний из стран Юго-Восточного региона с давней историей работы на рынке и хорошими рекомендациями, в т.ч. со стороны европейских заводов. В тоже время данные успехи (по моим наблюдениям) обычно были обусловлены высокой квалификацией персонала заказчика, наличием на производстве механиков и инженеров, способных доработать несовершенную конструкцию и оперативно устранять периодически появляющиеся проблемы, или отсутствием необходимости наличия сертификатов соответствия cGMP и FDA.

Получение высококачественной субстанции на недорогом оборудовании, подобранном своими силами, требует значительных усилий и тщательного контроля за работой производителя на всех этапах, начиная от получения первых версий технической спецификации и заканчивая пуско-наладочными работами, проведением квалификационных работ. При этом строго рекомендуется проведение FAT (приемка оборудования на заводе-изготовителе) и SAT (приемка оборудования на площадке клиента).

В деле выбора оборудования для синтеза фармацевтических субстанций имеется множество нюансов и подводных камней, способных свести на нет усилия заказчика и привести к значительным финансовым затратам и потерям времени. Каждый волен выбирать свой подход к решению данной задачи, однако в ряде случаев имеет смысл разделить проблему выбора со специалистами крупной компании-поставщика, имеющей свой штат технических специалистов, компетентных в подборе подобного оборудования. Выбирая оборудование самостоятельно, следует тщательно изучать технические характеристики предлагаемых изделий и внимательно следить за документами, включёнными в комплект поставки, ведь даже незначительные, на первый взгляд, отклонения в конструкции и комплектации аппаратов могут привести к серьёзным сложностям при валидации процесса.



КОНТРАКТНОЕ ПРОИЗВОДСТВО ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ: ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

А.Г. Одабашян[1]*, А.С. Морозова[1]

1 – ООО «ПвК Юридические Услуги»
190000, Россия,
г. Санкт-Петербург,
пер. Гривцова, д. 4-А,
Бизнес-центр «Боллоев»

1 – LLC PricewaterhouseCoopers Legal, Office building «Bolloev Center», 4-A, Grivtsova lane, St. Petersburg, 190000, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: andrey.odabashian@ru.pwc.com
Тел.: 8 (812) 326 66 93, доб. 4963

Резюме. В статье анализируются наиболее значимые практические аспекты заключаемых соглашений в области контрактного производства лекарственных препаратов в Российской Федерации.

Ключевые слова: контрактное производство, локализация.

CONTRACT MANUFACTURING OF PHARMACEUTICALS IN RUSSIA: PRACTICAL ASPECTS

A.G. Odabashian[1]*, A.S. Morozova[1]

Abstract. In article we analyse key practical aspects of contract manufacturing agreements with respect to pharmaceuticals in Russia.

Keywords: contract manufacturing, localization.

А.Г. Одабашян

А.С. Морозова

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время мы наблюдаем значительный рост интереса иностранных фармкомпаний к организации производства лекарственных препаратов в РФ. Безусловно, не последнюю роль в возникновении такого интереса сыграли введенные в России законодательные меры по поддержке локализации. Благодаря данным мерам у иностранных инвесторов, локализующих производство, среди прочего появилась потенциальная возможность заключения специальных инвестиционных контрактов, получения ряда преференций в сфере государственных закупок, а также субсидий и иных мер финансовой поддержки со стороны государственных органов и фондов. По результатам опроса, проведенного нами в ходе ежегодного семинара для фармацевтических компаний, мы видим, что почти 60% опрошенных представителей фармацевтической отрасли приняли решение локализовать или расширить уже существующее производство в России благодаря таким регуляторным мерам поддержки.

Как правило, обращающиеся к нам иностранные производители рассматривают следующие основные варианты локализации производства на территории России:

- создание собственной производственной площадки;
- предоставление российскому заводу лицензии на производство и дальнейшую реализацию лекарственных препаратов под товарным знаком иностранного производителя;
- контрактное производство на производственных мощностях российского производителя.

При этом, как нам представляется, наибольшее распространение в России получила локализация по последней из указанных опций, а именно по модели контрактного производства. Реализация данной модели требует от иностранного инвестора несравнимо более низкого уровня инвестиций, чем при организации собственной производственной площадки. При этом в отличие от лицензионной модели локализации контрактное производство предоставляет иностранному инвестору возможность самостоятельно реализовывать лекарственные препараты на территории России (через аффилированную с ним российскую компанию), не получая при этом лицензии на их производство.

Российское законодательство предусматривает применение ряда ограничений в сфере государственных закупок лекарственных средств для препаратов, не происходящих из Евразийского экономического союза (применение ограничений, установленных постановлением о «третьем лишнем»[1], а в случаях, когда оно не применимо, – 15% понижающего коэффициента к цене контракта, заключаемого с поставщиком препаратов иностранного происхождения[2]). Такие ограничения не будут применяться в отношении препарата при достаточной глубине локализации его производственных стадий (например, осуществление в России полного цикла производства) независимо от того, локализовано ли производство на собственном заводе инвестирующей мультинациональной группы в России или на производственных мощностях российского производителя – третьего лица.

С правовой точки зрения договоры, регулирующие контрактное производство, как правило, структурируются как договоры подряда на переработку давальческого сырья. Заказчиком в данном случае выступает аффилированное с иностранным инвестором юридическое лицо, зарегистрированное в России. По общему правилу, в рамках данной модели иностранный инвестор не может напрямую являться заказчиком по договору, поскольку заказчик становится первым собственником готовой продукции и выпускает ее в оборот. Такие действия в соответствии с российским законодательством требуют наличия у заказчика лицензии на осуществление фармацевтической деятельности, которая на практике не может быть получена иностранной компанией.

Помимо исключительно подрядных отношений, соответствующие договоры также могу включать в себя элементы договора агентирования и (или) договора оказания услуг. Так, в случае, если на российского производителя договором возложена обязанность оказать заказчику консультационную поддержку при подготовке изменений в нормативную документацию, такие действия могут структурироваться как услуги. В случае же, если в дополнение к этому российский производитель от имени владельца регистрационного удостоверения также подает подготовленные документы в Министерство здравоохранения, соответствующие действия могут быть структурированы как агентские отношения.

При этом рассматриваемые договоры охватывают достаточно длительный срок взаимодействия сторон (начиная с подготовительных работ по переносу технологии на производственные мощности подрядчика, возможного внедрения стадий по первичной/вторичной упаковке до перехода на производство готовой лекарственной формы из иностранной субстанции либо, при необходимости также и на производство самой субстанции в РФ).

Учитывая такую неоднородность правовой природы взаимоотношений, а также длительный период взаимодействия сторон, практическая реализация контрактного производства требует тщательной проработки ряда вопросов, среди которых мы бы хотели особо отметить следующие.

ЗАЩИТА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ (ИС)

Одним из недостатков локализации для иностранного правообладателя в рамках контрактной модели является то, что в ходе подготовительных работ подрядчику раскрывается ряд данных о процессе производства, носящих конфиденциальный характер. Такая информация имеет высокую коммерческую ценность для ее правообладателя. В особенности это актуально в отношении оригинальных препаратов, не имеющих аналогов.

Вместе с тем на практике существует риск того, что подрядчик, получивший такую информацию, может потенциально разгласить, передать её третьим лицам или иным образом самостоятельно использовать её вопреки интересам правообладателя в целях, не предусмотренных договором. Для минимизации риска утраты уникальности или конфиденциальности такой информации специалисты в области ИС внимательно анализируют предоставляемую подрядчику информацию, чтобы определить её правовой статус в качестве объекта ИС, охраноспособность и выявить недостатки её охраны. Конкретный механизм охраны прав при заключении и исполнении сторонами договора зависит от результатов такого анализа и квалификации предоставляемой подрядчику информации. В том числе такой механизм включает внесение соответствующих положений в заключаемый с подрядчиком договор.

Среди прочего минимизация рисков достигается за счет введения режима коммерческой тайны у подрядчика, установления детального регулирования процессов передачи и использования любой конфиденциальной информации, детального регулирования отношений, касающихся создания новых/производных объектов ИС, а также установления ряда компенсационных механизмов в случае нарушения таких процессов или иных требований договора к использованию объектов ИС.

---

[1] Постановление Правительства РФ от 30 ноября 2015 г. № 1289.

[2] Приказ Министерства экономического развития РФ от 25 марта 2014 г. № 155.

ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ РАБОТЫ

Перенос стадий производства и внесение изменений в уже существующую производственную схему, как правило, сопряжены с осуществлением российским подрядчиком существенного объема подготовительных работ, предшествующих началу производства коммерческих серий препарата.

Своим клиентам мы всегда рекомендуем включать в договор, регулирующий контрактное производство, соответствующий раздел, устанавливающий положения о выполнении подрядчиком подготовительных работ, требования к их объему, сроки выполнения, распределение расходов на осуществление работ и перенос производства и иные связанные с ними вопросы. При отсутствии таких положений существует высокий риск, что впоследствии между сторонами могут возникнуть споры о распределении или объеме таких работ, а также об условиях их оплаты.

Исходя из нашей практики, одним из важных аспектов, которому следует уделить особое внимание при подготовке соответствующего раздела договора, являются вопросы приобретения нового оборудования, необходимого для производства лекарственного препарата. Важное значение имеет вопрос, какая из сторон и в каких пропорциях несет расходы на приобретение данного оборудования и какая из них приобретает на него право собственности.

Анализируя договоры, подготовленные некоторыми клиентами без нашего участия, мы видим, что такие действия нередко оформляются следующим образом: заказчик перечисляет подрядчику полную стоимость оборудования, в то время как право собственности на оборудование получает не заказчик, а непосредственно подрядчик, приобретший его за счет средств заказчика. На наш взгляд, такой подход к структурированию данных отношений является неудачным и рискованным и может повлечь ряд неблагоприятных последствий.

Кроме того, в случае если договор предусматривает использование подрядчиком оборудования заказчика, в нем желательно урегулировать порядок передачи и использования такого оборудования, ответственность за его повреждение или утрату в период нахождения у подрядчика, а также за его нецелевое использование.

ПРОГНОЗЫ И ЗАКАЗЫ

На практике мы видим, что среди производителей лекарственных средств, помимо непосредственно заказов на производство, является стандартной практикой использование скользящих прогнозов, отражающих потребность заказчика в производстве лекарственного препарата на достаточно делительный срок (как правило, на 12–18 мес.).

В связи с этим в договоре, помимо непосредственно обязанности и сроков предоставления соответствующих прогнозов, также целесообразно урегулировать такие вопросы, как определение периода (например, 6 мес.), данные по которому в прогнозе являются обязательными при оформлении заказа; порядок согласования прогнозов и заказов в случае наличия между сторонами споров об их содержании; возможность в определенных случаях заказа иного количества продукции, чем указано в прогнозе; момент, когда каждый прогноз и заказ являются согласованными сторонами; права сторон на последующее изменение прогнозов и заказов, а также иные вопросы, которые могут повлечь возникновение разногласий между сторонами.

ПРИЕМКА МАТЕРИАЛОВ И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ

Одним из вопросов, которому также следует уделить особое внимание при подготовке договора на производство лекарственных препаратов, является распределение ответственности за качество произведенных лекарственных препаратов. В подготавливаемых нами договорах мы стараемся в максимальной степени детализировать не только абсолютно необходимые вопросы приемки готовой продукции, но и положения о приемке и проверке давальческого сырья, предоставляемого заказчиком.

Согласно статье 713 Гражданского кодекса России подрядчик вправе требовать оплаты выполненных им работ, в том числе и в части результатов (произведенного лекарственного препарата), имеющих недостатки, если такие недостатки вызваны дефектами предоставленного заказчиком материала, которые не могли быть обнаружены подрядчиком при надлежащей приемке материалов. В связи с этим в договоре важно максимально подробно урегулировать процедуру и сроки приемки и проверки подрядчиком качества материалов заказчика, чтобы разграничить ответственность сторон за недостатки таких материалов после их приемки, а также за качество готового лекарственного препарата, произведенного из данных материалов.

Помимо этого, закрепление непосредственно в договоре (либо в приложении / дополнительном соглашении к нему) норм расхода материалов, предоставляемых заказчиком, а также норм расхода материалов, закупаемых подрядчиком (в случае, если заказчиком дополнительно компенсируются подрядчику расходы на приобретение таких материалов), также предотвращает возникновение между сторонами споров в отношении того, какая из сторон должна нести соответствующие расходы в случае непредвиденного перерасхода, повреждения или утраты материалов.

Договор (либо оформляемые на основании него иные документы, например заказы) должен позволять установить место передачи материалов заказчика подрядчику и место передачи готовой продукции заказчику (или иному указанному им лицу). Также в нем желательно урегулировать вопросы транспортировки готовой продукции (если применимо).

Безусловно, необходимым является и определение в договоре подряда требований к остаточному сроку годности продукции на момент ее передачи заказчику, а также последствий несоблюдения таких требований подрядчиком.

ОПЛАТА РАБОТ

Как мы уже упоминали ранее, договором, регулирующим контрактное производство, может охватываться достаточно широкий с точки зрения правовой природы спектр взаимоотношений между заказчиком и российским подрядчиком, что, в свою очередь, требует дифференцированного подхода к регулированию оплаты таких работ, услуг и иных действий, выполняемых подрядчиком по договору.

Вместе с тем независимо от правовой природы отношений, любая выплата со стороны заказчика должна быть тщательно структурирована, так чтобы с одной стороны, ее размер был экономически обоснованным и разумным и не вызывал вопросов о ее чрезмерности, а с другой стороны, не возникла возможность рассматривать переданные результаты работ / оказанные услуги как полученные заказчиком на безвозмездной основе.

Так, например, достаточно спорным с юридической и налоговой точек зрения является весьма распространенный на практике подход к оплате заказчиком всех работ, произведенных подрядчиком в ходе подготовки к производству. Мы видим случаи, когда заказчиком оплачиваются не только производство технических и валидационных серий, правомерность оплаты которых не вызывает существенных сомнений (поскольку заказчик в этом случае получает овеществленный результат таких работ – предкоммерческие серии продукции), но также и иные действия подрядчика, такие как квалификация и валидация оборудования подрядчика, приобретение такого оборудования, подготовка подрядчиком внутренней документации, обучение персонала и т.д.

С позиции бизнес-подхода оплата указанных действий представляется вполне разумной, поскольку конечной целью их осуществления является подготовка к выполнению работ в пользу заказчика, и, соответственно, заказчик должен быть заинтересован в их надлежащем выполнении. В то же самое время при более детальном анализе данных работ становится очевидным, что заказчик напрямую не получает какую-либо экономическую выгоду вследствие выполнения таких работ, они выполняются скорее в пользу подрядчика и позволяют именно ему в дальнейшем выполнять работы в пользу заказчика.

Учитывая, что приведенный пример является одним из множества выплат, которые могут осуществляться по договору, в каждом конкретном случае требуется тщательный анализ планируемых по договору выплат и структурирование их с учетом требований российского гражданского и налогового законодательства.

АУДИТ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ПЛОЩАДКИ

Поскольку согласно Федеральному закону от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» держатель (владелец) регистрационного удостоверения несет ответственность за качество, эффективность и безопасность выпускаемых в оборот лекарственных препаратов, важно обеспечить ему возможность инспектировать производственные мощности подрядчика.

В связи с этим в тексте договора целесообразно установить право заказчика и держателя регистрационного удостоверения на осуществление проверок соответствия производственных мощностей подрядчика предъявляемым к ним требованиям, периодичность и сроки проведения таких проверок, основания для проведения внеплановых проверок, действия при выявлении нарушений, документы, оформляемые по итогам проверок, а также иные вопросы, связанные с такими проверками.

При отсутствии необходимого регулирования существует риск того, что подрядчик может препятствовать или затягивать проведение проверок со стороны заказчика.

Безусловно, договор подряда должен детально регулировать также и ряд иных важных аспектов, таких как, вопросы права собственности и распределения рисков, конфиденциальность, ответственность сторон и обстоятельства непреодолимой силы, обязанности сторон в случае получения рекламаций потребителей и отзыва готовой продукции, заверения и гарантии сторон, порядок разрешения споров, последствия прекращения договора подряда.

В завершение хотели бы отметить, что приведенный нами перечень отражает только наиболее распространённые вопросы, которые на практике вызывают наибольшее количество споров. Вместе с тем общее число всех положений, которым должно быть уделено внимание на этапе согласования сторонами текста договора, намного больше.

Недостаточная или некорректная регламентация в договоре хотя бы одного из указанных положений впоследствии может стать причиной возникновения не только договорных споров между сторонами, но и споров с налоговыми органами. В связи с этим в практике нашей компании во избежание негативных последствий при подготовке соответствующих договоров, регулирующих контрактное производство, участвуют специалисты из разных юридических и налоговых групп, а в случае необходимости консультирования по вопросам выбора производственной площадки либо по иным коммерческим вопросам к участию в проекте также привлекаются специалисты из группы бизнес-консультирования.

УДК 615.454.2;
615.276;
618.15-002

НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ СУППОЗИТОРИЕВ

Т.А. Панкрушева[1], Л.Н. Ерофеева[1]*, Т.В. Орлова[1], О.О. Курилова[1], М.С. Чекмарева[1]

1 – ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра фармацевтической технологии, 305041, Россия, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3

1 – Department of Pharmaceutical Technology of Kursk State Medical University, 3, Karla Marksa str., Kursk, 305041, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: lnerofeeva@rambler.ru

Резюме. В статье приведены теоретические и практические результаты многолетней работы коллектива кафедры фармацевтической технологии Курского государственного медицинского университета по разработке ректальных и вагинальных суппозиториев для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний и сформулированы подходы к выбору рационального состава и технологии изготовления суппозиториев, в том числе с использованием теста «Растворение».

Ключевые слова: ректальные и вагинальные суппозитории, рациональный состав и технология, инфекционно-воспалительные заболевания, тест «Растворение».

SCIENTIFIC-METHODICAL APPROACHES AND RESULTS OF THE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF SUPPOSITORIES

T.A. Pankrusheva[1], L.N. Erofeeva[1]*, T.V. Orlova[1], O.O. Kurilova[1], M.S. Chekmareva[1]

Abstract. In article theoretical and practical results of longstanding work of collective of Pharmaceutical technology department of Kursk State Medical University for the development of rectal and vaginal suppositories for the treatment of infectious and inflammatory diseases have been shown and approaches to the choice of rational suppositories composition and technology, including using of Dissolution test, have been formulated.

Keywords: rectal and vaginal suppositories, rational composition and technology, infectious and inflammatory diseases, Dissolution test.

ВВЕДЕНИЕ

К 50-летию образования фармацевтического факультета Курского государственного медицинского университета кафедра фармацевтической технологии подводит итоги научной работы, в том числе по такому направлению, как разработка рациональных составов суппозиториев и технологии их изготовления. С 90-х годов XX века активно развивается производство суппозиториев, ежегодно выпускаются новые препараты и создаются новые фармакотерапевтические направления использования суппозиториев [4].

Исследования, проводимые в течение длительного времени сотрудниками кафедры, связаны с экспериментальным и теоретическим обоснованием состава, технологии ректальных и вагинальных суппозиториев, предназначенных для лечения воспалительных, инфекционно-воспалительных и других заболеваний. Результатами многочисленных экспериментов доказано, что определяющими фармацевтическими факторами для суппозиториев являются вид и количество вспомогательных веществ, степень дисперсности фармакологически активных субстанций. Именно они в значительной мере определяют полноту и скорость высвобождения лекарственных веществ (ЛВ), терапевтическую эффективность лекарственного препарата [6, 12, 17, 18].

ОБЗОР ИССЛЕДОВАНИЙ РАЦИОНАЛЬНЫХ СОСТАВОВ СУППОЗИТОРИЕВ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ ИЗГОТОВЛЕНИЯ

Одной из первых работ, проведенных Т.А. Панкрушевой, О.О. Куриловой и соавт., явилось обоснование, разработка состава и технологии суппозиториев с широко используемым в кардиологической практике представителем группы бета-адреноблокаторов – анаприлином. В связи с низкой биодоступностью анаприлина при приеме внутрь (30–40%) и системной элиминацией печенью целесообразным было создание его ректальной лекарственной формы. При разработке суппозиториев анаприлина изучено влияние вида основы,

наличия поверхностно-активных веществ (ПАВ), способа введения ЛВ в основу на его высвобождение. В результате эксперимента в качестве оптимальных основ выбраны гидрогенизированное хлопковое масло с 5% эмульгатора Т-2 (ГХМ-5Т) и витепсол Н-15 [24].

Несмотря на растворимость анаприлина в воде, его введение по типу эмульсии было исключено вследствие образования в процессе хранения лекарственной формы крупных игольчатых кристаллов размером до 200 мкм и неоднородности распределения субстанции в суппозиторной массе. Показана необходимость измельчения исходной субстанции анаприлина в присутствии анионного ПАВ (натрия лаурилсульфата) и введения его по типу суспензии. Установлено, что ПАВ способствует увеличению скорости высвобождения анаприлина из суппозиториев в 2–4 раза. Для оценки фармацевтической доступности лекарственной формы было предложено проведение теста «Растворение» (аппарат «Вращающаяся корзинка»), рекомендуемого в то время ГФ XI только для твердых лекарственных форм (ЛФ). Использование этого теста получило свое дальнейшее развитие в последующих работах коллектива авторов, а в настоящее время он включен в ГФ XIII применительно к суппозиториям.

Исследования фармакологической активности суппозиториев в опытах на экспериментальных животных показали, что ректальный способ введения анаприлина обладает более мягким бета-адреноблокирующим действием и позволяет сердцу лучше выполнять максимальную физическую нагрузку, предотвращает реактивность миокарда на нагрузку объемом и адреналином, исчерпывание миокардиальных резервов. Разработан оптимальный способ изготовления суппозиториев предлагаемых составов и установлена их стабильность в течение 18 мес. хранения [24, 28].

Актуальной проблемой современной медицины является повышение эффективности лечения воспалительных заболеваний женской половой сферы. Данные заболевания представляют собой как медицинскую, так и социальную проблему, поскольку затрагивают здоровье не только настоящего, но и следующего поколений, уровень рождаемости и здоровье нации в целом.

Т.А. Панкрушевой с соавт. разработаны составы суппозиториев с офлоксацином; флуконазолом; азитромицином; метронидазолом в сочетании с фуразолидоном, предназначенные для лечения урогенитальных инфекционных заболеваний разной этиологии.

На основании проведенного комплекса исследований при разработке суппозиториев с офлоксацином (противомикробным препаратом группы фторхинолонов) Т.А. Панкрушевой и Е.А. Рудько с соавт. (2004 г.) обоснована его концентрация в лекарственной форме, осуществлен выбор вспомогательных веществ и их количеств, доказана биоцидная активность в отношении шести тест-штаммов микроорганизмов, взятых в эксперимент. В результате предложены два состава суппозиториев на липофильной (витепсол Н-15) и гидрофильной (полиэтиленоксидной) основах с включением в последнюю аэросила, улучшающего структурно-механические свойства лекарственной формы. По общепринятым показателям установлена их стабильность в процессе хранения в течение 24 мес. [26, 27]. Для оценки фармацевтической доступности офлоксацина в суппозиториях также был предложен дополнительный критерий качества – тест «Растворение».

Для лечения бактериального вагинита Т.А. Панкрушевой и С.Н. Зубовой с соавт. обоснованы и разработаны составы и рациональная технология интравагинальных суппозиториев, содержащих сочетание метронидазола и фуразолидона на полиэтиленоксидной основе и основе витепсол Н-15. Оптимальный профиль высвобождения лекарственных веществ был достигнут введением твина-80. Суппозитории обладали выраженным противомикробным действием в отношении 5 тест-культур микроорганизмов и превышали активность взятых в качестве контроля суппозиториев «Флагил» [25].

Для лечения урогенитального кандидоза Т.А. Панкрушевой и Т.В. Автиной с соавт. теоретически и экспериментально обоснованы составы, технология интравагинальных суппозиториев с флуконазолом на основе витепсол Н-15 и сплаве полиэтиленоксидов с молекулярной массой 1500 и 400 (ПЭО-1500 и ПЭО-400) [21, 22]. Благодаря включению в их состав антисептика бензалкония хлорида суппозитории проявляли активность не только в отношении специфического тест-штамма *Candida albicans*, но и в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, что дало возможность предложить использовать их при лечении вагинальных кандидозов, сопровождающихся микст-инфекциями. При оценке качества суппозиториев, кроме общепринятых критериев, применяли дополнительные тесты «Однородность дозирования» и «Растворение» [1, 2].

При разработке состава и технологии суппозиториев с представителем группы макролидов – азитромицином Т.А. Панкрушевой и Т.А. Бредихиной с соавт. в результате эксперимента в качестве оптимальных основ выбраны бутирол (для экстемпорального изготовления) и витепсол Н-15 (для промышленного производства). Включение научно обоснованных количеств ПАВ (эмульгатора Т-2, твина-80) обеспечило надлежа-

щую скорость и полноту высвобождения антибиотика, а введение консервантов (нипагина с нипазолом) способствовало микробиологической стабильности лекарственной формы в процессе хранения в течение 24 мес. [23].

Многолетние исследования по разработке рациональных составов двухкомпонентных вагинальных суппозиториев проведены Л.Н. Ерофеевой с соавторами. Для лечения неспецифических вагинитов, которые выявляются у 60–65% больных, обратившихся в женскую консультацию, в качестве антимикробного средства был выбран клотримазол. С целью расширения спектра и усиления действия в состав суппозиториев введены цефазолин или фурацилин. Микробиологическим методом диффузии в агар установлено, что их комбинирование в 1,5–2 раза статистически достоверно увеличило зоны угнетения роста пяти взятых в эксперимент тест-микроорганизмов. Изучен процесс высвобождения *in vitro* ЛВ из гидрофобных и гидрофильных основ, стабильность суппозиториев и выбраны оптимальные составы. Разработана и запатентована основа – вагинальная фармацевтическая композиция, представляющая собой глицерогель натрийкарбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) с добавлением ПЭО-400. Предложенные на этой основе составы суппозиториев обеспечивают оптимальную осмотическую активность и фармацевтическую доступность ЛВ [3]. Установлена стабильность суппозиториев с клотримазолом и цефазолином на основе витепсол, суппозиториев с клотримазолом и фурацилином на основах витепсол, полиэтиленоксидной и на основе вагинальной фармацевтической композиции в течение 24 мес. хранения, что позволяет рекомендовать их для промышленного производства. Суппозитории с клотримазолом и цефазолином на основе вагинальной фармацевтической композиции, стабильные в течение 1,5 мес., можно готовить в аптеках по рецептам врачей или в виде внутриаптечной заготовки [3, 5, 6].

СОВРЕМЕННЫЙ АССОРТИМЕНТ СУППОЗИТОРНЫХ ОСНОВ

Анализ литературы и результаты собственной многолетней работы позволили Т.В. Орловой структурировать современный ассортимент суппозиторных основ в зависимости от их физико-химических свойств, исходного сырья и способов получения, охарактеризовать жировые основы лауриновой и нелауриновой природы, провести сравнительный анализ свойств твердых жиров, используемых в качестве суппозиторных основ, дать рекомендации по их использованию и сформулировать подходы к выбору оптимальной основы с учетом факторов, влияющих на скорость, полноту растворения и всасывания ЛВ из суппозиториев (таблица 1) [9, 17, 18].

В результате комплекса экспериментальных исследований разработаны дискриминаторные условия теста «Растворение» (аппарат «Вращающаяся корзинка»), позволяющие осуществлять выбор оптимальных вспомогательных веществ для суппозиториев НПВС и проводить их стандартизацию [20]. Тем самым обоснована возможность и целесообразность использования теста «Растворение» для разработки и контроля качества суппозиториев отдельных

Таблица 1.

Общие рекомендации по выбору суппозиторной основы

Растворимость ЛВ	Основа для суппозиториев		
	резорбтивного действия		локального действия
	немедленного	пролонгированного	
Растворимо в жирах	Жировая абсорбционная с эмульгаторами типа в/м	Эмульсионная типа м/в	1. Жировая 2. Гидрофильная водная с эмульгаторами типа м/в (для вагинальных)
Растворимо в воде	Жировая с низкой температурой плавления (33–35 °С)	1. Жировая с температурой плавления 36–37 °С 2. Эмульсионная типа в/м	1. Жировая с температурой плавления 36–37 °С 2. Гидрофильная (для вагинальных)
Нерастворимо в жирах и воде	Жировая абсорбционная с определенными эмульгаторами типа в/м (ФК, эмульгатор Т-2, МГД)	1. Жировая 2. Жировая абсорбционная с соответствующими эмульгаторами	1. Жировая 2. Гидрофильная (для вагинальных) 3. Жировая абсорбционная (для вагинальных)

НПВС (парацетамол, напроксен, диклофенак, анальгин, натрия салицилат, кислота ацетилсалициловая и др.). Получены индивидуальные профили растворения НПВС из различных суппозиторных основ. Исследована степень влияния ПАВ разной природы на процесс высвобождения НПВС и установлено их преимущественно положительное влияние на кинетику и динамику данного процесса. Обоснован суспензионный способ введения НПВС в жировые суппозиторные основы, в том числе для водорастворимых субстанций. Установлена эффективность высвобождения водорастворимых НПВС из жировых суппозиторных основ с низкой температурой плавления, а малорастворимых в воде НПВС – из жировых абсорбционных основ, содержащих эмульгаторы типа в/м [11, 12]. С этих позиций показана универсальность и рациональность использования абсорбционной основы витепсол Н-15. Активаторами высвобождения всех НПВС из твердого жира признаны эмульгатор Т-2 и фосфатидный концентрат (ФК). На основе определения эквивалентности профилей растворения НПВС сформулированы условия взаимозаменяемости вспомогательных веществ, обеспечивающие одинаковую фармацевтическую доступность активной субстанции из суппозиториев [14, 20].

Результаты изучения фармацевтической доступности суппозиториев подтверждены в опытах *in vivo*. Так, в экспериментах на лабораторных животных Т.В. Орловой с соавт. показана существенная роль суппозиторной основы в реализации фармакологической активности НПВС. Установлено статистически значимое преимущество основы витепсол Н-15 по сравнению с кондитерским жиром в обеспечении анальгетической и антипиретической активности суппозиториев НПВС – до 24 и 35% соответственно [16].

В опытах *in vivo* изучено антипиретическое и анальгетическое действие комбинированных суппозиториев на основе витепсол Н-15 и установлена высокая эффективность следующих составов (таблица 2), разработана технология, методики стандартизации, изучена стабильность суппозиториев и установлен срок их годности [13, 15, 16]. На суппозитории, содержащие парацетамол, димедрол и папаверина гидрохлорид, получен патент на изобретение [7].

Таким образом, разработанные сотрудниками кафедры фармацевтической технологии суппозитории (таблицы 2, 3) позволяют расширить ассортимент имеющихся лекарственных препаратов для лечения заболеваний различной этиологии. На все составы суппозиториев подготовлена нормативная документация – проекты фармакопейных статей предприятия, лабораторные регламенты и методические рекомендации [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Практическая значимость исследований коллектива кафедры фармацевтической технологии состоит в создании электронных учебных пособий «Суппозитории. Современные ректальные, вагинальные и уретральные лекарственные формы», «Биофармацевтические аспекты разработки суппозиториев»; монографии «Вспомогательные вещества в технологии суппозиториев и научно-методические подходы к их выбору»; научно-практических руководств для фармацевтической отрасли (главы в книгах «Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации», «Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств»); методических рекомендаций; многочисленных выступлениях на съездах и конференциях; актах внедрений материалов исследований в учебный процесс ряда кафедр фармацевтической технологии нашей страны, научных лабораторий производственных предприятий и фирм-разработчиков лекарственных препаратов, в том числе ОАО «Нижфарм», ООО «Альтфарм», ЗАО «Московская фармацевтическая фабрика» [8, 10, 17, 19, 20].

Таблица 2.

Результаты разработки ректальных суппозиториев (составы на 1 суппозиторий)

Содержание субстанции, г	Вспомогательные вещества	Срок годности, мес.	Область применения
Анаприлин 0,02	ГХМ-5Т Натрия лаурилсульфат Нипагин	18	Кардиология, бета-адреноблокатор
	Витепсол Н-15 Натрия лаурилсульфат Нипагин		
Парацетамол 0,1 Димедрол 0,01 Папаверина гидрохлорид 0,01	Витепсол Н-15	24	Терапия воспалительных процессов
	Масло какао	12	
Анальгин 0,1 Димедрол 0,01 Папаверина гидрохлорид 0,01	Витепсол Н-15	24	Терапия воспалительных процессов
	Масло какао	12	
Анальгин 0,1 Напроксен 0,1	Витепсол Н-15	24	
	Масло какао	12	

Таблица 3.

Результаты разработки вагинальных суппозиториев (составы на 1 суппозиторий)

Содержание субстанции, г	Вспомогательные вещества	Срок годности, мес.	Область применения
Офлоксацин 0,2	Витепсол Н-15 Твин-80 Нипагин, нипазол	24	Инфекционные урогенитальные заболевания
	Сплав ПЭО-400 и ПЭО-1500 (1:4) Твин-80 Нипагин, нипазол Аэросил		
Метронидазол 0,25 Фуразолидон 0,02	Витепсол Н-15 Твин-80 Нипагин, нипазол	24	Бактериальные вагиниты
	Сплав ПЭО-400 и ПЭО-1500 Твин-80 Нипагин, нипазол		
Флуконазол 0,15	Витепсол Н-15 Твин-80 Бензалкония хлорид	24	Урогенитальные кандидозы
	Сплав ПЭО-400 и ПЭО-1500 Твин-80 Бензалкония хлорид		
Азитромицин 0,2	Витепсол Н-15 Твин-80 Нипагин, нипазол	24	Бактериальные вагинозы
	Бутирол Эмульгатор Т-2 Нипагин, нипазол		
Клотримазол 0,1 Фурацилин 0,05	Витепсол Н-15	24	Неспецифические вагиниты
	Сплав ПЭО-400 и ПЭО-1500		
	Вагинальная композиция		
Клотримазол 0,1 Цефазолин 0,05	Витепсол Н-15	24	
	Вагинальная композиция	1,5	

ЛИТЕРАТУРА

1. Т.В. Автина, Т.А. Панкрушева, М.В. Покровский. Биофармацевтические аспекты разработки суппозиториев с флуконазолом // Кубанский научный медицинский вестник. 2011. № 3(126). С. 12–15.
2. Т.В. Автина, Т.А. Панкрушева, М.В. Покровский. Оценка качества разработанных суппозиториев с флуконазолом // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2012. № 10(129). С. 119–122.
3. Патент РФ № 2347568. МПК A61K31/4164, A61K31/546, A61K31/345, A61K9/02, A61J3/08. Вагинальная фармацевтическая композиция и способ ее получения / Л.Н. Ерофеева, Н.Д. Афонина, М.А. Захарова, В.А. Михайлюкова, О.Д. Печенин, Т.В. Куриленко. – № 2007138236; заявл. 15.10.07; опубл. 27.02.09, бюл. № 6. 4 с.
4. А.С. Дзюба, Е.О. Трофимова. Современное состояние и перспективы развития рынка суппозиториев // Фармация. 2014. № 3. С. 27–30.
5. Л.Н. Ерофеева, И.М. Раздорская, М.А. Захарова, В.А. Михайлюкова. Позиционирование новых вагинальных суппозиториев // Фармация. 2012. № 8. С. 17–19.
6. М.А. Захарова, Л.Н. Ерофеева, Н.Д. Афонина, О.Д. Печенин, В.А. Михайлюкова, И.В. Ферапонтова, Н.А. Зимина. Разработка состава, технологии и изучение вагинальных суппозиториев для лечения неспецифических кольпитов // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2009. № 2. С. 134–142.
7. Патент РФ № 2483719. МПК[7] A61P29, A61K9/02, A61K47/44, A61K31/472, A61K31/167, A61K31/137. Комбинированное жаропонижающее лекарственное средство в форме ректальных суппозиториев / Т.В. Орлова, Т.А. Панкрушева, А.В. Нестерова [и др.]. – № 2012114536; заявл. 12.04.12; опубл. 10.06.13, бюл. № 16. 4 с.
8. Г.А. Лазарева, Т.А. Панкрушева, Л.Н. Ерофеева, Т.В. Орлова, Н.Д. Афонина, А.В. Нестерова, Н.Д. Огнещикова, О.А. Медведева, О.Д. Печенин, М.С. Чекмарева, Т.В. Автина, Т.А. Бредихина, М.А. Захарова, В.А. Михайлюкова. Технология, контроль качества и применение комбинированных суппозиториев в терапии воспалительных заболеваний различной этиологии. Методические рекомендации. Изд. 2-е, перераб. и доп. – Курск: КГМУ, 2013. 131 с.
9. Т.В. Орлова. Особенности состава и перспективы использования жировых суппозиторных основ в фармацевтической практике // Жизнь без опас-

ностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2013. Т. VIII. № 3. С. 74–78.

10. Т.В. Орлова. Современные ректальные, вагинальные и уретральные лекарственные формы // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2014. № 1. С. 126–133.

11. Т.В. Орлова, Т.А. Панкрушева. Определение температуры плавления и времени полной деформации суппозиториев с нестероидными противовоспалительными средствами // Хим.-фармацевт. журн. 2010. Т. 44. № 7. С. 54–56.

12. Т.В. Орлова, Т.А. Панкрушева, А.В. Нестерова, Н.Д. Огнещикова. Биофармацевтическое исследование суппозиториев нестероидных противовоспалительных средств // Хим.-фармацевт. журн. 2010. Т. 44. № 5. С. 33–35.

13. Т.В. Орлова, Т.А. Панкрушева, А.В. Нестерова, Н.Д. Огнещикова. Исследования по разработке комбинированных суппозиториев жаропонижающего действия с парацетамолом // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2013. № 2. С. 112–116.

14. Т.В. Орлова, Т.А. Панкрушева. Лецитин – активатор высвобождения нестероидных противовоспалительных средств из суппозиториев // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2013. Т. VIII. № 1. С. 52–56.

15. Т.В. Орлова, Т.А. Панкрушева, А.В. Нестерова, М.С. Чекмарева Разработка суппозиториев жаропонижающего действия, содержащих анальгин, димедрол и папаверина гидрохлорид // Забайкальский медицинский вестник: электрон. науч. изд. 2013. № 2. С. 90–97.

16. Т.В. Орлова, Т.А. Панкрушева, Е.Б. Артюшкова, М.С. Удалова. Влияние способа введения на анальгетическое и жаропонижающее действие препаратов нестероидных противовоспалительных средств // Фармация. 2012. № 5. С. 41–44.

17. Т.В. Орлова, Т.А. Панкрушева. Вспомогательные вещества в технологии суппозиториев и научно-методические подходы к их выбору. – Курск: КГМУ, 2013. 160 с.

18. Т.В. Орлова, Т.А. Панкрушева. Выбор суппозиторной основы в технологии суппозиториев // Фармация. 2014. № 1. С. 34–38.

19. Т.В. Орлова, Т.А. Панкрушева. Разработка технологии производства суппозиториев // Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. С.Н. Быковского, И.А. Василенко, Н.Б. Деминой, И.Е. Шохина и др. – М.: Перо, 2015. С. 134–171.

20. Т.В. Орлова. Исследование суппозиториев по тесту «Растворение» // Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. И.Е. Шохина. – М.: Перо, 2015. С. 185–218.

21. Т.А. Панкрушева, Т.В. Автина, М.В. Покровский, О.А. Медведева. Исследования по разработке суппозиториев для лечения вагинального кандидоза // Научные ведомости Белгородского госуд. университета. Серия: Медицина. Фармация. 2010. № 22(93). Вып. 12/2. С. 42–48.

22. Т.А. Панкрушева, Т.В. Автина, М.В. Покровский, О.А. Медведева. Исследования по разработке вагинальных суппозиториев с флуконазолом // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 3(8). С. 88–95.

23. Т.А. Панкрушева, Т.А. Бредихина, О.А. Медведева. Исследования по разработке интравагинальных суппозиториев с азитромицином для лечения урогенитальных инфекционных заболеваний // Забайкальский медицинский вестник. 2011. № 2. С. 146–155.

24. Т.А. Панкрушева, О.О. Курилова, М.В. Покровский. Фармацевтические аспекты разработки суппозиториев с анаприлином // Современные проблемы фармацевтической науки и практики: Научные труды НИИ фармации. 1999. Т. 38. Ч. 1. С. 138–141.

25. Т.А. Панкрушева, С.Н. Зубова, О.А. Медведева, А.В. Нестерова, Ю.А. Козорез. Суппозитории для лечения бактериального вагинита // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология Фармация. 2004. № 2. С. 249–253.

26. Т.А. Панкрушева, Е.А. Рудько, А.В. Нестерова, О.А. Медведева, М.С. Чекмарева. Разработка состава, технологии и оценка качества суппозиториев с офлоксацином // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2003. № 2. С. 220–224.

27. Т.А. Панкрушева, Е.А. Рудько, О.А. Медведева, Л.А. Гулина, Е.И. Шашкова, М.С. Чекмарева, В.А. Каурова. Микробиологические аспекты исследования суппозиториев с офлоксацином // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2004. № 2. С. 254–257.

28. Патент РФ № 2191001. МПК A61K9/02, A61K31/138, A61P9/00 Суппозитории для лечения сердечно-сосудистых заболеваний / Т.А. Панкрушева, О.О. Курилова, М.В. Покровский, Б.В. Кузьмин. – № 2000121414 ; заявл. 10.08.2000; опубл. 20.10.2002, бюл. № 29.

УДК 615.454.1

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОРИГИНАЛЬНОЙ ОСНОВЫ ТИЗОЛЬ-ГЕЛЬ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ЕГО ОСНОВЕ ПО МАНУАЛЬНЫМ ПРОПИСЯМ

М.В. Махотина[1]*, Б.Б. Сысуев[2,4], А.Ю. Петров[3], И.В. Емельянова[1]

1 – ООО «Общество лабораторных исследований медицинских препаратов», 620075, Россия, г. Екатеринбург, ул. Бажова, 79, оф. 315

2 – ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

3 – ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

4 – ГБУ «Волгоградский научный медицинский центр», 400081, Россия, г. Волгоград, ул. Рокоссовского, 1г

1 – Organization of laboratory researches of medical preparations, 79, Bazhov's str., Ekaterinburg, 620075, Russia

2 – Volgograd State Medical University, Ministry of Healthcare, 1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, 400131, Russia

3 – Ural State Medical University, Ministry of Healthcare, 3, Repina str., Ekaterinburg, 620028, Russia

4 – Volgograd scientific medical center, 1g, Rocossovskogo str., Volgograd, 400081, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: tisolium@mail.ru
Тел.: 8 (343) 350 00 87

Резюме. Методом вискозиметрии исследованы реологические характеристики оригинальной основы тизоль-гель и лекарственных композиций на этой основе, построены и проанализированы кривые вязкости и кривые течения объектов исследования, рассчитана их механическая стабильность. Показано, что лекарственные композиции, изготовленные на основе тизоль-геля, имеют оптимальные структурно-механические свойства, которыми должна обладать мягкая лекарственная форма для местного и наружного применения. Подтверждена целесообразность и эффективность применения этой основы для изготовления лекарственных композиций по мануальным прописям.

Ключевые слова: оригинальная основа, тизоль-гель, лекарственные композиции, реологические характеристики.

STUDY OF RHEOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ORIGINAL BASIS TIZOL GEL AND MEDICINAL COMPOSITIONS ON THIS BASIS IN MANUAL RECIPES

M.V. Makhotina[1], B.B. Sysuev[2,4], A.U. Petrov[3], I.V. Emelyanova[1]

Abstract. Rheological characteristics of the original basis tizol gel and medicinal compositions on this basis were studied by method of viscosimetry, constructed and analyzed curves of viscosity and flow curves objects of research, calculated their mechanical stability. It was shown that the medicinal compositions made on the basis of tizol gel have optimal structural and mechanical properties which the soft medicinal form for local and external application has to possess. Expediency and efficiency of application of this basis for production of medicinal compositions in manual recipes were confirmed.

Keywords: original basis, tizol gel, medicinal compositions, rheological characteristics.

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени известно более ста лекарственных композиций, изготовленных по мануальным прописям на основе тизоль-геля, которые успешно используются для местного и наружного применения в различных областях медицины [1]. Обусловлено это высокой клинической эффективностью, экономичностью и удобством нанесения таких составов на кожу и слизистые.

Оригинальная основа тизоль представляет собой аквакомплекс глицеросольвата титана. Это гидрофильный коагуляционный гель, обладающий тиксотропными свойствами. Ранее для оценки потребительских свойств и стабильности структуры были изучены его реологические (структурно-механические) характеристики [2]. Было показано, что тизоль-гель обладает достаточно быстрой способностью к полному восстановлению структуры после механического разрушения, соответствует диапазону значений реологических оптимумов консистенции и намазываемости гидрофильной мягкой лекарственной формы, имеет хорошие потребительские свойства [3].

Известно, что реологические характеристики основы во многом определяют структурно-механические свойства лекарственных композиций и оказывают существенное влияние на полноту и скорость высвобождения фармацевтических субстанций в патологическом очаге. Вместе с тем реологические характеристики лекарственных композиций отличаются от таковых у основы, поэтому их исследование необходимо для оценки соответствия характеристик требованиям, предъявляемым к мягкой лекарственной форме для местного и наружного применения (стабильность структуры, оптимальные потребительские свойства). Эти показатели позволяют также подтвердить целесообразность и эффективность применения этой основы для приготовления многих лекарственных композиций [4, 5].

Соответственно в рамках данной статьи определена цель – исследование реологических характеристик оригинальной основы тизоль-гель и лекарственных композиций на этой основе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве образцов исследования были выбраны лекарственные композиции на основе тизоля, применяемые в медицинской практике, а именно: тизоль с диклофенаком натрия (0,5%) и лидокаина гидрохлоридом (1%), тизоль с лидазой 64 УЕ (1%).

Фармацевтические компоненты [диклофенак натрия (ФС 42-0260-07, субстанция-порошок производства «Хенан Донгтай Фарм Ко. Лтд», Китай, серия 120503, срок годности до 05.2016); лидокаина гидрохлорид (ФС 42-0251-07, субстанция-порошок производства G. Amphray Laboratories, Индия, серия 100215, срок годности до 03.2018); лидаза 64 УЕ (ФС 42-2606-93, лиофилизированный порошок производства ФГУП «НПО «Микроген», Россия, серия П130216, срок годности до 03.2018)] для приготовления составов на основе тизоль-геля (ФСП 42-3157-06, производства ООО «ОЛИМП», Россия, серия 10116, срок годности до 01.2018) использовались в виде порошкообразных субстанций. Процесс изготовления лекарственных композиций происходил в аптечных условиях при комнатной температуре путем постепенного и тщательного смешивания в ступке фармацевтических субстанций с основой. В результате тщательного растирания, измельчения субстанций с последующим растворением в тизоле получается гомогенный гель.

Исследование реологических характеристик лекарственных композиций проводили на следующий день после их приготовления методом вискозиметрии на вискозиметре Brookfield RVDV II+Pro (Brookfield engineering Laboratories, Middeleboro, USA) с насадкой для малых образцов системы «конус – плита» (тип CPE-40). Реологические характеристики данных составов необходимо было оценить в условиях их хранения, поэтому все измерения проводили при температуре образцов 20 °С. Образцы подвергали исследованию при 12 последовательно увеличивающихся скоростях, при этом регистрировались показания (среднее значение четырех показаний в секунду): напряжение сдвига, скорость сдвига, вязкость, температура.

Далее проводили разрушение структуры образцов с помощью мешалки верхнеприводной электронной RZR 2102 Control (Heidolph, Германия) в течение 1 мин со скоростью вращения шпинделя 50 об/мин, после чего, остановив вращение прибора на 10 мин, регистрировали показания прибора на каждой из 12 скоростей сдвига при их уменьшении. Аналогичные измерения проводили также через 60 мин после окончания разрушения структуры исследуемых образцов. Расчет данных проводили с помощью компьютерной программы WinGather V3, Brookfield, США.

Выбор скоростей был обусловлен особенностью технологического процесса, а именно скоростью перемешивания при получении геля (аптечная технология). Тем самым нами был смоделирован процесс получения геля и оценена его способность к восстановлению или разрушению структуры. Временной интервал в 10 минут был выбран исходя из особенностей стадии «Фасовка и упаковка продукции» в технологическом процессе, что позволяет проводить операцию фасовки до окончания процесса восстановления структуры. По истечении 60 мин важно было оценить способность структуры к полному восстановлению.

Механическую стабильность (МС), показывающую степень разрушения структуры системы в процессе необратимых деформаций, исследовали по методике Г.В. Михайловой и рассчитывали как отношение предела прочности структуры неразрушенной системы (τ_1) к величине предела прочности структуры системы, подвергнутой разрушению (τ_2), по формуле: $МС=\tau_1/\tau_2$, где τ_1 – предел прочности структуры неразрушенной системы (Н/м^2); τ_2 – предел прочности структуры разрушенной системы (Н/м^2) [4, 5, 7–10].

Результаты всех проведенных исследований сравнивали с полученными ранее [1] реологическими характеристиками основы тизоль-гель.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований реологических характеристик лекарственных композиций тизоля с лидазой, тизоля с диклофенаком и лидокаином были получены и обработаны данные, необходимые для построения кривых вязкости, показывающих зависимость «скорость сдвига – вязкость» (рисунок 1).

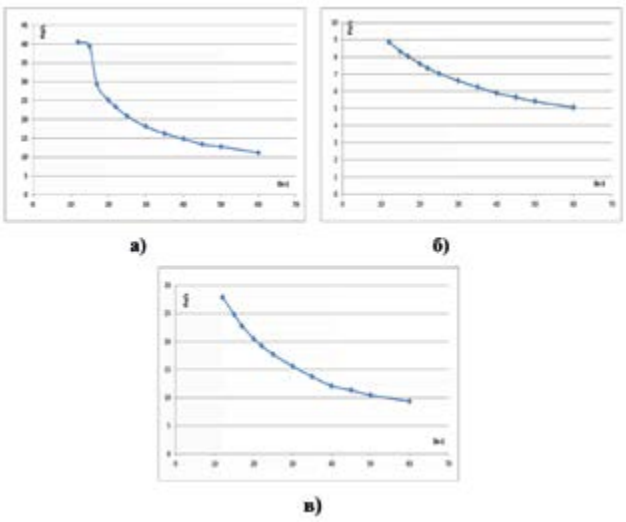


Рисунок 1. Кривые вязкости образцов (температура 20 °С):

а) лекарственной композиции тизоля с лидазой; б) лекарственной композиции тизоля с диклофенаком и лидокаином; в) основы тизоль-гель

Анализ кривых вязкости (рисунки 1а, 1б) позволил определить тип течения жидкости в результате механического воздействия на исследуемые образцы. Показано, что лекарственные композиции на основе тизоль-геля имеют неньютоновский тип течения жидкости, то есть являются псевдопластичными жидкостями с установленным пределом текучести. Вязкость этих жидкостей снижается при возрастании скорости сдвига, что свидетельствует о том, что разрушение структуры начинает преобладать над восстановлением. При анализе полученных кривых (рисунки 1а – 1в) видно, что вязкость основы тизоль-гель снижается в 3 раза (от 27,83 Pa/c до 9,37 Pa/c) при увеличении скорости сдвига от 12 до 60 c^{-1}. Основа обладает в исследуемом диапазоне скоростей более выраженными значениями вязкости по сравнению с изучаемыми образцами лекарственных композиций (рисунки 1а, 1б). Образцы лекарственных композиций показали снижение значений вязкости в изучаемом диапазоне скоростей в 4 раза для тизоля с лидазой (от 40,50 Pa/c до 11,20 Pa/c) (рисунок 1а) и в 1,7 раза для тизоля с диклофенаком и лидокаином (от 8,87 Pa/c до 5,07 Pa/c) (рисунок 1б). Такое отличие диапазона значений вязкости исследуемых образцов свидетельствует о влиянии фармацевтических субстанций (диклофенака натрия, лидокаина гидрохлорида и лидазы) на реологические свойства основы тизоль-гель. При добавлении диклофенака натрия и лидокаина гидрохлорида к основе происходит уменьшение вязкости (8,87 Pa/c), а в случае добавления лидазы происходит увеличение вязкости до значения 40,50 Pa/c. Высокая вязкость композиции тизоля с лидазой делает ее более устойчивой к механическим разрушениям, что подтверждается наличием горизонтального участка на кривой (рисунок 1а) в диапазоне значений скоростей сдвига от 12 до 15 c^{-1}.

Вместе с тем полученные данные исследуемых образцов соответствуют диапазону вязкости и реологических оптимумов консистенции, принятому для гидрофильных мазей и гелей [3].

Определение тиксотропных свойств исследуемых образцов проводилось путем построения и анализа кривых течения (зависимость напряжения сдвига от скорости сдвига) через 10 мин (рисунки 2–3, слева) и через 60 мин (рисунки 2–3, справа) после разрушения структуры образцов. Результаты сравнили с кривыми течения, полученными ранее [2] для основы тизоль-гель (рисунок 4).

Анализ кривых течения исследуемых образцов (рисунки 2–4) показал, что напряжение сдвига на всем участке скорости сдвига изучаемых составов возрастает до величин, соответствующих полному разрушению структуры систем. В период убывающего напряжения на 10 минуте эксперимента (рисунки 2–4, слева) происходит лишь частичное восстановление исходной структуры, однако уже на 60 минуте эксперимента (рисунки 2–4, справа) наблюдается образование

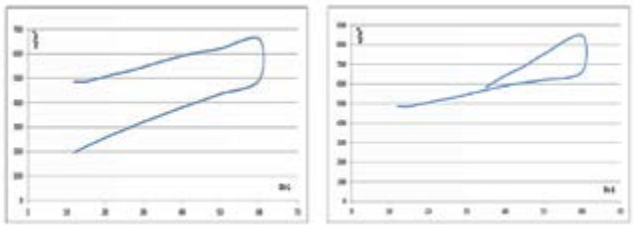


Рисунок 2. Кривая течения образца основы тизоля с лидазой (температура 20 °С):

слева – восстановление 10 мин; справа – восстановление 60 мин

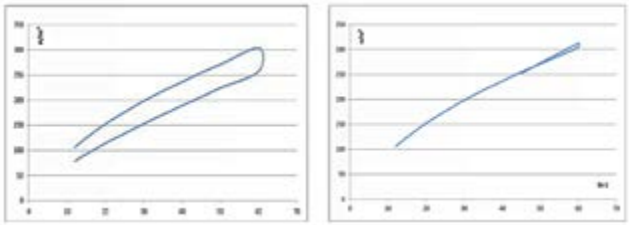


Рисунок 3. Кривая течения образца основы тизоля с диклофенаком и лидокаином (температура 20 °С):

слева – восстановление 10 мин; справа – восстановление 60 мин

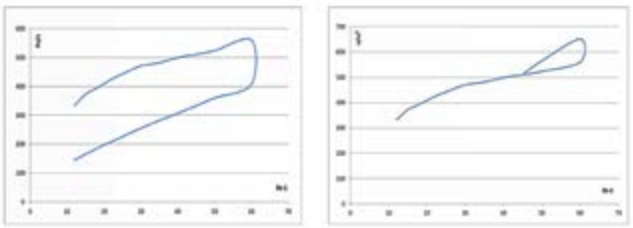


Рисунок 4. Кривая течения образца основы тизоль-гель (температура 20 °С):

слева – восстановление 10 мин; справа – восстановление 60 мин

петель гистерезиса, что позволяет сделать однозначный вывод о полном восстановлении структуры. При анализе данных восстановления на 60 минуте эксперимента (рисунок 2–4, справа) видно, что полное восстановление структуры лекарственной композиции тизоля с лидазой наблюдается в диапазоне скоростей 60–35 c^{-1}, что свидетельствует о более длительном ее восстановлении по сравнению с основой тизоль, у которой полное восстановление структуры наблюдается в диапазоне скоростей 60–45 c^{-1}.

При изучении образца лекарственной композиции тизоля с диклофенаком и лидокаином (рисунок 3, слева) установлено, что она имеет наименьшую площадь петли гистерезиса, то есть наиболее полно восстанавливает структуру по сравнению с основой тизоль и с лекарственной композицией тизоля с лидазой, однако при этом происходит резкое снижение ее вязкости. Анализ данных восстановления на 60 минуте эксперимента (рисунок 3, справа) показал, что полное

восстановление структуры данного образца происходит в диапазоне скоростей 60–45 $с^{-1}$, что характерно и для основы тизоль-гель.

Полученные результаты исследуемых образцов соответствуют диапазону реологических оптимумов намазываемости гидрофильных мазей и гелей [3, 5].

Согласно нашей методике определение показателя предела текучести мы проводили путем определения динамического предела текучести, принимая значение напряжения сдвига, при котором было возможно инструментально зафиксировать факт начала течения образца. Динамический предел текучести для основы тизоль-гель составил 333 $Н/м^2$, а для лекарственных композиций тизоля с лидазой и тизоля с диклофенаком и лидокаином – 486 и 106 $Н/м^2$ соответственно. Результаты определения механической стабильности лекарственных композиций и сравнение их с показателями основы тизоль-гель приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты определения механической стабильности исследуемых образцов

Показатель прочности структуры	Основа тизоль-гель	Основа тизоль с лидазой	Основа тизоль с диклофенаком и лидокаином
τ_1 ($Н/м^2$)	471±2,3	546±1,8	198,4±0,8
τ_2 ($Н/м^2$)	255±2,2	322±1,5	152,8±1,1
МС (τ_1/τ_2)	1,85±2,2	1,7±1,6	1,3±0,9

Из таблицы 1 видно, что рассчитанные значения механической стабильности указывают на наличие в структуре гелей коагуляционных связей [5], которые обеспечивают полную обратимость деформаций после снятия напряжений и сохраняемость реологических свойств исследуемых образцов в процессе длительного хранения. Лучшим показателем механической стабильности обладает лекарственная композиция тизоля с диклофенаком и лидокаином, из чего можно сделать вывод, что данная структура создает каркас, обладающий наибольшей стабильностью и пластичностью, способный к восстановлению после разрушения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что лекарственные композиции на основе тизоль-геля относятся к псевдопластичным жидкостям с установленным пределом текучести, обладают стабильной структурой, способной к полному восстановлению после механического разрушения (тиксотропностью), имеют схожий с основой тизоль-гель диапазон реологических характеристик, соответствующий диапазону реологических оптимумов консистенции и намазываемости гидрофильных мазей и гелей, обладают хорошими потребительскими свойствами, а значит, удовлетворяют требованиям, предъявляемым к мягкой лекарственной форме для местного и наружного применения.

Полученные результаты исследования позволили подтвердить целесообразность и эффективность применения тизоль-геля в качестве оригинальной основы для приготовления лекарственных композиций по мануальным прописям.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.С. Емельянов, Е.А. Филатова, И.В. Емельянова. О возможностях лекарственного препарата Тизоль® для использования в различных областях медицины и фармации // Новые технологии в медицине и фармации. Тизоль: Сб. научных статей. 2010. С. 7.
2. Б.Б. Сысуев, Е.А. Самошина, А.Ю. Петров, М.В. Махотина, А.С. Емельянов. Исследование реологических характеристик лекарственного препарата Тизоль® геля для местного и наружного применения // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. 2013. № 68. С. 532.
3. Б.Б. Сысуев. Технологические и фармакологические исследования минерала бишофит как источника магнийсодержащих лекарственных средств: дис. ... д. фарм. н. Пятигорск, 2012. 333 с.
4. Г. Шрамм. Основы практической реологии и реометрии. – М.: КолосС. 2003. 321 с.
5. А.В. Пантюхин. Экспериментально-теоретические аспекты использования поверхностно-активных веществ при создании лекарственных форм в виде гетерогенных систем: дис. ... д. фарм. н. Саратов, 2014. 298 с.
6. А.В. Пантюхин, И.И. Краснюк. Реологические модели упруго-вязких лекарственных форм // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 1. С. 1.
7. С.О. Лосенкова, М.А. Огай, А.В. Пантюхин. Реологические исследования пластырной массы с мексидолом // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2011. Т. 4. № 13. С. 187–189.
8. А.В. Пантюхин. Реология и поверхностные явления в фармацевтической технологии. – Саратов: Сарат. гос. тех. ун. 2010. 124 с.
9. Государственная фармакопея РФ XIII. Ч. 1. – М. 2015.

УДК 615.014.22

1 – Московский технологический университет (МИТХТ), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, 86

1 – Moscow Technological University (MITHT), 86, Vernadskogo prospect, Moscow, 119571, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: domnina.yulia@mail.ru

РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ КАРБОМЕРОВ ACRYPOL 974P И CADPOL 980

Ю.М. Домнина[1]*, С.А. Кедик[1], В.В. Суслов[1], Е.А. Шняк[1]

Резюме. Работа посвящена разработке нового офтальмологического лекарственного средства пролонгированного действия для лечения катаракты различного генеза, дистрофии и травмы роговицы. Результаты исследования показали возможность создания офтальмологического геля на основе карбомеров с добавлением таурина. Полученный препарат был исследован по основным показателям на соответствие требованиям, предъявляемым к глазным лекарственным формам.

Ключевые слова: офтальмологические гели, карбомер, таурин.

DEVELOPMENT AND STUDY OF THE CHARACTERISTICS OF OPHTHALMIC GELS BASED ON CARBOMER ACRYPOL 974P AND CADPOL 980

Y.M. Domnina[1]*, S.A. Kedik[1], V.V. Suslov[1], E.A. Shnyak[1]

Abstract. The work is devoted to the development of novel ophthalmic drug prolonged action in the treatment of cataract of different genesis, degeneration and corneal injury. The results showed the possibility of creating an ophthalmic gel based on carbomers with the addition taurine. The resulting preparation was studied on the basic parameters that demand for ophthalmic dosage forms.

Keywords: ophthalmic gels, carbomer, taurine.

ВВЕДЕНИЕ

Важной проблемой современной медицины является создание новых офтальмологических средств для лечения заболеваний глаза. Согласно Международной классификации болезней, травм и причин смерти заболевания глаз являются наиболее распространенными. При анализе ассортимента лекарственных форм, представленных на сегодняшний день, лидирующее место занимают глазные капли, глазные мази, лиофилизат для интравитриального введения, глазные гели, глазные кремы [1, 2].

Наиболее распространенными офтальмологическими заболеваниями являются катаракта, дистрофия сетчатки, синдром сухого глаза и травматические заболевания глаз. Анализ литературы, посвященной вопросам медикаментозной терапии катаракт и глаукомы, показывает ограниченность лечения данных заболеваний. Широкое применение в офтальмологии нашел 4% раствор таурина (глазные капли «Тауфон») в связи с тем, что он стимулирует репаративные процессы в тканях глаза, позволяет ускорить метаболизм клеточных мембран, активизировать энергетические и обменные процессы в цитоплазме, улучшить проведение нервного импульса [3].

Однако у глазных капель существует ряд недостатков: короткий период терапевтического эффекта и низкая биодоступность лекарственных средств, обусловленная сложным механизмом всасывания, неэффективным способом введения и вымыванием лекарственного вещества слезной жидкостью при моргании. Установлено, что только одна десятая дозы лекарственного вещества проникает в глаз [4].

Для устранения этих недостатков целесообразно применять пролонгированные офтальмологические лекарственные формы, такие как глазные гели, мази, пленки. Данные формы позволят снизить количество введений препарата при сохранении терапевтического эффекта [5, 6].

Цель нашей работы состояла в изучении возможности получения устойчивых гелей на основе карбомера, содержащих в качестве активного вещества таурин, и определении характеристик лекарственной формы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основываясь на литературных данных, в качестве полимерной матрицы для формирования геля был выбран карбомер – редкосшитый полимер полиакриловой кислоты марок Acrypol 974P (Corel Pharma Chem, India, USP) и Cadpol 980 (Shree Chemicals, India, USP). Применение карбомеров позволяет достичь длительного и прочного соединения пленки лекарственного препарата с роговицей, а также увеличивает вязкость слезы. В качестве лекарственного вещества использовали таурин («Вьетнамская акционерная химико-фармацевтическая компания», Вьетнам, НД ЛСР-005100/10-010610, серия ТР 11082118, срок годности 2 года). Вспомогательными элементами были выбраны бензалкония хлорид (Unilab chemicals and pharmaceuticals Pvt. Ltd., India, USP) и сорбитол (C*PharmSorbidex P 16616, USP).

Для получения геля предварительно смешивали навески карбомеров (0,25 мас.%) Acrypol 974P или Cadpol 980 с дистиллированной водой объемом 40–50% от готового препарата и оставляли на 8 ч для набухания. Затем приливали водный раствор (объемом 40% от готового препарата) таурина (4,0 мас.%), сорбитола (1,0 мас.%) и бензалкония хлорида (0,006 мас.%). Для формирования гелевой структуры добавляли по каплям при перемешивании на магнитной мешалке C-NAG HS-7 (IKA, Германия) 0,1 М NaOH (чда, ГОСТ 4328-77) в количестве, достаточном для достижения pH 6,0–7,5. Следует отметить, что при добавлении водного раствора таурина уже к сформированной структуре геля происходило разрушение гелевой структуры. Это связано с изменением значения pH геля. При pH<3 осаждается свободная полиакриловая кислота. Соль полностью нейтрализованной полиакриловой кислоты, существующая обычно

Магнитная мешалка C-NAG HS-7, IKA

при pH>10, не способна образовывать гелевую структуру [7]. Оптимальные характеристики гелей полиакриловой кислоты достигаются в диапазоне pH 6–10, а для глазных – 6,0–7,5.

Измерение значений pH, прозрачности, цветности, осмоляльности и вязкости гелей проводили в соответствии с требованиями фармакопейных статей [8]. Значение осмоляльности было получено на автоматическом криоскопическом осмометре ОСКР-1М («КИВИ осмометрия», Россия). Измерение вязкости осуществляли на ротационном вискозиметре типа Rheotest RN 4.1 (RHEOTEST Medingen GmbH, Германия), снабженном термостатируемой и измерительной ячейками в виде коаксиальных цилиндров. Испытания проводили при постоянной температуре 25±0,1 °С и скорости 100 об/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные образцы исследовали по показателям, представленным в таблице 1. В качестве образца сравнения использовали имеющийся на фармацевтическом рынке офтальмологический препарат «Офтагель», в состав которого входят: карбомер 974P,

Таблица 1.

Результаты измерений основных характеристик гелей

Измеряемые показатели	Методы	Гель на основе карбомера 0,25%		«Офтагель» 0,25%
		974P	980	
Внешний вид	Визуальный	Прозрачный, однородный, без осадка	Прозрачный, однородный, без осадка	Прозрачный, однородный, без осадка
pH	ГФ XIII; потенциометрически	6,1±0,3	6,8±0,3	7,0±0,4
Осмоляльность	ГФ XIII	520±26 мОсм/кг	621±31 мОсм/кг	320±16 мОсм/кг
Вязкость	ГФ XIII	331±16 мПа·с	1033±52 мПа·с	336±17 мПа·с
Цветность	ГФ XIII	Выдерживает сравнение с эталоном BY7	Выдерживает сравнение с эталоном BY7	Выдерживает сравнение с эталоном BY7
Прозрачность	ГФ XIII	Не превышает эталон сравнения III	Не превышает эталон сравнения III	Не превышает эталон сравнения III

бензалкония хлорид, сорбитол, лизина моногидрат, натрия ацетат, поливиниловый спирт, вода для инъекций.

Одним из важнейших показателей качества офтальмологических гелей является вязкость, от величины которой зависят терапевтические свойства препарата. Гель, разработанный на основе карбомера марки Cadpol 980, имеет значения вязкости, отличные от значений вязкости препарата «Офтагель», в то время как гель на основе карбомера 974Р имеет идентичные значения при одинаковых концентрациях полимерной основы.

Многие глазные лекарственные препараты вызывают неприятные ощущения при использовании. В большинстве случаев дискомфортные явления обусловлены несоответствием осмотического давления и значения pH. Для комфортного применения глазные формы должны быть изотоничны и соответствовать осмотическому давлению растворов натрия хлорида с концентрациями 0,9±0,2%. Наиболее предпочтительное значение осмоляльности определяется диапазоном от 260 до 340 мОсм/кг. Компонентом, позволяющим отрегулировать осмоляльность при данном составе, является сорбитол. В связи с этим нами были исследованы составы глазных гелей с различной концентрацией сорбитола. В таблице 2 представлены результаты.

Таблица 2.

Зависимость осмоляльности 0,25% геля на основе карбомера 974Р от процентного содержания сорбитола

№ образца	Концентрация сорбитола	pH	Осмоляльность, мОсм/кг H_2O	Прозрачность
1	–	6,6±0,4	278±14	Не превышает эталон сравнения III
2	0,25%	6,6±0,4	282±14	Не превышает эталон сравнения III
3	0,50%	6,6±0,4	284±14	Не превышает эталон сравнения III
4	1,0%	6,6±0,4	335±15	Не превышает эталон сравнения III
5	1,5%	6,6±0,4	358±18	Не превышает эталон сравнения III
6	2,0%	6,6±0,4	360±18	Не превышает эталон сравнения III

В офтальмологических препаратах, имеющихся на фармацевтическом рынке, количественное содержание сорбитола варьируется от 0,5 до 5,0%, при этом показано, что оптимальными являются значения 0,5÷2,0% [9]. Из полученных результатов видно, что при концентрациях сорбитола 0,5% и 1,0% осмоляльность гелей соответствует осмоляльности слезной жидкости, что обеспечивает комфортное применение лекарственного средства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения работы были определены оптимальные составы гелей с содержанием таурина 4%, карбомера 0,25% и сорбитола 0,5–1,0%, которые удовлетворяют требованиям ГФ XIII, предъявляемым к глазным лекарственным формам. Эффективность гелей разработанных составов и их стабильность будет изучена в ходе дальнейшей работы.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ РФ (НШ-7946.2016.11.).

ЛИТЕРАТУРА

1. И.М. Перцев. Фармацевтические и биологические аспекты мазей. – Харьков: НФаУ: Золотые страницы, 2003. 288 с.
2. Л.С. Новикова. Разработка глазных препаратов на коллагене // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: Материалы X Междунар. конф. (Минск, 6-7 апр. 2012 г.). – Минск: Изд. центр БГУ, 2012. С. 428–430.
3. Л.К. Мошетова. Препарат видисик в лечении синдрома сухого глаза // Синдром сухого глаза: Спец. издания Московской ассоциации офтальмологов. 2002. № 3. С. 7–8.
4. А.С. Гаврилова. Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных препаратов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 624 с.
5. А.Е. Егоров. Новый препарат искусственной слезы пролонгированного действия «Офтагель» для коррекции синдрома сухого глаза// Клиническая офтальмология, 2001. № 3(2). С. 123–124.
6. Е.Т. Жилякова. Офтальмологические препараты антикатарактального действия: современное состояние проблемы и пути ее решения// Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармакология. 2006. № 2, Вып. 4. С. 78–85.
7. А.Ю. Кривова. Технология производства парфюмерно-косметических продуктов. – М.: ДеЛи принт, 2009. 668 с.
8. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII издание. Т. 2. – Москва, 2015.
9. Патент US № 6159458 A. Sustained release ophthalmic compositions containing water soluble medicaments / L.M. Bowman, J.F. Pfeiffer. Заявл. 4.11.1997; опубл. 12.12.2000.

23-я Международная специализированная выставка

аптека 2016

ufi Approved Event

РОССИЙСКАЯ НЕДЕЛЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

DECEMBER
5–8
ДЕКАБРЯ

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ДЕЛОВОЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ

INTERNATIONAL MEDICAL AND PHARMACEUTICAL BUSINESS FORUM

Международный Форум

Традиционные медицинские системы мира

International Forum TRADITIONAL MEDICAL SYSTEMS OF THE WORLD

Москва
ЦВК «Экспоцентр»
павильон № 7

Pav.7, Expocentre
Fairgrounds, Moscow

Ждем вас на нашей выставке!

Организатор:
ЕВРОЭКСПО
EUROEXPO

16+

www.aptekaexpo.ru

УДК 615.3

1 – Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

1 – Pyatigorsk Medico-Pharmaceutical Institute, department of State Federal – Funded Educational Institution of Higher Vocational Training Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 11, pr. Kalinina, Pyatigorsk, Stavropol region, 357532, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: sergei_trofimov@ashland.com
Тел.: +49 1522 786 2343

ВЛИЯНИЕ ГИДРОКСИЭТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ГЛИБЕНКЛАМИДА ИЗ ТАБЛЕТОК ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

С.В. Трофимов[1]*

Резюме. Приведены практические результаты исследования влияния размера частиц и способа обработки активной субстанции глибенкламида на профиль высвобождения из матричной таблетированной формы пролонгированного действия. Изучено влияние гидроксиэтилцеллюлозы как компонента, используемого для пролонгации высвобождения, а также как вещества, способного улучшать скорость растворения и способствовать более полному высвобождению активной субстанции из пролонгированной готовой лекарственной формы.

Ключевые слова: гидроксиэтилцеллюлоза, глибенкламид, растворение, пролонгированное высвобождение.

EFFECT OF HYDROXYETHYLCELLULOSE ON THE RELEASE OF GLIBENCLAMIDE FROM SUSTAINED RELEASE TABLETS

S.V. Trofimov[1]*

Abstract. With this study the results of influence particle size distribution and method of modification API on dissolution profile from matrix tablets with sustained release are shown. The effect of Hydroxyethylcellulose, which is used as sustained release agent, also as an excipient, able to improve dissolution speed and maintain more complete release of an API from sustained release formulation, with glibenclamide as an example has been studied.

Keywords: Hydroxyethylcellulose, glibenclamide, dissolution, sustained release.

ВВЕДЕНИЕ

Для малорастворимых активных субстанций показатель «Растворение» часто является весьма критичным. Технологу приходится прибегать к различным способам улучшения этого показателя. Так, например, решать вопросы, связанные с низким растворением, позволяет метод распылительной сушки для получения комплексного соединения активной субстанции с носителем, обладающим улучшенными биофармацевтическими свойствами [1–4]. Решать вопросы улучшения растворимости позволяет метод экструзии расплава, также подразумевающий наличие специального оборудования и имеющий определенные ограничения к применению ввиду высокой температуры процесса, которая не всегда применима к термолабильным субстанциям [5–7].

В других случаях бывает достаточно использования специальных веществ, как правило ПАВ, для достижения необходимого результата за счет улучшения смачиваемости поверхности гидрофобного материала [8, 9].

В случае пролонгированных лекарственных форм, когда высвобождение субстанции должно осуществляться по строго заданному графику, помимо проблем с собственной растворимостью, дополнительный эффект вносят высокомолекулярные вещества, используемые для пролонгации, так как они ограничивают объем растворителя, контактирующего с активной субстанцией, находящейся в массе таблетки, и тем самым могут замедлять ее растворение и высвобождение из матрицы [10–14].

Большое значение этот факт имеет для субстанций 2 класса по биофармацевтической классификационной системе (БКС), поскольку ввиду невысокой собственной растворимости количество растворителя, контактирующего с субстанцией, будет иметь немаловажное значение для скорости растворения и высвобождения из матричной таблетки.

При этом растворимость вещества можно рассматривать как функцию нескольких параметров: низкой скорости растворения субстанции ввиду высокой энергии кристаллической решетки (темпера-

туры плавления) и гидрофобности (липофильности) вещества:

$$\text{Log } S_w = 0{,}5 - \log P - 0{,}01 \times (MP - 25), \quad (1)$$

где Log S_w – растворимость вещества в воде; Log P – коэффициент распределения октанол/вода – логарифм отношения концентраций неионизированной субстанции в системе двух несмешивающихся жидкостей (н-октанола и воды), показатель, характеризующий липофильность вещества; MP – температура плавления вещества в Кельвинах (°K) [15].

Уравнение (1) позволяет полуэмпирическим способом предварительно проводить оценку растворимости вещества и влияния энергии кристаллической решетки, а также свойств гидрофильности/гидрофобности на его растворимость. Сопоставляя эти параметры между собой, можно сделать выводы о степени влияния того или иного фактора на растворимость и, соответственно, подобрать наиболее оптимальный способ ее улучшения.

Субстанция глибенкламида относится ко 2 классу по БКС, характеризуется малой растворимостью и высокой проницаемостью [17].

Основные свойства глибенкламида приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Основные свойства субстанции глибенкламида [16, 17]

Показатель	Значение
Растворимость в воде	4,7 мг/л (при 27 °C)
Температура плавления	169 °C
Log P	4,7

Анализируя данные параметры, в соответствии с уравнением (1) можно заключить, что растворимость глибенкламида в равной степени обусловлена относительно высокой гидрофобностью и высокой температурой плавления.

Таким образом, можно предположить, что факторами, определяющими скорость высвобождения глибенкламида из матричной таблетируемой лекарственной формы, будет не только размер частиц активной субстанции, но и наличие в составе таблетки веществ, уменьшающих поверхностное натяжение и улучшающих смачиваемость субстанции глибенкламида.

В данной работе приведены результаты исследования влияния размера частиц активной субстанции на скорость высвобождения из пролонгированной формы [18, 19], а также влияние совместного измельчения с гидроксиэтилцеллюлозой [20, 21] на скорость высвобождения глибенкламида из таблеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанция глибенкламида (Ultratech limited, Индия), предоставленная ОАО «Мосхимфармпрепараты».

Лактоза 80 меш (Lactopress 80, Meggle).

Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ-102, FMC Biopolymer).

Кремния аэросил коллоидный (Aerosil A380, Evonik).

Магния стеарат (Magnesia).

Гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ Benecel K100 LV PH Pharm).

Гидроксиэтилцеллюлоза (ГЭЦ Natrosol 250M Pharm) и коповидон (Plasdone S-630), предоставленные компанией Ashland.

Измерение распределения размеров частиц

Проводилось на лазерном анализаторе размера частиц Sympatec Helos (Sympatec GmbH, Германия) с использованием программного обеспечения Windox (Sympatec GmbH, Германия). Давление сжатого воздуха 0,5 бар. Диапазон измерения размера частиц от 0,1 до 1750 мкм.

Получение таблеток

На роторном таблеточном прессе Bosch XSpress наработаны 3 различные серии глибенкламида с идентичным составом:

состав 1 включает в себя неизмельченную субстанцию глибенкламида;

состав 2 включает в себя измельченную субстанцию глибенкламида;

состав 3 включает в себя субстанцию глибенкламида, измельченную совместно с гидроксиэтилцеллюлозой в соотношении 1:7,5 (в этом соотношении вещества входят в составы таблеток 1 и 2).

Оценка показателей качества таблеток

Среднюю массу, прочность и высоту таблеток, полученных при усилии прессования 15 кН, определяли на 20 таблетках с помощью прибора Dr Schleuniger Pharmatron SmartTest 50 (Sotax AG, Швейцария), оснащенного модулями для измерения веса, прочности и высоты.

Количественное определение глибенкламида

Проводили в соответствии с ГФ XIII [22, 23] на спектрофотометре Specord 200 plus (Analytik Jena AG, Германия), совмещенном с программным обеспечением Win ASPECT PLUS (ver. 4.1, Analytik Jena AG, Германия). Количественное содержание глибенкламида оценива-

лось с помощью калибровочной кривой, построенной на растворе субстанции глибенкламида в диапазоне концентраций 1–25 мкг/мл.

Построение калибровочной кривой

Точную навеску 25 мг глибенкламида переносили в мерную колбу объемом 100 мл. В колбу прибавляли 80 мл метанола и встряхивали до полного растворения глибенкламида, после чего доводили раствор до метки метанолом. Данный раствор с концентрацией 250 мкг/мл использовали для дальнейшего разведения.

5 мл раствора с концентрацией глибенкламида 250 мг/мл переносили в мерную колбу объемом 50 мл и доводили до метки метанолом. Соответственно 0,8; 1,6; 4; 8; 12; 16 и 20 мл полученного раствора с концентрацией 25 мг/мл переносили в мерную колбу объемом 20 мл и доводили до метки метанолом. Таким образом, получали растворы с концентрацией 1, 2, 5, 10, 15, 20 и 25 мкг/мл и строили калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации глибенкламида, который в дальнейшем использовали для определения количества глибенкламида в таблетках и профиля высвобождения.

Количественное определение глибенкламида в таблетках

20 таблеток глибенкламида измельчали в фарфоровой ступке. Навеску 25 мг растертых таблеток переносили в мерную колбу объемом 50 мл и доводили до метки метанолом. После обработки ультразвуком в течение часа раствор отфильтровывали через полипропиленовый фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Оптическую плотность полученного раствора измеряли с помощью УФ-спектрофотометра в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор навески таблеток плацебо в метаноле; длина волны 300 нм.

Тест «Растворение»

Тест проводили в соответствии с ГФ XIII [22, 23]. Для теста «Растворение» применялся прибор «Лопастная мешалка» Sotax AT-7 smart (Sotax AG, Швейцария), 75 об/мин, с использованием спектрофотометра Specord 200 plus и программного обеспечения WinASPECT PLUS. В качестве среды растворения использовался фосфатный буфер с pH=8, молярный состав буфера: 0,067 М раствор Na_2HPO_4 и 0,067 М раствор KH_2PO_4 в соотношении 96:4 по объему, объем среды 500 мл. В колбу № 7 аппарата для растворения помещали таблетку плацебо, пробы которой использовались в качестве раствора сравнения в каждой точке контроля. Отбор проводили через 1, 2, 4, 8, 12 и 24 ч после начала теста, объем проб 10 мл с восполнением объема, полученные пробы отфильтровывали через полипропиленовый фильтр с размером пор 0,45 мкм. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при 300 нм с помощью УФ-спектрофотометра в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор навески таблеток плацебо в среде растворения (буферный раствор с pH=8).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Размер частиц как активной субстанции, так и полимера для пролонгации может существенно повлиять на профиль пролонгации и биодоступность, и поэтому этот параметр нужно закладывать при разработке пролонгированной лекарственной формы как одну из точек контроля [24, 25].

В случае когда субстанции имеют малую растворимость, обусловленную в том числе высокой энергией кристаллической решетки, уменьшение размера кристалла соответственно приводит к ускорению растворения. Также при уменьшении размера частиц существенно повышается площадь контакта субстанции с растворителем, что тоже способствует более высокой скорости растворения [26].

Уменьшение размера частиц пролонгирующего полимера способствует более быстрой его гидратации (набуханию), что, в свою очередь, влияет на кинетику высвобождения. Также важно учитывать, что более однородный по распределению частиц полимер даёт более стабильные и воспроизводимые результаты, поскольку частицы с различным размером характеризуются различной скоростью набухания и это будет оказывать влияние на колебание профиля растворения [27–29].

В данном исследовании субстанция глибенкламида измельчалась совместно с гидроксиэтилцеллюлозой в соотношении, в котором компоненты входят в состав таблетки. Параллельно с этим были произведены измерения распределения размеров частиц для гидроксиэтилцеллюлозы, неизмельченной субстанции глибенкламида и измельченной без добавления каких-либо вспомогательных веществ.

На рисунках 1–4 приведены кривые распределения частиц активной субстанции.

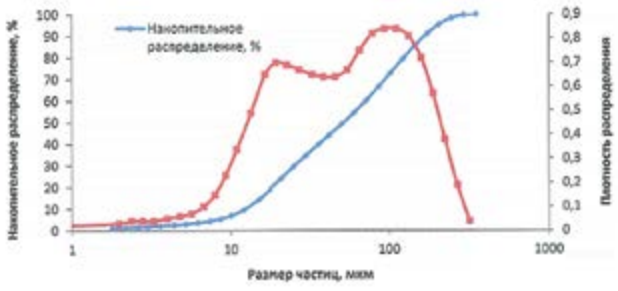


Рисунок 1. Кривые распределения частиц неизмельченной субстанции глибенкламида

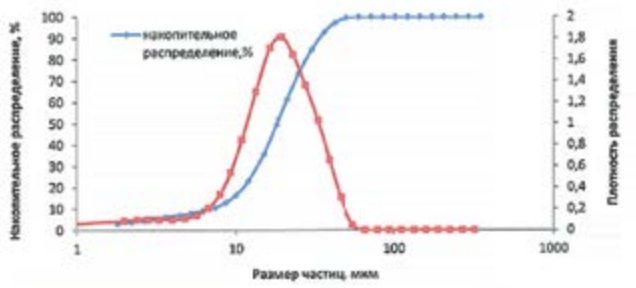


Рисунок 2. Кривые распределения частиц измельченной субстанции глибенкламида

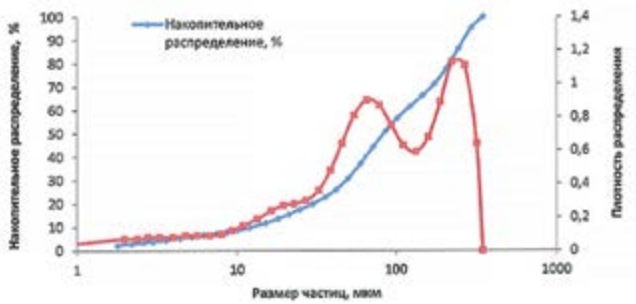


Рисунок 3. Кривые распределения частиц субстанции глибенкламида, измельченной совместно с гидроксиэтилцеллюлозой (Natrosol 250 G pharm)

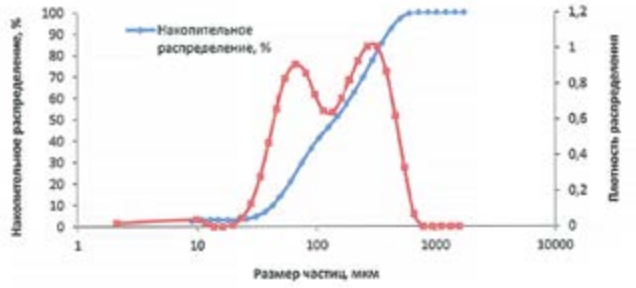


Рисунок 4. Кривые распределения частиц неизмельченной гидроксиэтилцеллюлозы

График накопительного распределения в первую очередь показывает, насколько корректно выбрана система линз, обеспечивает ли данный набор анализ всего образца. Для этого кривая на графике должна выходить из нуля и доходить до 100%

Плотность распределения показывает, какой тип распределения присутствует в образце, а также используется как идентификатор правильности выбора этих условий (давление воздуха, объем пробы).

Как видно, исходная субстанция глибенкламида характеризуется достаточно большим разбросом значений размеров частиц, что с учётом малой растворимости и небольшой дозировки может оказывать критическое влияние на скорость высвобождения и однородность результатов в зависимости от того, какая фракция будет преобладать в тестируемых образцах. Основная фракция равномерно распределена в большом диапазоне от 15 до 146 мкм, в котором находится примерно 70% субстанции, при этом также присутствуют кристаллы размером 200 мкм и более.

Измельченная субстанция глибенкламида характеризуется в среднем более мелким размером частиц и более узким диапазоном распределения, что должно положительным образом сказываться на результатах, поскольку значительно увеличивается площадь контакта с растворителем. Это способствует более быстрому высвобождению АФИ, а более однородное распределение размеров частиц будет способствовать большей однородности и воспроизводимости результатов. Основная фракция распределена в пределах 10–50 мкм – 85% субстанции, остальные 15% имеют размер менее 10 мкм, частиц крупнее 50 мкм в пробе не обнаружено.

На рисунке 3 наблюдается бимодальное распределение частиц, что соответствует профилю распределения частиц исходного образца гидроксиэтилцеллюлозы (рисунок 4), но при этом нужно отметить, что при сохранении характерного для гидроксиэтилцеллюлозы графика распределения частиц уменьшилась фракция крупных частиц, в частности для «чистой» гидроксиэтилцеллюлозы фракция более 300 мкм составляла около 20%. В гидроксиэтилцеллюлозе, измельченной совместно с субстанцией, данная фракция отсутствует, в целом в образце гидроксиэтилцеллюлозы, измельченной совместно с субстанцией, практически отсутствует мелкая фракция до 15 мкм, характерная для измельченной субстанции глибенкламида.

Получение таблеток глибенкламида

Для оценки результатов воздействия измельченности, в том числе и совместного с пролонгирующим полимером, были приготовлены таблетки, у которых определен профиль высвобождения для каждого из вариантов механически обработанной субстанции глибенкламида в сравнении с неизмельченной субстанцией.

В составах 1 и 2 неизмельченную и измельченную субстанции глибенкламида соответственно смешивали с навеской гидроксиэтилцеллюлозы; к смеси добавляли остальные компоненты: лактозы моногидрат (таблеттоза-80), микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ Avicel ph 102), гипромеллозу (ГПМЦ Benecel K 100 LV PH PRM), коповидон (Plasdon S-630) и кремния диоксид коллоидный (Aerosil A380); полученную смесь просеивали через сито с диаметром отверстий 500 мкм и смешивали в коническом миксере Erweka AR400 в течение 15 мин; затем к полученной смеси добавляли просеянный через сито с диаметром отверстий 200 мкм магния стеарат и смешивали дополнительно в течение 3 мин.

Полученную массу таблетировали в таблетки диаметром 8 мм с массой 250±18,75 мг. Для оценки профи-

ля высвобождения глибенкламида использовались таблетки, спрессованные при усилии прессования 15 кН.

Для образца таблеток состава 3 субстанция глибенкламида предварительно измельчалась совместно с навеской гидроксиэтилцеллюлозы. В дальнейшем вся процедура их получения была идентична описанной выше.

Оценка качества таблеток

Результаты для таблеток глибенкламида, спрессованных при усилии прессования 15 кН, представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Основные показатели таблеток глибенкламида при усилии прессования15 кН

		Состав 1	Состав 2	Состав 3
Вес таблеток, мг	**Среднее значение**	**250,0**	**250,4**	**251,5**
	Минимум	244,8 (–2,08%)	245,6 (–1,92%)	246,1 (–2,15%)
	Максимум	254,1 (+1,64%)	254,4 (+1,60%)	254,4 (+1,15%)
Прочность таблеток, Н	**Среднее значение**	**144**	**147**	**146**
	Минимум	125 (–13,2%)	131 (–10,88%)	135 (–7,53%)
	Максимум	162 (+12,5%)	166 (+12,93%)	153 (+4,49%)
Высота таблеток, мм	**Среднее значение**	**4,67**	**4,66**	**4,68**
	Минимум	4,61 (–1,28%)	4,59 (–1,53%)	4,62 (–1,28%)
	Максимум	4,74 (+1,50%)	4,72 (+1,29%)	4,71 (+0,64%)

Образцы таблеток глибенкламида, полученные при усилии 15 кН, обладали практически одинаковыми показателями прочности, высоты и средней массы.

Количественное определение глибенкламида [30, 31]

Результаты представлены в таблице 3.

Результаты показывают, что количественное содержание соответствует требованиям, предъявляемым различными мировыми фармакопеями (ГФ XIII, USP 36) и нормативными документами (НД) на маннинил [32], диапазон отклонений находится в пределах ±5%, также демонстрируя хорошую однородность дозирования. При этом надо отметить, что образцы таблеток, содержащие субстанцию глибенкламида, измельченную с гидроксиэтилцеллюлозой, показали более высокий результат при количественном определении.

Таблица 3.

Количественное определение глибенкламида

	Среднее значение	Отклонения	
		минимум	максимум
Состав 1: неизмельченная субстанция глибенкламида	4,88 мг (–2,4% от номинала)	4,77 мг (–4,6%)	4,98 (–0,4%)
Состав 2: измельченная субстанция глибенкламида	4,89 мг (–2,2% от номинала)	4,88 мг (–2,4%)	4,90 мг (–2,0%)
Состав 3: измельченная совместно с гидроксиэтилцеллюлозой субстанция глибенкламида	5,03 мг (+0,6% от номинала)	4,86мг (–2,8%)	5,08 мг (+1,6%)

Тест «Растворение»

Анализ литературных данных показал, что USP 36 содержит 5 различных рекомендуемых методик для определения растворения глибенкламида [33]. В НД на Маннинил включена методика, не соответствующая ни одному из рекомендованных вариантов USP 36, при этом все они используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии и предназначены для определения растворения таблеток глибенкламида с немедленным высвобождением. В литературе описаны способы контроля с использованием УФ-спектрофотометрии [30, 31, 34], на основании этих данных была разработана методика определения растворения глибенкламида с использованием УФ-спектрофотометрии. Результаты высвобождения глибенкламида из таблетки пролонгированного действия приведены на рисунке 5.

Из результатов видно, что в целом высвобождение из образцов с субстанцией глибенкламида, измельченного совместно с гидроксиэтилцеллюлозой, идет быстрее, чем из двух других образцов. Различие невелико в первые часы, однако в дальнейшем различие в скорости высвобождения увеличивается. В течение 12 часов сохраняется линейный профиль высвобождения глибенкламида. При этом за 12 часов только из таблеток состава 3 растворение глибенкламида достигло 80%, аналогичный показатель для таблеток, приготовленных из неизмельченной субстанции, не

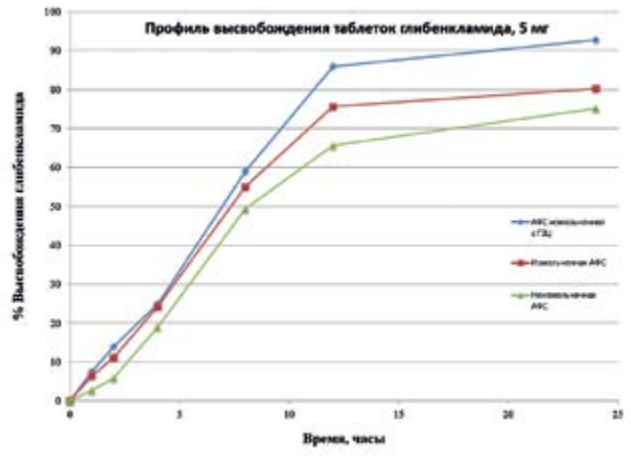


Рисунок 5. Профили высвобождения глибенкламида из образцов таблеток разного состава

достиг 80% и за 24 ч. По-видимому, данное различие по отношению к результатам с использованием «чистой» субстанции обусловлено присутствием гидроксиэтилцеллюлозы, которая, помимо пролонгирующего агента, выступает также в роли солюбилизатора и полимерного носителя малорастворимой АФИ, в результате чего за счёт снижения поверхностного натяжения обеспечивается лучшая смачиваемость АФИ, одновременно с быстрой гидратацией достигается более скоростной и длительный контакт АФИ с растворителем, что способствует более быстрому и более полному относительно использования «чистой» АФИ высвобождению из матричной пролонгированной формы. При этом количественное содержание и однородность дозирования во всех случаях соответствовали требованиям ГФ XIII. И очевидно, что разница в высвобождении субстанции глибенкламида из сравниваемых образцов не может быть объяснена меньшей дозировкой или неоднородным распределением и находится в прямой взаимосвязи со способом ее предварительной обработки или отсутствием таковой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных результатов следует, что при разработке состава таблеток глибенкламида 5 мг, пролонгированного действия, размер частиц используемых субстанций имеет важное значение для профиля высвобождения АФИ. С учетом большого разброса по размерам частиц исходной субстанции ее измельчение является необходимым, но недостаточным условием получения заданного профиля растворения, равно как и полного высвобождения АФИ из матрицы. Результаты, полученные при совместном измельчении АФИ с гидроксиэтилцеллюлозой, показывают значительно лучшие результаты, которые соответствуют заявленному профилю высвобождения. Реализованные в работе подходы в целом могут быть применены и к другим малорастворимым активным веществам при разработке пролонгированных таблетированных форм для улучшения скорости их растворения и более полного извлечения из таблеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. K. Wu, J. Li. Formation and characterization of solid dispersions of piroxicam and polyvinylpyrrolidone using spray drying and precipitation with compressed antisolvent // Journal of pharmaceutical sciences. 2009. V. 98(7). P. 2422–2431.
2. S. Kumar, J. Shen, D.J. Burgess. Nano-amorphous spray dried powder to improve oral bioavailability of itraconazole // Journal of Controlled Release. 2014. V. 192. P. 95–102.
3. B. Chauhan, S. Shimpi, A. Padarkar. Preparation and evaluation of glibenclamide-polyglycolized glycerides solid dispersions with silicon dioxide by spray drying technique // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2005. V. 26(2). P. 219–230.
4. E. Gue, S. Muschert, J.F. Willart, F. Danede, M. Descamps, E. Delcourt-Debruyne, J. Siepmann. Accelerated fenofibrate release from spray-dried microparticles based on polymer blends // Journal of drug delivery science and technology. 2014. V. 24(2). P. 185–190.
5. J. Fu, L. Xu, X. Wang, S. Zhang, X. Tao, X. Zhao, H. He, X. Tang. Nimodipine (NM) tablets with high dissolution containing NM solid dispersions prepared by hot-melt extrusion // Drug Development and Industrial Pharmacy. 2011. V. 37(8). P. 934–944.
6. R.K. Rajeswari, K. Abbulu, M. Sudhakar. Development, characterization and solubility study of solid dispersion of Valsartan // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2014. V. 3(1). P. 180–187.
7. D.S. Johes, D.N. Margetson, M.S. McAllister, Y. Tao, S. Li, C.P. McCoy, G.P. Andrews. Thermodynamically stable amorphous drug dispersions in amorphous hydrophilic polymers engineered by hot melt extrusion // Chemical Engineering Research and Design. 2014. V. 92(12). P. 3046–3054.
8. P.C. Senapati, S.K. Sahoo, A.N. Sahu. Mixed surfactant based (SNEDDS) self-nanoemulsifying drug delivery system presenting efavirenz for enhancement of oral bioavailability // Biomedicine & Pharmacotherapy. 2016. V. 80. P. 42–51.
9. U. Paaver, V. Matto, P. Veski. Effect of non-ionic surfactants on the dissolution of poorly soluble drugs // European journal of pharmaceutical sciences. 2007. V. 32(1). P. 34–35.

10. C. Maderuelo, A. Zarzuelo, J. M. Lanao. Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices // Journal of Controlled Release. 2011. V. 154. P. 2–19.
11. L. Yang, R. Fassihi. Examination of drug solubility, polymer types, hydrodynamics and loading dose on drug release behavior from a triple-layer asymmetric configuration delivery system // International Journal of Pharmaceutics. 1997. V. 155. P. 219–229.
12. S. Ensslin, K.P. Moll, K. Paulus, K. Mader. New insight into modified release pellets – Internal structure and drug release mechanism // Journal of Controlled Release. 2008. V. 128. P. 149–156.
13. S. Conti, L. Maggi, L. Segale, E. Ochoa Machiste, U. Conte, P. Grenier, G. Vergnault. Matrices containing NaCMC and HPMC. Swelling and release mechanism study// International Journal of Pharmaceutics 2007. V. 333. P. 143–151.
14. D.S. Roy, B.D. Rohera. Comparative evaluation of rate of hydration and matrix erosion of HEC and HPC and study of drug release from their matrices // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2002. V. 16. P. 193–199.
15. S. Yalkowsky, S.C. Valvani. Solubility and Partitioning. I: Solubility of Nonelectrolytes in Water // Journal of Pharmaceutical Sciences. 1980. V. 69(8). P. 912–922.
16. http://www.drugbank.ca/drugs/DB01016 (дата обращения 04.03.2016).
17. Analytical profiles of drug substances: Glibenclamide / Ed. by Klaus Florey. – New Jersey: Academic Press. 1981. 727 p.
18. Z.H. Loh, A.K. Samanta, P.W.S. Heng. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs // Asian journal of pharmaceutical sciences. 2015. V. 10. P. 255–274.
19. P. Khadka, J. Ro, H. Kim, I. Kim, J. T. Kim, Hyunil Kim, J.M. Cho, G. Yun, J. Lee. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability // Asian journal of pharmaceutical sciences. 2014. V. 9. P. 304–316.
20. J. Lee, J.Y. Choi, C.H. Park. Characteristics of polymers enabling nano-comminution of water-insoluble drugs // International journal of pharmaceutics. 2008. V. 355. P. 328–336.
21. R. Chen, C. Yi, H. Wu, S. Guo. Degradation kinetics and molecular structure development of hydroxyethyl cellulose under the solid state mechanochemical treatment // Carbohydrate Polymers. 2010. V. 81. P. 188–195.
22. ОФС 1.4.1.0015.15. Таблетки // Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. – М., 2015.
23. ОФС 1.4.2.0014.15. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм // Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. – М., 2015.
24. H. Liu, L.S. Taylor, K.J. Edgar. The role of polymers in oral bioavailability enhancement: a review // Polymer. 2015. V. 77. P. 399-415.
25. N.S. Abbas, M. Amin, M.A. Hussain, K.J. Edgar, M.N. Tahir, W. Tremel. Extended release and enhanced bioavailability of moxifloxacin conjugated with hydrophilic cellulose ethers // Carbohydrate Polymers. 2016. V. 136. P. 1297–1306.
26. W.H. De Jong, P.J.A. Borm. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards // International journal of nanomedicine. 2008. V. 3(2). P. 133–149.
27. K. Mitchell, J.L. Ford, D.J. Armstrong, P.N.C. Elliott, J.E. Hogan, C. Rostron. The influence of the particle size of hydroxypropylmethylcellulose K15M on its hydration and performance in matrix tablets // International Journal of Pharmaceutics, 1993. V. 100. P. 175–179.
28. P.W.S. Heng, L.W. Chan, M.G. Easterbrook, X. Li. Investigation of the influence of mean HPMC particle size and number of polymer particles on the release of aspirin from swellable hydrophilic matrix tablets // Journal of Controlled Release. 2001. V. 76. P. 39–49.
29. M.V. Velasco, J.L. Ford, P. Rowe, A.R. Rajabi-Siahboomi. Influence of drug: hydroxypropylmethylcellulose ratio, drug and polymer particle size and compression force on the release of diclofenac sodium from HPMC tablets // Journal of Controlled Release. 1999. V. 57. P. 75–85.
30. C. Eapen, V.G. Prasanth, A. Rai. Development of UV Spectrometric Method of Glibenclamide (Glyburide) in Bulk and Pharmaceutical Formulations // International Journal of ChemTech Research. 2012. V. 4(1). P. 356-360.
31. V.V. Karkhanis, A.D. Captain, P.H. Patel. Development and Validation of UV Spectrophotometric method for estimation of Glibenclamide in bulk and Pharmaceutical dosage forms // Journal of Pharmacy Research Biomed Rx. 2013. V. 1(1). P. 1–3.
32. НД 42-3120-05. Манинил 3,5 мг. 2005.
33. The Unired States Pharmacopeial Convention. USP 36 NF-31.2013.
34. E. Aparecida dos Santos Gianotto, R. Pires Arantes, M.J. Lara-Filho, A.C. Saraiva. Casimiro Filho, M.M. Fregonezi-Nery. Dissolution test for glibenclamide tablets // Quimica Nova. 2007. V. 30(5). P. 1218–1221.

ГК "ФАРМКОНТРАКТ" –
ЭКСКЛЮЗИВНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР КОРЕЙСКОЙ КОМПАНИИ **SEJONG PHARMATECH** В РОССИИ

Сушилка
в псевдосжиженном слое

D5Lm

- Функции установки D5L
- Производительность 1, 3, 5 л
- Экономичная технологическая линия

Высокоскоростной миксер

SM5C

- Смешивание, микрогранулирование, гранулирование
- Сменные емкости 1, 3 и 5 л

Установка псевдоожиженного
слоя сушки-грануляции

D5L

- Система быстрого сброса давления с пределом 12 бар
- Производительность 1 – 5 л
- Возможность реализации процессов нижнего и верхнего распыления

Optimized Technology
VANTIX

Лабораторная серия оборудования для таблетирования, капсулирования, сушки и грануляции

стр. 269

Таблеточные прессы серии P

P130S

- Система HMI, ПО отвечает требованиям FDA и 21CFR часть 11
- Комбинированный ротор B/D
- Система автоматического регулирования веса таблеток

Коатер серии C

C30FC

- Сменные полностью перфорированные драже-ровочные котлы
- Настройка распылительного пистолета
- Производительность 0,4 – 6,3 кг

Установка псевдоожиженного
слоя сушки-грануляции

C30JC

- HEPA-фильтр для выбрасываемого воздуха
- Система CIP
- Автоматическая выгрузка таблеток
- Производительность 0,4 – 6,3 кг

Pharmcontract®
group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 800 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
info@phct-group.com

УДК 536.45, 679.826

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СВОЙСТВА ГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ДЕТОНАЦИОННЫХ НАНОАЛМАЗОВ КАК СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Р.Ю. Яковлев[1,2]*, И.И. Кулакова[2], Г.А. Бадун[2], Г.В. Лисичкин[2], А.В. Валуева[1], Н.Г. Селезенев[1], Н.Б. Леонидов[1]

1 – ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 390026, Россия, г. Рязань, ул. Высоковольтная, 9

2 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, 1

1 – I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, 9, Vysokovol'tnaya str., Ryazan, 390026, Russia

2 – M.V. Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory str., Moscow, 119991, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: yarules@yandex.ru
Тел.: 8 (499) 126 32 81

Резюме. Освещены основные вопросы разработки систем доставки лекарственных веществ нового поколения как гибридных наноматериалов: выбор наноносителя, его стандартизация и способ иммобилизации биологически активных и лекарственных веществ. Выявлены основные органы распределения и кумуляции перспективного углеродного наноносителя – детонационного наноалмаза. Показано повышение эффективности антигипоксического действия конъюгата наноалмаз – глицин по сравнению с нативным глицином и препаратом сравнения – мексидолом.

Ключевые слова: системы доставки, наноноситель, углеродные наночастицы, детонационный наноалмаз, иммобилизация лекарственных веществ, гибридные наноматериалы.

PHYSICAL-CHEMICAL PRINCIPLES OF THE PREPARATION OF HYBRID MATERIALS ON THE BASIS OF DETONATION NANODIAMONDS AS A NEW GENERATION DRUG DELIVERY SYSTEMS AND THEIR PROPERTIES

R.Y. Yakovlev[1,2]*, I.I. Kulakova[2], G.A. Badun[2], G.V. Lisichkin[2], A.V. Valueva[1], N.G. Selezenev[1], N.B. Leonidov[1]

Abstract. There were illustrated the main questions of development of new generation drug delivery systems as hybrid nanomaterials as follows: selection of nanocarrier, its standardization and the methods of immobilization of biologically active and medicinal substances. The basic organs of distribution and accumulation of advanced carbon nanocarrier – detonation nanodiamond were identified. It was shown that antihypoxic effect of the nanodiamond-glycine conjugate increased in comparison with a native Glycine and Mexidolum® as reference drugs.

Keywords: drug delivery systems, detonation nanodiamond, nanocarrrier, carbon nanoparticles, immobilization drugs, hybrid nanomaterials.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений фармации и медицины является создание систем доставки лекарственных веществ (ЛВ) [1]. Такие системы позволяют повысить эффективность ЛВ и снизить токсические эффекты за счёт уменьшения дозировки. В качестве носителей – платформ для ЛВ применяют наноконтейнеры и наночастицы [1, 2]. На сегодняшний день наибольшее развитие в этом направлении получили липосомы [3]. Однако их применение сопряжено с низкой стабильностью и малым сроком хранения. Поэтому интерес исследователей смещается в сторону наночастиц, на поверхности которых могут быть иммобилизованы биологически активные вещества (БАВ). Среди наноматериалов, предложенных на роль носителей, особое место занимают углеродные наноструктуры – фуллерены, нанотрубки, графен и детонационный наноалмаз (ДНА). Методы синтеза этих наночастиц хорошо разработаны, и их химические, физико-химические и фармакологические характеристики достаточно изучены [4, 5]. Однако фуллерены и нанотрубки обладают существенной токсичностью и широким спектром побочных эффектов [6]. Поэтому в последние годы одним из наиболее перспективных и безопасных углеродных наноматериалов для применения в качестве носителя БАВ и ЛВ признается ДНА. В ряде работ была показана нетоксичность и биосовместимость ДНА наряду с его способностью проникать через биобарьеры, включая гематоэнцефалический. В отличие от других углеродных наноматериалов в настоящее время только ДНА получают в промышленных масштабах (тонны в год). Поэтому целью работы является анализ фи-

зико-химических подходов к разработке на основе детонационных наноалмазов эффективных систем доставки БАВ и ЛВ нового поколения.

ДЕТОНАЦИОННЫЙ НАНОАЛМАЗ

При детонации взрывчатых веществ с отрицательным кислородным балансом в неокислительной среде образуется алмазосодержащий конденсированный углерод, из которого путем окислительной обработки выделяют ДНА [7]. Условия детонационного синтеза обусловливают сферическую форму и малый размер (2–10 нм) первичных алмазных частиц. Эти частицы имеют химически инертное алмазное ядро, покрытое нарушенной углеродной оболочкой, с которой связан слой поверхностных функциональных групп [8, 9] (рисунок 1).

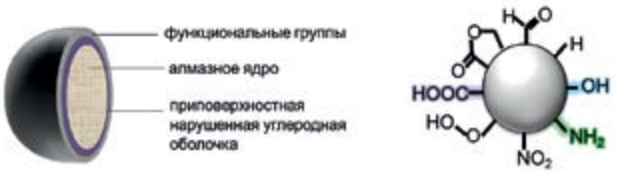


Рисунок 1. Структура первичной частицы ДНА и функциональные группы на его поверхности [9]

Высокая концентрация последних позволяет использовать широкий спектр химических реакций для функционализации (химического модифицирования) поверхности алмазных наночастиц [10–12].

Стандартизация и унифицирование образцов ДНА. Пока практическое использование ДНА в биомедицинских приложениях ограничено из-за отсутствия стандартизации промышленно выпускаемых образцов. Физико-химические характеристики образцов могут различаться не только для ДНА разных торговых марок, но и разных партий одной торговой марки. В связи с этим была разработана методика высокотемпературной обработки ДНА газообразным водородом [13], приводящей к унифицированию химии поверхности и способности ДНА в одинаковых условиях образовывать стабильные гидрозоли с близкими размерами агрегатов. Дополнительно был разработан способ кислотно-щелочной доочистки промышленных образцов ДНА, позволяющий удалять примеси железа, серосодержащих соединений и нитрат-анионов [14].

Изменение химического состояния поверхности ДНА. Рядом исследователей показано, что химический состав поверхностных групп ДНА может влиять на его взаимодействие с клетками и клеточными органеллами, на токсичность и способность иммобилизовывать ЛВ. Поэтому были разработаны новые или оптимизированы созданные ранее методики получения ДНА с различной химией поверхности (рисунок 2) [15]. Также были предложены методики ковалентной прививки реагентов разной химической природы на поверхность ДНА (рисунок 3) [16].

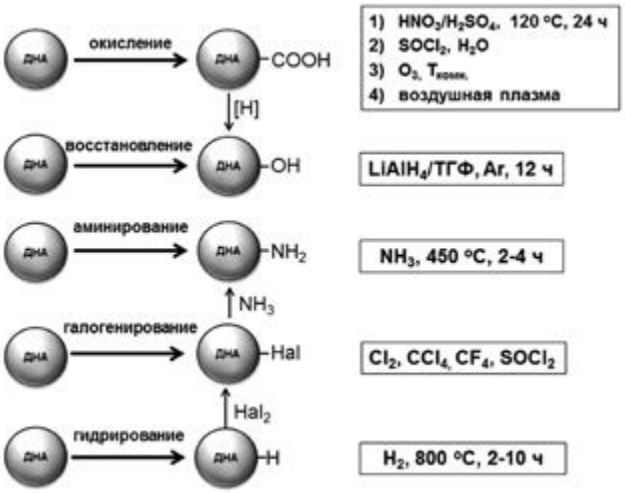


Рисунок 2. Схема различных видов функционализации поверхности ДНА [16]

ПОДГОТОВКА ДНА ДЛЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для эффективного применения ДНА в медико-биологических исследованиях был разработан способ получения стабильных гидрозолей ДНА с определенным размером агрегатов [13], заключающийся в чередовании циклов ультразвуковой обработки и центрифугирования. Это открыло возможность применения методов спектрофотометрии и флуориметрии для определения концентрации гидрозолей ДНА. На этой основе был впервые разработан химико-аналитический подход к определению концентрации ДНА в воде и в водных средах от 1 нг с использованием комплекса четырех физико-химических методов (гравиметрия, УФ-спектрофотометрия, флуориметрия и пьезокварцевое взвешивание) [17].

Создание систем доставки ЛВ невозможно без выяснения их специфической активности, токсичности, способности проникать в клетки, органы и ткани, динамики накопления в организме и выведения из него. Были разработаны и запатентованы способы визуализации ДНА – использование собственной или приобретенной люминесценции, введение на поверхность ДНА радиоактивной (тритий) или рентгеноконтрастной (3,4,6-трийодбензиловый спирт) меток [16]. Показано, что использование наноалмаза с тритиевой меткой возможно в любых экспериментах *in vitro* и *ex vivo*. На сегодняшний день этот метод визуализации ДНА является лучшим по своим характеристикам [18].

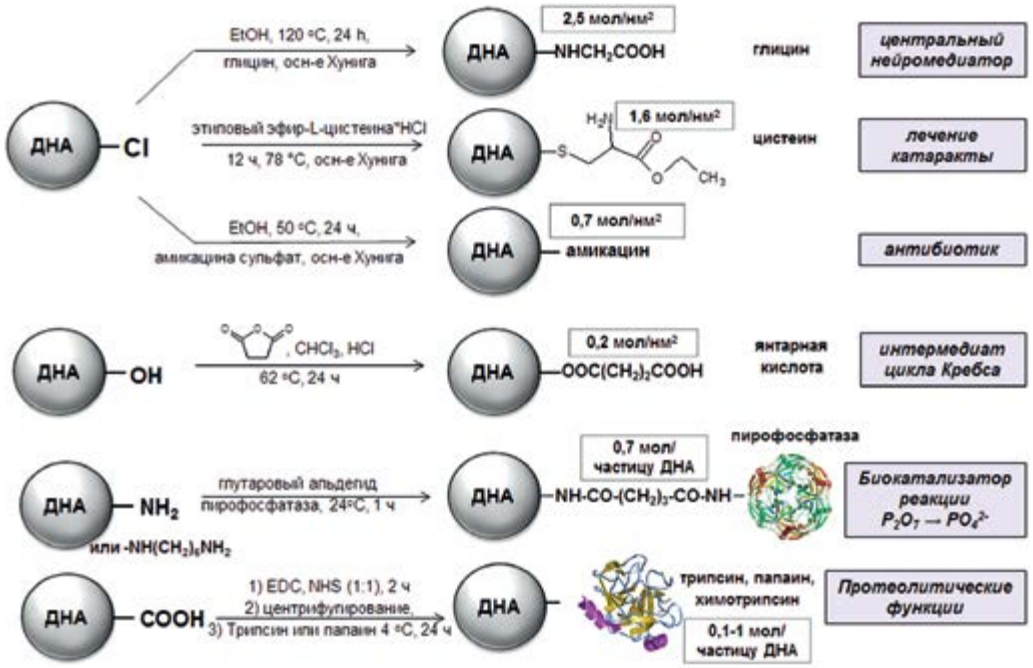


Рисунок 3. **Примеры ковалентной прививки БАВ и ЛВ на поверхность ДНА [16]**

Проникновение ДНА в клетки. Изучение мембранного транспорта ДНА показало, что частицы проникают в клетки уже через 15 мин инкубации (рисунок 4). Скорость проникновения ДНА в клетки уменьшается в ряду ДНА > ДНА – амикацин > ДНА – глицин. Следовательно, ковалентное связывание ДНА с глицином не препятствует связыванию с мембраной клетки частиц ДНА, но осложняет проникновение конъюгата внутрь клетки. Показано, что частицы ДНА, находясь внутри клетки, сформированы в цепочечные агрегаты, которые не окружены мембраной (свободно лежат в цитоплазме). При этом ДНА не проникает в ядро или митохондрии при коротких временах инкубации. Однако через 24 ч частицы ДНА были обнаружены в ядре, что может быть связано с митозом (делением клетки) [19].

Токсичность ДНА. В работе установлено, что при однократном внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c показатели LD_{50} составляют: для ДНА – 3420±414, глицина – 4100±300,9 и конъюгата ДНА – глицин – 2730±250 мг/кг соответственно. При этом конъюгат ДНА – глицин несколько токсичнее отдельных ДНА и глицина. Однако все эти вещества можно отнести к IV классу малотоксичных веществ.

В результате исследования побочного действия на организм животного конъюгата ДНА – глицин при внутрибрюшинном введении мышам линии BALB/c в дозах 75, 150 и 225 мг/кг установлено, что он не вызывал признаков интоксикации и гибели животных на протяжении 14 сут. Конъюгат ДНА – глицин также не вызывал у мышей изменения шерстяного покрова, состояния слизистых оболочек. При этом отсутствовали птоз верхнего века, повышенная уринация, дефекация,

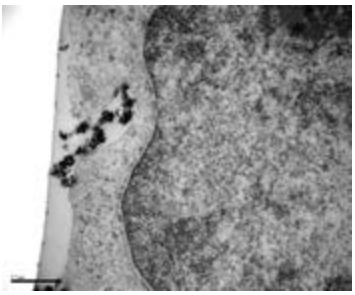


Рисунок 4. **Проникновение ДНА в клетку через 15 мин инкубации. На рисунке показана инвагинация мембраны при подходе к ней частиц ДНА [19]**

саливация, пилоэрекция, вокализация, боковое положение. В пределах нормы были ритм и глубина дыхательных движений, отсутствовали агрессивность, пугливость, тремор, судороги, каталепсия, стереотипия и груминг. Не наблюдалось изменения позы. У животных были сохранены пинеальный, роговичный и болевой рефлексы. На протяжении всего времени наблюдения экспериментальные животные удерживались на перевернутой сетчатой платформе в течение 5 с [20].

Биораспределение ДНА. Методом рентгеновской компьютерной томографии (РКТ) с помощью ДНА с рентгеноконтрастной меткой удалось визуализировать циркуляцию данного конъюгата в кровеносной системе кролика. Однако чувствительности метода не хватило для его обнаружения в основных органах, так как повышение радиометрической плотности органов по Хаусфилду оказалось статистически недостоверным до и после введения конъюгата в организм [21]. Поэтому было решено определить рас-

пределение ДНА в органах кролика *ex vivo* методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) по изменению в них с течением времени концентрации йода [22]. Для этого органы животного переводили в жидкую фазу нагреванием в 1 М растворе едкого натра и непосредственно перед измерением проводили ультразвуковую обработку образцов. Результаты анализа биораспределения ДНА с йодной меткой представлены на рисунке 5.

Установлено, что достаточно быстрое (уже через 1 ч после введения) и максимальное кумулирование ДНА происходит в легких (до 30 мкг/г), меньшее – в селезенке (23 мкг/г). Максимальное содержание ДНА в других органах достигается медленнее: в печени и головном мозге – через сутки, а в почках в и сердце – на 15-е сутки. При этом в сердце и головном мозге накапливается до 6,5 мкг/г. Выводится ДНА, как следует из рисунка 5, из всех органов практически в течение месяца. Это открывает дополнительные возможности применения ДНА в биофармацевтической практике для разработки пролонгированных лекарственных форм [16].

Биораспределение ДНА с тритиевой меткой ([^{3}H]-ДНА) изучали в течение 24 ч при внутривенном введении в бедренную вену крыс при определении радиоактивности в 13 видах биологических жидкостей, тканях и органах (рисунок 6).

Чтобы наглядно изучить распределение ДНА по каждому виду ткани или органа, из графика были убраны легкие, поскольку накопление в них было максимально и на порядок превышало накопление в других органах и тканях (4,5, 6,2, 4,7, 5,8, 1,8 и 2,5% от введенной дозы на грамм органа соответственно). Количество ДНА в легких достигает 4,4% на грамм органа в течение 15 мин и повышается до 6,2% к 30 мин. Через 6 ч

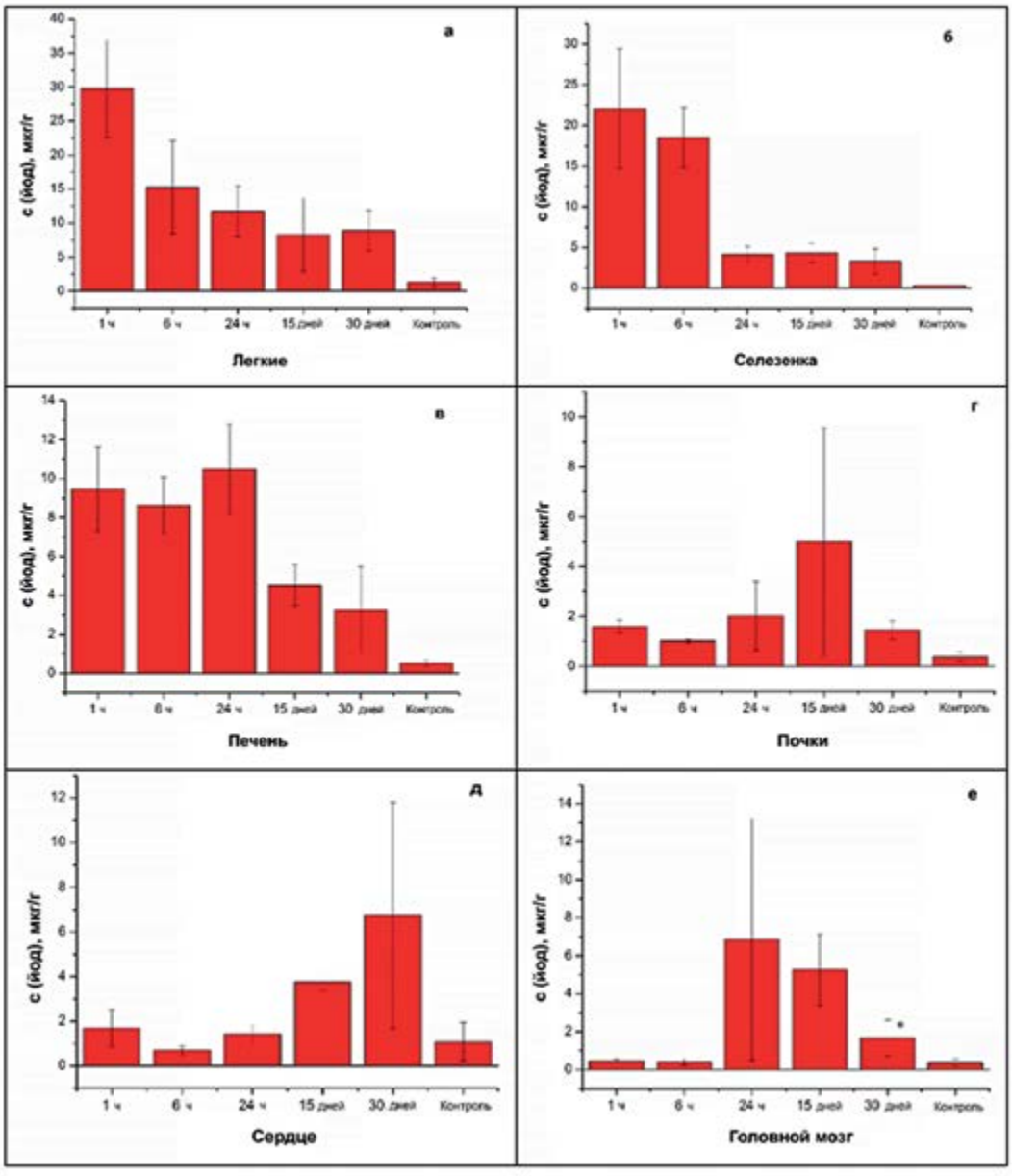


Рисунок 5. Динамика накопления и выведения ДНА по органам кролика (среднее по 5 животным) [16]

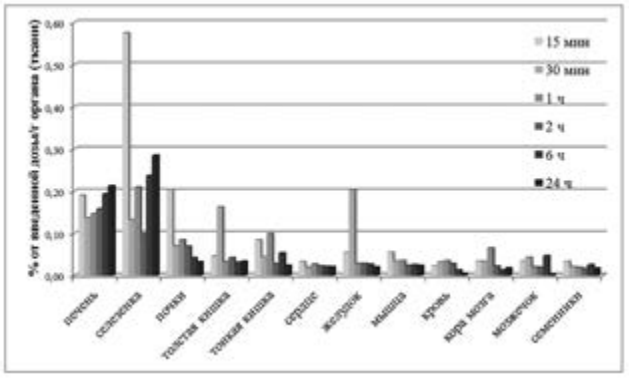


Рисунок 6. Биораспределение [^{3}H]-ДНА в организме крыс от 15 мин до 24 ч при внутривенном введении в бедренную вену (среднее по 2 животным)

количество частиц в легких снижается до 1,8%, а к 24 ч накапливается до 2,3%.

Следующим органом по количеству накопленного ДНА в течение 15 мин является селезенка, в которой через данный промежуток времени обнаруживается ДНА в количестве 0,6% от введённой дозы на грамм органа. ДНА проникает в почки уже через 15 мин после введения, после чего его концентрация постепенно снижается. Можно сделать вывод, что ДНА выводится через желудочно-кишечный тракт, в который он поступает через 30 мин после введения, и его концентрация увеличивается за это время в 4 раза – с 0,05 до 0,2% на грамм. В работе также была изучена фармакокинетическая кривая содержания ДНА в крови, концентрация которого с течением времени постепенно снижается. Таким образом, были определены основные органы накопления и выведения ДНА в организме крысы.

Синтез и свойства конъюгатов ДНА – БАВ и ДНА – ЛВ. Анализ молекулярной поверхности фермента неорганической пирофосфатазы (РРазы) показывает, что на ней расположено большое число аминогрупп, которые могут быть использованы для ковалентной пришивки к поверхности ДНА для получения системы доставки этого фермента в организм. Количество пришитого фермента составило 0,81±0,05 мг на 1 мг ДНА. Это определено по разности концентрации фермента в супернатанте до и после синтеза (при учете концентрации фермента в промывочной жидкости). Образцы иммобилизованной РРазы на ДНА имели большой средний размер частиц (до 1 μм) и отрицательный ζ-потенциал. Если предположить, что все частицы ДНА имеют размер 4,2 нм и содержат 7000 атомов углерода, из которых 1000 атомов (15%) находятся на поверхности, то к 2 частицам ДНА присоединяется 1 молекула РРазы. Взаимное положение ДНА и фермента в этом материале можно сравнить с булочкой с изюмом, где изюм (ДНА) составляет около 50%. Электронная микрофотография ДНА, полученная методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) до и после иммобилизации РРазы, представлена на рисунке 7 [23].

Так как молекула белка в основном состоит из углерода и других элементов с аналогичными атомными зарядами, электронные свойства ДНА и белка весьма близки и их трудно отличить с помощью метода ПЭМ. Тем не менее в поверхностном слое частиц можно наблюдать выраженное различие. Непосредственно частицы определяются благодаря узкому слою неупорядоченной материи, соответствующей, скорее всего, аморфному углероду. Кристаллическая природа, типичная для ядра наноалмаза, видна по рентгеновской дифрактограмме, показанной на рисунке 7 в качестве вставки. После иммобилизации РРазы (рисунок 7б) частицы ДНА сохраняют кристаллическую основу, но план становится размытым, что, вероятно, связано с толстым слоем неупорядоченной органической фазы на поверхности, включающей белковые молекулы. Можно предположить, что белковая молекула после иммобилизации сохраняет, по крайней мере, частичную способность к нековалентной адсорбции и служит звеном, соединяющим частицы ДНА, приводя к гибридному материалу типа «булочка с изюмом».

На микрофотографиях ПЭМ конъюгата ДНА – глицин в отличие от всех остальных образцов ДНА была зафиксирована оболочка вокруг частиц, которая имела размеры не более 1 нм [16]. По-видимому, это может свидетельствовать о большей доле молекул глицина, включенных в конъюгат (рисунок 8).

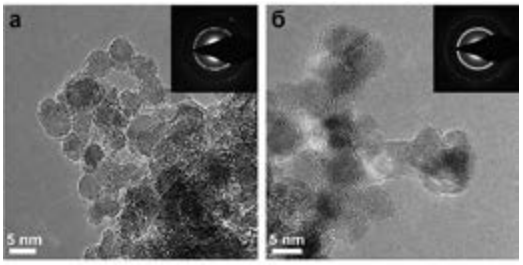


Рисунок 7. Микрофотография ПЭМ частиц ДНА до (а) и после (б) иммобилизации РРазы [23]

Конъюгат ДНА – глицин был охарактеризован методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) (таблица 1). Как видно из данных таблицы 1, происходит существенное увеличение содержания азота на поверхности ДНА, что свидетельствует о прививке глицина на поверхность ДНА. По базам NIST [24] атом N 1s в молекуле свободного глицина характеризуется энергиями связи 400,6 и 398,7 эВ соответственно. В конъюгате эта энергия оказалось равной 399,6 эВ, что соответствует среднему значению [25].

Антигипоксическая активность конъюгата ДНА – глицин. Исследование специфической противогипоксической активности конъюгата ДНА – глицин в сравнении с фармакопейным глицином и широко применяемым в медицинской практике препаратом мексидолом осуществлялось при использовании двух

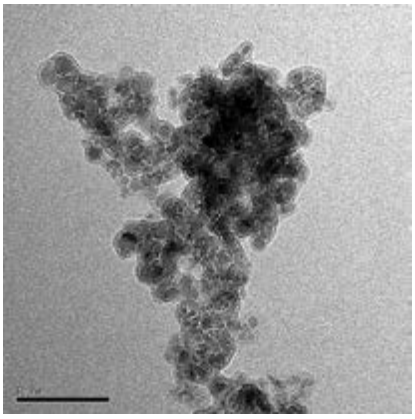


Рисунок 8. Микрофотография ПЭМ конъюгата ДНА – глицин [15]

методик с различным генезом гипоксических состояний: нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме и гемической гипоксии [26].

Таблица 1.

Данные РФЭС конъюгата ДНА – глицин [25]

Наименование характеристики	Химические элементы		
	C	O	N
Атомные %,	80,1±0,1	11,5±0,1	8,4±0,1
Энергии связи, эВ	285,2±0,5	530,7±0,5	399,6±0,5

Было обнаружено, что конъюгат ДНА – глицин статистически достоверно увеличивал время выживания животных в условиях гипоксии. Показано, что его противогипоксический эффект имеет дозозависимый характер, усиливается с увеличением дозы от 10 до 20 мг/кг и выявляется как при однократном, так и при повторном введении. По противогипоксической активности в тесте нормобарической гипоксии конъюгат ДНА – глицин превосходит ДНА, не уступает глицину и препарату сравнения мексидолу, а в тесте гемической гипоксии существенно превосходит как ДНА и глицин, так и мексидол [27].

Исследование специфической активности конъюгата ДНА – глицин на других моделях экспериментальной психофармакологии [15,19] позволило выявить практически в каждом случае изменение интенсивности или природы фармакологической активности по сравнению с нативным глицином. Кроме того, было выявлено, что конъюгат ДНА – глицин обладает рядом эффектов, которые нативный глицин не проявляет. Это позволяет нам предположить, что обнаружено фундаментальное явление наномедицины – изменение спектра (амплификация) фармакологической активности лекарственного вещества при его иммобилизации на поверхности ДНА. Это открывает синтетические возможности разработки на основе ДНА нового класса высокоэффективных инновационных лекарственных средств.

Таблица 2.

Противогипоксическая активность конъюгата ДНА – глицин в сравнении с глицином и препаратом сравнения мексидолом в тестах нормобарической гипоксии с гиперкапнией и гемической гипоксии (мыши, вн/в, n=10) [26]

Вещества	Доза, мг/кг	Продолжительность жизни, мин
Тест нормобарической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме		
Контроль (физ. раствор)	–	15,08±0,45
Конъюгат ДНА – глицин	0,5	14,54±0,19
	1	16,09±0,21
	5	17,32±0,6*
	10	18,32±0,43*
Глицин	1	15,32±0,42
	10	17,14±0,41*
Мексидол	100	18,01±0,12*
Тест гемической гипоксии		
Контроль (фон – $NaNO_2$)	–	17,58±0,75
Конъюгат ДНА – глицин	10	30,49±2,4*
Глицин	10	25,50±3,57*
Мексидол	100	20,5±3,45

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная стратегия получения стандартизованных детонационных наноалмазов с определенной функциональной поверхностью, выбором метода и условий иммобилизации биологически активного вещества и контролируемым размером частиц синтезированного гибридного наноматериала в стабильном гидрозоле позволяет создавать высокоэффективные лекарственные средства нового поколения, превышающие лучшие зарубежные аналоги и позволяющие не только решать проблему импортозамещения в лекарственном обеспечении населения страны, но и создать мощный экспортный потенциал, обеспеченный правовой защитой интеллектуальной собственности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 14-03-00423 и 16-08-01156).

ЛИТЕРАТУРА

1. Нанолекарства. Концепции доставки лекарств в нанонауке / Под ред. Алфа Лампрехта. – М.: Научный мир, 2010. 232 с.

2. Н.Б. Демина, С.А. Скатков. Стратегии развития и биофармацевтические аспекты систем доставки лекарств // Российский химический журнал. 2012. Т. 56(3–4). № 3–4. С. 5–10.
3. Ю.С. Тараховский. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ. – М.: ЛКИ, 2011. 282 с.
4. J.M. Say, C. Vreden, D.J. Reillyetal. Luminescent nanodiamonds for biomedical applications // Biophys. Rev. 2011. V. 3. P. 171–184.
5. X. Zhang, W. Hu, J. Li, L. Tao, Y. Wei. A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond // Toxicol. Res. 2012. V. 1. P. 62–68.
6. L.C. Cheng, X. Jiang, J.Wang. Nano-bio effects: interaction of nanomaterials with cells // Nanoscale. 2013. V. 5(9). P. 3547–3569.
7. Ultra Nanocrystalline Diamond. Synthesis, Properties, and Applications / Ed. by O.A. Shenderova, D.M. Gruen. – Norwich, New York: William Andrew Publishing, 2006. P. 333–404.
8. И.И. Кулакова. Химия поверхности наноалмазов // ФТТ. 2004. Т. 46(4). С. 621-628.
9. И.И. Кулакова, В.В. Корольков, Р.Ю. Яковлев, Г.В. Лисичкин. Строение частиц химически модифицированного наноалмаза детонационного синтеза // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5(7–8). С. 66–73.
10. И.И. Кулакова. Модифицирование детонационного наноалмаза: влияние на его физико-химические свойства // Российский химический журнал. 2004. Т. 48(5). С. 97–106.
11. A. Krueger. The structure and reactivity of nanoscale diamond // J. Mater. Chem. 2008. V. 18. P. 1485–1492.
12. O.A. Shenderova, G.E. McGuire. Science and engineering of nanodiamond particle surfaces for biological applications (Review) // Biointerphases. 2015. V. 10(3). P. v030802.
13. Р.Ю. Яковлев, А.С. Осипова, А.С. Соломатин, И.И. Кулакова, Г.П. Муравьева, Н.В. Авраменко, Н.Б. Леонидов, Г.В. Лисичкин. Подход к унифицированию физико-химических свойств детонационных наноалмазов промышленного производства // Российский химический журнал. 2013. Т. 57(5). С. 86–96.
14. Патент РФ № 2506095. Способ селективной доочистки наноалмаза / Р.Ю. Яковлев, А.С. Соломатин, И.И. Кулакова, Г.В. Лисичкин, К.М. Королев, Н.Б. Леонидов; 2014.
15. A. Krueger. Functionality is Key: Recent Progress in the Surface Modification of Nanodiamond // Adv. Funct. Mater. 2014. V. 22. P. 890–906.
16. Р.Ю. Яковлев, А.С. Соломатин, Н.Б. Леонидов, И.И. Кулакова, Г.В. Лисичкин. Детонационный наноалмаз – перспективный носитель для создания систем доставки лекарственных веществ // Российский химический журнал. 2012. Т. 56(3-4). С. 114-125.
17. R.Y. Yakovlev, I.I. Kulakova, O.V. Golubev, N.B. Leonidov, G.V. Lisichkin. Determination of detonation nanodiamonds concentration in hydrosols by optical methods // In Book of Abstract Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures (ACNS). – St.-Petersburg. 2015. P. 119.
18. G.A. Badun, M.G. Chernycheva, R.Y. Yakovlev, N.B. Leonidov, M.N. Semenenko, G.V. Lisichkin. A novel approach radiolabeling detonation nanodiamonds through the tritium thermal activation method // Radiochimica Acta, 2015. V. 102(10). P. 941–946.
19. R.Y. Yakovlev, I.B. Alieva, N.B. Leonidov, D.R. Rakita, V.N. Agafonov, R.E.Uzbekov. Interaction dynamics of the nanodiamond with living cells in culture // In Book of Abstract Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures (ACNS). – St.-Petersburg. 2011. P. 206.
20. Патент РФ № 2521404. Средство, обладающее противоинсультным действием, и способ его получения / Н.Б. Леонидов, Р.Ю. Яковлев, Д.Р. Ракита, Г.В. Лисичкин; 2014.
21. R.Y.Yakovlev. The problem of nanodiamond visualization in biopharmaceutical research // In Book of Abstract Int. Conf. Advanced Carbon Nanostructures (ACNS). St. Petersburg, 2011. P. 376.
22. Патент РФ № 2528096. Способ количественного определения углеродных наноструктур в биологических образцах и их распределения в организме / Р.Ю. Яковлев, А.А. Елисеев, Н.Б.Леонидов, Д.Р. Ракита, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, Г.В. Лисичкин; 2014.
23. E.V. Rodina, A.V. Valueva, R.Y. Yakovlev, N.N. Vorobyeva, I.I. Kulakova, G.V. Lisichkin, N.B. Leonidov. Immobilization of inorganic pyrophosphatase on nanodiamond particles retaining its high enzymatic activity // Biointerphases. 2015. V. 10(4). P. 041005-1-041005-12.
24. National Institute of Standards and Technology. URL: http://www.nist.gov (дата обращения 15.05.2016).
25. Patent US 9254340 B2. Nanodiamond and glycine conjugate and method for the preparation thereof / R.Y. Jakovlev; 2016.
26. Т.А. Воронина, Р.У. Островская, Т.Л. Гарибова. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств ФГБУ «НЦЭМСП». – М.: Гриф и К, 2012. С. 276–296.
27. Патент РФ № 2506074. Антигипоксант и способ его получения / Н.Б. Леонидов, Р.Ю. Яковлев, И.И. Кулакова, Г.В. Лисичкин; 2014.

ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОЕ ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

CRYSTE Laboratory & Biomedical Technology

Центрифуги CRYSTE с расширенным набором технических возможностей и системой охлаждения от -10°C до +40 °C с набором роторов под пробирки различного объема

Универсальная центрифуга PURISPIN 17R

- разделение жидких систем с высокой скоростью до 17000 об/мин
- сохраняет термочувствительные пробы
- поддерживает основные стандарты работы с микрообъемами: реакции с нуклеиновыми кислотами, ПЦР, субклеточное разделение и т.д.

286 000 руб.

Универсальная центрифуга большой вместимости VARISPIN 15R

- скорость вращения до 15000 об/мин
- поддерживает работу с роторами разного типа

501 000 руб.

Низкоскоростные центрифуги

Универсальная центрифуга VARISPIN 4 с угловым ротором или ротором крестовиной

171 000 руб.

Низкоскоростная центрифуга VARISPIN 4A с угловым ротором

129 000 руб.

Локальные вытяжные системы PURIFUME_ductless

- вытяжное устройство без воздуховода для очистки опасных газов с использованием специальных фильтров с рециркуляцией очищенного воздуха
- удаление частиц размером до 0,3 мкм эффективностью 99,993%

303 000 руб.

PURICUBE бокс биологической безопасности (II класс, тип A2)

- HEPA–фильтр нисходящего потока очищает рециркулирующий воздух: 70% от загрязненного воздуха
- HEPA–фильтр на выходе очищает отработанный воздух: 30% от загрязненного воздуха, фильтрация мельчайших частиц размером 0,3 мкм с эффективностью 99,999%

342 000 руб.

Фильтрация воздуха в лаборатории от CRYSTE - максимальная безопасность для сотрудников предприятия: 3-х уровневая схема позволяет одновременно устранять NH_3, H_2S, HCHF, SO_x NO_x, кислоты, летучие органические соединения

Pharmcontract® group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98 (ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)

www.phct-group.com

8 800 333-69-11 (БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)

info@phct-group.com

УДК 615.32

1 – Московский технологический университет (МИТХТ), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, 78

1 – Moscow Technological University (MITHT), 78, Vernadsky pr., Moscow, 119571, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: sk-vika@yandex.ru

ЦИКЛОДЕКСТРИНЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ (ОБЗОР)

С.А. Кедик[1], А.В. Панов[1], В.С. Тюкова[1]*, М.С. Золотарева[1]

Резюме. В обзоре литературы рассмотрены основные свойства циклодекстринов и возможность их использования в рецептурах различных лекарственных форм в качестве вспомогательных веществ, благодаря которым становится возможным увеличение растворимости лекарственных веществ, биодоступности и стабильности лекарственного препарата.

Ключевые слова: циклодекстрины, комплекс включения, растворимость, биодоступность.

CYCLODEXTRINS AND THEIR APPLICATION IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY (REVIEW)

S.A. Kedik[1], A.V. Panov[1], V.S. Tyukova[1]*, M.S. Zolotareva[1]

Abstract. In the review describes the main properties of cyclodextrins and their potential use in the formulations in various dosage forms as excipients, by which it becomes possible to modify the solubility of drugs, increase the bioavailability and stability of the drug.

Keywords: cyclodextrins, inclusion complex, solubility, bioavailability.

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире на фармацевтическом рынке появляются все более совершенные лекарственные препараты. Одной из основных характеристик лекарственных веществ является растворимость. Растворимость играет существенную роль в действии лекарственных препаратов, прежде всего предназначенных для перорального приема, так как максимальная скорость пассивного транспорта препарата через биологические мембраны – основной путь для поглощения лекарственных веществ – зависит от проницаемости мембраны и концентрации раствора / растворимости. Учитывая, что ~40% выпускающихся лекарственных субстанций классифицируются как практически нерастворимые, а ~85% самых продаваемых препаратов в США и Европе принимаются перорально, актуальность исследований в данном направлении становится очевидной [1]. Стоит отметить, что около 40% производимых лекарственных веществ классифицируются Европейской Фармакопеей как нерастворимые в воде, в то время как в большинстве случаев наиболее эффективным способом введения является парентеральный. Таким образом, актуальность исследований по увеличению растворимости лекарственных веществ становится очевидной.

Циклодекстрины (ЦД) взаимодействуют с плохо растворимыми в воде соединениями, увеличивая их растворимость. Главной причиной такого взаимодействия является способность ЦД образовывать комплексы включения. ЦД – циклические олигосахариды, состоящие из определенного числа D-глюкопиранозных звеньев, связанных α-(1-4)-связями. Впервые ЦД были описаны Вильером в 1851 году [2]. На рисунке 1 представлена структура трех природных ЦД.

Поскольку все глюкопиранозные звенья имеют конформацию «кресло» и соединены между собой посредством α-(1-4)-гликозидных связей, молекула ЦД имеет форму усеченного конуса или тора, по нижнему и верхнему ободу которого расположены гидроксильные группы. Гидроксильные группы у С-2 и С-3 расположены на широком ободе молекулы ЦД и направлены в одну сторону, а гидроксильные группы у С-6 расположены на противоположном ободе молекулы ЦД и направлены в другую сторону. Неполярные атомы водорода у С-3 и С-5, а также эфирные атомы кислорода находятся на внутренней поверхности тороподобной молекулы. Внутри тора гидроксильных групп нет, поэтому внутренняя полость является гидрофобной, а внешняя оболочка – гидрофильной. Молекулы ЦД имеют довольно жесткую

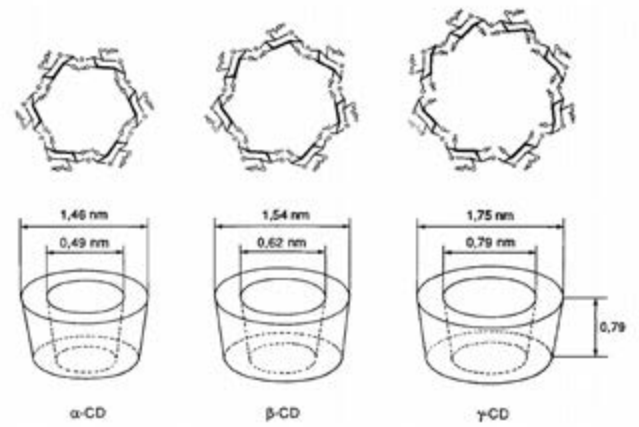


Рисунок 1. Структура α-, β-, γ-ЦД и размеры их молекул [3]

структуру (стабилизированную водородными связями между С-2 и С-3 гидроксильными группами), кроме того при таком расположении отсутствует свободное вращение по α-(1-4)-связи [3].

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЦД

ЦД устойчивы к действию щелочи, но могут быть гидролизованы концентрированными кислотами [4]. Кислотный гидролиз ЦД был описан еще Шардингером в прошлом веке [5]. Основные свойства представлены в таблице 1.

Циклодекстрин для получения комплекса включения выбирают исходя из размера его внутренней полости, которая должна соответствовать геометрическим размерам молекулы лекарственного вещества. α-ЦД может образовать комплекс включения с молекулами низкой молекулярной массы или с частью молекул, имеющих алифатические боковые цепи. β-ЦД способен образовать комплекс включения с ароматическими и гетероциклическими молекулами. γ-ЦД может размещать в своей внутренней полости молекулы больших размеров, таких как стероиды.

Поскольку природные ЦД имеют ограниченную растворимость в воде, для улучшения их химических свойств были получены различные виды их производных [5]. Физико-химические свойства производных ЦД зависят от вида заместителя и степени замещения.

В последнее время интерес к ЦД как вспомогательным веществам, используемым в различных системах доставки, значительно возрос. Рассмотрим несколько примеров использования ЦД в фармацевтической промышленности. На рисунке 2 представлена составленная по данным статьи [7] гистограмма, на которой показано, во сколько раз увеличивается растворимость в воде лекарственных веществ, модифицированных циклодекстринами с образованием комплекса включения, по отношению к растворимости в воде чистых лекарственных веществ.

Таблица 1.

Основные физико-химические свойства α-ЦД, β-ЦД, γ-ЦД [6]

Свойство	α-ЦД	β-ЦД	γ-ЦД
Эмпирическая формула	$C_{36}H_{60}O_{30}$	$C_{42}H_{70}O_{35}$	$C_{48}H_{80}O_{40}$
Число остатков глюкозы в макроцикле	6	7	8
Молекулярный вес, Да	972,85	1134,99	1297,14
Внешний диаметр тора, нм	1,46	1,54	1,75
Внутренний диаметр полости тора, нм	0,49	0,62	0,79
Высота тора, нм	0,79	0,79	0,79
Объём внутренней полости, $Å^3$	174	262	472
Физический объём полости в навеске 1 г ЦД, мл	0,1	0,14	0,2
Частичный молярный объём в растворах, мл · $моль^{-1}$	611,4	703,8	801,2
Растворимость в воде при 25 °С, г/100 мл	14,5	1,85	23,2
Температура разложения, °С	278	299	267

В работе [7] приводятся данные о влиянии природы активного вещества и циклодекстрина, а также их исходного соотношения на растворимость комплекса включения, которые обобщены на рисунке 3.

Применение ЦД возможно при пероральном введении. Из всех возможных способов доставки лекарственных веществ пероральный путь введения наиболее популярен. Использование ЦД-комплексов увеличивает скорость адсорбции и биодоступность лекарственных веществ, кроме того маскирует неприятный вкус и запах, увеличивает стабильность [8].

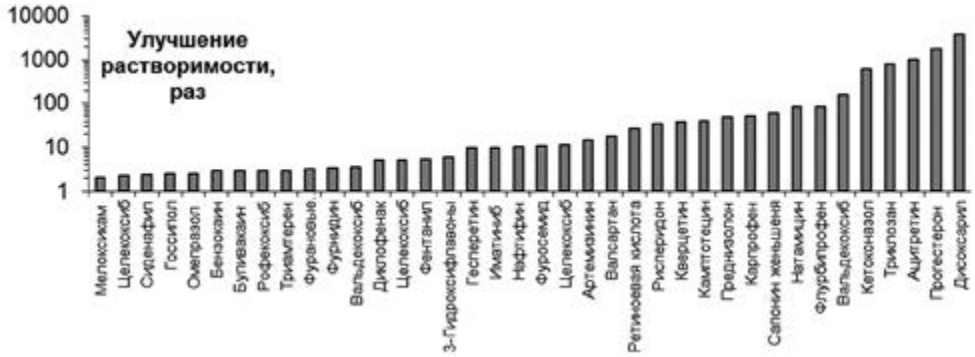


Рисунок 2. **Увеличение растворимости в воде лекарственных веществ, модифицированных циклодекстринами с образованием комплекса включения [7]**

Примерами лекарственных веществ, заключенных в комплексы с ЦД, могут служить ибупрофен [9], кетопрофен [10], флурбипрофен [11] и индометацин [12], спиронолактон [13], преднизолон [14], диазепам [15], витамин B_{13} [16] и др. Исследования на животных показали хороший результат: увеличение биодоступности до 50% лекарственного вещества дигоксина [17], заключенного в комплексе с γ-ЦД, применяемого в виде таблеток, по сравнению с использованием чистого вещества; исследования проводили на собаках. Биодоступность лекарственного вещества кетопрофен [18], заключенного в комплексе с три-О-метил-β-ЦД, увеличивается в 3,7 раз по сравнению с использованием чистого вещества; исследования проводили на крысах. Биологическая активность витамина K_3 увеличивается в комплексе с β-ЦД [19]; исследования проводили на курицах. Исследования на людях также показали хороший результат. При пероральном применении салициловой кислоты в комплексе с β-ЦД биодоступность лекарственного вещества значительно увеличивается по сравнению с применением чистой салициловой кислоты [20]. Также было установлено улучшение биодоступности преднизолона [21] и спиронолактона [22], применяемых перорально в виде комплекса с β-ЦД; исследования проводили на людях. Циклодекстриновые производные также демонстрируют улучшение биодоступности при пероральном применении на людях. Так, α-ЦД-епихлоргидриновый полимер, используемый в качестве комплесообразующего агента, показал увеличение биодоступности индометацина [23]. Гидроксипропил-β-ЦД в комплексе с тестостероном показал значительное увеличение биодоступности при сублингвальном и буккальном применении в отличие от перорального [24].

Использование ЦД и их производных для доставки лекарственных веществ также возможно при ректальном применении. Зачастую такой тип введения актуален для детей и младенцев. На биодоступность лекарственного вещества в суппозиториях, то есть на период его действия и степень всасывания, существенное влияние оказывает характер высво-

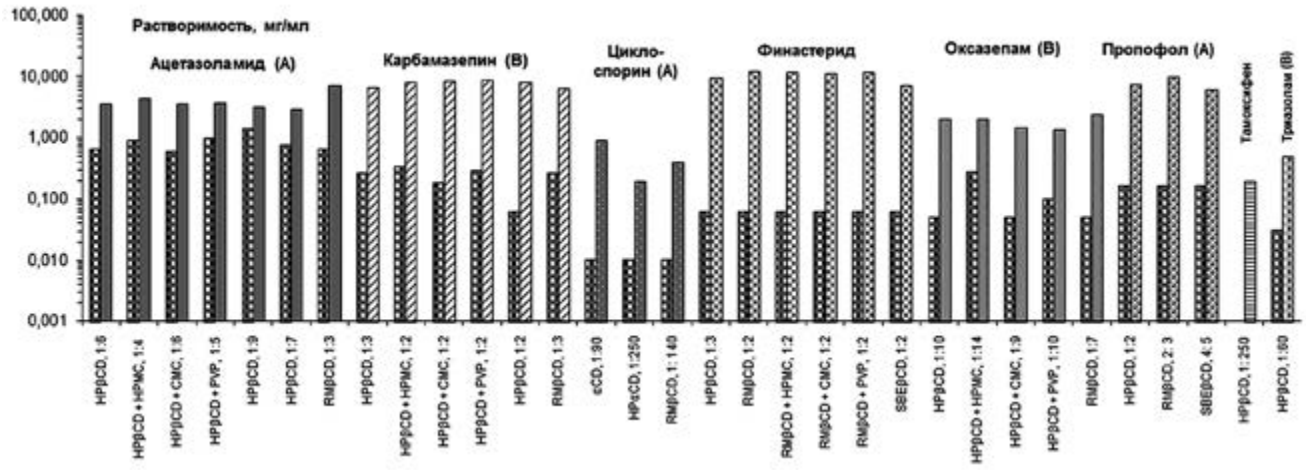


Рисунок 3. **Влияние природы активного вещества и циклодекстрина, а также их исходного соотношения на растворимость комплекса включения [7]**

бождения этого вещества из суппозитория. Процесс высвобождения является фактором, регулирующим скорость и полноту всасывания лекарственного вещества в кровь, особенно в тех случаях, когда оно находится в лекарственной форме в твердом (суспендированном) состоянии. Высвобождение лекарственного вещества из суппозиториев происходит путем растворения и распределения активной субстанции в слизистой оболочке прямой кишки. ЦД используются для повышения биодоступности лекарственных веществ в суппозиториях при ректальном применении. Кроме того, они не раздражают слизистую оболочку, препятствуют обратной диффузии лекарственных веществ. Стоит отметить, что имеются данные о том, что использование ЦД намного эффективнее для суппозиториев на жировой основе [25]. Так, при использовании суппозиториев на жировой основе, содержащих комплекс фенобарбитала с β-ЦД, наблюдалось значительное увеличение биодоступности в отличие от суппозиториев на основе полиэтиленоксидов [26]; исследования проводились на крысах. Также наблюдалось увеличение биодоступности при использовании суппозиториев на жировой основе, содержащих преднизолон в комплексе с β-ЦД или γ-ЦД [14], флурбипрофен – также в комплексе с β-ЦД или γ-ЦД [27] и кармофур – в комплексе с β-ЦД или диметил-β-ЦД [28] (исследования проводились на кроликах), индометацин – в комплексе с β-ЦД [29] (исследования проводились на крысах).

Трансдермальный путь доставки лекарственных веществ (ЛВ) достаточно сложный и в то же время более надежный способ доставки для локального и системного действия. Контролируемое высвобождение действующего вещества в данной лекарственной форме позволяет ЛВ непрерывно попадать в организм со скоростью, обеспечивающей постоянный уровень ЛВ в кровотоке, близкий к минимальному терапевтическому уровню. Особенно важное преимущество – снижение побочных действий путем оптимизации концентрации лекарственного вещества; прекращение терапии возможно путем простого удаления лекарственного средства с поверхности кожи. Однако основной недостаток – ограниченная проницаемость кожи для лекарственных веществ. Использование ЦД в качестве энхансеров (веществ, увеличивающих проникновение) стало достаточно популярной областью изучения ЦД-комплексов в последние годы. Такие вещества должны быть терапевтически инертными, не должны мешать нормальному функционированию кожи, в частности ее защитной функции (защита от действия тепла, влажности, радиации и др.), не должны вызывать раздражения кожи, изменять ее pH. Использование лекарственных препаратов, содержащих комплексы ЦД, особенным образом влияет на эффективность кортикостероидов. Имеются данные о том, что проникновение беклометазона через кожу увеличивалось при использовании комплексов с β-ЦД и γ-ЦД. Кроме того, было отмечено увеличение сосудосуживающей активности беклометазона дипропионата в комплексе с γ-ЦД [30].

β-ЦД не вызывает раздражения или гипоаллергенных реакций. Для трансдермального применения допускается широкий спектр ЦД и их производных, за исключением, пожалуй, диметилированного β-ЦД [31]. Данные о мутагенном и тератогенном действии ЦД и их производных даже при длительном применении отсутствуют [8].

Возможно также использование некоторых ЦД для приготовления парентеральных лекарственных форм ввиду их низкой токсичности [32]. Одним из таких ЦД является гидроксипропил-β-ЦД. В работе [33] было показано, что гидроксипропил-β-ЦД увеличивает растворимость в воде эстрадиола, что делает возможным его использование в парентеральной форме. Кроме того, гидроксипропил-β-ЦД использовался при получении лекарственных препаратов дезинтоксикационного действия, увеличивая биологическую активность действующего вещества [34].

Лекарственные препараты для назального применения обеспечивают локальную доставку лекарственных веществ к очагу воспаления. Вещества, попавшие на слизистую оболочку носа, практически сразу же всасываются и через некоторое время ввиду анатомических особенностей попадают в общий кровоток, тем самым оказывая и системное действие. ЦД имеют способность увеличивать проницаемость лекарственных веществ через биологические мембраны, не затрагивая их барьерные функции, это свойство делает ЦД идеальными энхансерами для назальной системы доставки. Кроме того, способность ЦД солюбилизировать нерастворимые в воде лекарственные вещества делает возможным их использование в виде назальных спреев на водной основе. Имеются данные об использовании в качестве назальных спреев лекарственных веществ в комплексе преимущественно с гидроксипропил-β-ЦД и метил-β-ЦД [35]. Назальный спрей, содержащий эстрадиол и метилированный β-ЦД, уже применяется для лечения остеопороза у женщин в постменопаузе, что обеспечивает достаточно быструю диффузию препарата в клетки тканей [33].

Применение ЦД в комплексе с лекарственными субстанциями на слизистой оболочке рассматривается как безопасное в широком диапазоне концентраций. В назальных лекарственных формах наиболее широкое применение нашел метилированный β-ЦД, как наиболее эффективный из производных β-ЦД [36]. Однако в случае использования метилированных производных ЦД концентрация и время воздействия долж-

ны контролироваться, поскольку имеются данные о том, что применение 5% раствора произвольно метилированного β-ЦД при длительном воздействии вызывает некоторые морфологические изменения эпителия носовой полости [37]. Исследования на модели культур клеток слизистой оболочки носовой полости человека 10% раствора диметил-β-ЦД-производного показали необратимые изменения в частоте цилиарных мерцаний [36], что снижает защиту нижних дыхательных путей: микроорганизмы задерживаются на поверхности слизистой, инфицируют клетки и вызывают или усугубляют воспаление.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

Особенность глаза состоит в том, что его конъюнктива обильно снабжена капиллярами, через которые лекарственные вещества легко всасываются в кровь. Главным образом во избежание раздражения лекарственные вещества должны быть растворимы в слезных жидкостях. В то же время они должны быть в некоторой степени липофильны, для того чтобы преодолеть эпителий роговицы. Другими словами, лекарственное вещество должно быть и гидрофильно и гидрофобно [38]. Непрерывная секреция слезной жидкости добавляет к этому еще и лимитированное время контакта лекарственного вещества с поверхностью глаза, что также снижает биодоступность, особенно в случае применения растворов с низкой вязкостью. Вследствие этого на поверхности глаза адсорбируется менее 5% лекарственного вещества [39]. Для решения этой проблемы в лекарственных формах используются различные вспомогательные вещества, которые могут снижать барьерную функцию глаза (например, бензалкония хлорид или др. сурфактанты), позволяя проникнуть лекарственным веществам или увеличивая время контакта лекарственного вещества с поверхностью глаза (то есть увеличивая вязкость с помощью водорастворимых полимеров) [40]. Для увеличения биодоступности лекарственных веществ были разработаны лекарственные формы в виде гидрогелей, микроэмульсий и липосом [41]. Однако такие лекарственные формы не стали высоко востребованными ввиду высокой вероятности побочных действий (таких как нечеткость зрения и местное раздражение) и низкой стабильности [42]. ЦД в последнее время стали востребованы и в офтальмологии, поскольку в отличие от других вспомогательных веществ ЦД способны увеличить биодоступность лекарственных веществ, не влияя на барьерные функции глаза и существенно не увеличивая вязкость водных растворов лекарственных форм [43]. ЦД сохраняют в своей внутренней полости молекулы гидрофобных лекарственных веществ, доставляя их к поверхности мембраны, где они выделяются из полости ЦД в липофильную мембрану. Таким образом, ЦД делают возможным применение в виде глазных капель целого ряда лекарственных веществ, которые ранее не были доступны в такой лекарственной форме или же их применение было затруднительно. Стероидные лекарственные вещества, в том числе кортикостероиды, являются хорошим примером таких лекарственных веществ. Эти лекарственные вещества были доступны в виде суспензий, что ограничивало их концентрацию и биодоступность.

В исследовании [44] была получена рецептура глазных капель, содержащих 1% раствор гидрокортизона в комплексе с гидроксипропил-β-ЦД, и было показано, что биодоступность гидрокортизона увеличивается на 55%.

Исследовательской группой [45] была получена рецептура глазных капель, содержащая 0,32–1,3% дексаметазона в виде комплекса с гидроксипропил-β-ЦД. Полученную рецептуру сравнили с уже имеющимся на рынке лекарственным препаратом, содержащим 0,1% дексаметазон в виде суспензии (Maxidex®) для закапывания глаз. В результате были получены данные, подтверждающие увеличение биодоступности лекарственного вещества. Концентрация дексаметазона в слезных жидкостях, достигнутая при применении дексаметазона в виде комплекса с гидроксипропил-β-ЦД, была выше в 2,6 раза по сравнению с лекарственным препаратом Maxidex®. Кроме того, через 4 ч после введения лекарственного препарата Maxidex® концентрация дексаметазона в слезных жидкостях еще была практически равна нулю, в то время как при введении дексаметазона в виде комплекса с гидроксипропил-β-ЦД концентрация активного вещества уже достигла 100 нг/мл.

В работе [46] была разработана рецептура глазных капель, содержащих метазоламид. Метазоламид – эффективное лекарственное средство для лечения глаукомы, долгое время из-за низкой растворимости в воде применялся исключительно перорально. Авторами была разработана рецептура глазных капель, которая демонстрировала снижение на 14% внутриглазного давления. Разработанная рецептура содержала 1% метазоламида, 23% гидроксипропил-β-ЦД, 0,1% гидроксиметилцеллюлозы, 0,01% бензалкония хлорида и 0,05% ЭДТА.

Исследовательской группой [47] была разработана рецептура глазных капель, содержащих 0,5% цилостазола, которая показала свою эффективность для лечения глаукомы путем снижения внутриглазного давления.

В работе [48] была разработана рецептура глазных капель, содержащих ципрофлоксацин, используемый для лечения инфекционных заболеваний глаз. Ципрофлоксацин практически нерастворим в

воде, неустойчив при воздействии света. Авторами было продемонстрировано увеличение растворимости, биодоступности и стабильности ципрофлоксацина в виде глазных капель при получении комплекса с гидроксипропил-β-ЦД. Кроме того, было показано, что эти свойства можно оптимизировать добавлением водорастворимого полимера, такого как поливинилпирролидон или гидроксиметицеллюлоза. Эта рецептура содержит: 0,2% ципрофлоксацина, 20% гидроксипропил-β-ЦД, 0,1% поливинилпирролидона или гидроксиметицеллюлозы, 0,01% бензалкония хлорида и 0,05% ЭДТА.

Природные ЦД в целом рассматриваются как не вызывающие раздражения кожи, глаз и слизистой оболочки. Среди производных ЦД гидроксипропил-β-ЦД рассматривается как безопасный и не раздражающий слизистую глаза ЦД, в то время как метилированный β-ЦД может вызывать раздражение глаз [49].

Большой интерес вызывают исследования, касающиеся разработки рецептуры глазных капель, содержащих комплекс дисульфирама (DSF) с гидроксипропил-β-ЦД. Исследовательской группой [50] было показано применение этой лекарственной формы для лечения катаракты. DSF выступает в качестве антиоксиданта: он устраняет действие гидроксильных радикалов, которые нарушают гомеостаз хрусталика, приводя к разрушению белков хрусталика и в конечном итоге его помутнению. Поскольку DSF практически нерастворим в воде (0,2 мг в 100 мл при 38 °C), неустойчив в нейтральных водных средах и не способен проникать через роговицу глаза, его применение в офтальмологии представлялось затруднительным. По результатам исследований [50] было доказано, что введение капель, содержащих 0,25–0,50% дисульфирама, 3,0–5,0% гидроксипропил-β-ЦД и 0,1% гидроксипропилметилцеллюлозы, к 77 дню жизни животных в 1,5–2 раза увеличивает пиксельный показатель прозрачности хрусталика.

Уже имеются данные о возможности создания устойчивой жидкой фармацевтической композиции, содержащей 0,2–0,5 масс.% дисульфирама, растворенного в водной фазе за счет образования комплекса включения с 0,5–2,0 масс.% гидроксипропил-β-ЦД, и 0,2–0,5 масс.% таурина [51].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тем не менее существует потребность в новых эффективных и безопасных офтальмологических препаратах, которые могли бы обладать большей фармакологической активностью. Таким образом, можно с уверенностью заключить, что эпоха ЦД еще только начинается.

Но стоит заметить, что в некоторых случаях применение ЦД в качестве вспомогательных веществ, увеличивающих растворимость лекарственных веществ, для разработки новых лекарственных форм экономически нецелесообразно: когда стоимость лекарственных веществ значительно ниже стоимости ЦД; когда лекарственные вещества уже долгое время выпускаются на рынке в виде твердых или других лекарственных форм.

Результаты работы получены в рамках Государственного задания Минобрнауки Российской Федерации № 2014/114, код проекта 507 и при поддержке гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ России (НШ-7946.2016.11.).

ЛИТЕРАТУРА

1. А.В. Душкин, Л.П. Сунцова, С.С. Халиков. Механохимическая технология растворимости лекарственных веществ // Pharmaceutical sciences. 2013. № 1. С. 448–457.
2. T. Loftsson, D. Duchene, Cyclodextrins and their applications // International Journal of Pharmaceutics. 2007. № 329. P. 1–11.
3. H. Dodziuk. Cyclodextrins and their complexes. – Wheinheim: Wiley-VCH Verlag, 2006. 489 p.
4. Н.Г. Гулюк, Т.С. Пучкова, Д.М. Пихало, В.А. Гулакова. Исследование кинетики кислотного и ферментативного гидролиза циклодекстринов // Пищевая и перерабатывающая промышленность. 2010. № 12. С. 67.
5. E.M. Martin Del Valle. Cyclodextrins and their uses: a review // Process Biochemistry. 2004. № 39. P. 1033–1046.
6. О.А. Иноземцева. Физико-химические свойства монослоев и пленок Ленгмюра – Блоджетт силилированных бромсодержащих производных β-циклодекстрина: дис. … к. хим. н. – Саратов: СГУ, 2006. 151 с.
7. G. Castronuovo, M. Niccoli, Thermodynamics of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrins with acetylsalicylic acid and ibuprofen in aqueous solution at 298 K // Thermochimica Acta. 2013. № 557. P. 44–49.
8. C. Krzysztof, K. Centkowska. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects // European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics. 2008. № 68. P. 467–478.
9. K. Hussein, M. Turk, M.A. Wahl. Comparative Evaluation of Ibuprofen/β-Cyclodextrin Complexes Obtained by Supercritical Carbon Dioxide and Other

Conventional Methods // Pharmaceutical Research. 2007. V. 24. № 3. P. 585–592.

10. A. Bounaceur, E. Rodier. Study of the maturation of a Ketoprofen/β-cyclodextrin complex // Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2010. V. 2(3). P.171–183.
11. S.R.S. Rudrangi, W. Kaialy, M.U. Ghori, V. Trivedi, M.J. Snowden, B.D. Alexander. Solid-state flurbiprofen and methyl-β-cyclodextrin inclusion complexes prepared using a single-step, organic solvent-free supercritical fluid process // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2016. V. 104. P. 164-170. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.04.024 (дата обращения 15.07.2016).
12. Патент US 4228160 A. Inclusion complex of cyclodextrin and Indomethacin and a process for the preparation thereof, method of use and pharmaceutical composition / L.J. Penkler, M.D. Bodley. – № 95/001152; filing 22.05.95; publ. 07.12.95.
13. Патент US № 5472954 A. Cyclodextrin complexation / T. Loftsson. – № 07/912853; filing 07.14.1992; publ. 06.28.1994.
14. H. Yano, F. Hirayama, M. Kamada, H. Arima, K. Uekama. Colon-specific delivery of prednisolone-appended a-cyclodextrin conjugate: alleviation of systemic side effect after oral administration // J. Cont. Rel. 2002. V. 79. № 1-3. P. 103–112.
15. Патент US № 6699849. Cyclodextrin complexes of benzodiazepines / T. Loftsson, M. Masson, E. Stefansson. – № 09/250185; filing 02.16.1999; publ. 03.02.2004.
16. I. Kacso, G. Borodi, S. I. Farcas, I. Bratu. Inclusion compound of vitamin B13 in b-Cyclodextrin // J. Phys.: Conference Series. 2009. V. 182. P. 1–5.
17. K. Uekama, T. Fujinaga, F. Hirayama. Improvement of the oral bioavailability of digitalis glycosides by cyclodextrin complexation // Pharmaceutical Science. 1983. № 72. P. 1338–1341.
18. Y. Nakai, K. Yamamoto, K. Terada. Interaction of tri-O-methyl-β-cyclodextrin with drugs // J. Incl. Phenom. 1984. № 2. P. 523-531.
19. J.J. Berzas Nevado, J.A. Murillo Pulgarin, M.A. Gomez Laguna. Spectrofluorometric study of the β-cyclodextrin: vitamin K_3 complex and determination of vitamin K_3 // Talanta. 2001. № 53. P. 951–959.
20. L.A. Belyakova, A.M. Varvarin, D.Yu. Lyashenko, O.V. Khora, E.I. Oranskaya. Complexation in a β-cyclodextrin-salicylic acid system // Colloid Journal. 2007. V. 69. № 5. P. 546–551.
21. K. Uekama, M. Otagiri, K Tasaki, A. Sugii. Improvement of oral bioavailability of Prednizalone by β-cyclodextrin complexation in humans // J. Pharm. Dyn. 1993. № 6. P. 124–127.
22. T. Vila-Jato, J. Blanco. Spirolactone/β-cyclodextrine complex: oral bioavailability in humans // Acta Pharmaceutical Technology. 1998. № 32. P. 82–85.
23. K. Uekama, K. Udo, T. Irie. Improvement of dissolution and absorption characteristics of indomethacin by water soluble α-cyclodextrine-epichlorohydrin polymer // Acta Pharm. Suec. 1987. № 24. P. 27-36.
24. J. Pitha, S.M. Harmau, M.E. Michel. Hydrophilic cyclodextrin derivates enable effective oral administration of steroidal hormones // J. Pharm. Sci. 1996. № 75. P. 165–167.
25. H. Beraldo, R.D. Sinisterra, L.R. Vieira, M.C. Doretto. An effective anticonvulsant prepared following a host-guest strategy that uses hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and benzaldehyde semicarbazone // Biochem Biophys Res Commun. 2002. № 296. P. 241–246.
26. K. Nishimura, R. Hidaka, F. Hirayama, H. Arima, K. Uekama. Improvement of dispersion and release properties of nifedipine in suppositories by complexation with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. 2006. № 56. P. 85–88.
27. M. Otagirri, T. Imai. Improvements to some pharmaceutical properties of flurbiprofen by β- and γ-cyclodextrin complexations // Acta Pharm. Suec. 1993. № 20. P. 1–10.
28. K. Kikuchi, F. Hirayama. Improvement of oral and rectal bioavailabilities of carmofur by methylated-β-cyclodextrin complexation // International Journal of Pharmaceutics. 1997. № 39. P. 191–198.
29. L. Szente, I. Apostol, J. Szejtli. Suppositories containing cyclodextrin complexes // Pharmazie. 1995. № 40. P. 406–407.
30. B. Malaekeh-Nikouei, S.A.S. Tabassi, G. Gerayeli, M.A. Salmani, A. Gholamzadeh. The effect of cyclodextrin mixtures on aqueous solubility of beclomethasone dipropionate // Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. 2012. V. 72. I. 3. P. 383–387.
31. R. Challa, A. Ahuja, J. Ali. Cyclodextrins in drug delivery: an update review // Pharmaceutical Science Technology. 2005. V. 6. № 2. P. 329–357.
32. T. Loftsson, D. Duchêneb. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications // International Journal of Pharmaceutics. 2007. V. 329. I. 1–2. P. 1–11.

33. А.В. Астахова, Н.Б. Демина. Современные технологии лекарственных форм: получение, исследование и применение комплексов включения лекарственных веществ с циклодекстринами (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. № 2. С. 46–49.

34. S.V. Kurkov, D.E. Madden, D. Carr, T. Loftsson. The Effect of Parenterally Administered Cyclodextrins on the Pharmacokinetics of Coadministered Drugs // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012. V. 101. Issue 12. P. 4367–4668.

35. S. Baboota, R. Khanna, S.P. Agarwal. Cyclodextrins in Drug Delivery Systems: An update // Pharmaceutical Information. 2003. № 58. P. 73–74.

36. W. Leng, L. Qin, X. Tang. Chitosan and Randomly Methylated β-cyclodextrin Combined to Enhance the Absorption and Elevate the Bioavailability of Estradiol Intranasally: in situ and in vivo Studies // The Journal of American Science. 2006. V. 2(1). P. 61–66.

37. M.E. Brewster, T. Loftsson. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers // Advanced Drug Delivery Reviews. 2007. V. 59. I. 7. P. 645–666.

38. E. Stefánsson, T. Loftsson. Cyclodextrins in eye drop formulations // Journal Incl. Phenom. Macroc. Chem. 2002. № 44. P. 23–27.

39. T. Loftsson, P. Jarho, M. Másson, T. Järvinen. Cyclodextrins in drug delivery // Expert Opinion on Drug Delivery. 2005. V. 2. I. 2. P. 335–351.

40. T. Loftsson, S.D. Sigfússon, H.H. Sigurðsson, M. Másson. The effects of cyclodextrins on topical delivery of hydrocortisone: the aqueous diffusion layer // STP Pharma Sci. 2003. № 13. P. 125–131.

41. K. Ravindra Reddy, M. Ravi Shankar Yadav, P. Sabitha Reddy. Preparation and evaluation of Aceclofenac ophthalmic in-situ gels // Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences. 2011. V. 1. № 2. P. 289–298.

42. E. Stefansson, S. Thorisdottir, O.G. Gudmundsson, T. Loftsson, H. Fridriksdottir, J.K. Kristinsson. HPβCD in eye drops: evaluation of artificial tear-drops in human patients // Proceedings of the 8th International Cyclodextrins Symposium (J. Szejtli and L. Szente, Eds.). – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1996. P. 391–394.

43. M. Masson, T. Loftsson, H. Fridriksdottir, D.S. Petersen. Complexation of drug compounds with ionic and ionic cyclodextrins // Proceedings of the 8th International Cyclodextrins Symposium (J. Szejtli and L. Szente, Eds.). – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1996. P. 365–368.

44. A.R. Bary, I.G. Tucker, N.M. Davies. Considerations in the use of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in the formulation of aqueous ophthalmic solutions of hydrocortisone // Eur. J. Pharm Biopharm. 2000. V. 50(2). P. 237–244.

45. T. Loftsson, E. Stefansson. Cyclodextrin enhanced topical delivery of corticosteroids to the eye // Acta Ophthalmol. Scand. 2002. № 80. P. 144-150.

46. E. Gudmundsdottir, E. Stefansson, G. Bjarnadottir, J.F. Sigurjonsdottir, G. Gudmundsdottir, M. Masson, T. Loftsson. Methazolamide 1% in cyclodextrin solution lowers IOP in ocular hypertensive humans // Inv. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000. V. 41(11). P. 3552–3554.

47. N. Nagai, Y. Ito, N. Okamoto. Preparation of ophthalmic formulations containing cilostazol as an antiglaukoma agent and improvement in its permeability through the rabbit cornea // J. Oleo Science. 2010. V. 59(8). P. 423–430.

48. A. Bozkir, Z. Denli. Effect of hydroxypropil-β-cyclpdextrin on the solubility, stability and *in vitro* release of ciprofloxacin for ocular drug delivery // Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug research. 2012. V. 69 (4). P. 719–724.

49. T. Jansen, B. Xhonneux, J. Mesens, M. Borgers. Beta-cyclodextrins as vehicles in eye-drop formulation: an evaluation of their effects on rabbit corneal epiteliumn // Lens Eye Toxicity Res. 1990. № 7. P. 459–468.

50. N. Nagai, Y. Ito, N. Takeuchi, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic evalution of the anti-cataract effect of drops containing Disulfiram and low-substituted methylcellulose using ICR/f rats as a hereditary cataract model // Biol. Pharm. Bull. 2012. V. 35(2). P. 239–245.

51. Патент РФ № 2485939. Офтальмологический препарат в виде глазных капель, содержащий дисульфирам и таурин / С.А. Кедик, Е.И. Ярцев, А.В. Панов, В.В. Суслов, И.В. Сакаева. – № 2012125357/15; заявл. 19.06.2012; опубл. 27.06.2013.

УДК 615.012.6

1 – «Крода Европа Лимитед», Великобритания, DN14 9AA, Ковик Холл

1 – Croda Europe Ltd., UK, DN14 9AA Cowick Hall, Snaith, DN14 9AA

*** адресат для переписки:**
E-mail: william.small@croda.com
Тел.: +44 (0) 1405 864 813

СТРАТЕГИЯ СОЗДАНИЯ РЕЦЕПТУР С УЛУЧШЕННОЙ БИОДОСТУПНОСТЬЮ

У. Смолл[1]*

Резюме. В этой статье описаны некоторые способы доставки активных ингредиентов с точки зрения скорости их проникновения и конечного распределения в коже, которые можно регулировать с помощью состава рецептуры. Каждый ингредиент в составе рецептуры в той или иной мере имеет потенциал воздействия на доставку активного компонента, влияя на растворимость активного вещества и на его взаимодействие с кожей, а также на рецептуру по мере того, как она претерпевает различные фазовые изменения на коже. Поэтому исключительно важно рассмотреть роль каждого ингредиента в рецептуре для оптимизации доставки активного ингредиента.

Ключевые слова: биодоступность, кожа, доставка, проникновение.

FORMULATION STRATEGIES FOR ENHANCED TOPICAL BIOAVAILABILITY

W. Small[1]*

Abstract. This article has described some of the ways in which the delivery of an active ingredients, in terms of there rate of permeation and location within the skin, can be controlled through formulation design. Every ingredient in the formulation possesses the potential to have some effect on the delivery of an active ingredient, either through its effect on the solubility of the active, its interaction with the skin, or on the formulation as it undergoes various phase changes on the skin. It is therefore important to consider the role of every ingredient in the formulation to optimize a delivery of the active ingredient.

Keywords: bioavailability, skin, delivery, penetration.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность рецептур для наружного применения, которые содержат активные ингредиенты, зависит не только от потенциала субстанции, но и от вспомогательных ингредиентов, присутствующих в составе. Выбор типа состава (прямая или обратная эмульсия, гель, мазь), эмолентов, усилителей проникновения и даже эмульгатора может существенно влиять на скорость доставки и на местоположение действующего вещества в коже. При этом оба фактора оказывают влияние на эффективность конечного продукта. В этой статье мы обсудим некоторые варианты стратегий создания рецептуры, а также выбор ингредиентов, которые можно использовать на первоначальном этапе разработки или в случае редизайна составов. Кожа – это самый распространенный и популярный путь доставки как косметических (например, осветляющих средств или автозагаров), так и фармацевтических (например, стероидов) активных ингредиентов, однако вследствие сложной структуры кожи это отнюдь не простой путь. В идеале он подходит только для узкого спектра соединений с ограничениями по молекулярному весу и липофильности. Но даже при соблюдении всех условий бывает трудно достичь хорошей биодоступности активного вещества, доставленного в нужное место за необходимый период времени, при сохранении эффективности.

КОНТРОЛЬ СКОРОСТИ ДОСТАВКИ – СТРАТЕГИЯ «ВЫСВОБОЖДАТЬ»

С того момента, когда препарат наносят на кожу, существует ограниченное количество времени, в течение которого активный ингредиент должен проникнуть в ее верхние слои. За это время активное вещество может кристаллизоваться или осаждаться на поверхности кожи за счет испарения водных или спиртовых вспомогательных веществ или из-за адсорбции других веществ кожей. Один из способов эффективного использования этого узкого временного окна для проникновения – добиться гарантированного высвобождения активного компонента из состава и встраивания его в кожу, что может быть осуществлено несколькими способами. Одним из них является простое увеличение

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

концентрации активного ингредиента в составе, что приводит к большему количеству действующего вещества, попадающего в кожу. Более изящный способ – работа с активным веществом при его максимальной или близкой к максимальной растворимости при высокой термодинамической активности. Это создает движущую силу для проникновения активного ингредиента из рецептуры в кожу, это проиллюстрировано на следующем примере.

Были приготовлены три модельные рецептуры с салициловой кислотой, как описано в таблице 1. Концентрация активного ингредиента одинаковая во всех трех рецептурах, но использовались различные масляные фазы, в которых растворимость салициловой кислоты (СК) различается. В одной рецептуре концентрация СК близка к максимальной растворимости и термодинамическая активность (величина, характеризующая эффективную концентрацию) высока. В другой рецептуре концентрация несколько ниже максимальной растворимости и термодинамическая активность немного ниже, чем в первой рецептуре. В третьей рецептуре концентрация СК еще ниже и термодинамическая активность также еще ниже. Как показано на рисунке 1, термодинамическая активность оказывает сильное влияние на доставку активного компонента: большая термодинамическая активность приводит к ускорению доставки. Это свидетельствует о важности «неактивных» ингредиентов при разработке рецептур: простой переход от одной масляной фазы к другой существенно влияет на доставку активного вещества.

КОНТРОЛЬ СКОРОСТИ ДОСТАВКИ – СТРАТЕГИЯ «ДОСТАВЛЯТЬ»

Стратегия создания рецептуры, помогающей высвобождать активный ингредиент из нее, обсуждалась выше, однако это только одна часть комплексной проблемы. Широко известно, что активные ингредиенты с log P (коэффициент распределения) в интервале 1–3 являются наиболее подходящими для препаратов топического применения. И после того как эти компоненты были «вытолкнуты» из состава, они должны проникать в кожу относительно легко. Тем не менее активным веществам вне этого диапазона, которые являются гидрофильными (log P<1) или очень липофильными (log P>3), нелегко проникать в кожу из-за смены водных/неводных участков гидрофильных доменов и межклеточных липидов. Для этих активных веществ было бы лучше принять стратегию «доставлять», где эксципиент, в котором растворен активный ингредиент, действует как носитель, доставляя активное вещество в кожу. Для этого эксципиент должен одновременно хорошо солюбилизировать активное вещество и сохранять хорошую растворимость в коже, работая как интенсификатор проникновения. Диметилизосорбид (DMI) – пример такого выдающегося вещества.

Таблица 1.

Модельные рецептуры с салициловой кислотой

Ингредиент	Высокая активность	Средняя активность	Низкая активность
Salicylic acid *(салициловая кислота)*	2%	2%	2%
Crodacol CS90 *(цетостеариловый спирт)*	2%	2%	2%
Brij S2 *(ПЭГ-2, стеариловый эфир)*	3%	3%	3%
Brij S721 *(ПЭГ-21, стеариловый эфир)*	2%	2%	2%
Arlamol PS11E *(PPG11, стеариловый эфир)*	40%	–	–
Crodamol OP *(этилгексилпальмитат)*	–	40%	–
Arlamol HD *(изогексадекан)*	–	–	40%
Вода	До 100%	До 100%	До 100%
Консерванты	qs	qs	qs

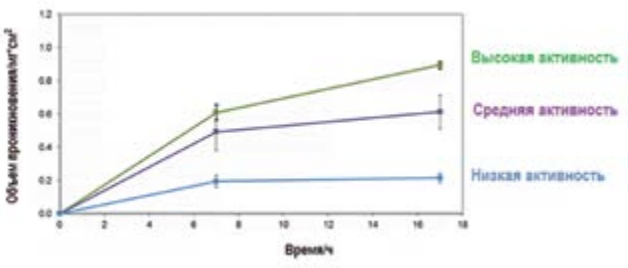


Рисунок 1. Проникновение 2% салициловой кислоты через мембрану полидиметилсилоксана (PDMS). Концентрация салициловой кислоты эквивалентна в каждой рецептуре, но различные масляные фазы (Arlamol PS11E, Crodamol OP, Arlamol HD) обеспечивают разную термодинамическую активность каждой рецептуры

В нашем следующем примере были приготовлены две рецептуры с модельным гидрофильным активным веществом пропагерманиумом (propagermanium). Препараты представляли собой простые кремы, как показано в таблице 2. Один состав включал 10% диметилизосорбида, а в контрольном составе диметилизосорбид был заменен водой. Проводились тесты на проникновение через свиную кожу, и количество активного вещества в различных фрагментах кожи измеряли через 20 ч. (Более подробные детали эксперимента можно найти в статье P. Rossi, J.W. Wiechers, C. Kelly. Improved Delivery and Efficacy with Dimethyl Isosorbide / C&T. 2005. V. 120. № 3. P. 107–111.)

Таблица 2.

Рецептуры с пропагерманиумом

Ингредиенты	Контрольный	С 10% Arlasolve DMI
Propagermanium *(пропагерманиум)*	0,5%	0,5%
Brij S2 *(ПЭГ-2, стеариловый эфир)*	1%	1%
Brij S721 *(ПЭГ-21, стеариловый эфир)*	5%	5%
Пропиленгликоля изостеарат	15%	15%
Триэтилгексаноил	3%	3%
Arlasolve DMI (диметилизосорбид)	–	10%
Глицерин	4%	4%
Ксантановая камедь	0,4%	0,4%
Вода	До 100%	До 100%
Консервант	qs	qs

На рисунке 2 показано, что препарат, содержащий 10% диметилизосорбида, обеспечил доставку большего количества активного ингредиента в глубокие слои кожи (после того, как клейкая лента была удалена с рогового слоя кожи), чем контрольный препарат. Интересно отметить, что активное вещество обнаружено только в коже и клейкой ленте, без проникновения в рецепторную жидкость. Таким образом, DMI обеспечивает ограниченную трансдермальную доставку, снижая потенциал проникновения активного компонента в кровоток, предотвращая тем самым нежелательные побочные реакции.

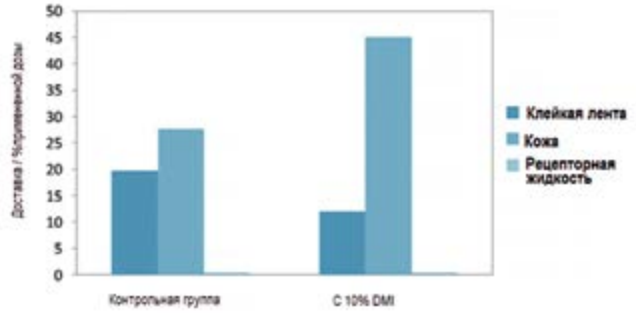


Рисунок 2. Исследование проникновения propagermanium через свиную кожу для двух составов: с 10% диметилизосорбида (DMI) и без него

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА – ПОПАДАНИЕ В НУЖНЫЙ СЛОЙ КОЖИ

Мы схематично рассмотрели регулирование скорости доставки «сложных» активных веществ в кожу. Но есть еще кое-что, что мы можем сделать как разработчики, – контролировать локализацию активного ингредиента в коже. Для этого можно использовать эмульгаторы, которые образуют жидкие кристаллы, два типа жидкокристаллических структур – олеосомные и гидросомные. Олеосомы представляют собой жидкокристаллическую систему, где множественные слои эмульгатора и воды окружают капли масла. Капли масла при оптической микроскопии выглядят как мальтийские кресты (рисунок 3a, b). Эти области состоят из множественных бислоев ПАВ, которые инкапсулируют капли масла, обеспечивая устойчивость к коалесценции и медленное, контролируемое высвобождение липофильных составляющих. Гидросомы являются жидкокристаллическими структурами, которые формируются в водных фазах эмульсии (B и C области на рисунке 3c). Рецептуры, содержащие гидросомные жидкие кристаллы, создают очень приятные легкие ощущения при нанесении, так как ламеллярные слои скользят при сдвиге.

Эффективность доставки липофильных и гидрофильных активных ингредиентов из этих двух эмульсионных систем рассмотрим на следующих примерах. На рисунке 4 показано количество **липофильного** активного ингредиента (октадеценовая кислота), определенного в различных слоях образцов свиной кожи после обработки двумя рецептурами (таблица 3). Одна из рецептур содержала олеосомную эмульсионную систему (Brij™ S2 / Brij S721, Croda), а дру-

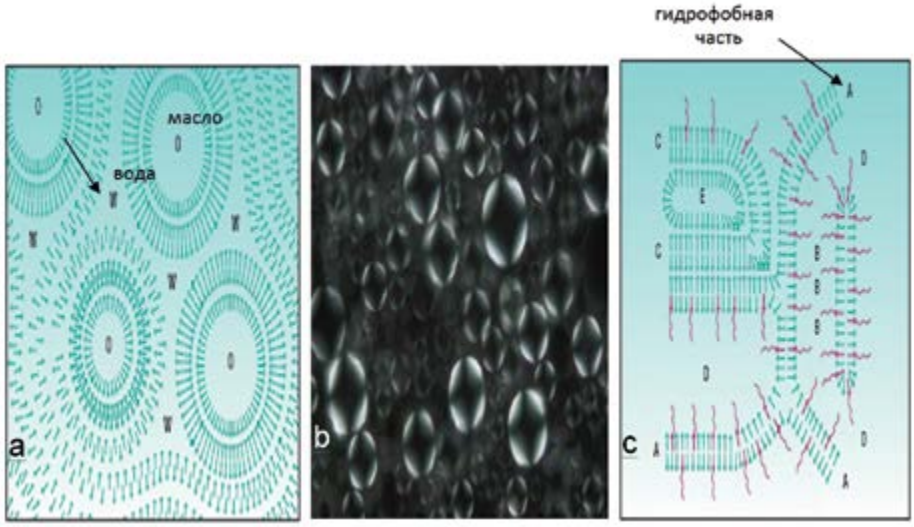


Рисунок 3. **Олеосомные (a, b) и гидросомные (c) жидкокристаллические системы. O – масло, W – вода, A – гидрофобная часть, B – связанная вода (в виде геля в фазе жидкого кристалла), C – гидрофильная часть, D – внешняя водная фаза, E-масляная фаза**

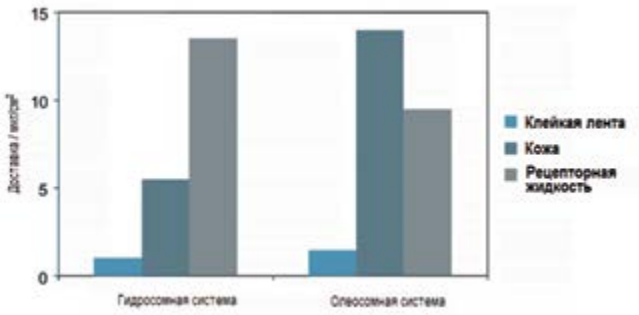


Рисунок 4. **Исследование проникновения липофильного активного ингредиента (октадеценовой кислоты) через свиную кожу. Составы идентичны, за исключением используемого эмульгатора (один из них содержит олеосомную систему эмульгаторов, второй – гидросомную систему эмульгаторов)**

гая – гидросомную эмульсионную систему (Arlacel™ 2121, Croda). Данные показывают, что наибольшее количество активного ингредиента проникло в рецепторную жидкость в случае использования гидросомной системы. Однако максимальное количество активного ингредиента непосредственно в коже наблюдалось в случае олеосомной системы. Это лишь один пример, но подтвердающий многочисленные внутренние эксперименты Croda, в которых аналогичная картина наблюдалась для ряда других липофильных активных веществ.

Для **гидрофильного** propagermanium наблюдается совершенно другой профиль проникновения. На рисунке 5 представлены сравнительные данные проникновения propagermanium в различные слои свиной кожи из олеосомных и гидросомных систем. Полученные результаты показывают, что количество активного вещества, присутствующего в коже, при олеосомной рецептуре значительно ниже, чем при использовании гидросомного препарата, в то время как рецепторная жидкость в каждом исследовании не содержит активного вещества.

Таблица 3.

Рецептуры с октадеценовой кислотой

Олеосомная рецептура		Гидросомная рецептура	
Пропиленгликоля изостеарат	15%	Пропиленгликоля изостеарат	15%
Триэтилгексаноил	3%	Триэтилгексаноил	3%
Октадеценовая кислота	2%	Октадеценовая кислота	2%
Brij S2 *(ПЭГ-2, стеариловый эфир)*	1%	Arlacel 2121 *(Сорбитана стеарат и сахарозы кокоат)*	5,5%
Brij S721 *(ПЭГ-21, стеариловый эфир)*	5%		
Глицерин	5%	Глицерин	5%
Ксантановая камедь	0,2%	Ксантановая камедь	0,2%
Вода	До 100%	Вода	До 100%
Консервант	Qs	Консервант	Qs

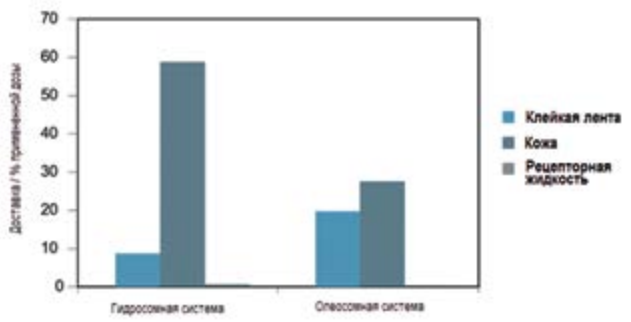


Рисунок 5. Исследование проникновения гидрофильного активного ингредиента (пропагерманиум) через свиную кожу. Составы идентичны, за исключением используемого эмульгатора (один из них содержит олеосомную систему эмульгаторов, второй – гидросомную систему эмульгаторов)

Так почему же доставка активного соединения различается в зависимости от используемой системы эмульгатора? Для липофильного активного ингредиента, находящегося в масляной фазе эмульсии, окружающая олеосомная структура действует как барьер для активного вещества, препятствуя быстрой диффузии из рецептуры и замедляя его проникновение. Это приводит к тому, что большее количество активного вещества остается на поверхности кожи. Что касается гидросомной рецептуры, то увеличенное смачивание кожи, которое происходит при использовании гидросом, приводит к повышению проникновения активного ингредиента, быстрому транспорту актива в кожу и проникновению его в рецепторную жидкость. При использовании гидрофильных активных ингредиентов, мы полагаем, гидросомная система помогает дольше содержать активный ингредиент в растворенном виде из-за снижения испарения, предоставляя больше времени для диффундирования в кожу. В то же время испарение из олеосомной рецептуры означает, что активный компонент остается на поверхности и в меньшей степени способен диффундировать в кожу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье рассмотрены способы доставки активного ингредиента с точки зрения скорости его проникновения и финального расположения в коже, а также возможность контроля этих параметров за счет регулирования состава рецептуры. Показано, что каждый ингредиент рецептуры имеет некий потенциал влияния на доставку активного компонента.

Чистота имеет значение

Ищите способ, как улучшить биодоступность, доставку и эффективность Ваших лекарственных форм?

Благодаря высокоочищенным функциональным эксципиентам Croda достигается максимальная производительность активных субстанций.

Croda предлагает широкий ассортимент продуктов, включая высокоочищенные и соответствующие основным фармакопеям солюбилизаторы и ПАВы для разработки различных лекарственных форм. Эксципиенты Super Refined™ оптимизируют доставку и повышают стабильность АФИ и, как следствие, конечных рецептур.

Мы знаем, как повысить устойчивость к окислению, оптимизировать стабильность и увеличить эффективность АФИ.

Более подробная информация на сайте www.crodahealthcare.com
Croda Россия: russia@croda.com
Екатерина Мышковская: Ekaterina.Myshkovskaya@croda.com
Тел.: 8-495-660-88-98 (доб.114) или 8-916-574-64-67

Innovation you can build on™

CRODA

22–25 ноября 2016

Москва, МВЦ «Крокус Экспо»

ufi Approved Event

pharmtech & ingredients

реклама

ITE

Организатор
Группа компаний ITE
+7 (499) 750-08-28
pharmtech@ite-expo.ru

При поддержке

Получите электронный билет

pharmtech-expo.ru

УДК 615.072

АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА СИРОПА АМБРОКСОЛА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

С.Н. Егорова[1]*, М.Р. Мцариашвили[2], В.А. Севодин[2], С.Ю. Гармонов[3]

1 – Казанский государственный медицинский университет 420012, Россия, г. Казань, ул. Бутлерова, 49

2 – ОАО «Татхимфармпрепараты» 420091, Россия, г. Казань, ул. Беломорская, 260

3 – Казанский национальный исследовательский технологический университет, 420015, Россия, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68

1 – Kazan State Medical University, 49, Butlerova str., Kazan, 420012, Russia

2 – OJSC «Tatchempharm-preparaty», 260, Belomorskaya str., Kazan, 420091, Russia

3 – Kazan National Research Technological University, 68, Karl Marx str., Kazan, 420015, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: zimsve@yandex.ru
Тел.: 8 (843) 521 44 96

Резюме. Для мониторинга стабильности процессов производства и качества сиропа амброксола использована процедура проведения обзора качества, которая является естественным продвижением производителями системы качества. Проведен обзор качества сиропа амброксола при помощи построения контрольных карт Шухарта. Оценена воспроизводимость и стабильность процесса производства лекарственного препарата относительно заданных параметров.

Ключевые слова: амброксол, обзор качества, контрольные карты, статистические методы, контроль качества.

ANALYSIS OF QUALITY INDICATORS AND PARAMETRS OF SYRUP AMBROXOL PRODUCTION USING STATISTICAL METHODS

S.N. Egorova[1]*, M.R. Mtsariashvili[2], V.A. Sevodin[2], S.Yu. Garmonov[3]

Abstract. The quality review procedure, which is an essential improvement of the quality system by manufacturers, was used for monitoring the stability of the production process and quality of Ambroxol syrup. The quality review of Ambroxol syrup was carried out, using Shewhart's control charts. Reproducibility and stability of the manufacturing process of the drug product were evaluated with respect to a set of parameters.

Keywords: Ambroxol, quality review, control charts, statistical methods, quality control.

ВВЕДЕНИЕ

Обзор качества продукта (ОК) – это регулярная периодическая или постоянно проводимая оценка качества всех зарегистрированных лекарственных препаратов (ЛП) (включая препараты, предназначенные исключительно для экспорта), которая проводится для подтверждения приемлемости утвержденного производственного процесса, для выявления любых тенденций, а также для выявления возможных улучшений процесса и продукта [1].

При составлении ОК данные, полученные при контроле качества серии или продукта, должны обрабатываться и анализироваться с использованием соответствующих статистических методов (контрольные карты, временные ряды, диаграммы и т.п.) [2].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось проведение обзора качества сиропа амброксола при помощи построения контрольных карт Шухарта и оценка воспроизводимости и стабильности процесса производства ЛП относительно заданных параметров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен статистический анализ показателей качества и процессов производства 48 товарных серий ЛП Амброксол, сироп 3 мг/мл, 100 мл производства ОАО «Татхимфармпрепараты» (ЛП 000899-181011) с использованием метода контрольных карт, построенных при помощи Microsoft Excel. Использовалась «классическая» пара контрольных карт Шухарта – карты индивидуальных значений (X-карты) и карты скользящих (MR-карты). Анализ процесса включал этап сбора исходных данных для оценки изучаемого процесса по показателям качества. Далее следовала обработка данных с их упорядочением, вычислением статистических характеристик, построением контрольных карт с контрольными границами [3–5]. Затем осуществлялся непосредственный анализ контрольных карт, формировались выводы и общее заключение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрены наиболее значимые показатели качества ЛП и параметры технологического процесса производства ЛП Амброксол, сироп 3 мг/мл, 100 мл.

Показатели качества нерасфасованной и готовой продукции

Контрольные карты для нерасфасованной и готовой продукции были проанализированы по следующим показателям качества: pH, плотность, количественное содержание амброксола гидрохлорида, количественное содержание натрия бензоата.

Распределение значений показателей качества сиропа амброксола pH и плотность сосредоточены в контрольных границах ±3σ и характеризуются стабильностью.

В то же время распределение значений количественного содержания амброксола гидрохлорида и натрия бензоата в нерасфасованной продукции нестабильно по разбросу и положению среднего (рисунки 1, 3).

Так, среднее значение показателя «количественное содержание амброксола гидрохлорида» в ЛП *Амброксол, сироп 3 мг/мл, 100 мл* составляло 2,95 мг/мл. Анализ X-карт (рисунок 1) показывает, что несколько серий ЛП (16, 17, 18, 21) находятся непосредственно на верхней границе допуска, а также выходят за контрольные границы ±3σ.

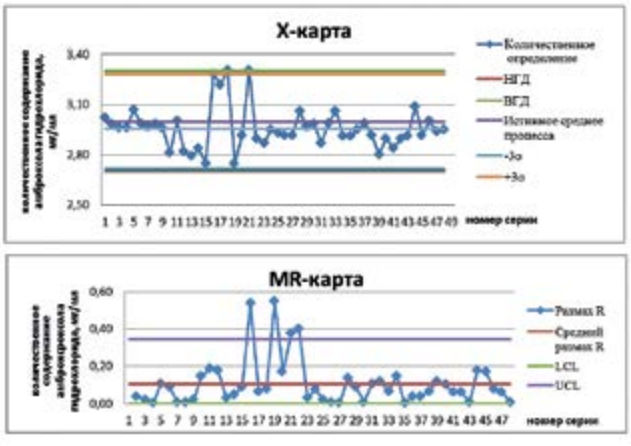


Рисунок 1. X- и MR-карты распределения значений количественного содержания амброксола гидрохлорида в нерасфасованной продукции

После повторных перемешиваний сиропа и контроля качества указанные серии соответствовали всем требованиям НД.

Анализ контрольных карт готовой продукции показал, что распределение значений количественного содержания амброксола гидрохлорида нестабильно по разбросу: среднее значение составляет – 2,9 мг/мл, что несколько ниже среднего значения спецификации, но входит в границы допуска. Характер распределения количественного содержания амброксола гидрохлорида в готовой продукции идентичен распределению в нерасфасованной продукции. Те же серии, что и в нерасфасованной продукции, находятся на верхней границе допуска (18, 21, 17).

На приведенной категоризованной диаграмме размаха количественного содержания амброксола гидрохлорида (рисунок 2) наблюдаются незначительные различия между средними значениями подгрупп «нерасфасованная продукция» и «расфасованная продукция».

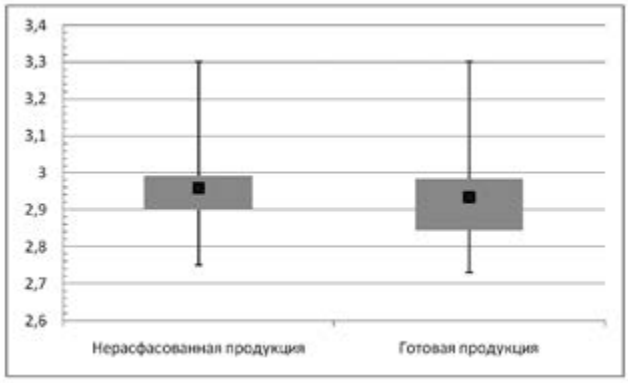


Рисунок 2. Категоризованная диаграмма размаха количественного содержания амброксола гидрохлорида

Внутригрупповая изменчивость значений показателя «количественное содержание амброксола гидрохлорида» в готовой продукции больше внутригрупповой изменчивости данного показателя в нерасфасованной продукции. Различия между максимальными значениями, а также минимальными значениями в подгруппах не наблюдаются; между средними значениями достоверные статистические различия отсутствуют.

Среднее значение распределения показателя «количественное содержание натрия бензоата» смещено относительно номинала (5,0 мг/мл) и составляет 4,95 мг/мл (рисунок 3).

X-карта свидетельствует о том, что процесс нестабилен по разбросу, изменчивость высокая, присутствуют серии, выходящие за границы ±3σ, которые практически совпадают с границами допуска, в связи с высокой изменчивостью показателя, о чем свидетельствует MR-карта.

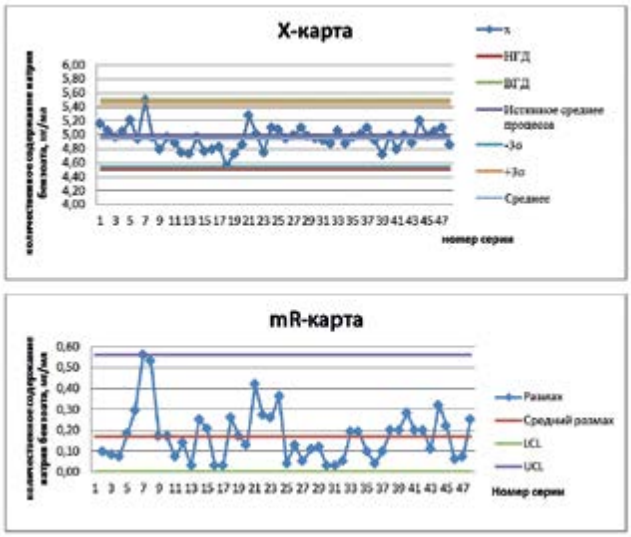


Рисунок 3. X- и MR-карты распределения значений количественного содержания натрия бензоата в нерасфасованной продукции

Характер распределения количественного содержания натрия бензоата в готовой продукции идентичен распределению в нерасфасованной продукции (рисунок 4).

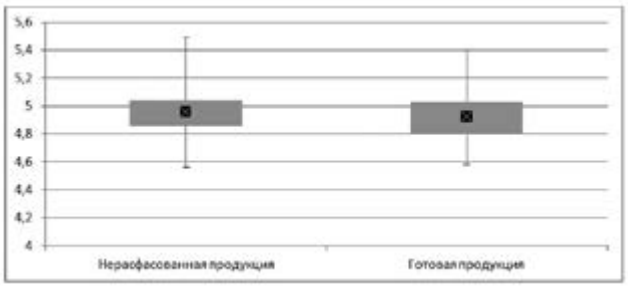


Рисунок 4. Категоризованная диаграмма размаха количественного содержания натрия бензоата

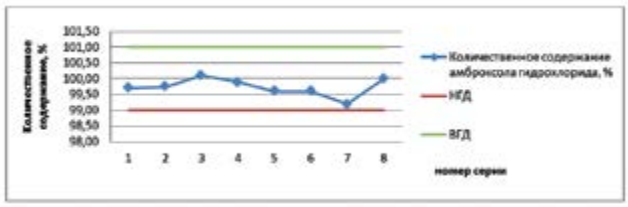
Внутригрупповая изменчивость значений показателя «количественное содержание натрия бензоата» в готовой продукции больше внутригрупповой изменчивости данного показателя в нерасфасованной продукции. Наблюдаются незначительные различия между максимальными значениями; между минимальными значениями подгрупп различия не наблюдаются. Между средними значениями достоверные статистические различия отсутствуют.

Качество исходного сырья

За исследуемый период проанализированы показатели качества 8 поставок амброксола гидрохлорида от производителя «Шилпа Медикер Лимитед», Индия, 4 поставки натрия бензоата от производителя Emerald Perfomance Materials, Нидерланды, 9 поставок сорбитола от производителя ООО «Компания «Сладкий мир», Россия, 5 поставок лимонной кислоты моногидрата от производителя WEIFANG ENSIGN INDUSTRY CO. LTD, Китай, 6 поставок натрия цитрата пентасесквигидрата от производителя ЗАО «Унихим», Россия (из них две поставки не соответствовали требованиям НД по показателю внешний вид и были возвращены производителю), 12 поставок 1,2-пропиленгликоля от производителя THE DOW CHEMICAL COMPANY, Германия, и INEOS, Германия, 4 поставки сырья рибофлавина от производителя «ДСМ Нутришнл Продактс ГмбХ», Германия, 6 поставок ароматизатора фруктового (эссенция ароматическая пищевая) от производителя ООО «Комбинат химико-пищевой ароматики», Россия.

Установлено, что за исследуемый период качество исходного сырья удовлетворительно и соответствует требованиям нормативной документации (НД). Все показатели стабильны и имеют низкую изменчивость.

На рисунках 5, 6 представлены графики распределения значений показателя «количественное содержание амброксола гидрохлорида» и «количественное содержание натрия бензоата» относительно границ допуска.



Рисеунок 5. График распределения значений показателя «количественное содержание амброксола гидрохлорида» относительно границ допуска

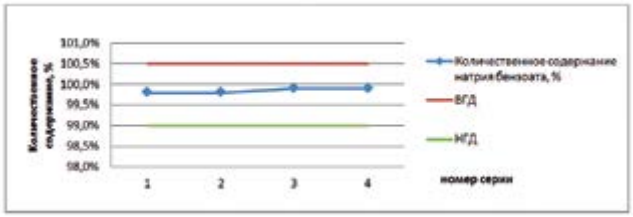


Рисунок 6. График распределения значений показателя «количественное содержание натрия бензоата» относительно границ допуска

В результате анализа досье на серии ЛП зависимость количественного содержания амброксола гидрохлорида и количественного содержания натрия бензоата в сиропе от поставщика, даты поставки, номера партии, количества загружаемого сырья не выявлена.

Параметры процесса производства

Процесс производства сиропа амброксола состоит из следующих технологических стадий: приготовление раствора рибофлавина в 1,2-пропиленгликоле, приготовление раствора сорбитола, приготовления амброксола сиропа 3 мг/мл, фильтрация амброксола сиропа 3 мг/мл.

Приготовление раствора рибофлавина проводят в реакторе, осуществляя растворение в 1,2-пропиленгликоле. Содержимое перемешивают от 10 до 20 мин.

Приготовление раствора сорбитола осуществляют в реакторе с загруженным объемом воды очищенной. Отвешенное количество сорбитола загружают в реактор при температуре воды от 30 до 50 °С. Содержимое реактора перемешивают и доводят до кипения. Раствор сорбитола готовят при температуре не более 110 °С от 15 до 20 мин.

На стадии приготовления амброксола сиропа осуществляется смешение охлажденного до (90–70) °С раствора сорбитола с раствором рибофлавина в 1,2-пропиленгликоле. Перемешивание осуществляют в течение 15–20 мин. При охлаждении содержимого реактора до температуры (50–70) °С осуществляется загрузка натрия бензоата. Перемешивание производится до полного растворения кристаллов натрия бензоата. При температуре содержимого реактора (50–70) °С осуществляется загрузка натрия цитрата пентосесквигидрата. Перемешивание производится до полного растворения кристаллов. Содержимое реактора охлаждают до температуры (40–35) °С и загружают амброксола гидрохлорид, перемешивают до полного растворения и добавляют кислоты лимонную моногидрат при температуре содержимого реактора не более 40 °С. При постоянном перемешивании в реактор добавляется ароматизатор фруктовый при температуре содержимого реактора не более 30 °С. Перемешивание полученного амброксола сиропа осуществляют в течение 30–40 мин.

В соответствии с требованиями НД на каждой стадии процесса производства сиропа амброксола определены контрольные точки.

Для улучшения процесса в отношении уменьшения разброса значений количественного содержания амброксола гидрохлорида проанализированы параметры «температура загрузки амброксола» и «время перемешивания» на различных технологических стадиях.

Температура загрузки амброксола гидрохлорида должна находиться в интервале (35–40) °С. В результате анализа контрольных карт установлено, что распределение значений сосредоточено на верхней границе спецификации, процесс является стабильным.

При растворении ингредиентов в НД указан интервал значений рекомендуемого времени перемешивания, определенный экспериментально при проведении опытных загрузок; полнота растворения определяется визуально.

В качестве примера растворения вспомогательных веществ на рисунке 7 представлены X- и MR-карты распределения значений времени перемешивания на стадии приготовления раствора рибофлавина в 1,2-пропиленгликоле (10–20 мин согласно НД).

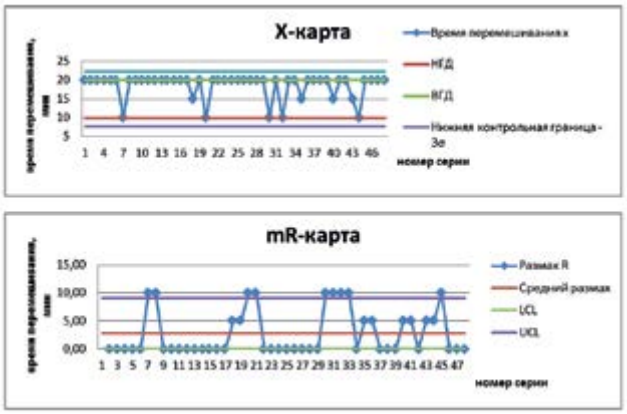


Рисунок 7. X- и MR-карты распределения значений времени перемешивания раствора рибофлавина в 1,2-пропиленгликоле

Распределение значений времени перемешивания раствора рибофлавина в 1,2-пропиленгликоле характеризуется большим разбросом, значения расположены как на нижней границе спецификации, так и на верхней, при этом не выходят за границу спецификации.

После загрузки всех вспомогательных веществ и амброксола в НД регламентировано время перемешивания сиропа – 30–40 мин (определено экспериментально по достижению полноты растворения ингредиентов). Установлено, что распределение значений нестабильно, сосредоточено на нижней и верхней границе спецификации, характеризуется большим разбросом (рисунок 8).

Таким образом, в результате обработки данных результатов анализа ЛП *Амброксол, сироп 3 мг/мл, 100 мл* выявлена тенденция к нестабильности по разбросу показателя качества *«количественное определение»*. Для выявления причин тренда и возможных улучшений продукта построена причинно-следственная диаграмма Исикавы (рисунок 9).

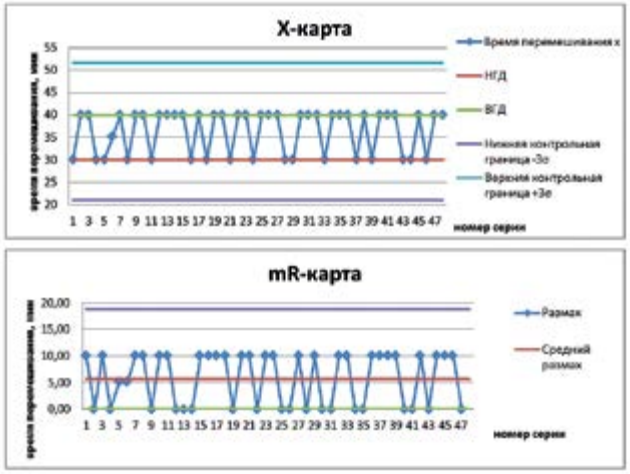


Рисунок 8. X- и MR-карты распределения значений времени перемешивания амброксола сиропа

При построении причинно-следственной диаграммы Исикавы было выявлено значительное влияние визуального определения полноты растворения на изменчивость показателя качества «количественное определение». После проведения контрольных загрузок и экспериментального определения времени перемешивания, необходимого для обеспечения полноты растворения ингредиентов, были внесены изменения в НД. Время перемешивания после загрузки натрия бензоата рекомендовано не менее 20 мин, после загрузки амброксола гидрохлорида – не менее 1,5 ч.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный при помощи контрольных карт Шухарта обзор качества свидетельствует о том, что процесс производства сиропа амброксола воспроизводим, однако вариабельность показателя качества «количественное содержание амброксола» и «количественное содержание натрия бензоата» высокая. Для стабилизации показателей качества готовой продукции и исключения субъективности оценки полноты растворения рекомендовано регламентировать значения времени перемешивания на стадии приготовления амброксола сиропа 3 мг/мл после загрузки каждого ингредиента.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.В. Александров. Проведение периодического обзора качества лекарственных препаратов // Промышленное обозрение. 2008. № 5. URL: http://archive.promoboz.com/n5_10/28-30.pdf (дата обращения 15.07.2016).
2. Приказ Министерства промышленности и торговли от 14 июня 2013 г. № 916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств».
3. С.И. Солонин. Метод контрольных карт: учебное пособие. – Екатеринбург: ЦНОТ ИТОО УрФУ, 2014. 213 с.
4. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 1. Общие принципы [Текст]: ГОСТ Р ИСО 7870-1-2011. Введ. 2011-11-09 – М.: Стандартинформ, 2012.
5. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта [Текст]: ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Введ. 2015-10-06 – М.: Стандартинформ, 2015.

Рисунок 9. Диаграмма Исикавы X- и MR-карты распределения значений времени перемешивания амброксола сиропа

В новом издании обсуждаются ключевые направления развития биофармацевтической отрасли как в нашей стране, так и зарубежом

В книге находят отражение вопросы разработки и внедрения технологии получения лекарственных соединений из биопродуцентов, проектирования и обеспечения качества биофармацевтической продукции посредством внедрения принципа Quality by Design, выбора технологического и аналитического оборудования для биофармы, а также описаны стандартные решения, ускоряющие разработку и делающие технологические процессы эффективнее и производительнее

www.phct-group.com
info@phct-group.com

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)

8 800 333-42-24
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК
ПО РОССИИ 24 ЧАСА)

При поддержке

Pharmcontract® group of companies

В сотрудничестве

GE Healthcare

УДК 57.085.2

1 – Научно-производственная биотехнологическая платформа «ЭкспертБИОТЕХ», 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, 18

1 – R&D and Pilot Plant Biotechnological Platform «ExpertBIOTECH», 18, Gamaleya str., Moscow, 123098, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail:
dmitriy.gusarov@expert-biotech.com

ДАУНСТРИМ-ПРОЦЕСС ОЧИСТКИ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Д.А. Гусаров[1]*

Резюме. Развитие биофармацевтической отрасли начинается с разработки эффективных продуцентов. Однако чем сложнее белок и его продуцент, тем большее количество примесей, среди которых эндотоксины, белки хозяина, вирусы, родственные примеси, агрегаты и высокомолекулярные контамитанты, синтезируется или накапливается в ходе процесса получения. Статья описывает подходы к выделению и очистке биофармацевтических белков (даунстрим-процесс). Обсуждаются основные хроматографические и нехроматографические методы.

Ключевые слова: даунстрим-процесс, выделение и очистка, примеси.

DOWNSTREAM PROCESS OF BIOPHARMACEUTICALS

D.A. Gusarov[1]*

Abstract. The development of the biopharmaceuticals begins with the development of effective producers. But the more complex protein and its producer, the greater the amount of impurities is synthesized or accumulated during the upstream process. Among them are as follows: bacterial endotoxins, viruses, host cell proteins, related impurities, aggregates and high molecular weight admixtures etc. This article describes approaches to the downstream process purification of biopharmaceutical proteins. We discuss the main chromatography and non-chromatographical methods.

Keywords: downstream process, purification, impurities.

ВВЕДЕНИЕ

Полученные в ходе биопроцесса лекарственные средства (зачастую лишенные биологической активности) необходимо очищать от примесей до терапевтических степеней чистоты. Весь цикл подобного даунстрим-процесса можно разделить на совокупность операций по выделению белка в той или иной форме из культуральной жидкости / клеток и очистки его от примесей. Для того чтобы определиться с операциями даунстрим-процесса, нужно точно знать [1]:

(1) физико-химические свойства белка (аминокислотную последовательность, которая определяет заряд, массу, гидрофобность и т.д.; третичную последовательность – в основном знание о цистеиновых связях и свободных цистеинах; наличие или отсутствие посттрансляционных модификаций и т.д.);

(2) способ биопроцессинга белка (платформа биосинтеза, способ производства – интрацеллюлярно или экстрацеллюлярно, физическое состояние в клетке – в растворе или в тельцах включения);

(3) спектр возможных примесей, включая возможности деградации продукта во время производственных процессов и хранения.

В широком плане можно представить себе даунстрим-процесс в виде схемы, представленной на рисунке 1.

К интрацеллюлярным белкам можно относить в основном некоторые прокариотические белки (реже – дрожжевые белки). Стадии разрушения и отделения дебрисов являются в технологическом плане лимитирующими выделение – это основной недостаток интрацеллюлярных платформ биосинтеза. Экстрацеллюлярные платформы, к которым относятся все эукариотические системы биосинтеза, лишены этого недостатка, что должно облегчать последующую очистку.

Однако сам факт проведения дополнительных операций – а это не только описанные процедуры выделения белка из клеток, но еще и стадии отмывки тел включения, их растворения в денатурирующих буферах – зачастую способствует тому, что белок, приходящий на очистку, гораздо более «чистый» по сравнению с подобным же экстрацеллюлярным бел-

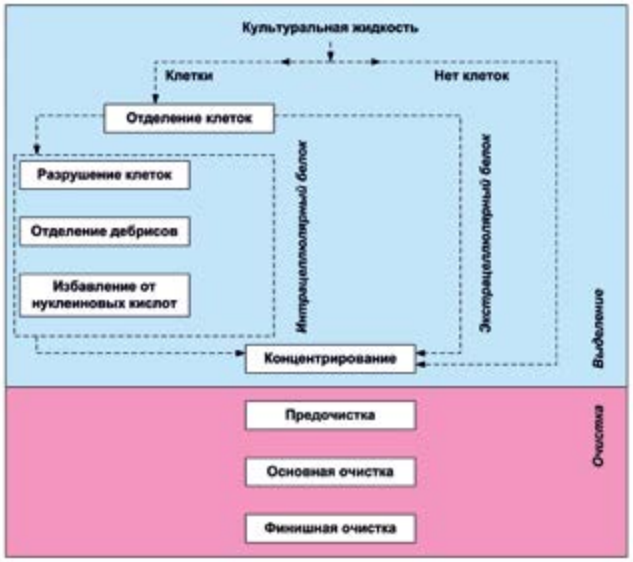


Рисунок 1. Схема даунстрим-процесса получения генно-инженерных белков

ком. Кроме того, концентрации выделяемых интрацеллюлярных белков также существенно выше, что облегчает и очистку, и внутрипроизводственный контроль всех этапов.

Следующие примеси должны быть минимизированы в ходе даунстрим-процесса:

(1) процессуальные, а именно:

(1.1) производные клеточного субстрата: остаточные нецелевые белки продуцента, балластные молекулы ДНК или ее фрагменты, компоненты клеточных стенок;

(1.2) производные клеточных культур: индукторы, антибиотики, плазма, компоненты питательных сред;

(1.3) производные даунстрим-процесса: ферменты, химические и биохимические реагенты, неорганические соли, растворители, носители, смытые с хроматографических колонн лиганды;

(2) родственные, а именно:

(2.1) продукты ферментативной или химической деградации;

(2.2) модифицированные формы целевой молекулы: дезамидированные, изомеризованные, окисленные формы, формы с некорректно замкнутыми дисульфидными связями, формы с некорректными конъюгированными остатками (гликозилирование, фосфорилирование);

(2.3) агрегаты целевого белка.

Очевидно, что максимальное избавление от примесей возможно только с помощью многостадийной очистки. В целом многостадийность можно описать тремя составляющими:

– предочистка, или грубая очистка от механических включений и примесей типов (1.1), (1.2), (2.3);

– основная очистка, или избавление от родственных примесей типов (2.1), (2.2) и остатков (2.3);

– финишная очистка, или доочистка от примесей типа (1.3) и иногда следовых количеств остальных примесей.

К наиболее опасным для человека примесям, очистка от которых должна быть максимально эффективна, относятся остатки нуклеиновых кислот продуцента, вирусы и эндотоксины клеточной стенки бактерий.

ОЧИСТКА БЕЛКОВ ОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ

Липополисахариды (ЛПС), или бактериальные эндотоксины (БЭ), – это фрагменты внешней клеточной стенки всех грамотрицательных бактерий, высоко токсичные для человека и способные приводить к развитию ряда тяжелых заболеваний, даже таких, как сепсис, рак и диабет [2–4]. Показано, что эндотоксины даже в очень низких концентрациях существенно воздействуют на организм животных и человека. Это воздействие главным образом определяется проведением токсического сигнала эндотоксина при участии TLR4, который является обязательным условием сигнализации эндотоксина, активация которого инициирует комплексную систему взаимодействия сигнальных молекул, что приводит к проявлению пирогенности и токсичности [5]. Например, ингаляционное введение мышам 1 мкг ЛПС *Escherichia coli* O111:B4 приводило к значительному возрастанию антител в крови животных (более 3000 нг/мл IgE, более 2000 мкг/мл IgG) [6].

Поэтому активные фармацевтические субстанции (АФС), особенно служащие для создания инъекционных лекарственных форм, должны быть максимально избавлены от подобных примесей. Фармакопеи всего мира рекомендуют лимитировать содержание БЭ в лекарственных формах внутривенного назначения до 5 единиц (EU, или endotoxin unit) на 1 кг веса тела за час [7]. Одна единица приблизительно равна 100 пкг эндотоксина.

Ниже (рисунок 2) приводится схематический вид химической структуры бактериального ЛПС [8]. Полисахаридный фрагмент содержит О-специфическую цепь, включающую повторяющуюся последовательность олигосахаридных единиц на основе гликозильных остатков (до 50), а также ядро [9]. О-специфическая цепь уникальна для каждого прокариотического штамма; она вносит сущест-

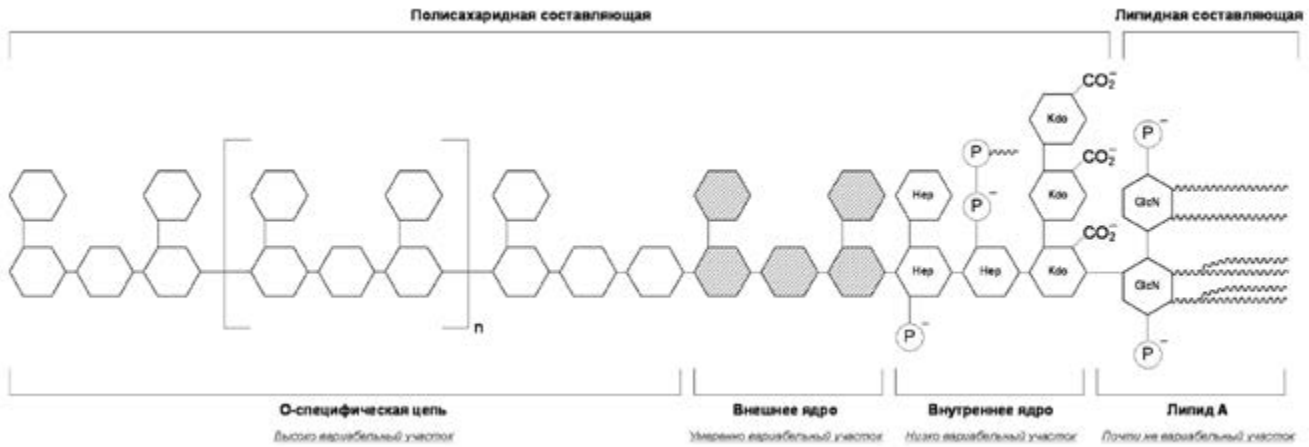


Рисунок. 2. **Схематическая химическая структура бактериального липополисахарида. Сокращения: Hep – гептоза; Kdo – 2-кето-3-деоксиоктоновая кислота; GlcN – N-ацетилглюкозамин; P – фосфат**

венный вклад в серологическую специфичность, вызывая иммунный ответ в организмах человека и животных. Основными составляющими ядра являются остатки гептозы (гексапиранозы во внешней части ядра и L-глицеро-D-манногептозы во внутренней части), а также группы 2-кето-3-деоксиоктоновой кислоты.

Липидный фрагмент эндотоксинов, или липид А, является наименее вариабельной и наиболее консервативной частью. Липид А отвечает за эндотоксическую активность [10]. Она проявляется в стимулировании производства и высвобождения гранулоцитами и макрофагами эндогенных медиаторов, таких как биоактивные липиды, NO, цитокины (например, интерлейкин-1) [11–13]. Большие концентрации таких медиаторов в организме могут привести к множеству различных патофизиологических реакций, как-то: повышению температуры тела, лейкопении, тахикардии, гипотонии, рассеянной внутрисосудистой коагуляции и т.д. [14, 15].

Важно отметить, что липид А и внутреннее ядро полисахаридной составляющей эндотоксинов частично фосфорилированы. Это приводит к тому, что в растворах с нейтральным или основным pH эндотоксины будут иметь выраженный отрицательный заряд (pKa 1,3) [16].

Молекулярная масса мономеров различных ЛПС может варьировать в достаточно широких диапазонах, что объясняется вариабельностью О-специфической цепи. Известны эндотоксины с молекулярными массами от 2,5 кДа (с укороченной О-специфической цепью) до 70 кДа (с очень длинной О-специфической цепью) [17]. Большая же часть ЛПС имеет молекулярную массу от 10 до 20 кДа.

Однако необходимо отметить, что мономерные ЛПС могут образовывать супрамолекулярные структуры за счет неполярных взаимодействий между липидными «хвостами», а также за счет образования «сшивок» фосфатных групп бивалентными катионами [18–20]. Таким образом, в водных растворах эндотоксины могут агрегировать в ламелярные, кубические или инвертированные гексагональные структуры, такие как мицеллы или везикулы (рисунок 3). Диаметр подобных структур достигает 0,1 мкм, а молекулярная масса – 1000 кДа. Бивалентные катионы, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+}, способствуют образованию супрамолекулярных структур, а детергенты, ЭДТА и бел-

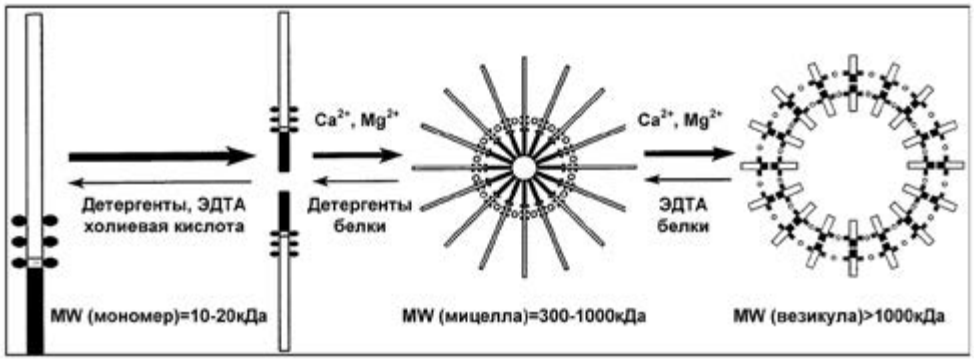


Рисунок 3. **Схема полиморфизма липополисахаридов в водных растворах**

ки, наоборот, смещают равновесие в сторону образования мономерных форм [21, 22].

Итак, ЛПС по своей природе гидрофобны (из-за включения липидных хвостов) и отрицательно заряжены (из-за наличия остатков фосфорной кислоты). Несмотря на то, что мономеры ЛПС относительно малы (10–20 кДа), они могут образовывать высокомолекулярные (выше 1000 кДа) структуры, достаточно устойчивые в водных растворах. Все эти свойства позволяют предложить ряд решений для очистки белков, составляющих АФС, от примесных бактериальных эндотоксинов.

Ультрафильтрация и гель-фильтрация

Очевидно, что супрамолекулярные формы эндотоксинов (мицеллы и везикулы) могут быть достаточно легко отделены от белка с меньшей молекулярной массой. Логично предположить, что такие методы, как ультрафильтрация или гель-фильтрация, могут быть использованы для очистки АФС.

Показано, что использование ультрафильтрационных мембран с порами 300 кДа позволяет достаточно эффективно (до концентрации 0,06 EU/мл) удалять ЛПС из водных растворов, не содержащих белки [23]. Однако большинство белков дестабилизируют супрамолекулярные структуры ЛПС, дезагрегируя их до мономерных форм. Поэтому для эффективного разделения необходимо дополнительно стимулировать полиморфизм эндотоксинов. Для этой цели предложено вводить в раствор ионы бивалентных металлов, а именно Ca^{2+} или Mg^{2+} [24]. Эти ионы резко смещают равновесие в сторону образования везикул, размер которых более 1000 кДа, и даже после удаления катионов из раствора (при отсутствии дестабилизирующих факторов) везикулы могут превращаться в мицеллы размером 300–1000 кДа, не распадаясь до мономеров. Например, введение 45 мМ Ca^{2+} в раствор, содержащий 85 мкг/мл гемоглобина, загрязненного эндотоксинами в концентрации 5 мкг/мл, способствовало образованию крупных везикул ЛПС, которые были отделены с помощью ультрафильтрации (финальное содержание эндотоксинов в растворе гемоглобина составило 6 пг/мл) [25].

Это же свойство, очевидно, можно использовать для удаления эндотоксинов методом гель-фильтрации. Стабилизованные бивалентными катионами везикулы должны элюироваться раньше, чем белки. Однако положительно заряженные белки могут электростатически связываться с ЛПС, что обычно резко уменьшает эффективность очистки [26].

Двухфазная экстракция

Этот метод основан на использовании детергентов в концентрациях, превышающих их критические концентрации мицеллообразования. Неполярные взаимодействия между детергентом и липидной частью эндотоксинов приводят к образованию мицеллярных структур. Агрегированные мицеллы при температурах выше точки мицеллообразования содержат незначительное количество воды и представляют собой отдельную фазу, в которую вовлечена большая часть эндотоксинов от общего содержания. Такие мицеллы могут быть отделены с помощью центрифугирования. Экстракцию при необходимости повторяют до тех пор, пока содержание эндотоксинов в растворе белка не окажется ниже требуемой величины [27, 28].

Для двухфазной экстракции чаще всего используются неионогенные детергенты ряда «Тритон». Например, точка мицеллообразования Тритона X-114 составляет +22 °C, поэтому смешение раствора белка, обогащенного эндотоксинами, и детергента проводят при пониженных температурах (+5 °C), а при нагревании смеси до температур выше +22 °C образуются две фазы, далее разделяемые центрифугированием.

Двухфазная экстракция позволяет снизить содержание ЛПС на несколько порядков, при этом не вызывая денатурации белка и не снижая его активность. Недостатком метода является то, что водная, обогащенная белком фаза содержит некоторое количество детергента, которое сложно контролировать методами анализа. Более того, сообщалось, что остаточный детергент в растворе белка значительно затрудняет проведение SDS-PAGE и LAL-тестов [29]. Таким образом, необходимо дополнительно вводить в процесс стадию гель-фильтрации для избавления белка от следов детергента. Необходимо также отметить, что разделение образующихся фаз методом центрифугирования проходит довольно плохо. Так, например, 4000–5000 g оказывается недостаточно для эффективного разделения: нижняя, осажденная гелеподобная фаза при неосторожном движении сразу же смешивается с верхней фазой. Очевидно, что такая методика не может быть использована в промышленных условиях.

Ионообменная хроматография

Рекомбинантные белки, выделяемые из культуральной жидкости штаммов-продуцентов чаще всего в форме тел включения, содержат значительное количество эндотоксинов клеточной стенки. Для очистки таких белков используются методы ионообменной хроматографии. Важно помнить, что pH подвижной фазы должен быть ниже изоэлектрической точки очищаемого белка, но выше pKa эндотоксинов. Слабо отрицательно или нейтрально заряженные белки чаще всего очищают с помощью анионообменной хроматографии [30]. При pH 8 большая часть таких белков будет десорбироваться при концентрации вытесняющего агента (например, хлорида натрия) 0,1–0,3 М. Эндотоксины, будучи сильно связанными с матрицей сорбентов, десорбируются только при концентрации 0,5 М или выше. Однако такие отрицательно заряжен-

ные белки, как бычий сывороточный альбумин, не будут эффективно очищаться от ЛПС [31].

В случае основных, положительно заряженных белков используют катионообменную хроматографию. Теоретически такие белки при pH 2-4 сорбируются матрицей, в то время как ЛПС элюируются без сорбции.

Однако на практике ионообменная хроматография не всегда позволяет избавить многие белки от эндотоксинов до необходимых степеней чистоты, так как отрицательно заряженные ЛПС могут образовывать комплексы с белками. Например, как сообщалось Sang-Hyun Pyo и соавторами, при очистке рекомбинантного гистона H 1,5, сильно основного белка (pI 10,91), на катионите СП-сефарозе (GE Healthcare, Швеция) содержание эндотоксинов было снижено с 7,89 EU/мг до 7,48 EU/мг, а на анионите ДЭАЭ-сефарозе (GE Healthcare, Швеция) – до 7,33 EU/мг [32].

Однако результаты ионообменной хроматографической очистки могут быть значительно улучшены, если использовать Тритон X-114. Раствор белка предварительно смешивают с 1% детергентом при пониженной температуре, а затем наносят на колонну, упакованную ионообменным сорбентом, предварительно уравновешенную подвижной фазой, также включающей 1% детергента. С повышением концентрации вытесняющей соли белок элюируется, практически лишенный эндотоксинных примесей (менее 0,05 EU/мг). Однако проблема контроля чистоты очищенного продукта остается, как и в случае использования двухфазной экстракции. Также серьезным недостатком такого метода является использование очень больших объемов подвижных фаз для промывки колонны [33, 34].

Адсорбционная хроматография

Было предложено использование хроматографии на активированном угле для удаления эндотоксинов [35, 36]. Однако такой метод можно применять для очистки подвижных фаз и растворов реагентов, используемых в биофармацевтических производствах, но не для очистки белковых растворов из-за необратимой сорбции неселективными адсорбентами.

Обращенно-фазовая ВЭЖХ

Было неоднократно показано, что ОФ ВЭЖХ является отличным средством для избавления от эндотоксинов. Гидрофобные липидные группы обеспечивают эффективное связывание с неподвижной фазой ВЭЖХ-сорбентов, поэтому время удержания эндотоксинов значительно выше времени удержания большинства белков; более того, десорбция эндотоксинов наступает только при существенных концентрациях органического модификатора в подвижной фазе (до 70–90% ацетонитрила) [37, 38].

Действительно, многие рекомбинантные белки, очищенные с помощью ОФ ВЭЖХ, практически не содержат бактериальных эндотоксинов [39]. Среди таких продуктов – инсулин человека [40, 41], гормон роста [42], гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [43], β-интерферон [44] и другие.

Однако со временем эндотоксины могут накапливаться на сорбенте, что приводит к их элюции вместе с продуктом, возможно, из-за вытеснения последним ЛПС с занятых ими активных центров сорбента [45]. То есть сорбент необходимо периодически депирогенизировать, промывая подвижной фазой, включающей, помимо органического модификатора, 1 М гидроксид натрия или 1–2 М уксусную кислоту. Подвижная фаза с крайними значениями pH может негативно отразиться на работоспособности и сроке эксплуатации сорбента. Это, конечно, ограничивает использование ВЭЖХ для очистки белков от эндотоксинов.

Хроматография гидрофобных взаимодействий

Хроматография гидрофобных взаимодействий, или HIC (hydrophobic interaction chromatography), является достаточно популярным методом очистки белков и пептидов, так как замечательно вписывается в линейку даунстрим-процесса: после ионообменной хроматографии элюируемый продукт содержит значительное количество соли, что позволяет наносить его сразу на HIC-колонну. Как и в случае ВЭЖХ, эндотоксины клеточной стенки удерживаются сорбентами HIC сильнее, чем белки. Однако HIC существенно уступает ВЭЖХ как в эффективности, так и в производительности. Основным преимуществом перед ВЭЖХ является возможность проводить депирогенизацию сорбента растворами щелочей.

Примеры использования такого метода хроматографической очистки от ЛПС: очистка на сорбенте фенил-тойоперл 650M (Tosoh, Япония) рекомбинантного 42 кДа фрагмента белка MSP1, компонента противомалярийных вакцин [46]; очистка антигена вируса гепатита Б от пирогенов [47].

Описана интересная оптимизация метода очистки белков от эндотоксинов с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий [30]. В раствор образца белка, предназначенного для нанесения на колонну, упакованную фенил-сефарозой (GE Healthcare, Швеция), вводили сульфат аммония и гуанидина гидрохлорид в таких концентрациях, в которых не наблюдалось осаждения (высаливания) продукта (однако их концентрации должны быть близки к точке осаждения). В таких условиях продукт элюировался без сорбции, в то время как эндотоксины связывались с лигандами сорбента. Таким способом удалось, выделяя

целевой белок из телец включения, одновременно снизить содержание эндотоксинов с 1 100 000 EU/мг до 200 EU/мг.

Аффинная хроматография

На данный момент аффинная хроматография (АХ) является наиболее признанным методом избавления от эндотоксинов. Однако ЛПС, биосинтезируемые различными штаммами, сильно отличаются друг от друга главным образом из-за различных О-специфических цепей. Поэтому аффинный сорбент, предназначенный для связывания ЛПС, должен специфически взаимодействовать с наиболее консервативной частью эндотоксинов, а именно с липидом А. Такая специфичность может достигаться за счет модификации матрицы сорбента следующими лигандами: полимиксином Б, гистамином/гистидином, остатком деоксихолиевой кислоты, полиэтиленимином, поли-ε-лизином и т.д.

Наибольшее распространение среди аффинных лигандов получил полимиксин Б (рисунок 4). Он представляет собой поверхностно-активный, положительно заряженный циклический пептид, который способен дезагрегировать комплексы с эндотоксинами и связываться с липидом А [48]. Например, использование полимиксин-Б-сефарозы (GE Healthcare, Швеция) позволяет получать моноклональные антитела, содержащие менее 0,625 EU/мл (исходно 20–100EU/мл) [49].

Однако АХ на полимиксиновых сорбентах может быть сопряжена с потерей очищаемого белка вследствие ионных взаимодействий между аминными группами лиганда и отрицательно заряженными областями белка в растворах с низкой ионной силой. Например, при очистке бычьей каталазы десорбируется только 74–76% белка, а при очистке бычьего сывороточного альбумина – только 80% [50, 51].

Еще одним серьезным недостатком полимиксиновых колонок является возможность загрязнения продукта вымываемым с сорбента лигандом, который обладает нейро- и нефротоксичностью и способностью при попадании в организм человека стимулировать высвобождение интерлейкина-1 моноцитами [52, 53].

Сорбенты с привитыми лигандами типа гистамина или гистидина обеспечивают сравнимую с полимиксином специфичность связывания. Гистамин обладает более высокой аффинностью к эндотоксинам, зато гистидин безопаснее для использования в хроматографической очистке биофармацевтических белков, так как не обладает такой биологической активностью, как гистамин [54, 55].

Стоит отметить, что и полимиксиновые, и гистаминовые/гистидиновые сорбенты достаточно дорогостоящие.

Однако такой поликатионный лиганд, как поли-ε-лизин, существенно дешевле и более устойчив к вымыванию с сорбента в процессе элюции. Сорбент, например сефароза, ковалентно иммобилизованный поли-ε-лизином, объединяет в себе как сильные катионные, так и гидрофобные свойства. Таким образом, можно элюировать растворы образца с существенной ионной силой (то есть содержащие большое количество соли, например до 3 М хлорида натрия); целевой белок не будет связываться с сорбентом, тогда как эндотоксины задержатся. Показано, что поли-ε-лизин позволяет снизить содержание ЛПС ниже 0,1 EU/мл даже в случае белков, обладающих кислотными свойствами, например сывороточного альбумина [56, 57].

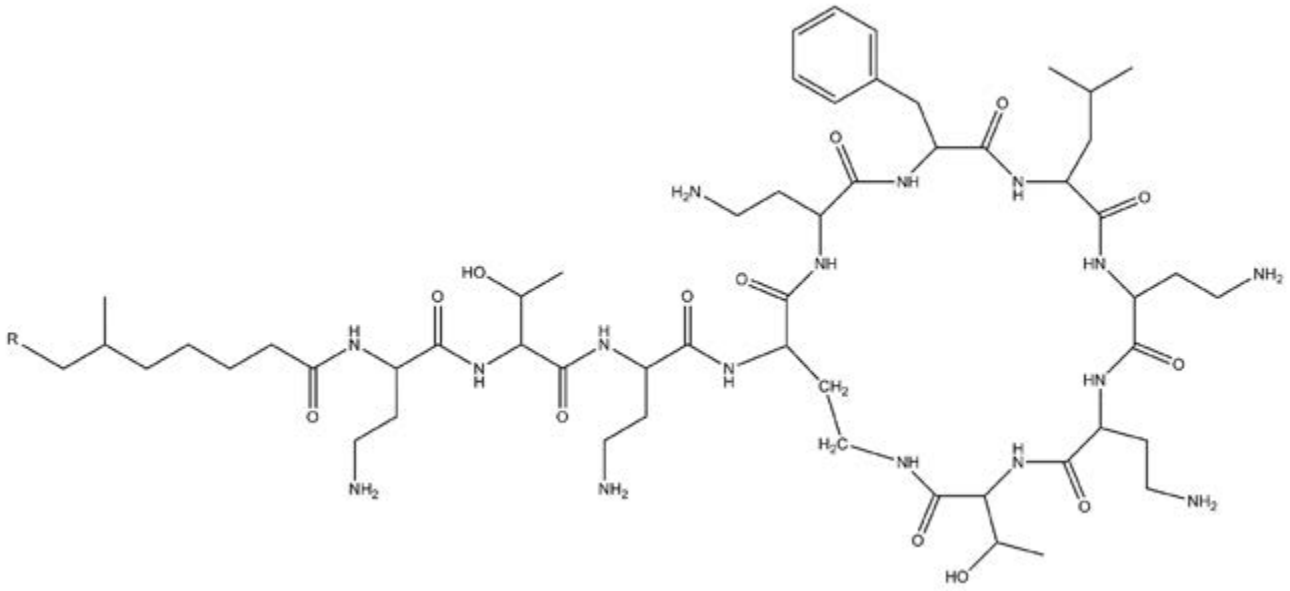


Рисунок 4. **Структура лиганда полимиксина Б**

Свойства аффинных сорбентов, применяемых для очистки от эндотоксинов клеточной стенки, одинаковы и основаны главным образом на сродстве к липидной части ЛПС. При использовании таких сорбентов крайне важно помнить, что эффективность избавления растворов белка от ЛПС зависит от времени контакта матрицы сорбента с элюируемым образцом. Необходимо так организовывать скорость потока, чтобы время контакта было не менее 16 ч.

Иммобилизованные мембранные фильтры и картриджи

Хроматографические методы избавления от эндотоксинов сегодня могут быть заменены на методы, основанные на фильтрации растворов через особые мембраны или картриджи. Эти мембраны или картриджи могут быть иммобилизованы любым из описанных в данном обзоре лигандом; чаще всего используются иммобилизации с помощью ДЭАЭ, полимиксина и поли-ε-лизина. Такие коммерчески доступные системы существенно дешевле сорбентов, они стерильны и апирогенны в отличие от сорбентов, и не нужно тратить время на упаковку колонны и ее депирогенизацию.

Однако, как уже отмечалось выше, время контакта депирогенизируемого раствора с лигандами мембраны/картриджа является наиболее критическим параметром процесса, что в конечном итоге ограничивает использование подобных систем.

Итак, технология рекомбинантных ДНК позволила получать множество белков, предназначенных для терапевтических целей. При этом чаще всего для биосинтеза целевых продуктов используются штаммы-продуценты *Escherichia coli*, так как культивировать прокариотические микроорганизмы дешевле по сравнению с эукаритиоческими клетками, бактерии способны быстро синтезировать белки в больших количествах, и, наконец, накоплен значительный опыт работы именно с *E. coli*. Однако процесс ферментации продуцента сопряжен с тем, что продукт загрязнен эндотоксинами клеточной стенки. Столь пирогенные и токсичные примеси необходимо удалять из растворов белка до предельно допустимых значений. Но эндотоксины – это очень стабильные соединения. Например, для того чтобы их разрушить, необходимы высокие температуры (180–250 °C) и крайние значения pH (0,5–1,0 M NaOH или 1–2 M уксусная кислота). Также их отрицательный заряд и наличие гидрофобных участков могут способствовать образованию комплексов с белками. Следовательно, очистка белков от эндотоксинов является очень сложной задачей, вынуждающей иногда вводить дополнительные стадии в даунстрим-процесс.

Обширный ассортимент способов, предложенных для избавления от ЛПС, в очередной раз подтверждает, насколько бывает сложно достичь необходимых степеней чистоты в том или ином производственном процессе получения биофармацевтических белков. Среди таких способов можно выделить хроматографические и нехроматографические.

К первым относятся ионообменная, обращенно-фазовая, аффинная, гель-проникающая хроматография и хроматография гидрофобных взаимодействий.

Нехроматографические способы включают ультрафильтрацию и двухфазную экстракцию. Оба метода отлично справляются с задачей очистки от эндотоксинов растворов, не содержащих белки. Однако для очистки целевых белков описанные методы малоэффективны. Особое место занимают фильтрационные мембраны и картриджи, которые являются своего рода упрощенным вариантом ионообменной и/или аффинной хроматографии.

ОЧИСТКА ОТ ФРАГМЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Остаточные нуклеиновые кислоты и их фрагменты, как правило, не представляют большой проблемы при очистке генно-инженерных белков. Это связано с тем, что их свойства уж слишком ярко выражены: большой отрицательный заряд и существенная гидрофобность. Очевидно, что практически все известные хроматографические методы, из которых наиболее предпочтительными кажутся ионообменная хроматография, ОФ ВЭЖХ и хроматография гидрофобных взаимодействий, являются достаточно эффективными.

К нехроматографическим методам избавления от фрагментов нуклеиновых кислот можно отнести кислотную экстракцию и белковое солевое осаждение.

Для кислотной экстракции на этапах выделения белка из клеток в раствор гомогената добавляют 1–3% хлорную кислоту при интенсивном перемешивании [58]. В результате в течение короткого срока (от нескольких минут до пары часов) большая часть молекул нуклеиновых кислот преципитирует. Осадок удаляют с помощью декантации, сепарации, центрифугирования или тангенциальной фильтрации.

Возможен и другой подход – осаждение целевого белка. Для этого используют различные соли (хлорид натрия, сульфат аммония и т.д.), наиболее удобные в соответствии с рядом Гоффмайстера [59]. Фрагменты нуклеиновых кислот не преципитируют и остаются в надосадочной жидкости.

ОЧИСТКА ОТ ВИРУСОВ

Вирусная, а также прионная контаминация является наиболее опасной для человека. Естественно, в первую очередь это относится к культурам клеток млекопитающих. Для оценки эффективности очистки

от вирусов введена единая система расчета логов избавления от вирусов (log-viral reduction, LVR). LVR рассчитывается по разности десятичных логарифмов количества вирусных частиц в титре до очистки и в титре после очистки. Очевидно, что чем выше значение LVR для той или иной стадии даунстрим-процесса, тем она более эффективна [60].

Наиболее известными и проверенными методами очистки от вирусов являются ионообменная, аффинная хроматографии, хроматография гидрофобных взаимодействий, ОФ ВЭЖХ, инактивация пониженными значениями pH (таблица 1) [61].

Таблица 1.

Типичные приемы очистки от вирусов

Метод очистки	LVR
Аффинная хроматография	4,23
Катионообменная хроматография	2,13
Анионообменная хроматография	4,98
Хроматография гидрофобных взаимодействий	4,19
Инактивация при низком pH	> 4,4

Интересно, что инактивация вирусов в низких значениях pH является одним из наиболее эффективных способов избавления от этих примесей. Для этого в растворе целевого белка понижают pH до 3,0 и ниже (если это возможно и не способствует преципитации, деградации белка или потере его активности) на 1 ч и более. После чего раствор подвергают ультрафильтрации на мембранах 20–80 нм.

ОЧИСТКА ОТ РОДСТВЕННЫХ БЕЛКОВ

В широком смысле слова родственными белками, с одной стороны, могут быть продукты агрегации белков, а с другой – продукты деградации.

Агрегаты – примеси более высокого порядка, чем целевой генно-инженерный белок. Поэтому одним из наиболее популярных методов очистки от агрегатов является гель-фильтрация.

Особого внимания заслуживает сорбент, который используется при гель-фильтрации. Чаще всего для этих целей применяют сефадексы, впервые введенные в практику Поратом и Флодином [62]. В настоящее время основным производителем сефадексов является корпорация GE Healthcare (ранее Amersham Biosciences, Pharmacia, Швеция). Однако в нашей стране подобный гидрофильный гель также был разработан и запатентован [63]. Показано, что осмотическая стабильность отечественного сорбента для гель-фильтрации даже выше стабильности зарубежных аналогов.

Пожалуй, самым изученным примером агрегаций является процесс фибриллообразования инсулина. Фибрилляция молекул инсулина в волокнообразные агрегаты протекает практически постоянно, но особенно заметной становится при высоких концентрациях гормона (выше 5 мг/мл) [64–66]. Катализируют агрегативное фибриллообразование низкий pH растворов инсулина, высокая температура (выше комнатной), высокая ионная сила, различные органические растворители, например этиловый спирт. В растворах кислот молекула инсулина существует главным образом в мономерной форме [67–69]. В нейтральной области pH инсулин стабилизирован в равновесии между мономерной и димерной формами. Фибриллообразование начинается с разворачивания молекулы до мономера с последующим волокнообразным скручиванием ее в нити, нерастворимые в физиологических условиях [70]. По-видимому, в условиях низких значений pH вокруг молекулы инсулина создается заряженное окружение водно-белковых молекул, в котором усиливается притяжение между гидрофобными и заряженными участками инсулиновой молекулы – создается эффект торнадо, когда все увеличивающееся притяжение заставляют молекулы соединяться друг с другом в вихреобразные нитевидные структуры, обладающие гораздо большим радиусом Стокса, чем исходная мономерная молекула гормона. Это позволяет проводить их гель-фильтрационное разделение [71, 72]. Удаление волокнобразных фибрилл необходимо, так как их наличие в растворе инсулина служит главным инициатором агрегации; при их отсутствии дальнейшее фибриллообразование сильно заторможено, особенно при низких температурах [73].

Для каждого конкретного генно-инженерного белка спектр родственных примесей, возникающий вследствие деградаций, уникален. Это может быть окисление, протеолитическая деструкция, дезамидирование по остаткам аспарагина или глутамина и др. Самые проблематичные для даунстрим-процесса примеси – дезамидированные формы целевого белка.

Методы избавления от дезамидированных примесей лучше всего также рассматривать на примере инсулина. В производстве инсулина проблема дезамидирования стоит настолько остро, что нормативной документацией особенно подчеркивается, что в конечных препаратах количество А21-дезамидоинсулина не должно превышать 2%. Эта родственная примесь образуется в ходе дезамидирования остатка аспарагина в 21 положении А-цепи. Дезамидирование протекает в кислых условиях гораздо быстрее, чем в щелочных; в нейтральных заметно не протекает [74, 75]. Однако сложность как раз и в том, что все производственные условия получения инсулина проводятся при низких

значениях pH, в которых инсулин лучше растворим и не осаждается. А хранятся препараты инсулина, в том числе готовые лекарственные формы, в условиях слабощелочных. В нейтральных же условиях инсулиновые растворы содержать проблематично из-за близости к *pI* белка.

Показано, что эффективного избавления от A21-дезамидоинсулина можно достичь только с помощью ОФ ВЭЖХ в очень селективных условиях [40, 41].

ИНСТРУМЕНТЫ СИСТЕМЫ МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА

После разработки подхода и оптимизации выделения и очистки генно-инженерных белков процесс необходимо валидировать, а именно: выполнением ряда проверок должно быть подтверждено, что все процессы, составляющие технологию получения белка, воспроизводимо и предсказуемо отвечают назначенным целям [76].

Валидация процесса позволяет в первую очередь оценить его способность воспроизводимо и предсказуемо достигать результатов, как-то: заданной производительности и необходимого качества продукта. Для этого первоначально определяются критические параметры, которые вносят определяющий вклад в процесс выделения и очистки. Эти критические параметры могут быть заданы по условию осуществления процесса (параметры «на входе») или получены в качестве результата осуществления процесса (параметры «на выходе»). Для валидации процесса параметры «на входе» следует менять в допустимых пределах и оценивать изменение параметров «на выходе» (таблица 2). Параметры «на выходе» оцениваются в соответствии с заданными критериями приемлемости: если параметры не выходят за диапазон критерия приемлемости, то можно считать процесс валидным; а если параметры в той или иной мере превышают пределы критериев приемлемости, то условия проведения такого процесса должны быть пересмотрены, то есть должны быть иначе заданы параметры «на входе».

Таблица 2.

Примеры параметров процесса хроматографии «на входе» и «на выходе»

	Параметры
«на входе»	pH, температура, ионная сила, нагрузка, скорость потока, время удержания
«на выходе»	Чистота, концентрация, стабильность, выход, содержание ДНК, содержание эндотоксинов, содержание вирусов, давление в системе

Алгоритмов нахождения оптимальных параметров «на входе» для получения максимально эффективных параметров «на выходе» не так много, как могло бы показаться с учетом достаточно длительного в историческом плане развития биотехнологии и методов выделения и очистки.

1. Эмпирический подход. Он включает установление полного перечня параметров процесса, проведение процесса при различных их значениях и математический анализ полученной матрицы эксперимента. Очевидно, что параметров много; значений, в пределах которых эти параметры варьируются, еще больше – следовательно, такая работа займет очень много времени, сил, реактивов и в конечном счете финансовых средств. Поэтому оптимизация/квалификация процесса с помощью такого алгоритма, как правило, проводится в наихудших условиях [58]. Метод основан на проведении серии процессов при параметрах, которые на практике приводят к наиболее безобразным результатам (старый сорбент, не до конца проведенная регенерация и т.д.), и оценке приемлемости получаемых результатов заданным критериям (чистота, время цикла, выход). Метод назван FMEA (Failure Mode Effect Analysis), или анализ влияния граничных условий валидности. Такой подход позволяет однозначно определить диапазон валидности процесса, а также оптимизировать некоторые его параметры с помощью математических процессоров [59].
2. Модельно-эмпирический подход. По своему принципу это то же самое, что и подход, описанный пунктом выше. Разница – в материальном обеспечении и масштабе [60, 61]. Вполне очевидно, что эксперименты по подбору оптимальных (или даже только граничных) условий проведения биотехнологических процессов всегда дорогостоящие. Рекомендации FDA, ICH, ВОЗ гласят [62], что любая квалификация процесса должна протекать минимум на пяти последовательных сериях/циклах получения продукта. А уж оптимизация займет гораздо больше пяти циклов. В этом подходе проводится обратное масштабирование процесса со всеми его параметрами до лабораторного уровня. После чего начинается эмпирически-аналитическая работа по оптимизации или квалификации в наихудших условиях функционирования. Вместо промышленного биореактора – маленький лабораторный прибор. Вместо препаративной хроматографической колонны – аналитический картридж, заполненный таким же сорбентом. С учетом коэффициентов маштабирования подбираются значения параметров, а результаты экспериментов оцениваются теми же методами, FMEA.

На наш взгляд, огромным недостатком обоих подходов является собственно скрининг всех параметров. И в первом, и во втором случае, хоть и в другом формате, необходимо проводить матрицу эксперимента для всех известных параметров процесса. Да, страте-

гия наихудшего случая функционирования помогает сократить число экспериментов. Но процессы биофармацевтики настолько многогранны и многофакторны, что общее число экспериментов все равно довольно высоко.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. Scott. Biopharmaceutical Manufacturing // Presentation on Lab Basics for the Biotech Industry, MIP480. 2009.
2. L. Anderson, F. Unger. Synthetic studies on structural elements of the hydrophobic region present in bacterial endotoxins. In Bacterial Lipopolysaccharides // American Chemical Society. ACS Symposium Series. 1983. № 231. P. 1.
3. K.C. Hou, R. Zaniewski. Scaling-up of affinity chromatography by radial-flow cartridges // Biotechnol. Appl. Biochem. 1990. V. 12. P. 315–321.
4. Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation, 3rd Edition / Ed. by K.L. Williams, M. Dekker // Drugs and Pharmaceutical sciences. 2007. V. 167. 440 p.
5. X. Du, A. Poltorak, Y. Wei. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression and evolution // Eur Cytokine Netw Eur Cytokine Netw. 2000. V. 11. P. 362–371.
6. K. Gerhold, K. Bluemchen, A. Franke, Ph. Stock, E. Hamelmann. Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice // J. Allergy Clin. Immunol. 2003. V. 112 (2). P. 389–396.
7. R.A. Nash, A.H. Wachter. Pharmaceutical Process Validation, an international third edition, revised and expanded // Drugs and Pharmaceutical sciences. 2003. V. 129. 536 p.
8. E.T. Rietschel, T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zaehringer, U. Seydel, F. Di Padova, M. Schreier, H. Brade. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function // FASEB J. 1994. V. 8. P. 217–225.
9. J. Schletter, H. Heine, A.J. Ulmer, E.T. Rietschel. Molecular mechanisms of endotoxin activity // Arch. Microbiol. 1995. V. 164. P. 383–389.
10. L. Li. Protein and endotoxin interactions and endotoxin removal from protein solutions: Diss. ... Doctor of Philosophy. – New Jersey Institute of Technology. 1999.
11. C. Galanos, O. Luederitz, E. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura, S. Kusumoto, T. Shiba. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities // Eur. J. BioChem. 1985. V. 148. P. 1–5.
12. M. Helander, B. Lindner, H. Brade, H. Altmann, A. Lindberg, E. Rietschel, U. Zaehringer. Chemical structure of the lipopolysaccharide of Haemophilus influenzae strain I-69 Rd–/b+. Description of a novel deep-rough chemotype / Eur. J. Biochem. 1988. V. 177. P. 483–492.
13. U. Zaehringer, B. Lindner, E. Rietschel. Molecular structures that influence the immunomodulatory properties of the lipid A and inner core region oligosaccharides of bacterial lipopolysaccharides // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1994. V. 50. P. 211–276.
14. S.N. Vogel, M.M. Hogan. Role of cytokines in endotoxin-mediated host responses // Immunophysiology: the role of cells and cytokines in immunity and inflammation / Ed. by J.J. Oppenheim, E.M. Shevach. – Oxford: Oxford University Press, 1990. P. 238–252.
15. D. Nogare. Septic shock // Am. J. Med. Sci. 1991. V. 302. P. 50–65.
16. K. Hou, R. Zaniewski. Depyrigenation by endotoxin removal with positively charged depth filter cartridge // J. Parenter. Sci. Technol. 1990. V. 44. P. 204–209.
17. F.B. Anspach. Removal of endotoxins by affinity sorbents // J. Biochem. Biophys. Methods. 2001. V. 49. P. 665–681.
18. J. Shands, J. Graham, K. Nath. The morphologic structure of isolated bacterial lipopolysaccharide // J. Mol. Biol. 1967. V. 25. P. 15–16.
19. E. Hannekart-Pokorni, D. Dekagel, F. Depuydt. Macromolecular structure of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria // Eur. J. Biochem. 1973. V. 38. P. 6–13.
20. U. Seydel, H. Labischinski, M. Kastowsky. Conformations of endotoxin and their relationship to biological activity // Immunobiology. 1993. V. 187. P. 191–197.
21. M. Kastowski, T. Gutberlet, H. Bradaczek. Molecular modeling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide // J. Bacteriol. 1992. V. 174. P. 4798–4806.
22. D. Petsch, F. Anspach. Endotoxin removal from protein solutions // J. Biotechnol. 2000. V. 76. P. 97–119.
23. L. Li, R. Luo. Protein concentration effect on protein-lipopolysaccharide (LPS) binding and endotoxin removal // Biotechnol. Lett. 1997. V. 19 (2). P. 135–138.

24. L. Li, R. Luo. Protein and endotoxin interactions and endotoxin removal from protein solutions // Separation Sciences and Technology. 1999. V. 34(9). P. 1729–1741.

25. L. Li. Luo RG: Use of Calcium to re-aggregate lipopolysaccharide (LPS) in hemoglobin solutions and the subsequent removal of endotoxin by ultra filtration // Biotechnol. Tech. 1998. V. 12(2). P. 119–122.

26. D. Morrison, L. Leive. Fractions of lipopolysaccharide from Escherichia coli O111:B4 prepared by two extraction procedures // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 2911–2919.

27. T.E. Karplus, R.J. Ulevitch, C.B. Wilson. A new method for reduction of endotoxin contaminations from protein solutions // J. Immunol. Methods. 1987. V. 105. P. 211–220.

28. Y. Aida, M. Pabst. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114 // J. Immunol. Methods. 1990. V. 132. P. 191–195.

29. M.J. Wilson, C.L. Haggart, S.P. Gallagher, D. Walsh. Removal of tightly bound endotoxin from biological products // J. Biotechnol. 2001. V. 88. P. 67–75.

30. R. Bischoff, D. Speck, P. Lepage, L. Delatre, K. Leoux, S. Brown. Roitsch C: Purification and biochemical characterization of recombinant 1-antitrypsin variants expressed in Escherichia coli // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 3464–3472.

31. D. Petsch, E. Rantze, F. Anspach. Selective adsorption of endotoxin inside a polycationic network of flat-sheet microfiltration membranes // J. Mol. Recognit. 1998. V. 11. P. 222–231.

32. S.-H. Pyo, H.-B. Park, S.-S. Hong, J.-H. Kim. A large-scale purification of paclitaxel from cell cultures of Taxus chinensis // Biotechnol. Lett. 2001. V. 23. P. 737–740.

33. P. Reichelt, C. Schwartz, M. Donzeau. Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents // Prot. Exp. Purif. 2006. V. 46. P. 483–488.

34. R.H. Chen, C-J. Huang, B.S. Newton, G. Ritter, L.J. Old, C.A. Batt. Factors affecting endotoxin removal from recombinant therapeutic proteins by anion exchange chromatography // Prot. Exp. Purif. 2009. V. 64. P. 76–81.

35. J.P. Nolan, J.J. McDevitt, G.S. Goldmann. Physiochemical properties of quartz controlling biological activity. Silica, Silicosis and Cancer –Surface Properties // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1975. V. 149. P. 766–771.

36. M. Nagaki, R. Hughes, J. Lau, R. Williams. Removal of endotoxin and cytokines by adsorbents and the effect of plasma protein binding // Int. J. Artif. Organs. 1991. V. 14. P. 43–50.

37. Y. Yasaka, M. Tanaka. The distribution of the blood flow during exercise in chronic heart failure – compensatory mechanism to the decreased cardiac output // J. Chromatogr. B. 1994. V. 659. P. 139–143.

38. Y. Li, R. Lander, W. Manger, A. Lee. Determination of lipid profile in meningococcal polysaccharide using reversed-phase liquid chromatography // J. Chromatogr. B. 2004. V. 804. P. 353–358.

39. K.M. Gooding, F.E. Regnier. HPLC of Biological Macromolecules. Methods and Applications. – N.Y. 1990. 796 p.

40. E.P. Kroeff, R.A. Owens, E.L. Campbell, R.D. Johnson, H.I. Marks. Production scale purification of biosynthetic human insulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. 1989. V. 461. P. 45–61.

41. Д.А. Гусаров, В.В. Востриков, Е.А. Ручко, В.А. Ласман, А.В. Михалев, Д.И. Баирамашвили. Способы очистки биофармацевтических белков от эндотоксинов клеточной стенки / Биотехнология. 2006. № 2. С. 44–49.

42. G. Karlsson, P. Gellerfors, A. Persson, B. Noren, P. Edlund, C. Sandberg, S. BirnBaum. Separation of oxidized and deamidated human growth hormone variants by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 1999. V. 855. P. 147–155.

43. S. Sainathan, L. Tu, K. Bishnupuri, M. Han, A. Li, R. Newberry, K. McDonald, D. Crimmins, C. Houchen, S. Anant, B. Dieckgraefe. PEGylated murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: production, purification, and characterization // Prot. Exp. Purif. 2005. V. 44. P. 94–103.

44. S. Hershenson, Z. Shaked. Purification of recombinant beta-interferon incorporating RP-HPLC, United States Patent. 1990. № 4, 894, 330.

45. Endotoxin Removal from Proteins. URL: http:/www.proteinchemist.com/tutorial/endotoxin.html (дата обращения 28.07.2016).

46. R. Shimp, jr., L. Martin, Y. Zhang, B. Henderson, P. Duggan, N. MacDonald, J. Lebowitz, A. Saul, D. Narum. Identification and Characterization of the Plasmodium yoelii PyP140/RON4 Protein, an Orthologue of Toxoplasma gondii RON4, Whose Cysteine-Rich Domain Does Not Protect against Lethal Parasite Challenge Infection // Prot. Exp. Purif. 2006. V. 50. P. 58–67.

47. Merck-USA. Removal of pyrogens and yeast proteins from hepatitis B virus surface antigen, United States Patent. 1989. № 4,707,542.

48. J. Lopes, W. Inniss. Electron Microscopy of Effect of Polymyxin on Escherichia coliLipopolysaccharide // J. Bacteriol. 1969. V. 100. P. 1128–1130.

49. A. Horenstein, F. Crivellin, A. Funaro, M. Said, F. Malavasi. Human CD38: a glycoprotein in search of a function // J. Immunol. Methods. 2003. V. 275. P. 99–112.

50. K. Hou, R. Zaniewski. Endotoxin removal by anion-exchange polymeric matrix // Biotechnol. Bioeng. 1990. V. 12. P. 315–324.

51. F. Anspach, O. Kilbeck. Removal of endotoxins by affinity sorbents // J. Chromatogr. A. 1995. V. 711. P. 81–87.

52. B.A. Newton. The properties and mode of action of the polymyxins // Bac. Rev. 1956. V. 20. P. 14–27.

53. C. Damais, C. Jupin, M. Parant, L. Chedid. Induction of human interleukin-1 production by polymyxin B // J. Immunol. Methods. 1987. V. 101. P. 51–56.

54. S. Minobe, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata. Characteristics of immobilized histamine for pyrogen adsorption // J. Chromatogr. 1983. V. 262. P. 193–197.

55. S. Minobe, T. Watanabe, T. Sato, T. Tosa. Charactristics and applications of adsorbents for pyrogen removal // Biotechnol. Appl. Biochem. 1988. V. 10. P. 143–148.

56. H. Choi, R. Yang, M. Kunioka. Surface modification of polyhydroxyalkanoate films and their interaction with human fibrablasts // J. Appl. Polym. Sci. 1995. V. 58. P. 807–811.

57. M. Sakata, M. Todokoro, C. Hirayama. Removal of endotoxin from protein solution using poly(ε-lysine)-immobilized cellulose beads // Am. Biotechnol. Lab. 2002. V. 20. P. 36–41.

58. G. Carta, A. Jungbauer. Protein Chromatography: Process Development and Scale-Up // WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. – Weinheim. 2010.

59. D. Voet, J. Voet. Biochemistry. – New York: John Wiley and Sons, 1990.

60. G. Subramanian. Bioseparation and bioprocessing. A handbook // WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. – Weinheim. 2007.

61. Y. Li, O. Galperina. PDA Viral Safety Workshop. – Germany. 2005.

62. J. Poreth, P. Flodin. Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation // Nature. 1983. V. 2. P. 1657–1659.

63. Патент РФ № 2187363. Способ получения гидрофильного геля / А.В. Смирнов, Е.А. Гукасова, Д.И. Баирамашвили, А.И. Мирошников. 2002.

64. Endotoxin Removal from Proteins. URL: http:/www.proteinchemist.com/tutorial/endotoxin.html (дата обращения 28.07.2016).

65. R. Shimp-jr., L. Martin, Y. Zhang, B. Henderson, P. Duggan, N. MacDonald, J. Lebowitz, A. Saul, D. Narum. Identification and Characterization of the Plasmodium yoelii PyP140/RON4 Protein, an Orthologue of Toxoplasma gondii RON4, Whose Cysteine-Rich Domain Does Not Protect against Lethal Parasite Challenge Infection // Prot. Exp. Purif. 2006. V. 50. P. 58–67.

66. Merck-USA. Removal of pyrogens and yeast proteins from hepatitis B virus surface antigen, United States Patent. 1989. № 4,707,542.

67. J. Lopes, W. Inniss. Electron Microscopy of Effect of Polymyxin on Escherichia coliLipopolysaccharide // J. Bacteriol. 1969. V. 100. P. 1128–1130.

68. A. Horenstein, F. Crivellin, A. Funaro, M. Said, F. Malavasi. Human CD38: a glycoprotein in search of a function // J. Immunol. Methods. 2003. V. 275. P. 99–112.

69. K. Hou, R. Zaniewski. Endotoxin removal by anion-exchange polymeric matrix // Biotechnol. Bioeng. 1990. V. 12. P. 315–324.

70. F. Anspach, O. Kilbeck. Removal of endotoxins by affinity sorbents // J. Chromatogr. A. 1995. V. 711. P. 81–87.

71. B.A. Newton. The properties and mode of action of the polymyxins // Bac. Rev. 1956. V. 20. P. 14–27.

72. C. Damais, C. Jupin, M. Parant, L. Chedid. Induction of human interleukin-1 production by polymyxin B // J. Immunol. Methods. 1987. V. 101. P. 51–56.

73. S. Minobe, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata. Characteristics of immobilized histamine for pyrogen adsorption // J. Chromatogr. 1983. V. 262. P. 193–197.

74. S. Minobe, T. Watanabe, T. Sato, T. Tosa. Charactristics and applications of adsorbents for pyrogen removal // Biotechnol. Appl. Biochem. 1988. V. 10. P. 143–148.

75. H. Choi, R. Yang, M. Kunioka. Surface modification of polyhydroxyalkanoate films and their interaction with human fibrablasts // J. Appl. Polym. Sci. 1995. V. 58. P. 807–811.

76. M. Sakata, M. Todokoro, C. Hirayama. Removal of endotoxin from protein solution using poly(ε-lysine)-immobilized cellulose beads // Am. Biotechnol. Lab. 2002. V. 20. P. 36–41.

УДК 615.454.1;
615.847.8;
542.953

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА МАГНИТНЫХ НАПОЛНИТЕЛЕЙ ДЛЯ МАГНИТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Ю.Я. Харитонов[1], О.Г. Черкасова[1], С.П. Завадский[1]*, С.Н. Цыбусов[2], И.И. Краснюк (мл.)[1], В.Ю. Григорьева[1]

1 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

2 – ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (НижГМА), 603950, Россия, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

1 – I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1, Minin and Pozharsky sq., Nizhny Novgorod, 603005, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: argus78@bk.ru

Резюме. На основании результатов экспериментальных исследований ряда магнитных лекарственных средств и магнитных лекарственных форм (МЛФ), магнитных наполнителей для МЛФ (химическими, физико-химическими, физическими методами) разработаны экспериментальные критерии оценки и контроля качества тонкодисперсного магнетита, тонкодисперсного феррита бария, используемых для получения МЛФ. Эти критерии учитывают сочетанное действие постоянного магнитного поля магнитных наполнителей и соответствующих фармакологически активных субстанций, вводимых в магнитные лекарственные формы.

Ключевые слова: магнитные лекарственные средства, тонкодисперсные магнитные наполнители, тонкодисперсный магнетит, феррит бария.

QUALITY CONTROL OF MAGNETIC FILLERS FOR MAGNETIC FORMULATIONS

Yu.Ya. Kharitonov[1], O.G. Cherkasova[1], S.P. Zavadskiy[1]*, S.N. Tsybusov[2], I.I. Krasnyuk (jr)[1], V.Yu. Grigorjeva[1]

Abstract. On the base of the experimental studies of some magnetic medications and dosage forms, magnetic fillers for magnetic dosage forms (by means of chemical, physical-chemical, physical methods) the experimental tests of the quality control of finely-dispersed magnetite, finely-dispersed barium ferrite have been developed.

Keywords: magnetic dosage forms, magnetic finely-dispersed fillers, finely-dispersed magnetite, barium feprite.

ВВЕДЕНИЕ

Магнитные лекарственные формы (МЛФ), другие магнитные лекарственные средства (МЛС), содержащие магнитные наполнители (источники постоянного магнитного поля), – это относительно новая группа препаратов [1–18]. МЛФ могут либо содержать, либо не содержать лекарственные вещества. Терапевтический эффект МЛС, включая МЛФ, обеспечивается либо действием только магнитного поля (МЛС без лекарственного вещества), либо сочетанным терапевтическим действием магнитного поля и лекарственных веществ (МЛФ с лекарственными веществами). К настоящему времени известны различные МЛС (твердые, жидкие, мягкие): пористые или полые сферы, приготовленные из магнетита или феррита бария, магнитные жидкости, магнитные мази, магнитореологические суспензии, магнитные микрокапсулы, магнитные пластыри, магнитные ректальные капсулы и суппозитории и т.д. В качестве магнитного компонента-наполнителя часто используют тонкодисперсные порошки феррита бария, металлического железа, магнетита, а в качестве фармакологически активных веществ, усиливающих фармакологический эффект МЛС, – метилурацил, новокаин, ортофен, пармидин и др. Наличие собственного постоянного магнитного поля у МЛС обусловливает их противовоспалительное, болеутоляющее, гипотензивное действие, положительное влияние на гомеостаз, обмен веществ, процессы репаративной регенерации травмированных тканей [1, 2, 17].

МЛС оказались эффективными в стоматологии, кардиологии, хирургии, проктологии; перспективны при лечении наружных кишечных свищей и свищей пищевода, воспалительных заболеваний кожи, подкожно-жировой клетчатки, различных проктологических заболеваний, в диагностике патологий желудка, для использования в мирингопластике (восстановление слуха), в магниторефлексотерапии, в офтальмохирургии и т.д. Показана возможность применения наноструктурных частиц магнитного наполнителя, полученных плазмохимическим методом, в качестве компонентов теплопроводящих сред для магнитокриовоздействий в криохирургии, в частности использование железоуглеродного композита – активного компонента теплопроводящих сред для магнитоуправляемой теплопередачи. Доказана эффективность использования магнитных теплопроводящих сред при магнитокриодеструкции опухолей наружной

СТАТЬЯ ПРИВЕДЕНА В АВТОРСКОЙ РЕДАКЦИИ

локализации, вросшего ногтя и атером кожи, криомагнитной миринготластике, магнитохирургии небных миндалин [8, 9, 12, 25, 31, 38, 40, 41].

Исследования по разработке и возможностям применения МЛС в практическом здравоохранении активно развиваются в Первом МГМУ им. И.М. Сеченова в течение последних 25 лет [19–25] при сотрудничестве с рядом других научно-исследовательских и медицинских учреждений Москвы, Нижнего Новгорода, Самары, Екатеринбурга. При этом широко используются различные химические, физико-химические, физические методы исследования и анализа [26–38], включая разработку способов и методик контроля качества МЛС [39–45]. Аналогичные исследования проводятся в последние годы и зарубежными исследователями [46–48].

По характеру действия МЛФ условно можно разделить на две основные группы: МЛФ, обеспечивающие силовое взаимодействие с наружным источником магнитного поля, и МЛФ, оказывающие биотропное действие за счет собственного магнитного поля. Для характеристики магнитного поля МЛФ чаще всего используют две величины: магнитную индукцию (B) и напряженность магнитного поля (H). Магнитная индукция зависит от свойств среды и определяет силу, действующую на заряженную частицу со стороны магнитного поля. Напряженность магнитного поля не зависит от свойств среды, на которую оно воздействует, и численно равна индукции магнитного поля в вакууме. Связь между указанными величинами выражается формулой:

$$B=\mu_a H,$$

где μ_a – абсолютная магнитная проницаемость среды. В интернациональной системе единицей измерения индукции является тесла (Тл), а единицей измерения напряженности магнитного поля – ампер на метр (А/м) [2, 21].

В данной работе излагаются результаты проведенных систематических экспериментальных исследований по разработке критериев, способов, методик оценки и контроля качества некоторых магнитных наполнителей для МЛС, без чего невозможно получение и использование МЛС и МЛФ в практическом здравоохранении, что и явилось целью исследований.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовался комплекс различных методов исследования и анализа: химический синтез, потенциометрия, мессбауэровская (гамма-резонансная) спектроскопия, спектрофотометрия в УВИ-области спектра, ИК-спектроскопия, рентгеновская спектроскопия, электронная микроскопия, химический анализ (реакции подлинности, гравиметрия, титриметрия), определение магнитных характеристик изучавшихся магнитных наполнителей – токодисперсного магнетита, феррита бария, а также другие методы контроля качества лекарственных субстанций и лекарственных форм, предусмотренные фармакопейными требованиями [19–25].

Статистическая обработка полученных экспериментальных данных проводилась в рамках выборки Стьюдента общепринятыми методами [43]. Образцы магнетита готовили, как описано далее. Использовали порошкообразный феррит бария, выпускаемый в соответствии с ТУ 6-09-27-254-89 или аналогичный.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общие указания по критериям и методам контроля качества магнитных наполнителей для МЛФ

Магнитные наполнители можно разделить на две основные группы: магнитомягкие (железо, магнетит и др.) и магнитотвердые (феррит бария, феррит стронция и др.). Магнитомягкие наполнители имеют высокую магнитную проницаемость, способны намагничиваться до насыщения даже в слабых магнитных полях. Для них характерны малые потери на перемагничивание. Магнитотвердые наполнители обладают большой остаточной индукцией, придают МЛФ после намагничивания свойства постоянного магнита. Мелкодисперсные феррит бария и магнетит, присутствующие в МЛФ, практически безвредны для организма при наружном введении [19–21].

Основные требования к качеству тонкодисперсного магнетита (железа феррита Fe_3O_4)

При приготовлении МЛФ с использованием магнетита целесообразно иметь свежеприготовленные образцы мелкодисперсного магнитного наполнителя. Осаждение магнетита проводят раствором аммиака из водных растворов солей железа(II) и железа(III) в соответствии с уравнением:

$$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8NH_3 \cdot H_2O = Fe_3O_{4\,(т)} + 8NH_4^+ + 4H_2O.$$

Методика. Навеску 27 г $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ растворяют в 250 мл дистиллированной воды (раствор 1). Навеску 14 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в 150 мл дистиллированной воды (раствор 2). Растворы 1 и 2 смешивают при комнатной температуре. Полученную смесь при интенсивном перемешивании приливают к 75 мл 25%-го раствора аммиака. При этом из раствора выпадает около 11,6 г мелкодисперсного магнетита в виде осадка черного цвета. Образовавшийся осадок промывают дистиллированной водой до значения pH промывных вод, равного 6–7, контролируя отсутствие в промывных водах хлорид-, сульфат-ионов, катионов аммония, железа(II) и железа(III). Промытый осадок после отделения его от водной фазы и высушивания на воздухе в течение нескольких часов можно исполь-

зовать в качестве наполнителя МЛФ, который должен соответствовать нижеследующим требованиям:

Описание, внешний вид. Магнетит Fe_3O_4 – вещество черного цвета без запаха и вкуса, имеет характерный металлический блеск, легко притягивается постоянным магнитом. Частично медленно окисляется на воздухе.

Растворимость. Практически нерастворим в воде и в обычных органических растворителях; растворяется в минеральных кислотах.

Подлинность. Жидкость, полученная при растворении тонкодисперсного магнетита в хлороводородной кислоте (1:1), дает хорошо известные характерные реакции на железо(II) и железо(III).

В ИК-спектре поглощения магнетита (таблетки в KBr или суспензия в вазелиновом масле) в области 400–4000 $см^{-1}$ имеется широкая полоса с максимумом около 590 $см^{-1}$. Возможно также появление плеча в области ~635 $см^{-1}$, что свидетельствует о наличии примеси γ-Fe_2O_3, практически не влияющей на магнитные свойства магнетита.

Потеря в массе при высушивании. Не более 10%.

Магнитные характеристики материала. Начальная магнитная проницаемость – не менее 70, намагниченность насыщения – не более 477,7 кА/м, удельная намагниченность – не более 91 $А \cdot м^2/кг$. Эти характеристики обеспечивают необходимое взаимодействие данного магнитомягкого наполнителя, введенного в состав магнитных мазей, с внешним источником магнитного поля. Это характеризует терапевтическое действие магнитных мазей, содержащих данный наполнитель. Нормы обоснованы результатами собственных исследований авторов [2, 19].

Количественное определение. Точную навеску магнетита (0,5–1 г) помещают в мерную колбу объемом 250 мл, прибавляют 10 мл хлороводородной кислоты (2:1) и встряхивают 1–2 минуты содержимое колбы до полного растворения твердой фазы. Раствор в колбе должен приобрести желто-оранжевую окраску, обусловленную хлоридными комплексами железа(III). Содержимое колбы доводят до метки 0,05 моль/л раствором хлороводородной кислоты (1:1) и тщательно перемешивают. В полученном растворе определяют содержание железа общего, железа(II) и железа(III) двумя титриметрическими методами: дихроматометрически и йодометрически, а именно:

1. Методика дихроматометрического определения железа

Железо общее. Аликвотную долю полученного образца объемом 10 мл помещают в плоскодонную колбу, прибавляют 5 мл концентрированной хлороводородной кислоты и осторожно, по стенке колбы, вносят около 2,5 г металлического цинка (в виде гранул, стружки). Колбочку закрывают маленькой воронкой, помещают на горячую песчаную баню и нагревают до полного обесцвечивания раствора, что служит визуальным критерием полного восстановления железа(III) до железа(II). Колбочку охлаждают проточной водой, содержимое колбочки количественно переносят в колбу для титрования объемом 250 мл, фильтруя его через вату для отделения непрореагировавших частиц цинка.

К полученному раствору в колбе для титрования добавляют 80 мл дистиллированной воды, 8 мл кислоты серной (1:1), охлаждая колбу проточной водой, 5 мл кислоты ортофосфорной, 1–2 капли раствора дифениламина и титруют 0,05 моль/л раствором калия дихромата с молярной концентрацией эквивалента 0,05 моль/л до сине-фиолетового окрашивания.

Массовую долю W (в %) железа общего рассчитывают по формуле:

$$W(\text{Fe}),\ \% = \frac{0{,}0698 \cdot v_1 \cdot 100}{m},\ \%,$$

где v_1 – объем стандартного раствора дихромата калия с(1/6 $K_2Cr_2O_7$) = 0,05 моль/л, мл; m – масса навески магнетита, г.

Железо(II). 25–50 мл анализируемого раствора вносят в колбу для титрования. Пропуская операцию восстановления, поступают, как описано выше при определении железа общего.

Массовую долю железа(II) [W(Fe(II)], %, рассчитывают по формуле:

$$W(\text{Fe(II)}),\ \% = \frac{0{,}0698 \cdot v_1 \cdot 100}{v_2 \cdot m},\ \%,$$

где v_1 – объем стандартного раствора дихромата калия с(1/6 $K_2Cr_2O_7$) = 0,05 моль/л, мл; v_2 – объем анализируемого раствора в мл; m – масса навески магнетита, г.

Железо(III). Содержание железа(III) находят по разности между содержанием железа общего и железа(II).

2. Методика йодометрического определения железа

Железо общее. В коническую колбу для титрования объемом 250 мл вносят 25 мл анализируемого раствора. Для окисления железа(II) до железа(III) осторожно, по каплям, добавляют к содержимому колбы 0,5%-й раствор перманганата калия до неисчезающего со временем розового окрашивания. Избыток перманганата калия устраняют добавлением 1 капли 0,7%-го водного раствора щавелевой кислоты. Затем к содержимому колбы добавляют 15 мл свежеприготовленного 20%-го раствора калия йодида, накрывают колбу стеклом и ставят в темное место на 30-40 минут. Выделившийся йод оттитровывают стандартным 0,1 моль/л

раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала до полного обесцвечивания раствора. Массовую долю (в %) железа общего [*W*(Fe)], %, рассчитывают по формуле:

$$W(\text{Fe}),\ \% = \frac{0{,}0558 \cdot V \cdot 100}{m},\ \%,$$

где *V* – объем стандартного 0,1000 моль/л раствора тиосульфата натрия в мл; *m* – масса навески магнетита, г.

Железо(III). 25 мл анализируемого раствора переносят в колбу для титрования. Опуская операцию окисления, поступают, как описано выше при определении железа общего. Массовую долю железа(III) *W*(Fe(III)), %, рассчитывают по формуле:

$$W(\text{Fe}) = \frac{0{,}0558 \cdot V \cdot 100}{m},\ \%,$$

где *V* – объем стандартного 0,1000 моль/л раствора тиосульфата натрия в мл; *m* – масса навески магнетита, г.

Железо(II). Содержание железа(II) находят по разности между содержанием железа общего и железа(III).

В свежеосажденном магнетите мольное соотношение железо(II) : железо(III) должно составлять около 1:2; массовая доля железа(III) – не менее 48%, массовая доля железа общего составляет 72,4%.

При хранении происходит частичное окисление магнетита с образованием твердого раствора γ-Fe_2O_3 в магнетите. Магнитные характеристики наполнителя при этом практически не меняются. При хранении содержание железа(III) возрастает. Диапазон массовой доли железа(III) может колебаться в интервале от 48,3 до 70%.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с требованиями ГФ XI и Изменения № 3 (категория 3А).

Условия хранения. Магнетит хранят в закрытых емкостях при комнатной температуре.

Срок годности. Более 5 лет.

Основные требования к качеству тонкодисперсного феррита бария $BaO \cdot 6Fe_2O_3$ (ФБ)

При приготовлении МЛФ с использованием феррита бария можно применять порошкообразные образцы последнего, выпускаемые в соответствии с ТУ 6-09-27-254-89 или с более поздней аналогичной нормативной документацией.

Перед введением в лекарственную форму промышленные порошки многократно промывают дистиллированной водой до pH промывных вод 6–7 и отрицательной реакции на хлорид- и сульфат-ионы. Промытые порошки прокаливают около одного часа при 1000–1200 °С. При этом достигается полная стерилизация порошков и улучшаются их магнитные свойства. Полученный тонкодисперсный феррит бария должен отвечать следующим требованиям:

Описание. Однородный порошок (пудра) темно-коричневого, черного или темно-фиолетового цвета без запаха и вкуса. Притягивается постоянным магнитом. Устойчив при хранении в закрытых емкостях при обычной температуре.

Растворимость. Практически нерастворим в воде, этаноле, в других обычных органических растворителях. Медленно растворяется в смеси концентрированных азотной и хлороводородной кислот (1:3) при нагревании.

Подлинность. Жидкость, образующаяся при растворении испытуемого образца феррита бария в смеси концентрированных азотной и хлороводородной кислот (1:3) при нагревании, дает характерные реакции на ионы бария (с сульфат-ионами) и железа(III) согласно общей фармакопейной статье ОФС.1.2.2.2.001115 ГФ XIII издания.

В ИК-спектре поглощения бария феррита (таблетки в KBr или суспензия в вазелиновом масле) в области 400–4000 $см^{-1}$ имеются характерные широкие полосы около 450 и 600 $см^{-1}$.

Потеря в массе при высушивании. Не более 10%.

Магнитные характеристики материала. Удельная намагниченность ($\sigma_S = I_s/\rho$, где ρ – плотность ФБ, равная 5,27 $г/см^3$) – около 72 $А \cdot м^2/кг$; коэрцитивная сила H_c – не менее 187 кА/м. Эти показатели характеризуют свойства ФБ как магнитотвердого наполнителя, который при введении в состав МЛФ придает ей свойства источника постоянного магнитного поля. Нормы обоснованы результатами собственных исследований авторов [2, 20, 22, 24]. При введении ФБ в состав магнитных суппозиториев в определенной массовой доле создается необходимое значение магнитной индукции на их поверхности, которое обусловливает то или иное терапевтическое действие (противовоспалительное, обезболивающее, ранозаживляющее) [20–23].

Количественное определение. Оптимальные магнитные свойства феррита бария соответствуют формуле $BaO \cdot nFe_2O_3$, где n = 5,5–5,75. Точную навеску феррита бария (около 1 г) помещают в термостойкую плоскодонную колбу, прибавляют ~40 мл смеси концентрированных хлороводородной и азотной кислот (3:1). Колбу закрывают маленькой воронкой и нагревают до прекращения выделения бурых паров оксидов азота. Образовавшийся раствор охлаждают до комнатной температуры, фильтруют через бумажный фильтр (синяя лента) для отделения белого нерастворившегося остатка (по-видимому, кремнезема) в термостойкий стакан объемом 200–250 мл.

Гравиметрическое определение бария. Полученный в термостойком стакане фильтрат разбавляют дистиллированной водой до объема около 100 мл, нагревают и медленно (по каплям) прибавляют к нему осадитель (H_2SO_4), взятый в 1,5-кратном избытке по сравнению со стехиометрическим количеством. Из раствора выпадает осадок сульфата бария. После выпадения осадка проверяют полноту его осаждения, добавляя капли осадителя в просветленную надосадочную жидкость. Раствор с осадком оставляют на сутки для созревания мелкокристаллического осадка. Затем через беззольный фильтр «синяя лента» осадок фильтруют и промывают [до отрицательной реакции на сульфат-, хлорид-ионы и ионы железа(III)]. Промывные воды присоединяют к основному фильтрату. Полученный кислый раствор (фильтрат) сохраняют для дальнейшего количественного определения в нем железа(III).

Фильтр с осадком $BaSO_4$ сушат в сушильном шкафу (~100 °С), озоляют фильтр и доводят осадок бария сульфата до постоянной массы в муфеле (700–900 °С).

Гравиметрическое определение железа. К кислому раствору, полученному после отделения осадка $BaSO_4$, осторожно добавляют концентрированный раствор аммиака. После нейтрализации испытуемого раствора из него выпадает объемный аморфный красно-коричневый осадок железа(III) гидроксида – осаждаемая форма; при этом ощущается слабый запах аммиака. Осадку дают отстояться 3–5 мин, проверяют полноту осаждения железа, осторожно добавляя по стенке стакана 2–3 капли аммиака. Для отделения осадка используют беззольный фильтр «красная лента». Осадок на фильтре тщательно промывают дистиллированной водой до отрицательной реакции на хлорид- и сульфат-ионы. Промытый осадок сушат в сушильном шкафу (~100 °С), озоляют фильтр и прокаливают осадок в муфельной печи до постоянной массы при 800–900 °С. Получают гравиметрическую форму – Fe_2O_3.

Мольное отношение оксидов в магнитном наполнителе рассчитывают следующим образом:

$$n(BaO) : n(Fe_2O_3) = \frac{m(BaSO_4)}{233,39} : \frac{m(Fe_2O_3)}{159,69};$$

массовую долю бария [W(Ba), %] и железа [W(Fe), %] определяют по формулам:

$$W(Ba) = \frac{m(BaSO_4) \cdot M(Ba)}{M(BaSO_4) \cdot m(ФБ)} \cdot 100\% = \frac{m(BaSO_4) \cdot 137,327}{233,39 \cdot m(ФБ)} \cdot 100\% =$$

$$= 0,5884 \cdot \frac{m(BaSO_4)}{m\ (ФБ)} \cdot 100\%;$$

$$W(Fe) = \frac{m(Fe_2O_3) \cdot 2 \cdot M(Fe)}{M(Fe_2O_3) \cdot m(ФБ)} \cdot 100\% = \frac{m(Fe_2O_3) \cdot 2 \cdot 55,847}{159,69 \cdot m(ФБ)} \cdot 100\% =$$

$$= 0,6994 \cdot \frac{m(Fe_2O_3)}{m(ФБ)} \cdot 100\%.$$

Содержание бария и железа можно определить и титриметрически после растворения феррита в царской водке. Для определения бария используют метод сульфатометрического титрования с металлохромными индикаторами – нитхромазо и ортаниловым А. Количественное определение железа(III) можно провести, используя методы перманганатометрического, дихроматометрического или йодометрического титрования, предварительно восстановив железо(III) до железа(II) хлоридом олова(II) или металлическим цинком.

Условия хранения. Феррит бария хранят в закрытых емкостях при комнатной температуре.

Срок годности. Не менее 5 лет.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с требованиями ГФ XI и Изменения № 3 (категория 3А).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны критерии, способы и методики контроля качества магнитных наполнителей (тонкодисперсного магнетита, феррита бария), используемых для получения магнитных лекарственных средств. Предложенные апробированные на практике методики предназначены для контроля качества магнитных мазей, суппозиториев, композитов для криохирургии, жидкостей, суспензий, микрокапсул, пластырей и т.д.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю.Я. Харитонов, О.Г. Черкасова. Новые магнитные лечебные средства и лекарственные формы // Фармация. 1996. № 5. С. 14–19.
2. О.Г. Черкасова. Магнитные поля и магнитные лекарственные формы в медицине // Химико-фармацевтический журнал. 1991. Т. 26. № 5. С. 4–11.
3. Е.Ю. Шабалкина. Нанодисперсные магнитные материалы и современные направления их использования в медицине и фармации // Фармация. 2008. № 5. С. 57–60.
4. О.Г. Черкасова, Е.Ю. Шабалкина, Ю.Я. Харитонов, С.Н. Цыбусов, В.И. Коченов. Использование мелкодисперсных железосодержащих композитов в лечении и диагностике: достижения и проблемы // Современные технологии в медицине. 2012. № 3. С. 113–120.
5. Е.Ю. Шабалкина, О.Г. Черкасова, В.И. Коченов, С.Н. Цыбусов, Ю.Я. Харитонов, А.П Арзамасцев. Мазевые композиции с магнетитом для магнитокриодеструкции патологических очагов // Нижегородский медицинский журнал. 2008. № 4. С. 55–60.
6. О.М. Анесоглян, В.И. Коченов, С.Н. Цыбусов, Г.А. Буланов, А.Г. Григорьев, Е.Е. Ермакова, О.Г. Черкасова,

Е.Ю. Шабалкина. Способы криохирургического лечения с конденсацией атмосферного кислорода и применением мягких магнитных теплопроводящих сред при вросшем ногте // Международный сборник «Медицинская криология». – Н. Новгород: НГМА. 2009. С. 311.

7. С.Н. Цыбусов, В.И. Коченов, О.Г. Черкасова. Применение ферромагнитных материалов для диагностики и лечения хирургических заболеваний // Международный сборник «Медицинская криология». – Н. Новгород: НГМА. 2009. С. 311.

8. В.И. Коченов, Ю.В. Королев, С.Н. Цыбусов, О.Г. Черкасова, Е.Ю. Шабалкина. Использование МЛФ в криохирургии и криотерапии небных миндалин // Международный сборник «Медицинская криология». – Н. Новгород: НГМА, 2002. С. 156.

9. В.И. Коченов, С.Н. Цыбусов, О.Г. Черкасова, Е.Ю. Шабалкина, Т.Н. Цыбусова, Э.К. Добринский. Магнитные лекарственные композиции в криохирургии опухолей // Международный сборник «Медицинская криология». – Н. Новгород: НГМА. 2006. С. 178.

10. О.Г. Черкасова, Г.А. Григорьева, Д.Г. Крутогин, С.Н. Цыбусов, М.В. Корнеева, Е.А. Мылкина, Ю.Я. Харитонов. Магнитные суппозитории – новые источники магнитного поля для ректального введении // Материалы I Всероссийской школы «Ферромагнетики в медицине». Обнинск. 1998. С. 197.

11. О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов, М.Н. Денисова. Новые источники постоянного магнитного поля в проктологии // Тез. докл. научн. конф. «Актуальные проблемы колопроктологии». Н. Новгород. 1995. С. 301.

12. М.Н. Денисова, О.Г. Черкасова, Г.А. Григорьева, Н.А Лысов., Б.Н. Жуков, Ю.Я. Харитонов. Новые гастроэнтерологическое лечебное средство – магнитные лекарственные суппозитории с новокаином // Тез. докл. научн. конф. «Перспективные проблемы в гастроэнтерологии». Москва. 1994. С. 155.

13. О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов, М.Н. Денисова, С.В. Грачев, С.Н. Цыбусов, Д.Г. Крутогин. Основные итоги исследований по созданию магнитных лекарственных средств // Тезисы докладов 7 Международной плесской конференции по магнитным жидкостям. Плёс. 1996. С. 122–123.

14. О.Г. Черкасова, М.Н. Денисова, Н.А. Лысов, Г.А. Григорьева, Ю.Я. Харитонов, Б.Н. Жуков. Местноанестезирующие магнитные ректальные суппозитории с новокаином // Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Лазерная и магнитная терапия в экспериментальных и клинических исследованиях». Ч. 2. Обнинск. 1993. С. 230–231.

15. O.G. Cherkasova, Yu. Ya. Kharitonov. Magnetic ointments for the obturations of external gulletic and instinal fistulas. // Transactions of the 2nd European Bioelectromagnetics Association Congress. Bled. Slovenia: Dec. 1993. P. 37–38.

16. O.G. Cherkasova, G.A. Grigorjeva, Yu. Ya. Kharitonov. Preparations and investigations of magnetic rectal suppositories // Ibid. P. 38.

17. О.Г. Черкасова, Д.Г. Крутогин, Ю.Я. Харитонов. Лечебные и диагностические средства, содержащие магнитные наполнители // Влияние электромагнитных полей на организм человека. – М.: Новые технологии. 1998. 180 с.

18. O.G. Cherkasova, Yu. Ya. Kharitonov, G.A. Grigorjeva, M.N. Denisova, E.V. Khammad, B.N. Zhukov, D.G. Krutogin, S.S. Gorelik, S.V. Grachev. Magnetic rectal suppositories (isotropic and anisotropic) with different topography of magnetic fields // Advanced materials and processes. Third Russian Symposium. Kaluga. Russia. 1995. P. 159.

19. А.А. Гонием. Мелкодисперсный магнетит как магнитный компонент мазей на гидрофильно-липофильной основе: дисс. … к. фарм. н. – Москва. 1991. 167 с.

20. Н.Б. Саидов. Феррит бария как компонент магнитных ректальных суппозиториев пармидина: дисс. … к. фарм. н. – Москва. 1991. 143 с.

21. О.Г. Черкасова. Физико-химические основы применения мелкодисперсных магнитных материалов в фармации: дисс. … д. фарм. н. – Москва. 1993. 285 с.

22. М.Н. Денисова. Изучение связи между составом и свойствами магнитных ректальных суппозиториев с ферритом бария: дисс. … к. фарм. н. – Москва. 1997. 126 с.

23. М.В. Смолянинова. Изучение связи между составом и свойствами двуслойных магнитных ректальных суппозиториев с ферритом бария: дисс. … к. фарм. н. – Москва. 2000. 98 с.

24. С.П. Завадский. Разработка методов стандартизации магнитных ректальных суппозиториев с ферритом бария: дисс. … к. фарм. н. – Москва. 2005. 203 с.

25. Е.Ю. Шабалкина. Нанодисперсные магнитомягкие материалы как компоненты теплопроводящих сред для магнитокриовоздействий: дисс. … к. фарм. н. – Москва. 2010. 147 с.

26. A.V. Bykov, V.I. Nikolaev, C. Diaz, Yu. Ya. Kharitonov, O.G. Cherkasova, V.I. Shulgin. Mössbauer study of the magnetic filler for suppositories // Hyperfine Interactions. 1991. № 67. P. 607–610.

27. A.V. Bykov, V.I. Nikolaev, E.R. Ruiz, Yu. Ya. Kharitonov, O.G. Cherkasova, V.I. Shulgin. Mössbauer research of magnetic particles in medicinal ointments // Hyperfine Interactions. 1991. № 67. P. 603–606.

28. Е.Ю. Шабалкина, О.Г. Черкасова, С.В. Грибанова, Ю.Я. Харитонов, И.И. Краснюк. Разработка методик определения железа в магнитных наполнителях // Фармация. 2011. № 4. С. 14–17.

29. Е.Ю. Шабалкина, О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов, И.И. Краснюк, Т.Н. Брусенцова. Удельная намагниченность мазевых теплопроводящих композиций для магнитокриохирургии // Фармация. 2011. № 8. С. 28–29.

30. Ю.Я. Харитонов, О.Г. Черкасова, С.П. Завадский. Определение бария, железа и мольного отношения оксидов бария и железа(III) в магнитных ректальных суппозиториях // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 5. С. 75–77.

31. О.Г. Черкасова, В.И. Коченов, С.Н. Цыбусов, Е.Ю. Шабалкина, Ю.Я. Харитонов. Теплопроводность магнитных композиций для криохирургии и криотерапии небных миндалин // Медицинская криология. Международный сб. научных трудов. Нижний Новгород. 2004. Вып. 5. С. 208–209.

32. Е.Ю. Шабалкина. Теплопроводность мазевых композиций для криохирургии // Фармация. 2009. № 4. С. 9–11.

33. Д.Г. Крутогин, О.Г. Черкасова, М.Н. Денисова, Ю.Я. Харитонов, С.Н. Цыбусов. Магнитооптическая оценка магнитных свойств ректальных суппозиториев с ферритом бария // Магнитология. 1994. № 1. С. 12–13.

34. М.Н. Денисова, О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов. Спектрофотометрическое определение новокаина в магнитных ректальных суппозиториях // Фармация. 1996. Т. 40. № 3. С. 22–29.

35. О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов, С.Е. Гукасян, В.Н. Нестеров, А.А. Гонием, А.Н. Жиганов, В.Н. Фадеева. Физико-химическое исследование магнитной фазы магнетитовых паст-концентратов на углеводородной основе // Изв. АН СССР. Серия: Неорганические материалы. 1991. Т. 27. № 4. С. 766–770.

36. О.Г. Черкасова, Н.Б. Саидов, Ю.Я. Харитонов, А.П. Арзамасцев, К.Д. Кондратенко. Спектрофотометрическое определение пармидина в традиционных и магнитных ректальных суппозиториях // Химико-фармацевтический журнал. 1992. № 11–12. С. 93–95.

37. О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов, Н.Б. Саидов, О.В. Баринова, Т.С. Кондратьева, Л.Ф. Андреева. Разработка технологий традиционных и магнитных ректальных суппозиториев пармидина // Фармация. 1989. № 2. С. 13–16.

38. Е.Ю. Шабалкина, О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов, В.А. Дорофеев. Химическая совместимость мелкодисперсных магнитных наполнителей с компонентами мазей // Фармация. 2012. № 4. С. 13–15.

39. Е.Ю. Шабалкина, О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов, Г.П. Матюшина, И.И. Краснюк. Достоверность титриметрических методик определения железа в магнитных пастах-концентратах // Фармация. 2008. № 4. С. 17–19.

40. Е.Ю. Шабалкина, О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов, А.П. Арзамасцев, В.Н. Коченов, С.Н. Цыбусов. Контроль качества магнитных лекарственных средств для криологии // Медицинская криология. Вып.6. Международный сб. научных трудов. Нижний Новгород. 2006. С. 179–181.

41. Е.Ю. Шабалкина, О.Г. Черкасова, Г.П. Матюшина, Ю.Я. Харитонов, И.И. Краснюк, С.Н. Цыбусов, С.Н. Добринский, В.И. Глебов. Оценка пригодности нанодисперсного железоуглеродного композита как компонента магнитных мазевых композиций для криохирургии // Инновационные технологии в медицине: материалы конференции. Саров. 2006. С. 120.

42. С.П. Завадский, О.Г. Черкасова, Ю.Я. Харитонов. Критерии контроля качества и свойства магнитных ректальных суппозиториев // Химико-фармацевтический журнал. 2000. Т. 34. № 10. С. 43–48.

43. Ю.Я. Харитонов. Аналитическая химия. Аналитика 2. Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. 5-е изд. – М.: Высшая школа. 2010. С. 560.

44. О.Г. Черкасова, Е.Ю. Шабалкина, С.В. Грибанова, Ю.Я Харитонов, Н.И. Чистякова, Д.Г. Крутогин. Изучение растворимости плазмохимических порошков магнитных наполнителей // Фармация. 2015. № 1. С. 34–36.

45. О.Г. Черкасова, С.П. Завадский, Е.Ю. Шабалкина, Ю.Я. Харитонов, И.И. Краснюк (мл.), А.В. Беляцкая, А.Н. Кузьменко. Определение содержания магнитных наполнителей в лекарственных формах. // Вестник Московского университета. Серия 2, Химия. 2015. Т. 56. № 2. С. 106–112.

46. S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, P. Veverka, G. Goglio, A. Demourques, Y. Portier, E. Pollert, E. Duquet. Magnetic nanoparticle design for medical applications // Progress in Solid State Chemistry. 2006. V. 34. P. 237–247.

47. K.H. Bae, M. Park, M.Y. Do, N. Lee. Chitosan oligosaccharide-stabilized ferromagnetic iron oxide nanocubes for magnetically modulated cancer hyperthermia // ACS Nano. 2012. V. 6. № 6. P. 5266–5273.

48. C. Tassa, S.Y. Shaw, R. Weissleder. Dextran-coated iron oxide nanoparticles: A versatile plastform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics and therapy // Accounts of Chemical Research. 2011. V. 44. № 10. P. 842–852.

OL pharm

НЕЗАВИСИМЫЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР

Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутагенность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее и иммунотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

WWW.OLPHARM.RU

Исследования в области микробиологии

- исследование и тестирование чувствительных патогенных микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам
- изучение антимикробного действия лекарственных средств в отношении определенных видов микроорганизмов во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту и стерильность
- анализ антагонистической активности пробиотических штаммов и препаратов на их основе методом отсроченного антагонизма на плотной среде в чашках Петри

Исследования в области разработки лекарственных средств

- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФЛ10 от 08.10.2014

Лицензия № 77.01.13.001.Л.000142.04.09 от 30.04.2009 на выполнение работ с микроорганизмами 3–4 групп патогенности

ООО «ОЛФАРМ»
117105, Г. МОСКВА,
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36
E-MAIL: INFO@OLPHARM.RU

УДК 615.07

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123182, Россия, г. Москва, ул. Щукинская, 6

1 – Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 6, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: Osipov@expmed.ru
Тел.: 8 (495) 234 61 04 доб. 31 03

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ОРГАНИЧЕСКИХ НИТРАТОВ

А.С. Осипов[1]*, Е.Б. Нечаева[1], Л.А. Трухачёва[1]

Резюме. Исследована возможность применения хроматографических колонок с аминосорбентами для анализа нитроглицерина и разделения изосорбида динитрата и изомеров изосорбида мононитрата. В качестве подвижных фаз применяли смеси ацетонитрила и воды. Разделение анализируемых соединений на колонках с аминосорбентами в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий возможно при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 95%. Лучшее разделение изомеров изосорбида мононитрата наблюдалось на колонке Zorbax NH_2, 150×4,6 мм, при содержании ацетонитрила в подвижной фазе 99,8%. Разделение изосорбида динитрата и изосорбида мононитратов на колонках с аминосорбентами приводило к изменению последовательности элюирования этих соединений по сравнению с обращенно-фазовой хроматографией.

Ключевые слова: ВЭЖХ, глицерина тринитрат (нитроглицерин), изосорбида динитрат, изосорбида мононитрат.

APPLICATION OF HYDROPHYILIC INTERACTIONS LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR ORGANIC NITRATE ANALYSIS

A.S. Osipov[1]*, E.B. Nechaeva[1], L.A. Truhacheva[1]

Abstract. The possibility of the use of chromatographic columns with amino sorbents for the analysis of nitroglycerin and separation of isosorbide dinitrate and isomers of isosorbide mononitrate was investigated. As the mobile phase used a mixture of acetonitrile and water. Separation of analytes on amino columns in condition of the hydrophilic interaction liquid chromatography possible with acetonitrile content in the mobile phase, more 95%. Best separation isomers of isosorbide mononitrate on column Zorbax NH_2, 150×4,6 mm was achieved with acetonitrile content in the mobile phase 99,8%. Separation of isosobide dinitrate and isosorbide mononitrates on columns with amino sorbents resulted in changing the sequence of elution of these compounds compared to reversed-phase chromatography.

Keywords: HPLC, HILIC, Glyceryl Trinitrate (Nitroglycerin), Isosorbide Dinitrate, Isosorbide Mononitrate.

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные средства, содержащие органические нитраты, применяют в медицинской практике для лечения сердечной недостаточности. В настоящее время в основном применяют препараты, содержащие следующие действующие вещества: тринитрат глицерина (нитроглицерин), изосорбида динитрат (ИСДН) и изосорбида 5-мононитрат (ИСМН). Анализ препаратов и субстанции нитроглицерина обычно проводят на хроматографических колонках с сорбентами С18 в условиях обращенно-фазовой хроматографии с использованием смесей метанола с водой (1:1) либо ацетонитрила и воды (1:1) в качестве подвижных фаз [1, 2]. Для анализа близких по фармакологическому действию препаратов ИСМН и ИСДН наряду с обращенно-фазовой хроматографией [3–5] применяют нормально-фазовую хроматографию. В этом случае анализ проводят на колонках с аминосорбентами, в качестве подвижной фазы используют смесь безводного этанола и 2,2,4-триметилпентана (15:85) [6]. Действующим веществом ИСМН является 5-нитроизомер ИСМН (5-изомер ИСМН). Содержание примеси 2-нитроизомера ИСМН (2-изомер ИСМН), а также ИСДН контролируется в субстанции и лекарственных препаратах ИСМН [3, 4]. Ранее было показано, что в условиях обращенно-фазовой хроматографии для анализа органических нитратов могут быть применены колонки с фенильными и нитрильными сорбентами и их модификации [7, 8]. Однако необходимо отметить, что в условиях обращенно-фазовой хроматографии органические нитраты не разделяются на хроматографических колонках с аминосорбентами [8].

Препараты органических нитратов пролонгированного действия часто представляют собой сложную аналитическую матрицу, и иные, не фармакопейные, методы анализа лекарственных препара-

тов могут быть более предпочтительны. Таким образом, целью исследования являлось определение возможности применения альтернативных методов анализа органических нитратов, в частности жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography; HILIC) на хроматографических колонках с амино- и нитрильными сорбентами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на хроматографе Agilent серии 1100 (Agilent Technologies, США). Тестировали колонки с аминосорбентами Lichrosher NH_2, 250×4,6 мм, 5 мкм (Merck, Германия), Zorbax NH_2, 150×4,6 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США), Luna NH_2, 150×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США), а также колонку с нитрильным сорбентом Zorbax SB CN, 150×4,6 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США).

Детектирование осуществляли при 210 нм (детектор DAD G1515B). Скорость потока элюента – 1,0 мл/мин. Ввод образцов в объёме 5 мкл. В работе использовали стандарт нитроглицерина [стандарт фирмы Egis, Венгрия, с содержанием действующего вещества 10,0% (смесь с лактозой), серия 005280698], а также стандартные образцы 5-изомера ИСМН (серия 4), 2-изомера ИСМН (серия 3) и ИСДН (серия 3) Европейской Фармакопеи. Подготовка проб: навеску стандарта (5 мг в пересчёте на действующее вещество) растворяли в 5 мл смеси ацетонитрил – вода (3:1), затем доводили до объёма 50 мл ацетонитрилом и перемешивали.

Анализировали препарат «Нитроглицерин», таблетки сублингвальные, 0,5 мг (изготовитель ООО «Озон», Россия, серия 020314, срок годности до 03.2017). Подготовка проб: 1 таблетку помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 5 мл ацетонитрила, обрабатывали ультразвуком 7 мин при периодическом перемешивании до полной дезинтеграции таблетки. Анализ проводили на 10 образцах. Перед введением в хроматограф все пробы центрифугировали при 11 тыс. об./мин в течение 7 мин (центрифуга ELMI CM 50, Латвия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий свойства колонок с аминосорбентами могут быть в зависимости от анализируемых объектов как близки [9, 10], так и кардинально отличаться от колонок с нитрильными сорбентами [11]. Зависимость времени удерживания нитроглицерина от состава подвижной фазы изучали на колонке Zorbax NH_2, 150×4,6 мм, 5 мкм. В качестве подвижных фаз применяли смеси ацетонитрила и воды в соотношении 90:10 (фаза 1), 95:5 (фаза 2), 98:2 (фаза 3), 99:1 (фаза 4) и 99,5:0,5 (фаза 5). С увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе время удерживания нитроглицерина последовательно возрастает с 1,93 мин (фаза 1) до 2,19 мин (фаза 5), что свидетельствует о механизме жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. В отличие от этого при хроматографировании на нитрильной колонке Zorbax SB CN время удерживания нитроглицерина не только не возрастает, но даже несколько уменьшается с увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе – 1,84 мин (фаза 1) против 1,81 мин (фаза 5). Более того, даже при применении подвижной фазы ацетонитрил – вода (99:1) ИСДН и изомеры ИСМН не разделяются и элюируются с данной колонки одним пиком (1,69 мин). В отличие от аминогрупп нитрильные группы не обладают заметным сродством к нитрогруппам и гидроксильным группам анализируемых соединений в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Напротив, на колонках Zorbax NH_2 и Luna NH_2 нитраты изосорбида уверенно разделяются в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. В таблице 1 приведены некоторые результаты хроматографирования модельной смеси стандартных образцов ИСДН и изомеров ИСМН. Причём с увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе увеличивается разрешение между пиками ИСДН и изомеров ИСМН (рисунок 1). По сравнению с обращенно-фазовой хроматографией на колонках С18 (подвижные фазы: смеси метанол – вода или ацетонитрил – вода) меняется очерёдность элюирования ИСДН и 5-изомера ИСМН. Однако последовательность элюирования 2-изомера и 5-изомера ИСМН остаётся той же, что и для обращенно-фазовой хроматографии [12, 13] (рисунок 2).

При применении подвижной фазы ацетонитрил – вода (99,8:0,2) селективность сорбента Zorbax NH_2 к паре 2-изомер ИСМН / 5-изомер ИСМН составляет 1,18. Для сравнения [14]: селективность сорбента L1 (Zorbax ODS) в условиях обращенно-фазовой хроматографии [подвижная фаза: метанол – вода (25:75)] к данной паре изомеров ниже – 1,11. В условиях нормально-фазовой хроматографии [15] при применении подвижной фазы безводный этанол – 2,2,4-триметилпентан (15:85) селективность аминосорбента (Lichrosorb NH_2) к паре 2-изомер ИСМН / 5-изомер ИСМН составляет 1,37. Таким образом, разделение изомеров ИСМН в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий по крайней мере не хуже, чем разделение в условиях обращенно-фазовой хроматографии.

Основываясь на предварительном исследовании по хроматографии нитроглицерина на колонке Zorbax NH_2, 150×4,6 мм, 5 мкм, для анализа таблеток нитроглицерина применили более длинную хрома-

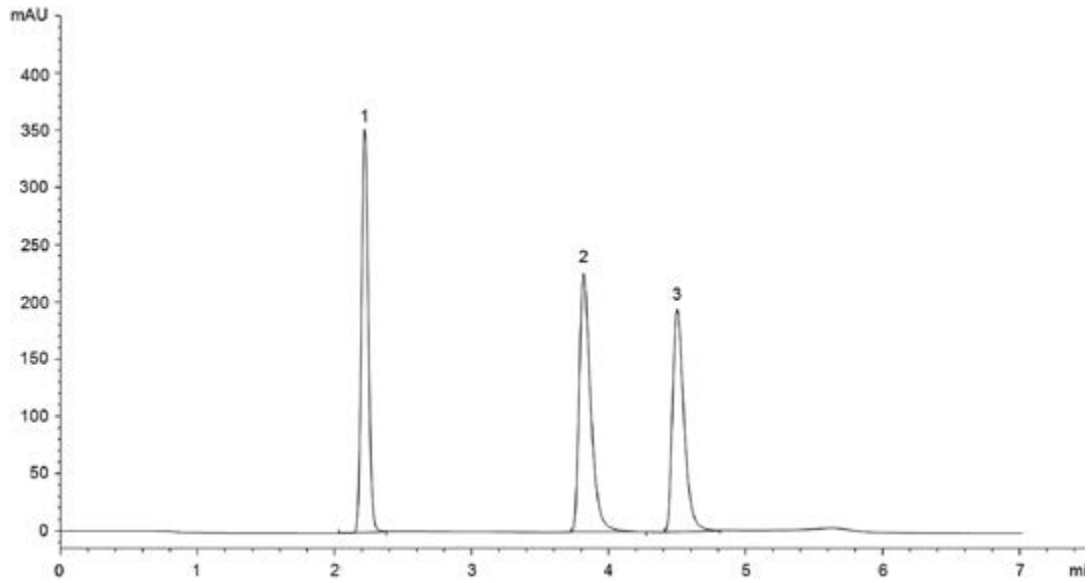


Рисунок 1. **Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов изосорбида динитрата и изомеров изосорбида мононитрата. Условия анализа: колонка Zorbax NH2, 150×4,6мм, (5мкм); подвижная фаза: ацетонитрил – вода (99,8:0,2); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование – 210 нм.**
1 – изосорбида динитрат, 2 – 2-изомер изосорбида мононитрата, 3 – 5-изомер изосорбида мононитрата

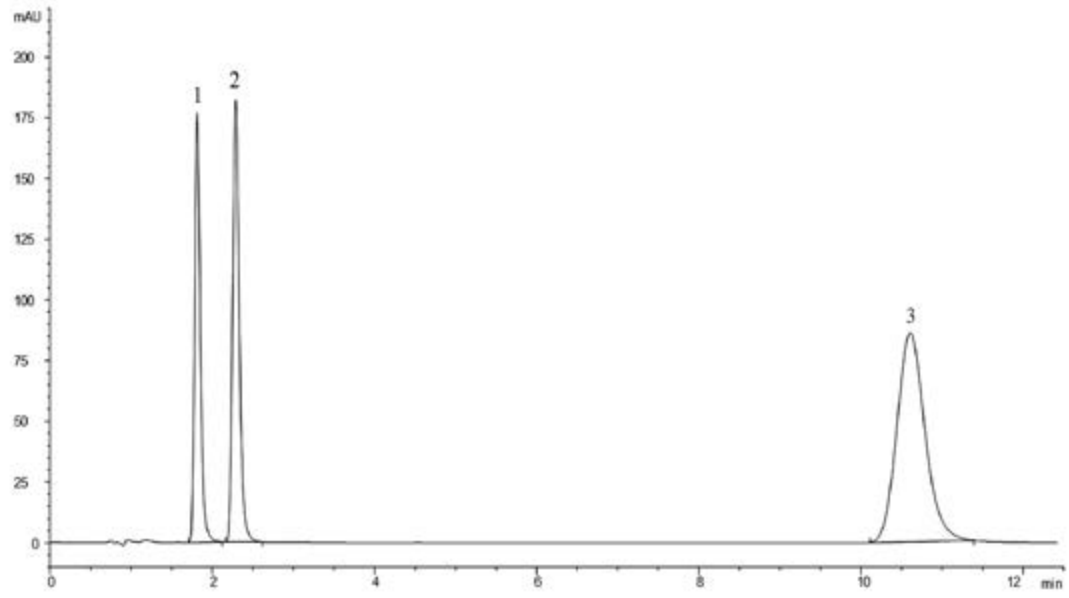


Рисунок 2. **Хроматограмма модельной смеси стандартных образцов и изомеров изосорбида мононитрата и изосорбида динитрата.**
Условия анализа: колонка Chromolith SpeedROD RP-18e, 50×4,6 мм; подвижная фаза: метанол – вода (10:90); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование – 210 нм.
1 – 2-изомер изосорбида мононитрата, 2 – 5-изомер изосорбида мононитрата, 3 – изосорбида динитрат (иллюстрация взята из работы [13])

тографическую колонку Lichrosher NH_2, 250×4,6 мм, 5 мкм [подвижная фаза: ацетонитрил – вода (98:2)]. При хроматографировании на данной колонке время удерживания нитроглицерина – 3,68 мин. Эффективность колонки по пику данного соединения составила 18000–19000 теоретических тарелок. Коэффициент асимметрии пика нитроглицерина – 1,0. Содержание нитроглицерина в таблетке – 0,495 мг (99%) – среднее значение 10 определений однородности дозирования (RSD% = 2,68).

Полученные данные могут быть использованы для дальнейшей оптимизации и последующей валидации альтернативной хроматографической методики определения органических нитратов.

Таблица 1.

Времена удерживания и разрешение между пиками ИСДН, 2-изомера ИСМН и 5-изомера ИСМН при различных условиях хроматографирования*

Условия анализа: колонка, подвижная фаза, скорость потока	Время удерживания ИСДН	Время удерживания 2-изомера ИСМН	Время удерживания 5-изомера ИСМН	Разрешение между пиками ИСДН и 2-изомера ИСМН	Разрешение между пиками 2-изомера ИСМН и 5-изомера ИСМН
Zorbax NH_2, 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (90:10), 1 мл/мин	2,00	2,25	2,38	–	–
Zorbax NH_2, 150×4,6мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (98:2), 1 мл/мин	2,16	2,69	2,86	5,56	1,79
Zorbax NH_2, 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99:1), 1 мл/мин	2,19	2,84	3,09	6,20	2,29
Zorbax NH_2, 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,5:0,5), 1 мл/мин	2,20	3,35	3,63	9,64	3,32
Zorbax NH_2, 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,8:0,2), 1 мл/мин	2,22	3,87	4,57	13,20	4,55
Luna NH_2, 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99:1), 1 мл/мин	2,17	2,72	3,35	7,95	2,79
Luna NH_2, 150×4,6 мм, 5 мкм; ацетонитрил – вода (99,5:0,5), 1 мл/мин	2,18	3,02	3,46	9,.12	3,12

Примечание: *средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённого исследования показано, что хроматографические колонки с аминосорбентами могут быть использованы для анализа органических нитратов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. При анализе нитратов изосорбида жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий является более удобной альтернативой нормально-фазовой хроматографии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monograph: Diluted Nitroglycerin // The United States Pharmacopoeia, 38 ed. 2015.
2. Monograph: Glyceryl Trinitrate Tablets // British Pharmacopoeia, 2012.
3. Monograph: Diluted Isosorbide Mononitrate // The United States Pharmacopoeia, 38 ed. 2015.
4. Monograph: Isosorbide Mononitrate Tablets // British Pharmacopoeia, 2012.
5. Monograph: Isosorbide Dinitrate Tablets // British Pharmacopoeia, 2012.
6. Monograph: Diluted Isosorbide Dinitrate // European Pharmacopoeia, 8.0 ed. 2014.
7. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, Н.Б. Дёмина и др. Применение хроматографических колонок отечественного производства для анализа препаратов органических нитратов // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 1. С. 46–49.
8. Е.Б. Нечаева, А.С. Осипов, Н.Б. Дёмина. Анализ лекарственных препаратов из группы органических нитратов на хроматографических колонках с различными типами сорбентов // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2008. № 4. С. 47–50.
9. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, О.А. Победин. Применение хроматографической колонки с диольным сорбентом для анализа координационных соединений платины // Химико-фармацевтический журнал. 2013. Т. 47. № 6. 51–53.
10. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева. Применение хроматографических колонок с нитрильными и фенильными сорбентами для анализа координационных соединений платины // Химико-фармацевтический журнал. 2014. Т. 48. № 8. С. 45–48.
11. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, М.М. Миронова, Е.Л. Ковалёва. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для разделения изомеров бутилгидроксианизола // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49. № 3. С. 50–52.
12. А.С. Осипов, Е.Н. Орлов. Применение нитроалканов для анализа примесей в лекарственных препаратах нитратов изосорбида методом ВЭЖХ // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2010. № 11. С. 28–32,
13. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, Е.Н. Орлов. Применение монолитной колонки Chromolith SpeedROD RP-18e для разделения нитратов изосорбида // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2012. № 8. С. 20–23.
14. Monograph: Isosobide Mononitrate Extended – Release Tablets // The United States Pharmacopoeia, 38 ed. 2015.
15. Monograph: Isosobide Dinitrate Sublingual Tablets // British Pharmacopoeia, 2009.

УДК 543.42.062; 615.03

1 – Министерство здравоохранения Республики Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении», 220037, Республика Беларусь, г. Минск, Товарищеский переулок, 2а

2 – Белорусский государственный технологический университет, 220006, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Свердлова, 13а

1 – The Ministry of Health of the Republic of Belarus, Republican Unitary Enterprise «Centre for Expertise and Testing in Health Care», 2a, Tovarishesky Lane, Minsk, 220037, Republic of Belarus

2 – Belarusian State Technological University, 13a, Sverdlova str., Minsk, 220006, Republic of Belarus

*** адресат для переписки:**
E-mail: katedubodelova@tut.by
Тел.: (+37529) 501 43 61

КОМПЛЕКСНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.Ю. Рымашевская[1], Е.В. Дубоделова[2]*, В.В. Горжанов[2]

Резюме. Исследована возможность комплексного количественного определения пиридоксина гидрохлорида, тиамина гидрохлорида, цианокобаламина, лидокаина гидрохлорида, бензилового спирта в лекарственном средстве «Витагамма, раствор для внутримышечного введения в ампулах по 2 мл в упаковке №5×2» методом ВЭЖХ. Рекомендовано использование 0,1 М раствора ортофосфата натрия с величиной pH, равной 5, в качестве буферного раствора и введение ион-парного агента – 0,001 М натрия пентансульфаната. Осуществлен выбор условий для хроматографического определения действующих веществ: градиент концентрации органического растворителя (ацетонитрил) – от 2 до 60%; хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse Plus C8, 3,0×150 мм, 3,5 мкм; температура колонки – 30 °С; скорость подвижной фазы – 0,6 мл/мин; длина волны спектрофотометрического детектора – 245 нм; объем пробы – 20 мкл.

Ключевые слова: мультивитаминные комплексы, водорастворимые витамины, высокоэффективная жидкостная хроматография, буферный раствор, ион-парный агент, методика выполнения измерений.

DETERMINATION OF WATER-SOLUBLE VITAMINS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

A.U. Rumascheuskaia[1], K.V. Dubodelova[2]*, V.V. Gorzhanov[2]

Abstract. This paper considers the possibility to comprehensive quantification of pyridoxine hydrochloride, thiamine hydrochloride, cyanocobalamin, lidocaine hydrochloride, benzyl alcohol are selected of "Vitagamma solution for intramuscular injection in ampoules of 2 ml per pack №5×2" drug by HPLC method. The expediency of using 0.1 M sodium orthophosphate solution with pH level equal to 5 as a buffer solution and introduction of 0.001 M sodium pentansulfonat as an ion pair agent is proved. The conditions for chromatographic determination of active ingredients in the drug are selected: a gradient of concentration of the organic solvent (acetonitrile) from 2 to 60%; chromatographic column ZORBAX Eclipse Plus C8, 3.0×150 mm, 3.5-Micron; column temperature 30 °C; mobile phase velocity of 0.6 ml/min; spectrophotometric detector wavelength of 245 nm; sample volume of 20 ul.

Keywords: multivitamin complexes, water-soluble vitamins, high-performance liquid chromatography, buffer solution, ion pair agent, measurement method.

ВВЕДЕНИЕ

Контроль качества лекарственных средств является важной составляющей системы обеспечения безопасности при производстве фармацевтической продукции. Одним из главных показателей, по которым контролируется качество лекарственных средств (ЛС), является количественное содержание в них действующих веществ.

В качестве объекта исследований были выбраны мультивитаминные комплексы. Они представляют собой комплексные препараты, включающие необходимые каждому человеку ежедневно водо- и жирорастворимые витамины. Важной характеристикой мультивитаминных комплексов является наличие в их составе ингредиентов в соответствующих, рекомендованных дозировках, поскольку они предназначены для безрецептурного отпуска. Также важна полнота перечня элементов, входящих в состав комплекса.

В настоящих исследованиях анализ мультивитаминных комплексов проводился на примере ЛС «Витагамма, раствор для внутримышечного введения в ампулах по 2 мл в упаковке №5×2», производитель СО-АО «Ферейн» (далее – ЛС «Витагамма»), который применяется при неврологических заболеваниях, обусловленных доказанным дефицитом витаминов B_1, B_6 и B_{12}, и в качестве вспомогательного средства для симптоматической терапии заболеваний нервной системы различного происхождения [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Согласно техническим нормативным правовым актам (ФСП 1779-13) на ЛС «Витагамма» для определения действующих веществ рекомендовано проводить четыре анализа методом высокоэффективной

жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Это обусловлено использованием разных буферных растворов, необходимых для разделения компонентов с подбором для каждого анализа условий хроматографирования. Поэтому процедура определения является длительной и дорогостоящей, что обусловило поиск способов комплексного определения всех действующих веществ в ЛС.

Для этого была проведена разработка и валидация методики комплексного определения количественного содержания действующих веществ в ЛС «Витагамма». Состав данного ЛС приведен в таблице 1.

Таблица 1.

Состав лекарственного средства «Витагамма» на 1 ампулу

Название компонента ЛС	Количество компонента, мг	ТНПА
Тиамина гидрохлорид (B_1), DSM Nutritional Products Ltd., Швейцария / DSM Nutritional Products GmbH, Германия	100,0	НД РБ 0381С
Пиридоксина гидрохлорид (B_6), Shanghai Chenfu Chemical Co., Ltd., Китай	100,0	НД РБ 0180С
Цианокобаламин (B_{12}), North China Pharmaceutical Victor Co., Ltd., Китай	1,0	НД РБ 0374С
Лидокаина гидрохлорид, Dishman Pharmaceuticals & Chemicals Ltd, Индия	20,0	НД РБ 0340С
Бензиловый спирт	40,0	СТП-12
Натрия полифосфат	20,0	СТП-07
Калия феррицианид	0,2	СТП-08
Натрия гидроксид	12,0	ГФ РБ т. 2 стр. 210
Вода для инъекций	до 2	ГФ РБ т. 2 стр. 95

Существует большое количество способов определения пиридоксина гидрохлорида, тиамина гидрохлорида, цианокобаламина, лидокаина гидрохлорида, бензилового спирта в ЛС (таблица 2).

Как видно из таблицы 2, общими методами для количественного определения основных действующих веществ ЛС «Витагамма» являются спектрофотометрический и ВЭЖХ-метод. Остальными методами можно определить 2–3 компонента, но для полного анализа всего состава основных действующих веществ эти методы не могут быть применимы [2–4]. После сравнения метрологических характеристик методов ВЭЖХ и спектрофотометрии можно отметить, что оба метода являются эффективными для анализа рассматриваемого ЛС. Но, несмотря на большую стоимость и относительно высокую погрешность определения, в настоящее время предпочтение отдается ВЭЖХ-анализу, так как этот метод обладает высокой воспроизводимостью и позволяет определять малые количества вещества, что обуславливает его точность [5].

Таблица 2.

Методы количественного определения пиридоксина гидрохлорида, тиамина гидрохлорида, цианокобаламина, лидокаина гидрохлорида, бензилового спирта в ЛС

Метод	Тиамин (B_1)	Пиридоксин (B_6)	Цианокобаламин (B_{12})	Лидокаин
Титриметрия	+	+	–	+
Спектрофотомерия	+	+	+	+
Колориметрия	+	+	–	–
ВЭЖХ	+	+	+	+
Электрофорез	+	+	–	–
Флуориметрия	+	+	–	–
Потенциометрия	+	+	–	–

Согласно справочнику «The essential chromatography & spectroscopy catalog LC and LC/MS» разделить смесь витаминов группы В можно, используя буферный 0,1 М раствор ортофосфата натрия с pH=2,5 с градиентом концентрации органического растворителя от 2% до 60%. Для более корректного разделения пиков тиамина и пиридоксина при их совместном нахождении в растворе рекомендуется добавлять в буферный раствор ион-парный агент.

Вещества лидокаинового ряда также можно разделить при помощи 0,1 М буферного раствора ортофосфата натрия (№ 342483 из каталога Sigma-Aldrich), но значение pH раствора должно быть равным 4. В этой системе лидокаина гидрохлорид (№ L5647 из каталога Sigma-Aldrich) обнаруживается при содер-

жании в подвижной фазе 30–40% органического растворителя.

Бензиловый спирт (№ 80708 из каталога Sigma-Aldrich) можно обнаружить, используя любой фосфатный буфер со значением pH=4–6. Главное условие его определения – длина волны спектофотометрического детектора в диапазоне от 240 до 250 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании поисковых исследований и рекомендаций, приведенных выше, было принято решение использовать один буферный раствор – 0,1 М раствор ортофосфата натрия с добавлением 0,001 М натрия пентансульфоната (ион-парный агент) (№ 221538 из каталога Sigma-Aldrich), pH раствора – 5.

Также были подобраны следующие условия для хроматографического определения всех компонентов ЛС «Витагамма», которое готовили путем помещения 2,0 мл ЛС в мерную колбу вместимостью 100 мл с прибавлением 60 мл воды для хроматографии Р, последующим перемешиванием и доведением объема раствором воды для хроматографии Р до метки:

– градиент концентрации органического растворителя (ацетонитрил, № 271004 из каталога Sigma-Aldrich) – от 2 до 60%;

– хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse Plus C8, 3,0×150 mm, 3,5-Micron;

– температура колонки – 30 °С;

– скорость подвижной фазы – 0,6 мл/мин;

– длина волны спектрофотометрического детектора – 245 нм;

– объем пробы – 20 мкл.

Исследования были проведены на хроматографе жидкостном Agilent 1100 с УФ-детектором системой регистрации, обработки и хранения информации.

Методика разрабатывалась с учетом требований ТКП 432 «Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний».

Важной составляющей процесса разработки методики являлось изучение стабильности растворов витаминов, так как совместное определение нескольких компонентов – процесс более длительный, чем анализ каждого из индивидуальных веществ. Исходя из того, что достоверные результаты можно получить, усредняя значения 3–5 заколов, можно сделать вывод, что максимальное время одного закола должно варьироваться в диапазоне 48–80 мин. Изучение стабильности растворов витаминов производилось путем анализа растворов сравнения (РСО) и испытуемых растворов согласно рекомендуемым ФСП №1779-13 методикам

Хроматограф жидкостной Agilent 1260 Infinity II пришел на смену с производства Agilent 1100

количественного определения действующих веществ. Анализ растворов проводился в течение первых 4 ч после их приготовления. Определение стабильности растворов проводилось путем сравнения площадей пиков компонентов на их хроматограммах. Установлено, что РСО тиамина гидрохлорида («Хромлаб», Россия), цианокобаламина («Хромлаб», Россия), лидокаина гидрохлорида, бензилового спирта обладали стабильностью в течение 4 ч, так как разброс средних значений площадей пиков не превышал ±20%.

Раствор сравнения отвечал следующим требованиям: в состав входили те же компоненты, что и в ЛС; концентрация РСО в растворе была такая же, как и в испытуемом растворе (таблица 1); масса навески РСО была не менее 20,0 мг. Результаты исследований показали, что растворы РСО следует готовить, руководствуясь следующими рекомендациями.

Приготовление раствора 1: 100,0 мг РСО тиамина гидрохлорида и 100,0 мг РСО пиридоксина гидрохлорида («Хромлаб», Россия) необходимо внести в мерную колбу объемом 100,0 мл, добавить 20 мл подвижной фазы, довести объем раствора подвижной фазой до метки и перемешать.

Приготовление раствора 2: 20,0 мг РСО лидокаина гидрохлорида и 40,0 мг РСО бензилового спирта необходимо внести в мерную колбу объемом 50,0 мл. К смеси РСО необходимо добавить 15 мл раствора 1. Полученный раствор довести до метки раствором 1 и перемешать.

Приготовление раствора 3: 20,0 мг РСО цианокобаламина необходимо внести в мерную колбу объемом 100,0 мл и добавить 20 мл подвижной фазы. Полученную смесь перемешать до полного растворения навески. После этого необходимо объем раствора довести до метки и перемешать. Далее следует отобрать 5,0 мл полученного раствора и перенести его в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, довести объем раствора подвижной фазой до метки и перемешать.

Для получения раствора сравнения нужно смешать 10,0 мл раствора 2 и 10,0 мл раствора 3.

После приготовления раствора сравнения был проведен хроматографический анализ в условиях, описанных выше. Полученная хроматограмма приведена на рисунке 1.

Для идентификации пиков, наблюдаемых на хроматограмме (рисунок 1), были использованы спектры индивидуальных веществ, полученные при изучении стабильности ЛС. Анализ данных спектров показал, что первым компонентом является пиридоксина гидрохлорид, вторым – тиамина гидрохлорид, третьим – цианокобаламин, четвертым – лидокаина гидрохлорид, а пятым – бензиловый спирт.

Статистической обработке подвергали 5 хроматограмм раствора сравнения. Она показала, что среднее время выхода для пика 1 составляет 3,76 мин, для пика 2 – 6,70 мин, для пика 3 – 11,37 мин, для пика 4 – 13,35 мин и для пика 5 – 14,71 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора (рисунок 2) также наблюдалось 5 пиков, что свидетельствует о том, что все компоненты ЛС можно идентифицировать в заданных условиях.

Статистическая обработка 5 хроматограмм испытуемого раствора показала, что среднее время выхода для пика 1 составляет 3,62 мин, для пика 2 – 6,61 мин, для пика 3 – 11,05 мин, для пика 4 – 12,95 мин и для пика 5 – 14,24 мин.

Из представленных хроматограмм (рисунки 1 и 2) видно, что все компоненты легко идентифицируются, а время выхода исследуемых компонентов совпадает.

Далее был произведен расчет количественного содержания действующих веществ в ЛС «Витагамма». Согласно ФСП 1779-13 количественное содержание тиамина гидрохлорида должно находиться в пределах от 45,0 до 62,5 мг/мл, пиридоксина гидрохлорида – от 47,5 до 52,5 мг/мл, цианокобаламина – от 0,450 до 0,625 мг/мл, лидокаина гидрохлорида – от 9,5 до 10,5 мг/мл, бензилового спирта – от 19,0 до 21,0 мг/мл. Результаты определения, полученные после обработки 5 хроматограмм ЛС, приведены в таблице 3.

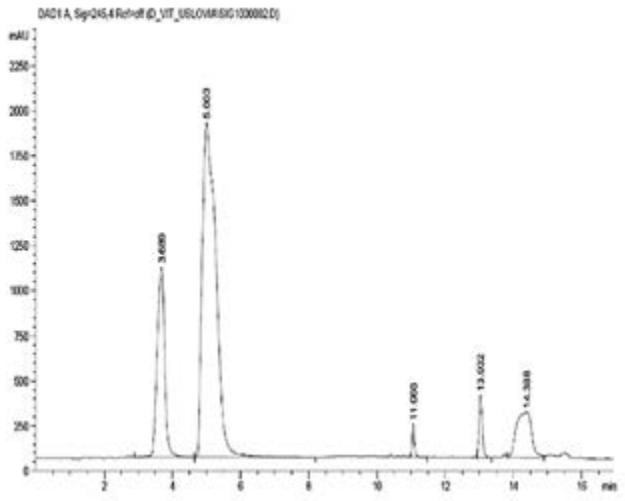


Рисунок 1. Хроматограмма раствора сравнения

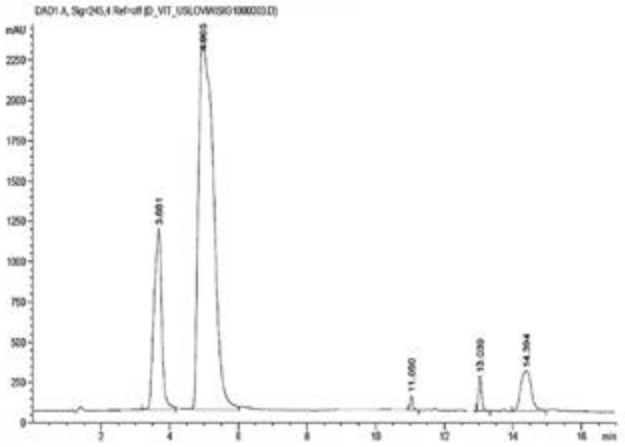


Рисунок 2. Хроматограмма испытуемого раствора

Как видно из таблицы 3, количество всех определяемых веществ находилось в пределах обнаружения.

Согласно ТКП 432 и ТКП 438 был проведен комплекс необходимых испытаний и рассчитаны основные валидационные характеристики разрабатываемой методики: повторяемость; точность, включая сходимость и внутрилабораторную воспроизводимость; линейность; правильность и диапазон применения.

Результаты расчета повторяемости приведены в таблице 4.

Сходимость разработанной методики подтверждена испытаниями образца готового ЛС «Витагамма». Получены значения среднеквадратичного отклонения (СКО) для каждого компонента лекарственного средства: пиридоксина гидрохлорида – 0,33; тиамина гидрохлорида – 0,51; цианокобаламина – 0,96; лидокаина гидрохлорида – 0,86,

Таблица 3.

Количественное содержание действующих веществ в ЛС «Витагамма»

№ хроматограммы	Компонент				
	Пиридоксина гидрохлорид	Тиамина гидрохлорид	Цианокобаламин	Лидокаина гидрохлорид	Бензиловый спирт
1	51,50	54,86	0,56	10,17	19,72
2	52,31	54,42	0,54	9,65	19,71
3	52,11	53,51	0,56	9,77	19,59
4	51,65	53,20	0,57	10,08	20,22
5	51,43	53,25	0,58	10,10	20,13

бензилового спирта – 0,52. Данные значения удовлетворяют критериям приемлемости и не превышают 1%. Воспроизводимость методики подтверждена испытаниями в условиях внутрилабораторной воспроизводимости. Критерий Стьюдента для пиридоксина гидрохлорида составил 2,902; для тиамина гидрохлорида – 3,774; для цианокобаламина – 2,826; для лидокаина гидрохлорида – 0,759, для бензилового спирта – 1,210, что меньше табличного значения, равного 4,3. Полученные значения относительных стандартных отклонений также удовлетворяют критерию приемлемости и не превышают 1%. Линейность методики подтверждена испытаниями и расчетами в пределах требуемого диапазона применения – 80–120% содержания действующих веществ от их номинального количества. Правильность методики подтверждена испытаниями и расчетами в пределах требуемого диапазона – 90–110% содержания действующих веществ от их номинального количества. Установлено, что разработанная методика удовлетворяет критериям правильности, поскольку смещение результатов измерения, отнесенное к абсолютному СКО среднего значения, не превышает значение критерия Стьюдента t(0,95;5)=2,57, а процент восстановления для каждого из определяемых веществ находится в диапазоне от 95 до 105%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанная методика прошла процедуру подтверждения пригодности, следовательно, она может быть предложена к использованию заводам-производителям мультивитаминных комплексов, в составе которых используются пиридоксина гидрохлорид, тиамина гидрохлорид, цианокобаламин, лидокаина гидрохлорид, бензиловый спирт, и аналитическим лабораториям, которые занимаются контролем качества лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю.А. Овчинников. Витамины. Биоорганическая химия. – М: Просвещение, 1987. 668 с.
2. А.И. Лутцева. Анализ и стандартизация водорастворимых витаминов // Фармация. 1998. Т. 47. № 5. С. 22–29.
3. И.В. Власова. Определение водорастворимых витаминов в премиксах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Заводская лаборатория. 2007. Т. 73. № 9. С. 25–27.
4. R.T. Sane, U.A. Ghorpade. Colorimetric estimation of vitamin B, pharmaceutical preparations // Acta vitaminol et enzymol. 1983. V. 5. №. 1. P. 29–34.
5. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / Под ред. В.Ф. Селеменева – Воронеж: Водолей, 2004. 528 с.

Таблица 4.

Результаты расчета повторяемости

Компонент	Результаты определения количественного содержания компонента							СКО
	1	2	3	4	5	6	Среднее	
Пиридоксина гидрохлорид	51,50	52,31	52,40	51,65	51,43	52,05	51,89	0,42
Тиамина гидрохлорид	54,86	54,42	53,51	53,20	53,25	53,73	53,83	0,67
Цианокобаламин	0,56	0,54	0,56	0,57	0,58	0,56	0,57	0,013
Лидокаина гидрохлорид	10,17	9,65	9,77	10,08	10,10	9,84	10,02	0,21
Бензиловый спирт	19,72	19,71	19,59	20,22	20,13	20,08	20,16	0,25

12–14 ОКТЯБРЯ 2016

БИОИНДУСТРИЯ

КОНГРЕССНО-ВЫСТАВОЧНЫЙ ЦЕНТР **ЭКСПОФОРУМ**

МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА-КОНКУРС

ИННОВАЦИОННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ

ПМФЗ

Выставка-конкурс проходит в рамках Петербургского международного форума здоровья

РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ

1. **БИОТЕХНОЛОГИИ В СФЕРЕ ИНДУСТРИИ ЗДОРОВЬЯ**
2. **СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ И ПИЩЕВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ**
3. **БИОТЕХНОЛОГИИ В СФЕРЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ**
4. **ЛАБОРАТОРНОЕ И АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

ДЕЛОВАЯ ПРОГРАММА

- КОНКУРС ИННОВАЦИОННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ
- КОНФЕРЕНЦИЯ-ПРЕЗЕНТАЦИЯ ИННОВАЦИОННЫХ РАЗРАБОТОК «БИОИНДУСТРИЯ НА ПУТИ К ТЕХНОЛОГИЯМ БУДУЩЕГО»
- КРУГЛЫЙ СТОЛ ПО ВОПРОСАМ КОММЕРЦИАЛИЗАЦИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ РАЗРАБОТОК

ОРГАНИЗАТОР

EXPOFORUM

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ МЕДИАПАРТНЕР

Санкт-Петербург topspb.tv

0+

ПЕТЕРБУРГСКОЕ ШОССЕ, 64/1
ТЕЛ. 8 (812) 240 40 40, ДОБ. 225
BIO@EXPOFORUM.RU
YU.VOLODARSKAYA@EXPORORUM.RU
WWW.BIO.EXPOFORUM.RU

УДК 615.07

1 – Автономное объединение «ШТАДА ФармДевелопмент» АО «НИЖФАРМ», 109029, Россия, г. Москва, Автомобильный проезд, 6

1 – Autonomous Incorporation «STADA PharmDevelopment», JSC «NIZHPHARM», 6, Avtomobilny proyezd, Moscow, 109029, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: naumepshtein@gmail.com
Тел.: 8 (985) 771 73 59

О СТРЕССОВЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ ПРИ РАЗРАБОТКЕ / УСОВЕРШЕНСТВОВАНИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК И ТЕХНОЛОГИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ И ПРЕПАРАТОВ

Н.А. Эпштейн[1]*

Резюме. Подробно рассмотрены основные задачи стрессовых экспериментов и соответствующие им испытания, а также стрессовые эксперименты для приготовления растворов для проверки пригодности хроматографических систем. Предложен подход для систематизации и анализа результатов стрессовых экспериментов (стресс-исследований). Этот подход основан на использовании относительных времен выхода пиков и специальной таблицы, которая дает возможность надежно выявлять перекрывающиеся пики на хроматограммах до и после стрессовых экспериментов; это особенно важно для разработки и валидации аналитических методик. Таблица также дает возможность соотнести пики примесей с определенными типами негативных химических реакций разложения/превращения лекарственных веществ. Даны рекомендации по проведению стрессовых экспериментов, которые, несомненно, будут полезны на практике.

Ключевые слова: стрессовые эксперименты, стресс-исследования, лекарственные вещества, лекарственные препараты, стабильность, методики, валидация.

ABOUT STRESS EXPERIMENTS BY DEVELOPING / IMPROVING ANALYTICAL METHODS AND TECHNOLOGY OF DRUG SUBSTANCES AND MEDICINES

N.A. Epshtein[1]*

Abstract. The main objectives of stress experiments and tests corresponding to them, and also stress experiments for preparation of solutions for check of system suitability of chromatographic systems are in detail considered. Approach for systematization and the analysis of results of stress experiments (stress testing) is offered. This approach is based on use of relative times of peaks of substances and on the special table, which allows resolving overlapping peaks before and after stress tests with high confidence; it is especially important for development and validation of the analytical methods. The table also gives the possibility to correlate peaks of impurity to certain types of negative chemical reactions of decomposition/transformation of drug substances.Recommendations are presented for conducting stress tests, which would be without doubts a great help in practice.

Keywords: stress testing, stress experiments, drug substances, drugs, medicines, stability, methods, validation.

ВВЕДЕНИЕ

Под стрессовыми экспериментами (стресс-исследованиями, stress testing) понимают такие эксперименты, которые проводятся при более сильном, чем обычно, воздействии факторов, способных влиять на свойства объекта исследования. В отношении лекарственных веществ и смесей основными факторами стрессового воздействия являются: температура, действие воды или ее паров, кислая или щелочная среда, окислители (обычно кислород воздуха), углекислый газ, реакционноспособные примеси из вспомогательных веществ, действие света, а также механохимическое воздействие и действие ультразвука [1]. Известно, что стрессовые эксперименты играют важную роль при решении ряда задач в фармации: при разработке и валидации аналитических методик; при исследовании возможности взаимодействия (совместимости) лекарственных и вспомогательных веществ; при экспрессной, предварительной оценке стабильности лекарственных субстанций и препаратов; при подборе подходящей упаковки и т.д. Этому посвящено много публикаций. К сожалению, как правило, в публикациях при обсуждении результатов стрессовых экспериментов используют визуальное сравнение хроматограмм и/или таблицу времени выхода пиков (RT) на хроматограммах, что недостаточно[1]. То же самое наблюдалось автором статьи и в ходе многочисленных экспертных оценок валидационной документации

[1] Перекрывание пиков примесей на хроматограммах до и после стрессовых экспериментов неоднократно наблюдалось нами в ходе разработки аналитических методик при использовании подхода, предлагаемого в данной статье. Однако когда для тех же хроматограмм составляли единую таблицу «RT примеси – ее содержание в %», то часто не видели перекрывание пиков (получали большее количество пиков, причем некоторым, близким RT в таблице, как оказалось, соответствовала одна и та же примесь).

отечественных и иностранных фирм. Однако сравнение хроматограмм до и после стрессовых экспериментов с использованием времени выхода пиков связано с риском неправильных выводов. Дело в том, что значения RT на хроматограммах могут существенно изменяться (сдвигаться в ту или иную сторону) в ходе стрессовых экспериментов даже при небольшом, практически неизбежном, варьировании характеристик подвижной фазы (соотношения компонентов, pH, ионной силы и т.д.). Поэтому высока вероятность того, что даже при сравнении RT пиков до и после стрессовых экспериментов в одной таблице, не говоря уже о визуальном сравнении хроматограмм, не будет установлено перекрывание близко расположенных пиков. Это может привести к неправильной идентификации пиков примесей, что особенно критично при использовании поправочных коэффициентов, наличии большого количества пиков на хроматограммах после стрессовых экспериментов, а также при отнесении пиков примесей к соответствующим лекарственным веществам в многокомпонентных препаратах.

Цель статьи: а) рассмотреть основные стрессовые эксперименты[1] и дать по ним рекомендации; б) предложить подход для оценки результатов стрессовых экспериментов, сводящий к минимуму упомянутый выше риск (этот подход показал высокую эффективность на практике); в) предложить специальную таблицу, дающую возможность связать образование пиков примесей – продуктов разложения/превращения лекарственных веществ с определенными негативными химическими реакциями; г) рассмотреть наиболее полезную, на взгляд автора, литературу по стрессовым экспериментам и связанным с ними вопросам.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР ПО ПРОВЕДЕНИЮ СТРЕССОВЫХ ЭКСПЕРЕМЕНТОВ

Прежде всего, подчеркнем, что в основных руководствах ICH, EMEA и национальных регуляторных органов приводятся очень краткие и сравнительно малоинформативные рекомендации по проведению стрессовых экспериментов (за исключением фотостабильности) [2–5]. Это, по-видимому, связано как с тем, что такие руководства дают только рекомендации общего типа, так и с многообразием условий стрессовых экспериментов, сильно зависящих от свойств молекул исследуемых веществ и смесей, а также от поставленных задач.

В настоящее время наиболее полное рассмотрение стрессовых экспериментов представлено в книге [1], главы которой написаны ведущими специалистами в различных областях фармации. В [1] рассмотрены следующие основные вопросы: стрессовые эксперименты как инструмент прогноза [глава (2)]; химические реакции разложения лекарственных веществ (3); особенности проведения стрессовых экспериментов – условия испытаний и подготовка образцов (4); исследование восприимчивости веществ к окислению (6), тестирование фотостабильности (7, 8); совместимость лекарственных и вспомогательных веществ (11). При этом в большинстве глав обсуждаются также стрессовые эксперименты в связи со стабильностью лекарственных веществ и препаратов. Очевидно, что в [1] представлены взгляды авторов соответствующих разделов, которые не являются всеобъемлющими. Поэтому можно порекомендовать также ряд обзоров и публикаций по стрессовым экспериментам и связанным с ними вопросам (компьютерный прогноз потенциально возможных примесей – продуктов разложения/превращения лекарственных веществ, идентификация примесей, механизмы реакций в твердой фазе и т.д.).

В русскоязычной литературе можно выделить обзор [6], в котором рассмотрены стресс-исследования в основном с регуляторной точки зрения и более подробно – исследование фотостабильности. При этом исследование фотостабильности рассматривается отдельно от стресс-исследований. По-видимому, это вызвано тем, что фотостабильности посвящено специальное руководство ICH [4], хотя по смыслу тестирование фотостабильности является частью стресс-исследований. В [7] рассмотрены необходимые стрессовые эксперименты для разработки так называемых Stability-Indicating Methods, то есть методик, предназначенных для исследования и контроля стабильности лекарственных субстанций и препаратов. В [8] рассмотрены особенности организации стрессовых экспериментов при действии окислителей и интерпретации получаемых результатов.

Следует отметить презентацию [9], в которой обсуждаются специальные подходы и компьютерные программы для прогноза возможных продуктов разложения/превращения лекарственных веществ. Компьютерная программа Pharma D3 (CambridgeSoft Pharmaceutical Drug Degradation Database) [10] имеет online-версию. Она дает возможность прогнозировать образование определенных примесей и связанных с ними вероятных механизмов деградации лекарственных веществ на основании базы данных для нескольких сотен молекул лекарственных веществ («базовых» молекул). Ее достоинством является то, что она основывается на фактических данных по определению примесей при хранении лекарственных веществ и препаратов, а недостатком – то, что она может ис-

[1] В статье не рассматриваются дополнительные стрессовые эксперименты, которые могут потребоваться для мягких лекарственных форм, например охлаждение/замораживание.

пользоваться только для молекул, химическая структура которых может быть получена добавлением или удалением небольших химических фрагментов относительно структуры «базовых» молекул. Компьютерная программа Zeneth Chemical Degradation Prediction Software [11] лишена этого недостатка: она позволяет вводить любые химические структуры, прогнозировать потенциальные примеси не только для процессов деструкции, но и для бимолекулярных реакций взаимодействия молекул, а также для фотохимических реакций. Однако эта программа не ориентирована на лекарственные вещества и препараты. В связи с этим для лекарственных веществ при прогнозе с помощью программы Zeneth Chemical Degradation Prediction Software можно ожидать получения всех теоретически возможных продуктов деструкции/превращения, а не только наиболее реальных, как в случае программы Pharma D3. Тем не менее обе упомянутые выше компьютерные программы оказались полезными при идентификации пиков примесей на хроматограммах по массам фрагментов с помощью масс-спектрометрических детекторов [9].

В связи с идентификацией примесей – продуктов стрессовых экспериментов представляет интерес книга [12]. В ней рассмотрены практически все методы определения примесей в лекарственных веществах и препаратах. Можно выделить также обзор [13], в котором обсуждены методики определения продуктов деструкции 197 лекарственных веществ и приведена обобщающая таблица с указанием хроматографических колонок и состава подвижных фаз, используемых при идентификации примесей. Следует обратить внимание на то, что требования ICH к идентификации примесей в лекарственных веществах и в препаратах существенно различаются. Это необходимо учитывать как при обосновании нормирования содержания примесей, так и при обсуждении результатов стрессовых экспериментов в связи с прогнозом стабильности лекарственных веществ и препаратов. Согласно ICH для лекарственных веществ должны быть идентифицированы все примеси, содержание которых превышает 0,1% при суточной дозе препарата ≤2 г или превышает 0,05% при суточной дозе препарата >2 г [14]. Для лекарственных препаратов эти требования менее жесткие [15] (таблица 1).

Важным при планировании, проведении и интерпретации стрессовых экспериментов является понимание механизмов химических процессов. Для жидких фаз, как правило, достаточно знаний, полученных при высшем химическом образовании. Однако для понимания реакций, протекающих в твердых фазах, особенно в связи с задачами прогнозирования стабильности и взаимодействия лекарственных и вспомогательных веществ, необходимы дополнительные знания по механизмам твердофазных реакций. Показателен случай, имевший место при обсуждении проблемы стабильности препарата на одной из производственных площадок. Было высказано предположение, что на стабильность препарата оказывает влияние гидролиз молекул лекарственного вещества в присутствии стеарата магния. Однако это предположение не устроило технологов и химиков производственной площадки: они возразили, что стеарат магния является твердым веществом и поэтому не может вызывать гидролиз лекарственного вещества при хранении препарата. Впоследствии наше предположение было подтверждено результатами стрессовых экспериментов, а также сравнительным исследованием стабильности исходного препарата и аналогичного опытно-промышленного образца, в котором стеарат магния был заменен на другой лубрикант. *При планировании стрессовых экспериментов и обсуждении их результатов надо иметь в виду, что твердофазные реакции могут резко ускоряться в присутствии даже небольшого количества воды. Более того, в твердой фазе в микроокружении катионов магния и щелочных металлов и анионов сильных кислот в присутствии молекул воды могут существовать микрообласти соответственно со щелочным и с кислым pH – «microenvironmental pH», способные вызывать гидролиз лекарственных веществ в твердой фазе* [16]. Для понимания возможных механизмов реакций лекарственных веществ в твердой фазе можно порекомендовать книгу [1] и обзор [17], а для реакций взаимодействия лекарственных и вспомогательных веществ – обзор [18].

Таблица 1.

Требования ICH к идентификации примесей в зависимости от максимальной дневной дозы (TDI) лекарственного препарата [15]

Максимальная дневная доза (Maximum Daily Dose)	Предел содержания примеси, выше которого она должна быть идентифицирована (Threshold)
<1 мг	1,0% или 5 мкг TDI – то, что меньше
1–10 мг	0,5% или 20 мкг TDI – то, что меньше
>10 мг – 2 г	0,2% или 2 мг TDI – то, что меньше
>2 г	0,1%

Имеется много публикаций по использованию термических методов анализа, таких как ДСК, ТГА, изотермическая калориметрия, термомикроскопия, для прогнозирования взаимодействия и совместимости лекарственных и вспомогательных веществ, в том числе в русскоязычной литературе [19]. Эти методы явля-

ются универсальными, экспрессными и легко применимы ко всем веществам и смесям. К сожалению, они в большинстве случаев недостаточны для надежного прогноза совместимости лекарственных и вспомогательных веществ. Тем не менее методы термического анализа полезны при объяснении результатов стрессовых экспериментов. Они дают возможность устанавливать процессы, влияющие на совместимость лекарственных и вспомогательных веществ, которые не обнаруживаются традиционными аналитическими методами. К таким процессам относятся плавление отдельных компонентов смесей, кристаллизация, полиморфные переходы, образование эвтектических смесей и т.д. [20].

ПРАВИЛА ПРОВДЕНИЯ СТРЕССОВЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

При проведении стрессовых экспериментов следует придерживаться следующих основных правил:

1. ***Стрессовые эксперименты должны проводиться таким образом, чтобы свести к минимуму образование примесей вследствие вторичных реакций.*** Основание: во-первых, такие реакции маловероятны как при хранении лекарственных субстанций, препаратов и их полупродуктов, так и при технологических процессах; во-вторых, пики продуктов вторичных реакций могут перекрываться с пиками основных веществ и пиками примесей, которые реально могут образовываться при получении и хранении лекарственных веществ и препаратов. Из-за этого могут возникнуть более жесткие, часто невыполнимые требования к разделяющей способности методики определения примесей. Для сведения к минимуму вторичных реакций, протекание которых маловероятно при получении и хранении лекарственных веществ и препаратов, рекомендуем, чтобы разложение (превращение) основного вещества не превышало 5% при стрессовых экспериментах с окислением и 20% – в остальных случаях. Более низкий допускаемый предел разложения при стрессовых экспериментах с окислением связан с тем, что при окислении протекают многочисленные радикальные реакции, а так как они имеют низкую энергию активации, увеличивается риск вторичных реакций.

2. ***Надо стремиться к тому, чтобы растворы до и после стрессовых экспериментов имели близкие концентрации основного вещества;*** при этом логично ориентироваться на номинальную концентрацию основного вещества в испытуемом растворе по методике определения примесей.

3. ***На хроматограммах растворов после стрессовых экспериментов следует контролировать (определять) спектральную чистоту пиков основных веществ и пиков примесей, для которых требуется использовать поправочные коэффициенты.*** Это важно прежде всего для доказательства специфичности аналитических методик. Оценку спектральной чистоты пиков можно легко проводить с помощью диодно-матричных детекторов и специальных программ, входящих в пакеты обработки хроматографических данных современных хроматографов. Например, в случае хроматографов Waters можно использовать графики Peak Purity[1] и/или проверять выполнение соотношения Purity Angle < Purity Threshold. Если окажется, что пик основного вещества или пик какой-то из примесей, для которой требуется использовать поправочные коэффициенты, не является спектрально чистым, то это сигнал о необходимости доработки методики определения примесей: надо улучшить разделяющую способность хроматографической системы. В качестве исключения из этого правила можно рассматривать пики примесей, которые, во-первых, расположены вблизи базовой линии основного пика (на нисходящей или восходящей ветви), во-вторых, не требуют использования поправочных коэффициентов и, в-третьих, при нормируемом содержании могут быть однозначно (воспроизводимо) отделены от пика основного вещества, то есть *p/v* – не менее 1,5 [21]. В пользу этого говорит возможность использования коэффициента *p/v* (peak-to-valley ratio) для частично перекрывающихся (то есть не спектрально чистых) пиков в Европейской Фармакопее [22]. В таких случаях, как правило, достаточно проводить оценку спектральной чистоты пика основного вещества без учета пика примеси на переднем или заднем «хвосте», проводя базовую линию под пиком основного вещества до точки valley (низшей точки впадины) между пиком основного вещества и пиком примеси.

Факторы, воздействие которых тестируется в стрессовых экспериментах, и связанные с ними химические и физические процессы систематизированы в таблице 2. В этой же таблице приведены характерные химические и физические процессы, вызываемые упомянутыми выше факторами.

[1] Графики типа Peak Purity имеют преимущество, так как они дают возможность надежнее определять наличие пика примеси под пиком рассматриваемого вещества, а также локализацию пика примеси.

Таблица 2.

Факторы стрессовых экспериментов и химические и физические процессы, вызываемые их действием на лекарственные вещества и смеси

№	Факторы стрессовых экспериментов	Химические и физические процессы	Моделирование	Примечание
1.	Температура	Термическое разложение. Термоокислительная деструкция в присутствии кислорода воздуха. Полиморфные переходы. Плавление.	Нагревание веществ и смесей в сушильном шкафу, в климатической камере или плавление (в случае очень стабильных веществ) в зависимости от задачи исследования (таблица 3)	При выборе температуры стрессовых экспериментов для прогноза стабильности лекарственных веществ и препаратов следует учитывать правило: чем выше температура стрессовых экспериментов, тем менее точен прогноз стабильности. Причина: при повышении температуры увеличивается вклад в разложение/превращение веществ тех реакций, которые имеют более высокую энергию активации, а эти реакции могут быть иными, чем скоростьопределяющие реакции при температуре хранения.
2	Действие окислителей, включая кислород воздуха	Химические реакции окисления	Взаимодействие вещества с окислителем при нагревании, при комнатной температуре или при охлаждении. Если используют нагревание, то для минимизации вторичных реакций лучше нагревать навеску лекарственного вещества с небольшим объемом раствора окислителя.	В качестве окислителя чаще всего используют раствор перекиси водорода. Условия стрессовых экспериментов сильно зависят от легкости/трудности окисления молекул основного вещества (см. текст статьи). При этом может образовываться много продуктов окисления. Задача – свести к минимуму вторичные реакции. Для этого следует ограничить разложение основного вещества: не более 5% (обычно достаточно 2–3%).
3	Действие света	Фотохимические процессы	Облучение вещества или смеси в соответствии с рекомендациями ICH по исследованию фотостабильности.	
4	Действие воды или ее паров	Гидролиз из-за взаимодействия с водой при повышенной температуре	Нагревание веществ и смесей в присутствии воды в сушильном шкафу или при повышенной относительной влажности в климатической камере.	Как правило, образуется сравнительно немного продуктов разложения. Часто можно идентифицировать пики как пики «родственных примесей» с помощью диодно-матричного детектора путем сравнения спектров основного вещества со спектрами пиков примесей.
5	Действие кислой среды	Кислотный гидролиз	Нагревание веществ и смесей, как правило, в 1 М HCl.	То же.
6	Действие щелочной среды	Щелочной гидролиз	Нагревание веществ и смесей, как правило, в 1 М NaOH.	То же.
7	Химическое взаимодействие компонентов лекарственной формы	Кислотно-основные или окислительно-восстановительные реакции, образование аддуктов и т.д.	Нагревание веществ и смесей в сушильном шкафу или в климатической камере.	То же.
8	Реакционноспособные примеси (РСП) из вспомогательных веществ	То же	Нагревание лекарственных (ЛВ) и вспомогательных (ВВ) веществ и модельных смесей ЛВ с РСП с последующим сопоставлением хроматограмм.	Для препаратов с очень низкими дозировками, для которых содержание РСП ≥ 0,1% от содержания лекарственного вещества.
9	Углекислый газ		Выдерживание веществ и смесей в атмосфере углекислого газа при комнатной и при повышенной температуре.	Химическое взаимодействие встречается редко, например в случае молекул, обладающих сильными щелочными свойствами, в присутствии влаги (воды).
10	Механохимическое воздействие	Химические процессы деструкции при растирании, дроблении или прямом прессовании	Обычно используют энергичное растирание в фарфоровой ступке.	Встречается редко.
11	Действие ультразвука при приготовлении растворов	Химические процессы деструкции	Не требует специальных экспериментов; достаточно сравнить хроматограммы для одного и того же раствора до и после обработки ультразвуком.	Встречается редко.

Таблица 3.

Основные задачи стрессовых экспериментов и соответствующие испытания

№	Основные задачи стрессовых экспериментов	Стрессовые эксперименты (испытания)							Примечание
		1	2	3	4	5	6	7	
1	Определение потенциально возможных примесей – продуктов разложения/превращения лекарственных и вспомогательных веществ.	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Используется главным образом для разработки и валидации аналитических методик. При обработке хроматограмм после любых стрессовых экспериментов необходимо оценивать спектральную чистоту пиков основных веществ и примесей, для которых необходимо использовать поправочные коэффициенты.
2	Разработка методик приготовления растворов для проверки пригодности хроматографической системы по показателю «Разрешение» (Resolution).	Да	Да	Да	Да	Нет	Нет	Нет	Подбирают условия получения пика примеси – продукта деструкции, который наиболее близко расположен к пику основного вещества среди учитываемых примесей (обычно больших, чем 0,05%) и имеет достаточно высокий пик. Для этой цели лучше всего подходит гидролиз, однако на практике чаще всего используют окисление раствором перекиси водорода.
3	Исследование совместимости лекарственных и вспомогательных веществ.	Да/ Нет	Да/ Нет	Нет/ Да	Нет/ Да	Да	Нет	Нет	Испытание в климатической камере (при температуре выше температуры ускоренного хранения и относительной влажности 75%) имеет решающее преимущество перед другими стрессовыми экспериментами.
4	Экспресс-оценка стабильности лекарственных препаратов и субстанций.	Нет	Нет	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Для выбора подходящих вспомогательных веществ и упаковки. Для прогноза стабильности препаратов и субстанций.
5	Исследование воздействия ультразвука при приготовлении испытуемых растворов.	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Да	Нет	Используется при разработке аналитических методик.
6	Исследование фотостабильности.	–	–	–	–	–	–	–	Испытание фотостабильности проводят в соответствии с требованиями ICH [4].

Примечание: 1 – Кислотный гидролиз (обычно в 1 М HCl); **2 –** Щелочной гидролиз (обычно в 1 М NaOH); **3 –** Окисление (чаще всего растворами перекиси водорода); **4 –** Нагревание при повышенной температуре, как правило, с добавлением небольшого количества воды (гидролиз водой и термоокислительная деструкция кислородом воздуха); **5 –** Нагревание в климатической камере при температуре выше температуры ускоренного хранения и относительной влажности 75%; **6** – Обработка ультразвуком; **7 –** Энергичное растирание в фарфоровой ступке или в мельнице. **Да/Нет** – чаще «Да», чем «Нет»; Нет/Да – чаще «Нет», чем «Да».

ПРОВЕДЕНИЕ СТРЕССОВЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

В таблице 3 рассмотрены основные задачи стрессовых экспериментов и соответствующие испытания. Рассмотрим эти испытания более подробно.

Кислотный гидролиз

Применяется для оценки устойчивости веществ и смесей к действию кислой среды, а также для определения пиков потенциальных продуктов кислотного гидролиза лекарственных веществ. С химической точки зрения гидролиз представляет собой реакцию взаимодействия молекул вещества с молекулами воды, приводящую чаще всего к замещению функциональных групп на ОН-группы, а иногда, например в случае эфиров, – к отщеплению фрагментов молекул. Обычно скорость гидролиза невелика, особенно в нейтральной среде – при pH, близком к 7. Для того чтобы ускорить гидролиз, в стрессовых экспериментах используют нагревание веществ и смесей в присутствии небольших количеств воды (моделирование действия остаточной влаги) или паров воды, реже применяют нагревание растворов. Используют также более сильное стрессовое воздействие – ускорение реакций гидролиза в кислой или в щелочной среде за счет катализа ионами H^+ (H_3O^+) или OH^-.

Для проведения кислотного гидролиза при стрессовых экспериментах применяют, как правило, растворы HCl подходящей концентрации – обычно 1М HCl. При этом в зависимости от устойчивости молекул веществ к гидролизу можно использовать нагревание, комнатную температуру или охлаждение, меньшую концентрацию кислоты, меньшее время воздействия с целью замедлить скорость гидролиза и выполнить требования правила 1, приведенного выше. Растворы, получаемые при кислотном гидролизе, рекомендуется доводить до нейтральной среды добавлением небольшого объема раствора щелочи с целью предотвращения преждевременного снижения эффективности хроматографической колонки из-за инжекций сильнокислого раствора.

Пример для трудногидролизуюемой субстанции. Около 25 мг (точная навеска) субстанции <наименование> помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают 1,0 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной и выдерживают в течение 2 ч при температуре 80 °С, затем доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают. Нейтрализуют полученный раствор с помощью 1 М раствора гидроксида натрия до pH, близкого к 7.

Щелочной гидролиз

О щелочном гидролизе можно написать то же самое, что отмечено выше для кислотного гидролиза, но только в отношении щелочной среды и с учетом замены HCl на NaOH.

Окисление

Основная задача стрессовых экспериментов окисления – определить хроматографические пики примесей, которые потенциально могут образовываться из-за окисления лекарственных веществ в ходе технологических процессов или при хранении лекарственных веществ и препаратов; задачей таких экспериментов может быть также установление связи между изменением окраски веществ и их окислением. Очевидно, что основным окислителем, влияющим на образование примесей в лекарственных веществах и препаратах, является кислород воздуха. Тем не менее в стрессовых экспериментах окисления кислород обычно не используют в связи с высокой взрывопожароопасностью при нагревании веществ в атмосфере кислорода. Применяют, как правило, перекись водорода и ее водные растворы. Такой выбор объясняется тем, что перекись водорода легко разлагается и не вызывает в отличие от других окислителей дополнительных трудностей очистки растворов перед хроматографическим анализом. В качестве исходного окислителя рекомендуется использовать 3% раствор перекиси водорода. Однако из-за того, что молекулы веществ могут сильно различаться по способности к окислению, на практике приходится экспериментально подбирать концентрацию перекиси водорода, способ приготовления раствора для стрессовых экспериментов и условия их проведения.

Механизм процессов окисления – это радикальные реакции; они имеют, как правило, очень низкие энергии активации. Поэтому при стрессовом окислении веществ могут образовываться многочисленные продукты вторичных реакций, которые невозможны в технологических условиях и при хранении лекарственных веществ и препаратов. Очевидно, что такие вторичные реакции надо свести к минимуму. Возникает вопрос: как это сделать? Теоретически обоснованного ответа в настоящее время не существует. Однако можно основываться на практических результатах исследований. Установлено, что вторичные реакции проявляются в большом количестве пиков продуктов окисления на хроматограммах растворов после стрессовых испытаний. Следовательно, необходимо свести к минимуму количество таких пиков. Для этого по нашему опыту *при стрессовых экспериментах окисления необходимо обеспечить такие условия (концентрация окислителя, температура и продолжительность воздействия), чтобы разложение лекарственного вещества не превышало 5%, причем в большинстве случаев достаточно провести разложение вещества на 2–3%*. Степень разложения лекарственных веществ можно легко контролировать по хроматограммам методом нормализации площадей пиков.

Для веществ, способных к легкому окислению, рекомендуется использовать концентрацию перекиси водорода <3%, например 0,3% [23], окисление проводить при комнатной температуре или даже охлаждать

раствор. Для замедления окисления веществ целесообразно готовить испытуемый образец следующим образом. К точной навеске вещества добавлять определенный объем раствора перекиси водорода, а по окончании стрессовых экспериментов проводить необходимые разведения.

Нагревание резко ускоряет разложение перекиси водорода и протекание вторичных реакций. Поэтому в стрессовых экспериментах окисления, направленных на определение потенциально возможных примесей – продуктов разложения лекарственного вещества, редко используют нагревание выше 50 °С [24, 25]. Исключение составляют трудно окисляющиеся вещества. Отметим, что имеются некоторые ограничения использования перекиси водорода для стрессовых экспериментов окисления [24]; среди них можно выделить образование гидроперекиси при окислении ацетонитрила в щелочной среде с последующими реакциями гидроксилирования, не свойственными перекиси водорода. Хотя эти ограничения редко встречаются на практике, о них лучше знать заранее.

Пример. Около 25 мг (точная навеска) субстанции <наименование> помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают 1,0 мл 3% раствора перекиси водорода и выдерживают в течение 1 ч при 50 °С, затем доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Приготовление растворов для проверки пригодности хроматографической системы (ППХС)

При использовании стрессовых экспериментов для приготовления растворов ППХС лучше всего применять гидролиз лекарственных веществ в кислой или щелочной среде. В этом случае образуется сравнительно небольшое количество примесей, как правило, достаточно хорошо разделенных, высота и площадь пиков которых хорошо воспроизводится. Однако при гидролизе сравнительно редко удается получить пик примеси, расположенный «достаточно близко» к пику основного вещества: в общем случае рекомендуется, чтобы разрешение Rs между пиком лекарственного вещества и пиком, используемым для оценки пригодности хроматографической системы, было бы ≤5 [21, 26]. Напротив, при окислении раствора лекарственного вещества перекисью водорода часто удается среди многих пиков продуктов окисления выделить пик, который расположен достаточно близко к пику основного вещества. Поэтому окисление перекисью водорода является наиболее часто используемым стрессовым экспериментом для получения растворов ППХС. Его недостатком является варьирование высот пиков продуктов окисления от опыта к опыту. В связи с этим при выборе пика для проверки пригодности хроматографической системы надо тщательно проверять, что этот пик хорошо воспроизводится, а его высота достаточно большая для надежной идентификации и определения значения Rs.

Следует подчеркнуть, что рекомендация использовать значения Rs≤5 в требованиях к пригодности хроматографической системы была справедлива раньше как с теоретической, так и с практической точки зрения, поскольку свойства сорбентов, как правило, варьировались от партии к партии и не для всех методик при валидации проводились стрессовые эксперименты. В настоящее время сорбенты ведущих производителей практически не отличаются по свойствам от партии к партии, стрессовые эксперименты, как правило, стали проводить при валидации. В связи с этим приемлемым стало использование значений *Rs* > 5, если выполнены определенные условия. Во-первых, если в аналитической методике указана конкретная хроматографическая колонка (например, Symmetry C18 150×3,9 мм, 5 мкм, фирмы Waters), дающая однозначное указание на сорбент, и только такая колонка должна применяться при контроле качества. Во-вторых, в валидационной документации должно быть доказано, что примесь, для пика которой нормируется разрешение Rs с пиком основного вещества, является наиболее близкой к нему из учитываемых примесей (обычно более 0,05%); этот вывод должен быть подтвержден результатами, полученными в ходе исследования стабильности субстанций/препаратов и стрессовых экспериментов.

Характерно, что при использовании перекиси водорода для приготовления раствора ППХС мы столкнулись с проблемой, которая оказалась неожиданной, но очень важной с практической точки зрения. Во время трансфера методики контроля качества препарата нам сообщили, что на хроматограммах раствора ППХС, полученных в лаборатории ОКК, наблюдается слишком маленький пик примеси, предназначенный для оценки Rs, причем эти результаты подтверждаются по процедуре Out of Specification. В ходе расследования оказалось, что причиной было частичное разложение концентрированной перекиси водорода во время хранения (срок годности перекиси водорода в производственной таре не превышает 6 мес. с даты производства). Поэтому при разработке и применении растворов ППХС, основанных на использовании перекиси водорода, настоятельно рекомендуется: а) проверять пригодность растворов ППХС, получаемых при использовании перекиси водорода с остаточным сроком годности менее 1 мес.; б) брать для приготовления раствора ППХС только перекись водорода из заводской упаковки.

Пример для трудно окисляющегося лекарственного вещества. Около 25 мг (точная навеска) субстанции <наименование> помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают 1 мл 3% раствора перекиси водорода, выдерживают в течение 30 мин при 60 °С, охлаждают до комнатной температуры, растворяют в метаноле, доводят объем раствора метанолом до мет-

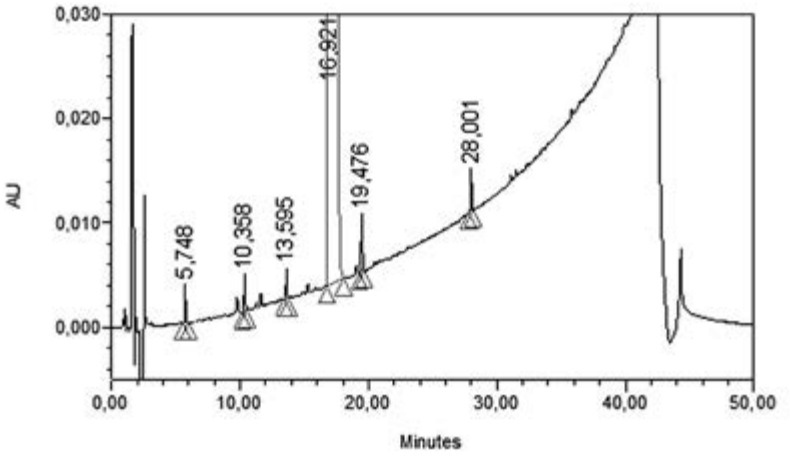


Рисунок 1. **Хроматограмма раствора субстанции лекарственного вещества после нагревания в течение 30 мин при 60 °С в присутствии 3% перекиси водорода**

	Name	Retention Time (RT)	RRT	Area	% Area	Height	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	Impurity 1	5,748	0,34	18194	0,07	2481		0,96	12637	26,232	74,079
2	Peak 2	10,358	0,61	17800	0,07	2377	23,85	1,01	44615	22,479	56,784
3	Peak 3	13,595	0,80	12781	0,05	1742	16,54	1,14	76443	26,601	81,363
4	Drug	16,921	1,00	25465326	99,59	1047172	7,70	4,26	8131	0,258	0,379
5	Peak 5	19,476	1,15	35980	0,14	4471	5,32	1,02	134295	10,898	21,443
6	Peak 6	28,001	1,65	21085	0,08	2910	42,47	0,93	334481	20,941	38,690

Примечание. Impurity 1 – идентифицированная примесь. Retention Time – время удерживания, RRT – относительное время удерживания, Area – площадь пика, %Area – процентное содержание (по методу внутренней нормализации площадей пиков), Height – высота пика, Resolution – разрешение с предыдущим пиком, USP Tailing ($T_{0,05}$) – фактор асимметрии пика, USP Plate Count – количество теоретических тарелок. Пики лекарственного вещества, примеси сравнения (RRT=1,15) и идентифицируемой примеси (RRT=0,34) спектрально чистые, так как Purity1 Angle < Purity1 Threshol

ки и перемешивают (раствор ППХС). Хроматограмма этого раствора приведена на рисунке 1. В результате стрессового эксперимента окисления образуется пик примеси с RRT≈1,15 , который расположен достаточно близко к пику основного вещества (Rs=5,3) и достаточно высок для обнаружения. Следовательно, этот пик может быть использован для нормирования Rs (разделяющей способности) в требованиях к пригодности хроматографической системы[1].

Нагревание веществ и смесей при повышенной температуре в присутствии небольшого количества воды (гидролиз водой) и без воды

Для исследования гидролиза водой рекомендуем следующий прием. Точную навеску субстанции лекарственного вещества, эквивалентную его содержанию в навеске порошка для приготовления испытуемого раствора по методике определения примесей, помещают в мерную колбу, добавляют из пипетки небольшое количество воды (обычно 1 мл), нагревают в сушильном шкафу при контролируемой температуре в течение определенного времени, колбу с веществом охлаждают до комнатной температуры, затем проводят разведения до концентрации испытуемого раствора по методике определения примесей и анализируют хроматографическим методом. Результаты таких стрессовых экспериментов используют чаще всего при разработке и валидации аналитических методик, а также для оценки совместимости лекарственных и вспомогательных веществ. Иногда такие стрессовые эксперименты применяют для оценки возможности гидролиза и/или окисления лекарственного вещества кислородом воздуха при повышенной температуре в ходе технологического процесса.

[1] Для приготовления растворов ППХС иногда используют химическую модификацию лекарственных веществ путем взаимодействия с реагентами, такими как бром, иод, формальдегид и т.д. При этом получают вещества, очень близкие по химической структуре и по значениям RT к лекарственному веществу.

Пример 1. Около 25 мг (точная навеска) субстанции <наименование> помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают 1,0 мл воды и выдерживают в течение 24 ч при температуре 80 °С, затем доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Пример 2. То же самое, но без добавления воды.

Исследование веществ и смесей в климатической камере при повышенной температуре и влажности

Эти стрессовые эксперименты имеют несомненные преимущества перед другими стрессовыми экспериментами при прогнозе стабильности лекарственных препаратов и субстанций. Испытания твердых лекарственных форм рекомендуется проводить при температуре 60 °С и относительной влажности W=75%. Увеличение температуры на 20 °С по сравнению с регламентированной температурой ускоренного хранения (40 °С) дает возможность быстрее (теоретически в 6 раз) установить негативные эффекты, которые могут протекать при хранении лекарственных веществ и препаратов (такие как увеличение содержания примесей – продуктов разложения основного вещества, уменьшение содержания основного вещества, изменение окраски и т.д.). Более высокую температуру используют редко, поскольку с повышением температуры значительно возрастает риск некорректного прогноза из-за того, что при высокой температуре скоростьопределяющими процессами могут стать процессы с высокой энергией активации, которые не проявляют себя при обычной температуре хранения.

Подчеркнем, что для прогноза стабильности лекарственных препаратов и субстанций стрессовые эксперименты в климатической камере не могут быть заменены никакими другими стрессовыми экспериментами (см. ниже обсуждение результатов таблицы 5). Продолжительность таких стрессовых экспериментов в климатической камере можно легко определить в зависимости от температуры (t_{ST}) по таблице эквивалентных температур, приведенной в ГФ XIII (раздел «Сроки годности лекарственных средств», таблица 3), или рассчитать в соответствии с уравнением Вант-Гоффа по формуле:

$$t_{ST} = t_0/2,5^{\frac{\Delta T}{10}},$$

где 2,5 – усредненное значение температурного коэффициента скорости реакции, ΔТ – разность температур стрессового эксперимента и долгосрочного испытания. Например, если стрессовые эксперименты проводят при 60 °С в климатической камере, а долгосрочные испытания – при 25 °С, то ΔТ=60–25=35. Тогда условному сроку хранения t_0=24 мес. соответствует: t_{ST}=24/2,5^{3,5}=24/24,7=0,95 мес. = 0,95 · 30=29,1 ≈ 29 дней; а значению t_0=12 мес. – 14,6 ≈ 15 дней.

В качестве важного примера кратковременных стрессовых испытаний в климатической камере в таблице 4 представлены экспериментально полученные сравнительные результаты анализа содержания основных примесей в таблетках препарата «БФ» трех

Таблица 4.

Результаты краткосрочных стрессовых экспериментов с таблетками «БФ» разной дозировки в климатической камере при 60 °С и относительной влажности 75%

Нормы	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 2,5 мг			Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг*			Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг*		
	Без стресса	2 суток	3 суток	Без стресса	2 суток	3 суток	Без стресса	2 суток	3 суток
Примесь А – не более 0,5%	0,01%	0,02%	0,03%	–	–	0,02%	–	–	0,02%
Примесь В – не более 0,5%	–	0,10%	0,17%	–	–	0,07%	–	–	0,03%
Примесь Е – не более 0,5%	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 0,5%	0,06%	0,15%	0,23%	0,03%	0,10%	0,17%	0,02%	0,04%	0,08%
Сумма примесей – не более 2,0%	0,26%	0,86%	1,30%	0,12%	0,55%	1,02%	0,05%	0,21%	0,53%

Примечание: *Таблетки с дозировкой 5 и 10 мг получены из одной и той же таблеточной массы.

дозировок: исходных и подвергнутых стрессовому воздействию при температуре 60 °С и относительной влажности 75% в течение двух и трех суток. *В ходе экспериментов было установлено, что скорость образования примесей зависит от соотношения «поверхность таблетки» / «объем таблетки», при этом она обратно пропорциональна дозировке препарата*. Отметим, что это соотношение выполнялось практически абсолютно точно для таблеток дозировкой 5 и 10 мг, наработанных из одной и той же таблеточной массы. Полученные результаты указали на определяющую роль диффузионных процессов при действии паров воды и кислорода воздуха на скорость образовании примесей при хранении таблеток «БФ». Этот вывод был также подтвержден результатами долгосрочных испытаний таблеток «БФ». Характерно, что аналогичная, обратно пропорциональная зависимость скорости образования (накопления) примесей от отношения поверхности к объему таблеток наблюдалась и для других препаратов, имеющих разные дозировки.

Исследование фотостабильности

Условия стрессовых экспериментов по оценке фотостабильности достаточно подробно рассмотрены в руководстве ICH [4] и обзоре [6]. Кроме того, в книгах [1, 27] подробно обсуждены детали стрессовых экспериментов по определению фотостабильности и механизмы фотохимических процессов превращения лекарственных веществ. Имеющаяся в них информация достаточна не только с теоретической, но и с практической точки зрения. Отметим только наиболее важные требования [4, 6]: 1) образцы подвергают воздействию света, обеспечивающего освещение не менее 1,2 млн люкс/ч и суммарную энергию ультрафиолета ближнего спектра не менее 200 Вт·ч/м^2; 2) твердые фармацевтические субстанции распределяют по контейнеру таким образом, чтобы толщина слоя не превышала 3 мм, а жидкие помещают в химически инертные прозрачные контейнеры.

Исследование возможности взаимодействия лекарственных веществ с реакционноспособными примесями из вспомогательных веществ

В [28] рассмотрены основные реакционноспособные примеси (РСП) из вспомогательных веществ, которые потенциально могут влиять на стабильность лекарственных препаратов. К ним относятся пероксиды; сахара, обладающие восстановительными свойствами; муравьиную кислоту, формальдегид и т.д. Обычно содержание РСП пренебрежимо мало по сравнению с лекарственным веществом. Поэтому исследование возможности взаимодействия лекарственных веществ с РСП целесообразно проводить, только если все другие стрессовые эксперименты не могут объяснить появление дополнительных пиков на хроматограммах испытуемых растворов при определении примесей в лекарственных препаратах.

Обработка ультразвуком

Этот вид стрессовых экспериментов применяют для того, чтобы убедиться, что обработка ультразвуком испытуемого, а иногда и стандартного растворов не ведет к деструкции основного вещества и образованию примесей. Для этого обычно готовят раствор стандартного образца с концентрацией, равной номинальной концентрации основного вещества в испытуемом растворе, и/или испытуемый раствор. Затем отбирают часть стандартного/испытуемого раствора и подвергают его обработке ультразвуком, так как это делается по соответствующей аналитической методике; хроматографируют растворы до и после обработки ультразвуком и сравнивают средние значения аналитических сигналов (площадей пиков или оптических плотностей). В случае установления различия в средних значениях аналитических сигналов до и после обработки ультразвуком принимают решение об исключении обработки ультразвуком из аналитической методики и замене обработки ультразвуком, например, на встряхивание на шейкере, перемешивание в миксере и т.д.

Механохимическое воздействие

Стрессовые эксперименты, моделирующие механохимическое воздействие, проводят при подозрении на то, что уменьшение содержания основного вещества и/или увеличение содержания примесей может происходить из-за механохимических реакций в ходе технологического процесса или при подготовке образцов для анализов с использованием растирания или размола. Обычно возможность механохимических реакций проверяют путем растирания веществ и смесей в фарфоровой ступке или в мельнице. После стрессового воздействия полученные образцы анализируют обычным образом. О возможности протекания механохимических реакций делают вывод на основании сравнения пиков на хроматограммах до и после стрессовых экспериментов: по появлению дополнительных пиков, уменьшению площади пика основного вещества, потере спектральной чистоты пика основного вещества и т.д.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ СТРЕССОВЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Заключительным, важным этапом стрессовых экспериментов является оценка их результатов и составление выводов с обоснованиями и рекомендациями. В связи с этим предлагаем специальный подход, по-

Таблица 5.

Типичные результаты стрессовых экспериментов для определения потенциально возможных примесей – продуктов разложения для разработки методики контроля качества одной из субстанций по показателю «Посторонние примеси»

Наименование	Субстанция, не подвернутая стрессовому эксперименту		Кислотный гидролиз 1М HCl, 80 °С, 1 ч		Щелочной гидролиз 1М NaOH, 50 °С, 2 ч		Окисление 3% H_2O_2 50 °С, 3 ч		Термическое разложение в присутствии воды, 80 °С, 2 ч		Климатическая камера, тонкий слой порошка субстанции, 60 °С, W=75%, 3 дня		Воздействие света* 1,2 млн люкс/ч и 200 Вт·ч/м^2	
	RRT	% Area	RRT	% Area	RRT	% Area	RRT	% Area	RRT	% Area	RRT	% Area	RRT	% Area
Peak RRT 0,15 (blank)														
Peak RRT 0,19 (blank)														
Peak RRT 0,35							0,35	0,04						
Peak RRT 0,39							0,39	0,07						
Peak RRT 0,56							0,56	0,02						
Peak RRT 0,64							0,64	0,02						
Peak RRT 0,67							0,67	0,03						
Peak RRT 0,72	0,72	0,01	0,72	0,02	0,72	0,02	0,72	0,03	0,72	0,01	0,72	0,01	0,72	0,01
Peak RRT 0,79							0,79	0,06						
Peak RRT 0,83	0,83	0,01	0,82	0,01	0,82	0,01	0,83	0,03					0,83	0,01
Peak RRT 0,86							0,86	0,02						
Drug RRT 1,00	1,00	**99,81**	1,00	**99,79**	1,00	**98,25**	1,00	**99,21**	1,00	**98,30**	1,00	**98,37**	1,00	**99,80**
Peak RRT 1,20							1,20	**0,10**						
Peak RRT 1,84	1,84	0,02	1,85	0,02	1,85	0,02	1,84	0,04	1,85	0,02	1,84	0,02	1,84	0,02
Peak RRT 2,02	2,02	0,07	2,02	0,08	2,02	0,07	2,01	0,07	2,02	0,06	2,01	0,08	2,02	0,07
Peak RRT 2,14	2,14	0,04	2,15	0,03	2,15	0,05	2,14	0,03	2,15	0,03	2,14	0,04	2,14	0,04
Peak RRT 3,56	3,56	0,03	3,54	0,02	3,54	0,03	3,57	**0,11**	3,54	0,03	3,55	0,03	3,56	0,02
Peak RRT 3,75					3,75	**0,12**								
Peak RRT 5,22							5,22	0,02						
Peak RRT 5,76	5,76		5,77	0,02	5,74	**0,78**	5,78	0,00	5,76	**0,13**	5,76	**0,19**	5,76	
Peak RRT 5,94											5,94	**0,42**		
Peak RRT 6,16	6,16	0,01	6,12	0,01	6,19	**0,66**	6,16	0,07	6,16	**1,42**	6,16	**0,84**	6,16	0,01

Примечание: RRT – относительное время выхода пиков (относительное время удерживания);

% Area – процентное содержание вещества, вычисленное методом внутренней нормализации площадей пиков без поправочных коэффициентов.

* Образцы подвергали воздействию света, обеспечивающего освещение 1,2 млн люкс/ч и суммарную энергию ультрафиолета ближнего спектра 200 Вт·ч/м^2.

казавший высокую эффективность на практике. Известно, что при сопоставлении экспериментальных результатов, независимо от их природы, наибольшую информацию получают при использовании нормализованных показателей. Дело в том, что нормализованные показатели в отличие от абсолютных (к ним относится время выхода пика RT) дают возможность абстрагироваться от несущественных явлений и воздействий, более четко видеть тенденции развития процессов. *В случае стрессовых экспериментов в качестве нормализованных показателей целесообразно использовать относительные времена выхода пиков (относительные времена удерживания)* – **RRT**. Значения RRT дают возможность корректно сопоставлять пики на хроматограммах, поскольку RRT пиков (в отличие от абсолютного показателя RT) мало изменяются при практически неизбежном варьировании характеристик подвижной фазы в ходе стрессовых экспериментов. Это важно прежде всего для правильного отнесения («идентификации») пиков. В связи с этим в результатах обсчета хроматограмм в таблицах под рисунками хроматограмм следует обязательно приводить значения RRT наряду с временами выхода пиков. Могут спросить, а как быть в случае хроматограмм blank и плацебо, поскольку на них отсутствуют пики основных веществ и примесей, относительно которых можно вычислять значения RRT. Ответ простой: значения RRT системных пиков (blank) и пиков плацебо можно определять относительно времени выхода пика основного вещества на хроматограмме раствора сравнения или лучше, если нет «перегрузки» колонки, – относительно времени выхода пика основного вещества на хроматограмме испытуемого раствора (так как пики примесей определяют и обсчитывают по этой хроматограмме).

Для установления негативных химических процессов, ответственных за образование примесей в лекарственных препаратах и субстанциях, а также для проверки возможности неправильного отнесения (идентификации) пиков примесей *большую эффективность показала систематизация результатов стрессовых экспериментов в форме специальных таблиц со значениями RRT, полученными при всех стрессовых экспериментах.* В качестве примера можно привести один из наиболее простых вариантов систематизации результатов стрессовых экспериментов, представленный в таблице 5. В ней приводятся данные для всех пиков на хроматограммах растворов лекарственного вещества до и после стрессовых экспериментов. В каждой строке указывается наименование пика, его значение RRT, а также содержание в %[1], рассчитанное методом нормализации площадей/высот пиков. Столбцы представляют собой результаты обсчета хроматограмм, а именно значения RRT и Area (в %) для выяснения, площади каких пиков увеличились и на сколько процентов после стрессового воздействия. На основании такой таблицы можно надежно установить возможность перекрывания пиков примесей, что чрезвычайно важно для разработки и валидации аналитических методик (особенно в случае наличия примесей, для которых необходимо определять поправочные коэффициенты, а также лекарственных форм, содержащих два и более лекарственных вещества). Кроме того, с помощью подобной таблицы можно соотнести образование определенных примесей с химическими процессами; сообщить технологам о вспомогательных веществах, от которых лучше отказаться; дать предложения о предпочтительной упаковке и т.д. Заметим, что иногда, в случае очень близко расположенных пиков, для их правильного отнесения можно, помимо значений RRT, использовать сравнение спектров с помощью диодно-матричного детектора и указывать это в нормативной документации.

Перейдем к более подробному рассмотрению таблицы 5, систематизирующей результаты стрессовых экспериментов. Эти эксперименты проводили в связи с разработкой методики ВЭЖХ для контроля содержания примесей в субстанции лекарственного вещества. Из таблицы видно, что пики основного вещества, примесей и blank не перекрываются. Субстанция фотостабильна (нечувствительна к воздействию света). Основные примеси в субстанции могут образовываться из-за щелочного гидролиза: пики с RRT=5,76 (0,78%), 6,16 (0,66%) и 3,75 (0,12%); окисления: пики с RRT≈1,20 (0,10%) и 3,56 (0,11%); термического разложения в присутствии воды: пики с RRT=5,76 (0,13%) и 6,16 (1,72%). Кроме того, при стрессовом эксперименте в климатической камере установлено, что при длительном воздействии паров воды (60 °C, W=75%, 3 дня) дополнительно появляется пик примеси с RRT=5,94, который, как оказалась, является продуктом разложения примеси с RRT=6,16. Важно отметить, что эта примесь не была обнаружена в других стрессовых экспериментах, но оказалась одной из основных при исследовании стабильности испытуемой субстанции в условиях естественного хранения по ICH: 25 °C, W=60%, 2 года. *Это указывает на важность проведения стрессовых экспериментов в климатической камере при повышенных температуре и влажности не только для экспрессной оценки стабильности лекарственных веществ и препаратов, но и при разработке аналитических методик, а также при исследовании совместимости лекарственных и вспомогательных веществ.*

[1] Для пиков blank и плацебо (в случае препаратов) не указывается содержание в %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлен обзор публикаций по стрессовым экспериментам, представляющих наибольший интерес с практической точки зрения. Обсуждены основные компьютерные программы, дающие возможность прогнозировать механизмы превращения лекарственных веществ и образования примесей, а также облегчающие идентификацию примесей методами масс-спектрометрии и ЯМР.

Подробно рассмотрены основные задачи стрессовых экспериментов и соответствующие им испытания, в том числе стрессовые эксперименты для приготовления растворов для проверки пригодности хроматографических систем.

Приведены основные правила, выполнение которых обязательно для корректной оценки результатов стрессовых экспериментов. 1) Стрессовые эксперименты должны проводиться таким образом, чтобы свести к минимуму образование примесей вследствие вторичных реакций. Для этого разложение (превращение) основного вещества не должно превышать 5% при стрессовых экспериментах с окислением и 20% – в остальных случаях. 2) Надо стремиться к тому, чтобы растворы до и после стрессовых экспериментов имели близкие концентрации основного вещества. 3) На хроматограммах растворов после стрессовых экспериментов следует обязательно контролировать (определять) спектральную чистоту пиков основных веществ, а также пиков примесей, для которых требуется использовать поправочные коэффициенты.

Предложен подход для систематизации и анализа результатов стрессовых экспериментов, основанный на использовании относительных времен выхода пиков веществ и специальной таблицы. Он дает возможность надежно устанавливать перекрывание пиков веществ и тем самым оценивать валидность аналитических методик и необходимость их доработки. Этот подход будет полезен не только при разработке и валидации аналитических методик, но и при экспертной оценке соответствующих разделов документации на лекарственные вещества и препараты. В качестве примера использования предлагаемого подхода рассмотрена специальная таблица сравнения результатов до и после стрессовых экспериментов, которая дает возможность надежно выявлять перекрывающиеся пики веществ на хроматограммах. Кроме того, она дает возможность соотнести пики примесей с определенными негативными химическими реакциями разложения/превращения лекарственных веществ (кислотный или щелочной гидролиз, окисление, термическое разложение в присутствии небольших количеств воды или под действием паров воды, термоокислительная деструкция и т.д.). Зная возможные негативные химические реакции, можно корректировать состав лекарственных форм, условия технологических процессов, упаковку и т.д.

Показано, что стрессовые эксперименты в климатической камере являются наиболее точными при прогнозе стабильности: их нельзя заменить другими стрессовыми экспериментами без риска пропустить примеси, которые могут накапливаться в ходе долгосрочного хранения препаратов, их полупродуктов и субстанций.

Наглядно объяснено, с использованием результатов таблицы 4, почему при хранении разных дозировок одного и того же препарата в одинаковых условиях часто наблюдается значительно большее содержание примесей в меньшей дозировке.

Даны рекомендации по проведению стрессовых экспериментов, которые, несомненно, будут полезны на практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation. 2nd ed. / Ed. by S.W. Baertschi, K.M. Alsante, R.A. Reed. – N.Y.: Infoorma healthcare, 2011. 612 p.
2. Stability Testing of New Drug Substances and Products, Q1A(R2) // International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. URL: http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-testing-of-new-drug-substances-and-products.html (дата обращения 15.06.2016).
3. Stability Testing of Existing Active Ingredients and Related Finished Products (CPMP/QWP/122/02 Rev. 1 corr). EMEA. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003466.pdf (дата обращения 15.06.2016).
4. Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Q1B. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf (дата обращения 15.06.2016).
5. Изучение стабильности и установление сроков годности лекарственных средств // Руководство по экспертизе лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. Т. 2. – М.: Гриф и К, 2014. С. 224–268.
6. Л.И. Митькина, Е.Л. Ковалева, И.А. Прокопов. Стресс-исследования и фотостабильность как

часть данных по фармацевтической разработке лекарственного средства // Ведомости НЦЭСМП. 2015. № 2. С. 9–12.

7. A. Paola Cione, E. Tonhi, P. Silva. Stability Indicating Methods // Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas / Ed. by Yukihiro Shoyama. – INTECH. 2011. 282 p. URL: http://cdn.intechopen.com/pdfs/23465/InTech-Stability_indicating_methods.pdf (дата обращения 15.06.2016).
8. J. Ruan. Approaches to Oxidative Forced Degradation of API and their Prediction for Stability Studies. Bristol-Myers Squibb. URL: https://www.google.ru/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjdksLfrLPLAhWiApoKHcjSDOcQFggbMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.yumpu.com%2Fen%2Fdocument%2Fview%2F31342568%2Fapproaches-to-oxidative-forced-degradation-of-api-and-their-&usg=AFQjCNF2q5_w2gr3PIT2YvjDApDcUD1jSA&bvm=bv.116573086,bs.2,d.bGQ (дата обращения 15.06.2016).
9. S.W. Baertschi. Patterns and Pathways: Using Chemistry to Guide the Characterization of Degradation Products. – Boston, MA: COSMOS. 2009. URL: http://www.cosmoscience.org/archives/2009/Speaker%201-Patterns%20and%20pathways.pdf (дата обращения 15.06.2016).
10. Cambridge Soft Pharmaceutical Drug Degradation Database, Pharma D3. 2016 Arxspan. URL: https://www.google.ru/webhp?sourceid=chrome-instant&ion=1&espv=2&ie=UTF-8#newwindow=1&q=pharma+d3+drug+degradation+database; http://d3.arxspan.com/ (дата обращения 15.06.2016).
11. Zeneth Chemical Degradation Prediction Software. URL: http://www.lhasalimited.org/products/zeneth.htm (дата обращения 15.06.2016).
12. S. Görög. Identification and Determination of Impurities // Drugs Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2000. V. 4. 748 p.
13. D. Jain, P.K. Basniwal. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives // J. Pharm. and Biomed. Analysis. 2013. V. 86. P. 11–35.
14. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q3A(R2). Impurities in New Drug Substances. ICH. 2006.
15. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q3B(R2). Impurities in New Drug Products. ICH. 2006.
16. S.I. Farag Badawy, M.A. Hussain. Microenvironmental pH Modulation in Solid Dosage Forms // J. Pharm. Sci. 2007. V. 96. № 5. P. 948-959.
17. S.R. Byrna, W. Xub, A.W. Newmanc. Chemical reactivity in solid-state pharmaceuticals: formulation implications // Advanced Drug Delivery Reviews. 2001. V. 48. P. 115–136.
18. S.S. Bharate, S.B. Bharate, A.N. Bajajc. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review // J. Excipients and Food Chem. 2010. V. 1. № 3. P. 3–26.
19. Н.А. Эпштейн, С.В. Емшанова. Исследование взаимодействия лекарственных и вспомогательных веществ в твёрдых лекарственных формах // Химико-фармацевтический журнал. 1995. Т. 29. № 3. С. 47–50.
20. У. Уэндландт. Термические методы анализа / Пер. с англ. под ред. В. А. Степанова и В. А. Берштейна. – М.: Мир, 1978. 526 с.
21. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. 7th Ed. European Pharmacopoeia. 2015. P. 30.
22. European Pharmacopoeia 8th ed. 2.2.46. Chromatographic Separation Techniques. 2015.
23. U. A. Deokate, A. M. Gorde. Forced Degradation and Stability Testing: Strategies and Analytical perspectives. URL: http://www.pharmachitchat.com/forced-degradation-and-stability-testing-strategies-and-analytical-perspectives/(дата обращения 15.06.2016).
24. E. Nelson. Kick-Start the Evolution of Stability Indicating Methods with Forced Degradation. – TransForm. 2008. URL: http://www.iirusa.com/upload/wysiwyg/2010-P-Div/P1511/Documentation/IIR_P1303_Nelson.pdf (дата обращения 15.06.2016).
25. K.M. Alsante, L. Martin, S. W. Baertschi. A Stress Testing Benchmarking Study // Pharm. Tech. 2003. V. 27. № 2. P. 60-72. URL: http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/d7d074db-6cd2-41af-9007-bc42c9b355f5/article-47384.pdf (дата обращения 15.06.2016).
26. Н.А. Эпштейн, С.В. Емшанова. О требованиях к пригодности хроматографической системы при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом ВЭЖХ // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 11. С. 34–40.
27. Photostability of Drugs and Drug Formulations // Ed. by H.H. Tonnesen. – Boca Raton – London – New York – Washington: CRC Press, 2004. 413 p.
28. Y. Wu, J. Levons, A.S. Narang et al. Reactive Impurities in Excipients: Profiling, Identification and Mitigation of Drug-Excipient Incompatibility // AAPS Pharm. Sci. Tech. 2011. V. 12. № 4. P. 1248–1263. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225520/ (дата обращения 15.06.2016).

PHARMA
Saint-Petersburg

12–14 октября 2016

Санкт-Петербург
КВЦ «ЭКСПОФОРУМ»

4-я Международная выставка лекарственных препаратов, пищевых и биологически активных добавок «ФАРМАЦИЯ»

Разделы выставки

- Лекарственные средства и вакцины
- БАДы и витаминно-минеральные комплексы
- Фармацевтические ингредиенты и ферментные препараты
- Диетические продукты

Посетители выставки

Фармацевты, заведующие аптеками, руководители медицинских центров и клиник, главные врачи, практикующие врачи лечебно-профилактических учреждений и амбулаторно-поликлинических учреждений, специалисты отдела закупок лекарственных средств

Забронируйте стенд: **pharmaexpo.ru**

Организаторы:

primexpo ITE

+7 (812) 380 60 10/00
med@primexpo.ru

В рамках:

ПМФЗ ПЕТЕРБУРГСКИЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ ЗДОРОВЬЯ

0+

УДК 615.074

СОРБЦИОННО-ЦВЕТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ЛЕКАРСТВЕННОЙ СУБСТАНЦИИ ТЕТРАЦИКЛИНА ГИДРОХЛОРИДА И В РАСТВОРЕ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ ЦИАНОКОБАЛАМИНА

А.А. Чапленко[1,2]*, О.В. Моногарова[1], К.В. Осколок[1], С.А. Чапленко[1]

1 – ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», химический факультет, кафедра аналитической химии, 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, ГСП-2, 1, стр. 3

2 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, Россия, г. Москва, Петровский б-р, 8, стр. 2

1 – M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 1/3, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

2 – Federal State Budgetary Institution «Scientific Center for Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 8/2, Petrovskiy blv., Moscow, 127051, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: a.a.chaplenko@yandex.ru
Тел.: 8 (495) 939 25 79

Резюме. Предложен простой и доступный способ цветометрического определения тетрациклина в виде окрашенного комплекса с ионами железа(III) и витамина B_{12} в виде окрашенного комплекса кобальта(II) после химической минерализации цианокобаламина. Для отделения от сопутствующих компонентов фармацевтических препаратов аналиты извлекали из растворов с помощью сорбента, изготовленного из пенополиуретана на основе простых эфиров. Оптимизированы условия сорбционного извлечения и измерения аналитического сигнала указанных веществ. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, заявленными производителями. Адекватность предложенного подхода подтверждена результатами косвенного рентгенофлуоресцентного анализа субстанции тетрациклина и раствора для инъекций витамина B_{12} (цианокобаламина).

Ключевые слова: тетрациклин, цианокобаламин, пенополиуретановый сорбент, цветометрия.

SORPTION-CHROMATICITY DETERMINATION OF ACTIVE INGREDIENTS IN DRUG SUBSTANCE TETRACYCLINE HYDROCHLORIDE AND IN CYANOCOBALAMIN SOLUTION FOR INJECTION

A.A. Chaplenko[1,2]*, O.V. Monogarova[1], K.V. Oskolok[1], S.A. Chaplenko[1]

Abstract. The simple and available technique of determination of tetracycline in the form of colored complex with iron(III) ions and B_{12} vitamin in the form of the colored thiocyanate complex of cobalt(II) after a chemical mineralization of cyanocobalamin is offered. The analytes were separated from the accompanying components by sorption to polyurethane foam based on ethers. The conditions of sorption separation and measurement of analytical signal of these substances are optimized. The obtained results are in satisfactory agreement with data declared by the manufacturer. The adequacy of proposed approach is confirmed by results of indirect X-ray fluorescence analysis of tetracycline drug substance and injection solution B_{12} vitamin (cyanocobalamin).

Keywords: tetracycline, cyanocobalamin, polyurethane foam sorbent, chemical chromaticity method.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных задач фармацевтической химии является разработка эффективных способов определения действующих веществ в лекарственных препаратах [1]. Согласно российской и зарубежным фармакопеям для определения действующих веществ в фармацевтических препаратах традиционно используют как химические, так и инструментальные методы, например высокоэффективную жидкостную хроматографию или инфракрасную спектроскопию [2–4]. Низкая селективность первых существенно ограничивает круг определяемых действующих веществ, а высокая стоимость последних и требования к квалификации оператора – доступность для полевых лабораторий и производственных аптек. В связи с этим разработка технически простых и достаточно селективных способов определения действующих веществ в лекарственных препаратах является актуальной задачей современной фармацевтической химии.

К числу таких простых и доступных методов анализа относится цветометрия. Цветометрические методики широко используются в аналитической химии, а их комбинация с цифровой обработкой получаемых изображений открывает широкие перспективы для расширения областей применения и улучшения метрологических характеристик [5].

Цель настоящей работы – иллюстрация возможностей комбинированного химико-инструментального подхода, основанного на сорбционном извлечении действующих веществ из фармацевтических препаратов с последующим цветометрическим определением. Функция сорбента не ограничена исключительно стадией разделения и концентрирования. Поскольку фаза сорбента играет роль некой универсальной среды с постоянными свойствами, при-

нимающей участие в формировании аналитического сигнала и обеспечивающей единство условий его измерения, определение больших содержаний лекарственных веществ также должно осуществляться посредством переведения аналита в фазу сорбента. Для сорбционного извлечения действующих веществ из растворов использовали сорбенты, изготовленные из пенополиуретана (ППУ) на основе простых эфиров. Они очень дёшевы и доступны, обладают высокой химической, механической и термической устойчивостью. Для многих классов органических и неорганических соединений ППУ-сорбенты обеспечивают высокие коэффициенты распределения в системе «водный раствор – сорбент», составляющие от 3 до 5 порядков [6]. Для измерения аналитического сигнала – интенсивности окраски образца – вместо дорогостоящего оборудования предложено использовать простое, недорогое и доступное измерительное устройство – офисный планшетный сканер. Для обработки растровых изображений, полученных на сканере, можно использовать графический редактор.

Продукты физико-химического взаимодействия ППУ с лекарственными веществами, как правило, содержат функционально-аналитические хелатообразующие группы, способные связывать ионы переходных металлов в устойчивые комплексные соединения. Данное обстоятельство может быть использовано в работе для проверки адекватности цветометрических методик с помощью косвенного рентгенофлуоресцентного (РФ) определения указанных выше органических веществ определением аналитов по «тяжёлым меткам» – ионам металлов, образующих устойчивые комплексные соединения с соответствующими действующими веществами [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и материалы

Для сорбционного извлечения действующих веществ применяли ППУ на основе простых эфиров марки 5-30 (ГПО «Радикал», Украина). Для очистки от органических примесей и технологических примесей металлов таблетку ППУ массой ~0,2 г (размер 10×10 мм, толщина 1 мм) последовательно промывали в 1 М растворе HCl, ацетоне и деионизированной воде (приблизительно в течение часа в каждом растворе), после чего высушивали до воздушно-сухого состояния и сразу же использовали для сорбции. Степень очистки от металлов выборочно контролировали РФ-методом. В работе использовали государственный стандартный образец (ГСО) ионов кобальта(II), раствор в ампулах 5 мл, содержание ионов кобальта 0,999 мг/мл (ЭАА «Экоаналитика», Россия, серия 7784-2000, годен до 08.2017 г.); субстанции (х.ч.); NaF (кат. № 01148), KSCN (кат. № 207799), NaOH (кат. № S8045), $FeCl_3$ (кат. № 157740); концентрированные растворы кислот (х.ч.) – серной (кат. № 258105), соляной (кат. № 258148), ацетон (х.ч.) (кат. № 179124) (все – Sigma-Aldrich, США); цианокобаламина раствор для инъекций 0,5 мг/мл в ампулах по 1 мл (Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь, серия 00G272, срок годности до 06.2019 г.); фармацевтическая субстанция-порошок тетрациклина гидрохлорида (North China Pharmaceutical Goodstar Co., Китай, серия 98874HK, срок годности до 07.2017 г.). В качестве стандартного образца тетрациклина гидрохлорида использовали раствор субстанции тетрациклина (1 мг/мл), описанной выше, качество которой подтверждено согласно методам, описанным в фармакопейной статье Европейской Фармакопеи 8 изд. «Tetracyclini hydrochloridum» [2], содержание тетрациклина составило 99,4±0,2%.

В работе использовали перемешивающее устройство модели 6500 производства группы компаний «Экрос», Россия.

Пробоподготовка лекарственных средств и приготовление градуировочных растворов

Тетрациклина гидрохлорид. Для приготовления анализируемого раствора тетрациклина 0,250 г фармацевтической субстанции тщательно измельчили в фарфоровой ступке, количественно перенесли в мерную колбу объемом 100,0 мл, растворили в 30 мл 0,01 М NaOH, встряхивая на перемешивающем устройстве в течение 60 мин, после чего раствор довели до метки 0,01 М NaOH. Аликвоту (1,00 мл) полученного раствора перенесли в мерную колбу объемом 25,0 мл, добавили 1,00 мл раствора $FeCl_3$ (1 мг/мл) и довели раствор до метки деионизированной водой, подкисленной до pH 2-3 добавлением HCl 1М. Полученный раствор использовали для анализа. Для приготовления градуировочных растворов использовали стандартный образец субстанции тетрациклина, растворы готовили аналогично анализируемым, концентрации тетрациклина в градуировочных растворах: 0,0005; 0,001; 0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 мг/мл.

Тетрациклин сорбировали на ППУ в виде комплексов с ионами железа(III). Для повышения равномерности распределения аналита по объёму сорбента из ППУ-таблеток, помещённых в водный раствор, с помощью стеклянной палочки были тщательно удалены пузырьки воздуха. Концентрирование проводили в статическом режиме, встряхивая приготовленные растворы с ППУ-сорбентом на перемешивающем устройстве в течение 60 мин. После промывания дистиллированной водой ППУ-таблетки были высушены между листами фильтровальной бумаги.

Цианокобаламин. Пробоподготовка лекарственного препарата цианокобаламина включала этап минерализации. Содержимое 5 ампул выпарили досуха в фарфоровом тигле, к остатку прибавили 5 мл концентрированной H_2SO_4 и продолжили нагревание в течение 5 мин. Полученный после прокаливания остаток количественно перенесли в мерный фторопластовый стакан и растворили в 5 мл деионизированной воды, подщелоченной 1М NaOH до pH 10-11. Во фторопластовый стакан также вносили точные навески 50,0 мг NaF и 50,0 мг KSCN и встряхивали полученную смесь на перемешивающем устройстве до полного растворения. Раствор количественно перенесли в мер-

ную колбу вместимостью 25,0 мл и довели до метки деионизированной водой, подкисленной HCl 1М до pH 2-3.

Для приготовления градуировочных растворов использовали ГСО ионов кобальта(II). С помощью мерной пипетки отбирали аликвоту ГСО-раствора ионов кобальта(II) (0,999 мг/мл) объемом 1,00 мл и количественно переносили в колбу вместимостью 10,0 мл, в которую предварительно внесли точные навески 50,0 мг NaF и 50,0 мг KSCN, объем смеси довели до метки деионизированной водой, подкисленной HCl 1М до pH 2-3 и встряхивали до полного растворения. Полученный раствор последовательно разбавляли в 2 и в 5 раз. Содержание ионов кобальта(II) в градуировочных растворах: 0,0005; 0,001; 0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 (что соответствует интервалу содержаний цианокобаламина от 0,01 до 2,30 мг/мл).

Сорбцию тиоцианатных комплексов кобальта проводили аналогично сорбции комплексов тетрациклина. Полноту извлечения цианокобаламина проверяли косвенным РФ-методом при повторном добавлении таблетки ППУ к исследуемым растворам после проведения сорбции.

Измерение аналитического сигнала

Измерение аналитического сигнала (светлоты выбранного цветового канала) цветометрическим методом выполнено с помощью офисного сканера LaserJet M1120 MFP (Hewlett-Packard, США) и программы для просмотра и обработки растровых изображений Gimp 2.8.16 (The GIMP Team, США). Параметры сканирования: цветовой режим – цветное изображение; тип – фото; разрешение – 300 dpi. Обработка изображений таблеток ППУ и определение светлоты цветового *R*-канала (L_R) выполнены в графическом редакторе. Аналитический сигнал измеряли по шкале *RGB*-модели как светлоту *B*-канала в условных единицах от 0 до 255.

Для проверки адекватности предложенного подхода косвенное РФ-определение лекарственных веществ на ППУ-сорбенте проводили с использованием светосильного бесколлиматорного последовательного РФ-спектрометра «Спектроскан Макс-G» (НПО «Спектрон», Россия). Прибор укомплектован маломощной (4 Вт) острофокусной (3 мм) рентгеновской трубкой трансмиссионного типа с тонкоплёночным (2 мкм) Mo-анодом. Рабочее напряжение 40 кВ. Сила тока 100 мкА. Разложение вторичного рентгеновского излучения в спектр реализовано по схеме Иоганссона с помощью кристалла-анализатора LiF (200) (2d=0,4028 нм). Спектрометр укомплектован отпаянным газоразрядным пропорциональным счётчиком. Для измерения РФ-спектров ППУ-таблетки помещали в специально изготовленные кюветы, характеризующиеся низким уровнем рассеянного первичного излучения [8]. Для каждого образца сорбента измеряли амплитудное распределение интенсивности линий CoK_α, FeK_α в интервалах длин волн 0,1790±0,0050 нм, 0,1937±0,0050 нм соответственно. Время экспозиции 60 с. В качестве аналитического сигнала использовали интегральные интенсивности соответствующей линии за вычетом фонового сигнала. Для учета влияния положения образца под зондом на неопределённость результатов измерения аналитический сигнал измеряли 4 раза при повороте ППУ-таблетки на 90°.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий сорбции комплексов на ППУ-сорбенте

Для оптимизации условий сорбции роданидных комплексов Co(II) и хелатов тетрациклин-Fe(III) экспериментально определен оптимальный pH сорбции комплексов (для комплекса тетрациклина-Fe(III) pH составляет 5–6, для роданидных комплексов кобальта – 2–3) и времени контакта фаз на степень извлечения аналитов (рисунок 1). Показано, что время контакта фаз, необходимое для достижения максимальной сорбции, для изученных соединений наблюдается через 50–70 мин (рисунок 1).

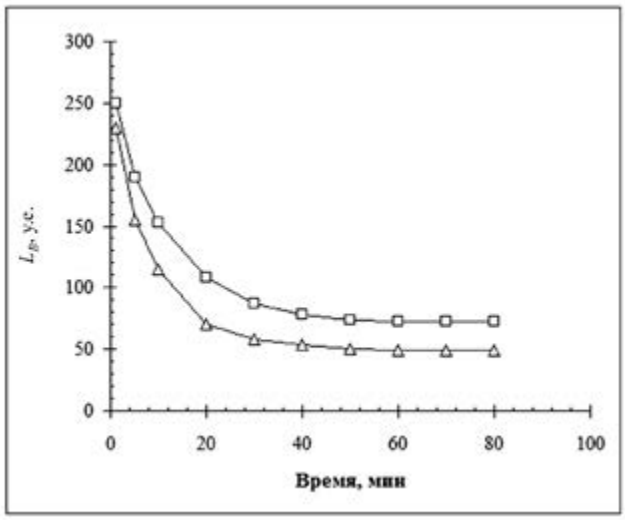


Рисунок 1. Зависимость светлоты цветового канала (L_B) от времени сорбции: Δ – для роданидного комплекса кобальта(II), □ – для тетрациклина-Fe(III)

Сорбционно-цветометрическое и косвенное РФ-определение действующих веществ

Метрологические характеристики цветометрического и косвенного РФ-определения действующих веществ в лекарственных препаратах после сорбционного извлечения на ППУ представлены в таблицах 1, 2. Для иллюстрации возможностей развитого комплексного подхода при анализе лекарственных препаратов, содержащих металлоорганические действующие вещества, в работе предложен способ определения витамина B_{12}. Процедура включает химическую минерализацию цианокобаламина, извлечение ионов кобальта(II) в виде роданидных

комплексов из водных растворов на ППУ-сорбенте с последующим цветометрическим и косвенным РФ-измерением аналитического сигнала. Роданидный комплекс кобальта окрашивает ППУ-сорбент в голубой цвет, комплекс тетрациклин-Fe(III) – в сиренево-серый. Проверку правильности определения витамина B_{12} проводили способом «введено – найдено» (таблица 3). Результаты определения действующих веществ в фармацевтических препаратах цветометрическим и косвенным РФ-методами представлены в таблице 4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, развитый химико-инструментальный подход применим для определения органических и металлоорганических действующих веществ, одним из продуктов трансформации которых является окрашенное комплексное соединение. К таким фармацевтическим препаратам, например, относятся таблетки тетрациклина и раствор цианокобаламина для инъекций, для них представлена методика определения содержания действующего вещества. Предложенный подход доступен, технически прост, для измерения аналитического сигнала не требуются специализированные и дорогостоящие приборы. Методика, представленная в статье, может быть использована в малобюджетных лабораториях, а также для предварительного скрининга препаратов, не соответствующих требуемым нормам, при проведении контроля качества фармацевтических препаратов.

Таблица 1.

Метрологические характеристики цветометрического определения лекарственных веществ после сорбционного извлечения с использованием ППУ-сорбентов (n=5, P=0,95)

Лекарственное вещество	R^2	Диапазон определяемых содержаний, мг/мл	c_{min}, мг/мл	s_r
Цианокобаламин	0,9933	0,3–1,5	0,090	0,030
Тетрациклин	0,9881	0,02–0,2	0,018	0,007

Таблица 2.

Метрологические характеристики косвенного РФ-определения лекарственных веществ после сорбционного извлечения на ППУ-сорбентах (n=5, P=0,95)

Лекарственное вещество	R^2	Диапазон определяемых содержаний, мг/мл	c_{min}, мг/мл	s_r
Цианокобаламин	0,9940	0,2–1,4	0,12	0,04
Тетрациклин	0,9916	0,05–0,2	0,024	0,009

Таблица 3.

Проверка правильности сорбционно-цветометрического и косвенного сорбционно-рентгенофлуоресцентного определения действующего вещества в растворе цианокобаламина для инъекций способом «введено – найдено» (n=5, P=0,95)

m цианокобаламина, мг		
Введено	Найдено	
	Цветометрия	РФА
0,5	0,50±0,05	0,045±0,06
1,0	1,05±0,07	0,94±0,09

Таблица 4.

Цветометрическое и косвенное РФ-определение лекарственных веществ с использованием ППУ-сорбентов (n=5; P=0,95)

Лекарственное вещество	*m*, мг/проба		
	согласно фармакопейным методам	цвето-метрия	РФА
Цианокобаламин	2,50±0,02	2,4±0,1	2,6±0,20
Тетрациклин	248,5±0,5	244±14	251±27

ЛИТЕРАТУРА

1. А. П. Арзамасцев. Фармацевтическая химия. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. 640 с.
2. European Pharmacopoeia (2014) (Ph. Eur.) 8th edition.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. 2015.
4. The United States Pharmacopoeia 33 – National Formulary 28, Reissue 2010.
5. V.M. Ivanov, O.V. Monogarova, K.V. Oskolok. Capabilities and prospects of the development of a chromaticity method // Journal of Analytical Chemistry. 2015. V. 70. № 10. P. 1165–1178.
6. С.Г. Дмитриенко, В.В. Апяри. Пенополиуретаны: Сорбционные свойства и применение в химическом анализе. – М.: Красанд, 2010. 264 с.
7. А.А. Чапленко, О.В. Моногарова, К.В. Осколок, С.А. Чапленко. Определение микроэлементов в витаминно-минеральных комплексах и лекарственном растительном сырье рентгенофлуоресцентным методом с использованием диазотированных пенополиуретановых сорбентов // Микроэлементы в медицине. 2016. № 1(17). С. 30–37.
8. К.В. Осколок, О.В. Моногарова, Е.Д. Девяткина. Прямое рентгенофлуоресцентное определение ртути на пенополиуретановом сорбенте // Вестник Московского университета. Серия 2, Химия. 2012. № 2(53). С. 115–118.

УДК 543.9;
615.072;
615.36

ВАЛИДАЦИЯ ТЕСТА «АНОМАЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ» ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ СУБСТАНЦИИ ИНСУЛИНА

В.М. Косман[1]*, К.Л. Крышень[2], А.А. Крышень[2], М.В. Гаврилин[3], О.Н. Пожарицкая[1], М.Н. Макарова[1]

1 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, 3, к. 245

2 – ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, 3, к. 245

3 – ООО «Завод «Медсинтез», 620014, Россия, г. Екатеринбург, ул. 8-е Марта, 90а

1 – St.-Petersburg Institute of Pharmacy, 3, Zavodskaya str., Kuzmolovo, Vsevoloski district, Leningrad region, 188663, Russia

2 – RMC «HOUSE OF PHARMACY», 3, Zavodskaya str., Kuzmolovo, Vsevoloski district, Leningrad region, 188663, Russia

3 – LLC «Zavod Medsintez», 90a, 8 Marta Str., Ekaterinburg, 620014, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: spbpharm@mail.ru
Тел.: 8 (812) 603 24 32

Резюме. Тест «Аномальная токсичность» является обязательным в Российской Федерации для стандартизации субстанций биологического происхождения, несмотря на неоднозначную оценку его целесообразности. Изучение аномальной токсичности субстанции инсулина по стандартной методике невозможно, поскольку его введение вызывает гибель животных в результате гипогликемического шока. Изменение фармакопейной методики определяет необходимость её последующей валидации. На примере субстанции человеческого генно-инженерного инсулина «Росинсулин» (ООО «Завод «Медсинтез») с использованием в качестве биологической тест-системы аутбредных мышей-самцов установлены оптимальные условия выполнения теста, включающие внутрибрюшинное введение раствора глюкозы за 60 мин до внутривенного введения инсулина. Оценено изменение показателей интоксикации, массы тела и уровня глюкозы в крови при выполнении теста для трех серий субстанции. Методика теста «Аномальная токсичность» валидирована по показателям «Робастность» (с оценкой влияния малых изменений объема вводимого раствора инсулина и времени между введением раствора глюкозы и инсулина) и «Прецизионность» (внутридневная и междневная). Получены удовлетворительные результаты по всем валидационным показателям.

Ключевые слова: тест «Аномальная токсичность», субстанция инсулина, стандартизация, валидация.

ABNORMAL TOXICITY TEST VALIDATION FOR INSULIN SUBSTANCE STANDARDISATION

V.M. Kosman[1]*, K.L. Kryshen[2], A.A. Kryshen[2], M.V. Gavrilin[3], O.N. Pozharitskaya[1], M.N. Makarova[2]

Abstract. Abnormal Toxicity test is obligatory in the Russian Federation for standardisation of biological origin substances, despite an ambiguous assessment of its expediency. Evaluation of abnormal toxicity of insulin by a standard technique is impossible because its introduction causes death of animals as a result of hypoglycemic shock. A change in pharmacopoeial technique defines need of its validation. On the example of substance of human genetically engineered insulin Rosinsulin (LLC «Zavod Medsintez») with mice males as biological test system the optimum conditions of the test were proposed. They include intraperitoneal introduction of glucose solution in 60 min, prior to intravenous administration of insulin. Indicators of intoxication, body weight and blood glucose level were monitored during the test for three bathes of insulin substance. Abnormal Toxicity test was validated on Robutness (with influence of small changes of volume of the entered solution of insulin and time between introduction of glucose and insulin solutions) and a Precision (intra-day and inter-day). Satisfactory results for all validation parameters were received.

Keywords: Abnormal Toxicity test, insulin substance, standardization, validation.

ВВЕДЕНИЕ

Валидация является неотъемлемой частью системы обеспечения качества. Прошедший валидацию процесс гарантирует, что все серии одного и того же продукта однородны и соответствуют требованиям действующей нормативной документации [1]. Валидация – документированное подтверждение соответствия оборудования, условий производства, технологического процесса, качества полупродукта и готового продукта действующим регламентам и/или требованиям нормативной документации [2].

Применение валидации выгодно производителям готовой продукции, так как позволяет не только предотвратить возникновение ошибок во время производственного цикла, но и обеспечить выпуск доброкачественных препаратов при снижении брака готовой продукции. Кроме того, хорошо разработанная и сосредоточенная на важнейших моментах производства валидация повышает воспроизводимость технологии и качество продукции [3].

Тест «Аномальная токсичность» является биологическим испытанием, применяемым в оценке качества фармацевтических субстанций [4]. Соответствующие разделы включены в большинство ведущих мировых фармакопей [5].

Основной целью проведения данного теста является выявление токсичности препарата, превышающей установленный ранее допустимый уровень, контролируемый по повышению летальности или по неожидаемым (нерегламентированным) явлениям интоксикации живот-

ных. Данное испытание позволяет определить аномальную (повышенную) токсичность лекарственного препарата, которая может возникнуть за счет появления продуктов разложения или нежелательных примесей при изменении процесса производства, не предусмотренных регламентом, транспортирования или хранения [6].

Испытанию на аномальную токсичность подлежат вещества природного происхождения, лекарственные средства, получаемые из крови, органов, тканей человека или животного, растительного сырья, микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности, при производстве из них готовых лекарственных форм, в основном для парентерального применения [6].

Примером подобных препаратов является субстанция инсулина, производство которой осуществляется биотехнологическим способом. Качество получаемой субстанции контролируют по ряду показателей, в том числе примесям родственных белков, примесям высокомолекулярных белков, проинсулиноподобной иммунореактивности, примесям ДНК штамма-продуцента, примесям иммунореактивных белков *Escherichia coli*, примесям одноцепочечного предшественника инсулина. Тем не менее не исключена возможность накопления в субстанции в процессе производства белков с высоким уровнем токсичности и неизвестной природой. Поэтому для подобных препаратов проводят испытание на аномальную токсичность.

Мнение о целесообразности данного теста весьма неоднозначно. В работе [5] проведен подробный анализ исторических и научных данных о проведении теста на аномальную токсичность. Авторы отмечают особенности проведения испытания, его неспецифичность, низкие воспроизводимость и надежность, отсутствие корреляции результатов теста с качеством продукции или загрязнением, непригодность теста для предусмотренного назначения. Поэтому они считают полное удаление этого испытания из фармакопей и других регуляторных требований, поддерживаемое рядом международных экспертов и реализованное в ряде частных монографий, включенных в зарубежные фармакопеи (прежде всего в Европейскую Фармакопею), обоснованным. Одним из доводов в пользу такой позиции является забота о благополучии животных, подкрепленная, например, инициативой 3Rs и другими современными директивами по защите животных [7, 8].

Авторы [9], напротив, считают, что тест на аномальную токсичность, разработанный на доклиническом этапе исследований, должен быть обязательным для серийно выпускаемых биотехнологических препаратов и биоаналогов.

В работе [10] отмечено, что при сохранении общемировой тенденции к исключению теста «Аномальная токсичность» из нормативных документов и оценке безопасности лекарственных средств с помощью альтернативных методов роль данного теста в России достаточно высока, особенно для субстанций биологического происхождения.

В Российской Федерации данный тест в настоящее время является обязательным для субстанций соответствующего типа (ОФС 1.2.4.0004.15 «Аномальная токсичность» [6]). Стандартная методика проведения исследования аномальной токсичности препаратов включает в себя парентеральное введение лекарственного средства пяти аутбредным мышам с последующим наблюдением за животными в течение 48 часов после введения препарата. Исследуемый препарат проходит испытание (отсутствует аномальная токсичность), если не зарегистрированы снижение массы тела, признаки интоксикации и гибель животных [6].

Оценка аномальной токсичности субстанции инсулина по стандартной методике невозможна, поскольку его введение вызывает гибель животных в результате гипогликемического шока. Поэтому необходимо изменение стандартной методики и разработка соответствующего раздела частной фармакопейной статьи. Внесение изменений в фармакопейную методику определяет необходимость её последующей валидации [6, 11].

Целью данного исследования являлась оптимизация и валидация методики оценки аномальной токсичности субстанции инсулина (производитель ООО «Завод «Медсинтез», Россия) при однократном внутривенном введении самцам аутбредных мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись опытно-промышленные образцы трех серий субстанции человеческого генно-инженерного инсулина «Росинсулин» (ООО «Завод «Медсинтез», Россия), соответствующие по качеству требованиям статьи «Human insulin» Европейской Фармакопеи (PhEu 8.0) [12].

В качестве тест-системы использованы аутбредные мыши-самцы массой 19–21 г [6] (ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»), которых содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях [7], на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92 [2]). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам надлежащей лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014) и одобрены на заседании биоэтической комиссии ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ».

В экспериментах использовали внутривенный способ введения тестируемых препаратов в хвостовую вену животных. Для проведения исследования использовали дозу 12 МЕ/кг, рассчитанную с учетом метаболических коэффициентов на основании инди-

видуальной суточной потребности в инсулине (согласно инструкции по применению препарата). Растворы тестируемых субстанций (с концентрацией 2,4 МЕ/мл, 1 МЕ соответствует 0,0347 мг) готовили непосредственно в день введения. В качестве растворителя использовали 0,9% раствор натрия хлорида для инъекций («Б. Браун Мельзунген АГ», Германия), подкисленный 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты (ООО «Экохим», Россия) до pH 2,5-3,5. Объем введения составлял 100 мкл / мышь массой 20 г. Методика подготовки тестируемых субстанций, выбор доз и объема введения отработан нами в ходе предварительных экспериментов.

Перед введением инсулина животным вводили раствор глюкозы [глюкоза (декстроза), раствор для инфузий 5%, ООО «Завод «Медсинтез», Россия] внутрибрюшинно в объеме 1 мл на животное.

У животных регистрировали следующие показатели:

- массу тела до введения глюкозы, через 24 и 48 часов после введения;
- уровень глюкозы в крови и признаки интоксикации до введения глюкозы, перед введением тестируемого препарата, через 60 минут после введения тестируемого препарата, через 24 часа и 48 часов после введения тестируемого препарата.

Животных лишали корма за 4 часа до начала манипуляций, доступ к воде при этом не был ограничен. Животные были обеспечены кормом через час после последнего измерения глюкозы в крови.

Массу тела экспериментальных животных регистрировали на электронных весах Vibra AJ-1200CE (Япония), анализ уровня глюкозы в крови был проведен с помощью глюкометра One Touch® Horizon™ (США).

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения. Были рассчитаны среднее значение ($\bar{X}$), стандартная ошибка среднего (SE), стандартные отклонения (SD) и относительные стандартные отклонения (RSD, %), межгрупповые различия были проанализированы параметрическими методами, различия определены при уровне значимости $p \leq 0,05$.

В план валидации метода включена его оценка по валидационным показателям прецизионность и прочность. В экспериментах по оценке прочности метода варьировали объем вводимого препарата и время между введением раствора глюкозы и инсулина. Прецизионность на уровне сходимости (повторяемости) оценена по результатам трех серий экспериментов, выполненных в один день, – внутридневная прецизионность, и по результатам трех серий экспериментов, выполненных в три разных дня, – междневная прецизионность. Внутридневная прецизионность (intra-day precision) и междневная прецизионность (inter-day precision) не должны превышать 15% (RSD) [13, 14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальное исследование включало три этапа:

- отработку теста с варьированием временного интервала между введением растворов глюкозы и инсулина;
- анализ трех серий (согласно ОСТ 91500.05.001-00 [15]) субстанции в оптимальных условиях;
- выполнение валидационных процедур.

Кроме регистрации изменения массы тела, интоксикации и гибели животных при выполнении теста «Аномальная токсичность», для субстанции инсулина целесообразным является анализ уровня глюкозы в крови. С одной стороны, этот показатель является маркером развития гипогликемии, характерной для биологического действия инсулина. С другой стороны, введение данного показателя решает одну из важных проблем оценки результатов теста. Одной из особенностей теста «Аномальная токсичность» является отсутствие каких-либо количественных критериев и/или показателей, получаемых при его выполнении. Гибель животных, как основной критерий теста, является оценкой в бинарной системе «да»/«нет». Такая оценка трудно поддается статистической обработке и недостаточна для определения валидационных параметров методик. Введение количественной характеристики – в данном случае оценки уровня глюкозы в крови – создает предпосылки для более корректной оценки результатов.

Для предотвращения гипогликемического шока инсулин следует вводить мышам внутривенно через определенное время после внутрибрюшинного введения раствора глюкозы. В задачу первого этапа исследования входила отработка теста для субстанции инсулина, включавшая выбор оптимального временного интервала между введениями (15 мин, 30 мин, 60 мин).

Первые симптомы токсического влияния исследуемого препарата были зарегистрированы через 60 мин после внутривенного введения раствора тестируемого препарата в дозе 12 МЕ/кг в объеме 100 мкл/мышь. У экспериментальных животных наблюдали угнетение поведения, снижение реакции на раздражители, повышение тонуса мускулатуры, одышки, вынужденное положение тела в пространстве – лежа на брюхе либо на боку. Через 24 часа после внутривенной инъекции раствора тестируемого препарата признаки интоксикации проходили. Животные были в удовлетворительном состоянии. Гибель животных вследствие гипогликемического шока была зарегистрирована в контрольных группах самцов, которые не получали внутрибрюшинную инъекцию раствора глюкозы перед внутривенным введением инсулина. Аналогичную картину интоксикации наблюдали и на последующих этапах исследования.

Массу тела экспериментальных животных регистрировали непосредственно перед введением тестируемого препарата, далее через 24 часа и 48 часов. До начала исследования масса тела между экспериментальными группами не различалась. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) не выявил статистически значимых отличий между группами, получившими инъекцию «Росинсулина» с разными временными интервалами после введения глюкозы.

Уровень глюкозы в крови экспериментальных животных измеряли натощак перед внутрибрюшинным введением раствора глюкозы, непосредственно перед внутривенной инъекцией «Росинсулина» (через 15, 30 и 60 мин), далее через 60 мин после введения тестируемого объекта, и через 24 часа и 48 часов (таблица 1).

До начала исследования уровень глюкозы между группами не отличался (ANOVA, $p>0,05$). Динамика уровня глюкозы также не отличалась между группами в регистрируемых временных промежутках.

Поскольку достоверной разницы между временем введения «Росинсулина» и уровнем глюкозы в крови обнаружено не было, для проведения следующих этапов эксперимента был выбран интервал 60 мин после внутрибрюшинного введения раствора глюкозы.

Результаты теста для трех серий субстанции «Росинсулина», полученные при выполнении второго экспериментального этапа, схожи с данными, приведенными выше. Через 60 мин после инъекции инсулина наблюдали проявление признаков интоксикации (с близкой степенью выраженности), исчезавших к 24 часам после введения тестируемого препарата. Динамика массы тела экспериментальных животных в группах, получивших глюкозу, сохраняла положительную динамику в период наблюдения; статистических отличий по массе между группами, получившими инъекцию трех серий «Росинсулина», и контрольной группой не было зарегистрировано. Уровень и динамика уровня глюкозы между группами, получившими глюкозу внутрибрюшинно, в регистрируемых временных промежутках не отличалась. Таким образом, уровень глюкозы при введении трех различных серий раствора субстанции «Росинсулина» не отличался между группами.

На третьем этапе был выполнен ряд валидационных испытаний. Процесс валидации является обязательным в практике качественного производства медицинской продукции и является важной частью системы обеспечения и контроля качества. Валидация метода оценки аномальной токсичности выполнена в соответствии с рекомендациями [11]. Основными валидационными параметрами методики являются специфичность, линейность, прецизионность, точность и робастность [11]. Следует подчеркнуть, что полная валидация обсуждаемой методики в соответствии с привычной схемой и пониманием, применяемым к химическим и/или физико-химическим и даже биологическим методикам, используемым в стандартизации лекарственных препаратов, в данном случае неприменима. Неизвестны конкретные токсины, вызывающие положительный результат теста «Аномальная токсичность», поэтому затруднительно оценить специфичность методики. Специфичность может быть рассмотрена только в таком аспекте: есть токсины – есть гибель животных – результат теста положительный; нет токсинов – нет гибели животных – результат отрицательный. По отношению к присутствию токсинов методика специфична, по отношению к их природе – нет, что и вызывает дискуссию относительно целесообразности самого теста [5]. Отсутствие конкретного аналита, аналитического отклика или сигнала (площади хроматографического пика, значения оптической плотности, объема титранта, какого-либо вида биологической активности или эффекта или

Таблица 1.

Уровнень глюкозы при отработке теста «Аномальная токсичность» на одной серии субстанции «Росинсулина», $\bar{X}$±SE

№ группы	Описание группы	Уровень глюкозы, моль/л				
		исходный	после введения глюкозы	через 60 мин после введения «Росинсулина»	через 24 часа после введения «Росинсулина»	через 48 часов после введения «Росинсулина»
1	без глюкозы, «Росинсулин»	7,7 ± 0,28 n=5	–	2,5 ± 0,16 n=5	9,7* n=1	–
2	глюкоза, «Росинсулин» через 15 минут	7,8 ± 0,24 n=5	9,4 ± 0,28 n=5	2,7 ± 0,17 n=5	7,5 ± 0,35 n=5	7,8 ± 0,16 n=5
3	глюкоза, «Росинсулин» через 30 минут	7,9 ± 0,21 n=5	9,9 ± 0,17 n=5	2,7 ± 0,17 n=5	8,2 ± 0,25 n=5	8,1 ± 0,19 n=5
4	глюкоза, «Росинсулин» через 60 минут	7,8 ± 0,26 n=5	10,5 ± 0,44 n=5	2,9 ± 0,19 n=5	8,4 ± 0,30 n=5	7,8 ± 0,17 n=5

Примечание: * – статистическую обработку данных этой группы не проводили в связи с гибелью четырех животных из пяти.

иного специфичного количественного параметра) не позволяет оценить линейность отклика в зависимости от концентрации аналита (с получением соответствующего уравнения регрессии и его параметров), а также точность методики. Поэтому в качестве параметров валидации метода были выбраны только два критерия, которые могут быть применены к рассматриваемому тесту, – прецизионность и робастность. Данный подход, с нашей точки зрения, позволяет удовлетворить требованию о необходимости валидации методики, отличающейся от приводимой в ГФ [6, 11]. При обсуждении результатов наибольшее значение имеют данные по содержанию уровня глюкозы в крови, как основной (хотя и косвенный) количественный показатель, оцениваемый в ходе выполнения теста.

Оценка робастности была проведена по двум параметрам: влиянию объема раствора «Росинсулина» для внутривенного введения (в диапазоне 90, 100 и 110% от номинального или 90, 100 и 110 мкл/мышь) и влиянию времени между введением раствора глюкозы и «Росинсулина» (в диапазоне 90, 100 и 110% от номинального или 54, 60 и 66 мин после введения раствора глюкозы).

Результаты, полученные при оценке влияния объема раствора «Росинсулина» для внутривенного введения на уровень глюкозы в крови животных, представлены в таблице 2.

Для каждого из объемов введения на каждой контрольной точке, а также при усреднении всех данных по каждой контрольной точке относительные стандартные отклонения полученных значений уровня глюкозы в крови животных не превышали 15%. Таким образом, варьирование объема раствора «Росинсулина» для внутривенного введения в интервале 90–110% от номинального не оказало значимого влияния на результаты теста.

Данные, полученные при оценке влияния времени между введением раствора глюкозы и инсулина на уровень глюкозы в крови животных при проведении теста «Аномальная токсичность», представлены в таблице 3.

Для каждого из интервалов между введениями на каждой контрольной точке, а также при усреднении всех данных по каждой контрольной точке относительные стандартные отклонения полученных значений уровня глюкозы в крови животных не превышали 15%. Таким образом, варьирование времени между введением раствора глюкозы и «Росинсулина» в интервале 90–110% от номинального не оказывает значимого влияния на результаты теста «Аномальная токсичность».

Прецизионность была оценена по результатам трех серий эксперимента, выполненных в один день, – внутридневная прецизионность (intra-day precision) и по результатам трех серий эксперимента, выполненных в три разных дня, – междневная прецизионность (inter-day precision). Мерой прецизионности является величина относительного стандартного отклонения (RSD,%), полученная при усреднении результатов измерений. Данные по уровню глюкозы в крови, полученные при оценке прецизионности, представлены в таблице 4.

Таблица 2.

Оценка влияния объема раствора «Росинсулина» для внутривенного введения в тесте «Аномальная токсичность»

Объем введения, % от номинального	Параметр	Время измерения				
		Исходная	После введения раствора глюкозы	Через 60 мин после введения «Росинсулина»	Через 24 часа после введения «Росинсулина»	Через 48 часов после введения «Росинсулина»
90	$\bar{X}$±SD	7,5±0,8	10,6±0,5	2,4±0,3	7,5±1,1	7,8±0,8
	RSD, %	10,6	4,6	13,5	14,7	10,4
100	$\bar{X}$±SD	7,9±1,1	10,0±0,5	2,4±0,2	8,4±0,6	8,8±0,6
	RSD, %	13,9	5,4	9,0	7,4	6,3
110	$\bar{X}$±SD	7,1±0,7	10,2±0,7	2,9±0,3	7,1±0,6	7,1±0,7
	RSD, %	10,5	6,4	8,8	8,3	9,3
Все группы	$\bar{X}$±SD	7,5±0,9	10,3±0,6	2,6±0,3	7,7±0,9	7,9±1,0
	RSD, %	12,1	5,8	13,3	12,0	12,2

Таблица 3.

Оценка влияния времени между введением раствора глюкозы и «Росинсулина» в тесте «Аномальная токсичность»

Время между введением раствора глюкозы и инсулина, % от номинального	Параметр	Время измерения				
		Исходная	После введения раствора глюкозы	Через 60 мин после введения «Росинсулина»	Через 24 часа после введения «Росинсулина»	Через 48 часов после введения «Росинсулина»
90	$\bar{X}$±SD	7,5±0,9	10,0±1,0	2,5±0,3	6,8±0,9	7,0±0,5
	RSD, %	11,8	9,9	13,8	12,9	7,7
100	$\bar{X}$±SD	7,8±0,8	9,9±1,2	2,7±0,4	8,2±1,0	7,9±0,8
	RSD, %	10,3	12,5	14,3	11,5	10,1
110	$\bar{X}$±SD	7,2±0,7	10,1±0,8	2,6±0,4	8,1±0,6	7,6±0,7
	RSD, %	9,8	7,8	14,6	7,6	8,9
Все группы	$\bar{X}$±SD	7,5±0,8	10,0±1,0	2,6±0,4	7,7±1,0	7,5±0,7
	RSD, %	10,5	9,5	13,8	13,0	10,0

Таблица 4.

Уровень глюкозы в крови аутбредных мышей при оценке прецизионности в тесте «Аномальная токсичность»

День/серия эксперимента	Параметр	Время измерения				
		Исходная	После введения раствора глюкозы	Через 60 мин после введения «Росинсулина»	Через 24 часа после введения «Росинсулина»	Через 48 часов после введения «Росинсулина»
День 1 (утро)	$\bar{X}$±SD	7,4±0,9	10,2±0,6	2,6±0,4	8,5±1,0	8,3±0,7
	RSD, %	12,7	5,6	14,6	11,4	8,2
День 1 (день)	$\bar{X}$±SD	7,4±0,6	10,5±1,2	2,8±0,4	6,4±0,6	6,8±0,8
	RSD, %	8,5	11,2	14,6	6,0	11,3
День 1 (вечер)	$\bar{X}$±SD	8,3±0,3	10,4±0,9	2,7±0,4	7,9±0,5	6,4±0,4
	RSD, %	4,0	8,9	13,9	6,5	5,6
Внутридневная прецизионность, RSD, %		10,2	8,4	13,5	14,6	14,3
День 2 (утро)	$\bar{X}$±SD	7,6±0,7	10,2±1,1	2,6±0,4	8,2±1,1	7,8±1,0
	RSD, %	8,5	11,0	14,4	13,5	13,2
День 3 (утро)	$\bar{X}$±SD	7,5±0,8	10,4±0,8	2,5±0,4	6,9±0,7	7,2±0,4
	RSD, %	10,3	7,4	14,7	10,7	6,1
Междневная прецизионность, RSD, %		9,6	8,4	13,7	14,3	12,9

Внутридневная прецизионность (intra-day precision) на каждой контрольной точке варьировала в диапазоне 8,4–14,6% и не превышала 15%. Междневная прецизионность (inter-day precision) варьировала в пределах 8,4–14,3% и также не превышала уровня 15%, регламентируемого [13, 14].

По результатам данного этапа методика была валидирована по показателям «Робастность» (с оценкой влияния малых изменений объема вводимого раствора инсулина и времени между введением раствора глюкозы и инсулина) и «Прецизионность» (внутридневная и междневная). Получены удовлетворительные результаты по всем валидационным показателям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тест «Аномальная токсичность» является обязательным в Российской Федерации для стандартизации определенного типа субстанций (преимущественно биологического происхождения). Изучение аномальной токсичности субстанции инсулина по стандартной методике невозможно, поскольку его введение вызывает гибель животных в результате гипогликемического шока. Изменение фармакопейной методики определяет необходимость её последующей валидации.

На примере субстанции человеческого генно-инженерного инсулина «Росинсулин» (ООО «Завод «Медсинтез») с использованием в качестве биологической тест-системы аутбредных мышей-самцов установлены оптимальные условия выполнения теста, включающие внутрибрюшинное введение раствора глюкозы за 60 мин до внутривенного введения инсулина.

Оценено изменение показателей интоксикации, массы тела и уровня глюкозы в крови при выполнении теста для трех серий субстанции.

Методика теста «Аномальная токсичность» валидирована по показателям «Робастность» (с оценкой влияния малых изменений объема вводимого раствора инсулина и времени между введением раствора глюкозы и инсулина) и «Прецизионность» (внутридневная и междневная). Получены удовлетворительные результаты по всем валидационным показателям.

ЛИТЕРАТУРА

1. С.В. Шилова. Валидация процессов производства лекарственных средств // Медицинский бизнес. 2000. № 2. С. 18–20.
2. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств Good Manufacturing Practice for medicinal products (GMP).
3. В.Г. Макаров, Л.И. Соколова, О.Н. Пожарицкая, А.Н. Шиков. Эликсиры «Демидовский» и «Алтайский»: Ретроспективная валидация // Фармация, 2001. № 2. С. 18-21.
4. Е.Л. Ковалева, В.Л. Багирова, К.С. Шахназаров. Совершенствование методологических подходов к стандартизации субстанций // ХФЖ. 2010. Т. 44. № 1. С. 35–42.
5. Й.Х.О. Гарбе, С. Озборн, К. Беггс, М. Бопст, А. Йос, А.А. Киташова, О.М. Ковбасенко, К.-Д. Шиллер, М. Швингер, Н.Ю. Семенова, Л.А. Смирнова, Ф. Стодарт, Т. Визалли, Л. Вроманс. Исключение теста на аномальную токсичность как теста контроля качества: исторический анализ данных и научные знания // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 2(11). С. 184–192.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации, изд. 13-е, URL: http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856 (дата обращения 02.02.2016).
7. Directive 2010/63/EU of 22/09/2010 Guide for the care and use of laboratory animals 8th edition. National Academy of Sciences. Washington, D.C. 2010.
8. R. Isbrucker, R. Levis, W. Casey, R. McFarland, M. Schmitt, J. Arciniega, J. Descamps, T. Finn, C. Hendriksen, Y. Horiuchi, J. Keller, J. Kojima, D. Sesardic, P. Stickings, N.W. Johnson, D. Allen. Alternative methods and strategies to reduce, refine, and replace animal use for human vaccine post-licensing safety testing: state of the science and future directions // Procedia in Vaccinology. 2011. V. 5. P. 47–59.
9. Н.П. Неугодова, Г.В. Долгова, А.В. Гавриков. Некоторые вопросы оценки токсичности генно-инженерных лекарственных препаратов // Биомедицина. 2011. № 3, С. 98–100.
10. М.С. Рябцева, Т.А. Батуашвили, Г.А. Сапожникова, Н.П. Неугодова, Ю.В. Олефир, В.А. Меркулов. История развития и современное состояние биологических тестов в России // Ведомости НЦЭСМП. 2016. № 1. С. 11–14.
11. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. – М., Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации. 2007. 49 с.
12. Human insulin. European pharmacopoeia. 8th edition // European Pharmacopoeia Commission, Council of Europe. Strasbourg: EDQM, 2014. P. 2491.
13. ICH, Q2A, Harmonized tripartite guideline, text on validation of analytical procedures, IFPMA, in: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1994, pp. 1–5.
14. ICH, Q2B, Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedure: methodology, IFPMA, in: Proceedings of the International Conference on Harmonization, Geneva, March 1996, pp. 1–8.
15. ОСТ 91500.05.001-00 Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. М., 2000. 54 с

12-14 ОКТЯБРЯ 2016

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
КОНГРЕССНО-ВЫСТАВОЧНЫЙ ЦЕНТР
ЭКСПОФОРУМ

Петербургский международный ФОРУМ ЗДОРОВЬЯ ПМФЗ

ПЕТЕРБУРГСКИЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ ЗДОРОВЬЯ

ЖДЁМ ВАС НА СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ВЫСТАВКАХ

МЕДИЗ Санкт-Петербург. МЕДИЦИНА И ЗДОРОВЬЕ
Международная выставка медицинской техники, оборудования, услуг и технологий для больниц, поликлиник, лабораторий и частных клиник
mediz-spb.ru

БИОИНДУСТРИЯ
Выставка-конференция биотехнологических решений для медицинской и фармакологической отраслей
bio.expoforum.ru

ФАРМАЦИЯ
Международная выставка лекарственных препаратов, пищевых и биологически активных добавок
pharmaexpo.ru

HEALTH&MEDICAL TOURISM
Международная выставка услуг в сфере медицинского и оздоровительного туризма
healthtourism-expo.ru

ЭСТЕТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА
Международная выставка косметических средств, препаратов, расходных материалов, инструментов и оборудования для эстетической медицины и косметологии
aestheticmed.ru

ОРГАНИЗАТОРЫ :
EXPOFORUM · Messe Düsseldorf Moscow · primexpo · ITE

www.pmfz.expoforum.ru
+7 (812) 240 40 40
0+

УДК
615.453.6.322.074;
543.422.3

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИОННАЯ ОЦЕНКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТАБЛЕТКАХ НООТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ

Н.Н. Крылов[1]*, Е. В. Компанцева[1]

1 – Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, 357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

1 – Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of SEI HPE Volgograd State Medical University, Russian Ministry of Health, 11, Kalinina av., Pyatigorsk, 357532, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: n.n.krylov@mail.ru
Тел.: 8 (961) 477 72 71

Резюме. Представлены результаты разработки методики определения суммы флавоноидов в таблетках, содержащих сухие экстракты гинкго двулопастного и лабазника вязолистного, методом дифференциальной спектрофотометрии. Предварительно определено содержание суммы флавоноидов в листьях гинкго двулопастного и траве лабазника вязолистного, представленных ООО «Витаукт-пром». Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в сухих экстрактах из данного сырья и таблетках «Гинкготропил-форте». Обоснована норма содержания суммы флавоноидов в таблетках «Гинкготропил-форте» не менее 6 мг в пересчете на среднюю массу таблетки. Проведенная валидационная оценка показала, что предлагаемая методика валидна по показателям: специфичность, линейность, прецизионность и правильность.

Ключевые слова: таблетки, флавоноиды, гинкго двулопастный, лабазник вязолистный, валидация, дифференциальная спектрофотометрия.

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION OF TOTAL FLAVONOIDS ASSAY IN TABLETS WITH NOOTROPIC ACTION

N.N. Krylov[1]*, E.V. Kompantseva[1]

Abstract. Results of development of differential spectrophotometry method for determination of the total flavonoids assay in tablets containing dry extracts of ginkgo biloba are presented. Total flavonoid assay in leaves of ginkgo biloba and grass meadowsweet is preliminary presented by LLC «Vitaukt-Prom». The assay method for the sum of flavonoids in the dry extracts from this raw material and tablets «Ginkgotropil-forte» is developed. Justification of limit of flavonoid content in tablets «Ginkgotropil-forte» is presented and the limit is not less than 6 mg, based on the average weight of the tablet. The proposed method was validated for specificity, linearity, precision and accuracy.

Keywords: tablets, flavonoids, ginkgo biloba, meadowsweet, validation, differential spectrophotometry.

ВВЕДЕНИЕ

Предприятие ООО «Витаукт-пром» выпускает биологически активную добавку к пище (БАД) «Гинкготропил», в состав которой входят микронизированные порошки листьев гинкго двулопастного, травы лабазника вязолистного, комплексный экстракт этих растений, а также глицин и кислота янтарная [1]. В результате применения БАД встал вопрос о разработке более эффективного ноотропного лекарственного препарата. Нами был предложен лекарственный препарат «Гинкготропил-форте», таблетки сублингвальные [2, 3], в состав которого входят сухие экстракты листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного, а также субстанции глицина и кислоты янтарной. При разработке НД на лекарственный препарат необходимо решать вопрос, связанный с обоснованием методик анализа и норм его качества. В литературе и нормативной документации не найдены методики анализа биологически активных веществ (БАВ) гинкго двулопастного и лабазника вязолистного при совместном присутствии [2].

В соответствии с ФС на листья гинкго двулопастного и сухой экстракт из них, включенными в Британскую и Европейскую фармакопеи, фармакопеи Республики Беларусь и США, сумму флавоноидов определяют методом ВЭЖХ в пересчете на СО кверцетина после кислотного гидролиза [4-7]. Однако согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIII издания (2015 г.) и ФСП 42-7870-06 («Сухой экстракт из листьев гинкго двулопастного») стандартизацию листьев гинкго двулопастного и соответственно сухого экстракта проводят по содержанию суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии по реакции образования комплексного соединения с алюминия хлоридом в пересчете на СО рутина [8, 9]. В работе Д.Г. Буланкина по стандартизации и разработке лекарственных средств на основе листьев гинкго двулопастного также приводится аналогичная методика [10].

В Британскую, Европейскую фармакопеи и ГФ Республики Беларусь включены ФС на траву лабазника вязолистного, в которых стандартизация данного сырья проводится методом перегонки по содержанию эфирного масла, которого должно быть в сырье не менее 1 мл/кг. В Европейскую фармакопею и ГФ Республики Беларусь включены ФС и на цветки лабазника вязолистного, стандартизация которых, так же как и в ВФС 42-1777-87 «Цветки лабазника вязолистного», ведется по сумме флавоноидов в пересчете на спиреозид методом дифференциальной спектрофотометрии [4–7, 11].

И.В. Шиловой проведена работа по стандартизации травы лабазника вязолистного и сухого экстракта на его основе, ею предложена методика определения основных БАВ – флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии по реакции образования комплексного соединения с алюминия хлоридом после кислотного гидролиза, где расчет содержания ведется в пересчете на кверцетин [12], однако данная методика требует длительной пробоподготовки сырья перед анализом.

Таким образом, в нормативных документах РФ и литературе имеются данные о возможности определения суммы флавоноидов как в сырье, так и в экстракте листьев гинкго двулопастного методом дифференциальной спектрофотометрии, а также в цветках лабазника вязолистного – без предварительного кислотного гидролиза. В связи с этим представляет интерес изучение возможности определения суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии без предварительного кислотного гидролиза в траве лабазника вязолистного, а также в сухих экстрактах листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного, полученных нами. Известно, что спиреозид (основной флавоноид лабазника вязолистного), как и рутин, является О-гликозидом кверцетина, отличается положением сахарной части в молекуле флавоноида и ее строением. В связи с этим спиртовые растворы как рутина, так и спиреозида имеют почти одинаковые максимумы светопоглощения [13]. Это может послужить основанием для определения суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на рутин в названных экстрактах при их совместном присутствии.

Целью настоящего исследования является разработка методики определения суммы флавоноидов в таблетках, содержащих сухие экстракты гинкго двулопастного и лабазника вязолистного, методом дифференциальной спектрофотометрии и ее валидация.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования использовали СО рутина (рутина гидрат, субстанция-порошок, содержание рутина 95%, Sigma-Aldrich, США, серия MKBR4390R, годен до 10.18), образцы сырья: измельчённые сухие листья гинкго двулопастного и трава лабазника вязолистного, предоставленные предприятием ООО «Витаукт-пром», а также сухие экстракты из данного сырья, полученные на кафедре технологии лекарств, образцы таблеток разрабатываемого препарата ноотропного действия «Гинкготропил-форте» (экспериментальная серия от 27.11.14) [2].

Работа проводилась с использованием спектрофотометра СФ-104 (ЗАО «Аквилон», Россия), СФ-2000 (ОКБ «Спектр», Россия).

Для определения суммы флавоноидов в листьях гинкго двулопастного и траве лабазника вязолистного использовали методику ФС.2.5.0010.15 «Гинкго двулопастного листья». Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, приливали 30 мл спирта 70% и взвешивали с точностью до ±0,01 г. Колбу с содержимым присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры колбу взвешивали, доводили ее содержимое спиртом 70% до первоначальной массы, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр «красная лента» (раствор А испытуемого раствора).

1 мл раствора А испытуемого раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2% и 1 каплю уксусной кислоты разбавленной 30%, доводили объем раствора спиртом 96% до метки и перемешивали (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряли через 40 мин на спектрофотометре при длине волны 406 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл раствора А испытуемого раствора, 1 капли уксусной кислоты разбавленной 30%, доведенный спиртом 96% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора СО рутина, приготовленного аналогично испытуемому раствору (с 1 мл 0,05% раствора СО рутина). В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл 0,05% раствора СО рутина, 1 капли уксусной кислоты разбавленной 30%, доведенный спиртом 96% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье (или сухом экстракте) в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{Ax \cdot a_0 \cdot 1 \cdot W_x \cdot 25 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot W_{ст} \cdot 25 \cdot a \cdot 1 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{Ax \cdot a_0 \cdot W_x \cdot P \cdot 100}{A_0 \cdot W_{ст} \cdot a \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

где Ax – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора СО рутина;

a – навеска сырья/экстракта, г; a_0 – навеска СО рутина, г; P – содержание основного вещества в СО рутина, %; W – влажность сырья(экстракта), %; W_x, $W_{ст}$ – объем приготовленного извлечения и исходного раствора СО рутина, мл.

Методика определения суммы флавоноидов в сухих экстрактах из листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного. Около 0,1 г (точная навеска) сухого экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливали 15 мл спирта 70%. Колбу с содержимым нагревали на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы доводили спиртом 70% до метки, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр «красная лента» (раствор А испытуемого раствора). Далее поступали как описано в методике выше. Содержание в процентах суммы флавоноидов в экстракте в пересчете на рутин (X) вычисляли по формуле 1.

Методика определения суммы флавоноидов в таблетках. Около 0,5 г (точная навеска) измельченной массы растертых таблеток помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливали 15 мл спирта 70%. Колбу с содержимым нагревали на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы доводили спиртом 70% до метки, перемешивали и фильтровали через бумажный фильтр «красная лента» (раствор А испытуемого раствора). Далее поступали как описано в методике выше.

Содержание в граммах суммы флавоноидов в пересчете на рутин (X) вычисляли по формуле 2:

$$X = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 25 \cdot P}{A_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot a_x \cdot 1} = \frac{A_x \cdot a_0 \cdot P}{A_0 \cdot 2 \cdot a_x}, \quad (2)$$

где A_x; A_0; a_0 – см. обозначения в вышеприведенной формуле; a_x – навеска массы растертых таблеток, г; P – средняя масса таблеток, г.

Приготовление модельной смеси таблеток

Приготавливали 10 г модельной смеси таблеток, используя точные навески в пересчете на состав таблеток: сухой экстракт листьев гинкго двулопастного и сухой экстракт травы лабазника вязолистного – по 0,0300 г, глицин – 0,1000 г, кислота янтарная – 0,0200 г, вспомогательные компоненты (аспасвит, полипласдон XL 10, кальция стеарат, коллидон-90) – 0,0300 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительно нами были проанализированы извлечения из листьев гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного по методике, описанной выше. В соответствии с предложенной методикой измерены спектры поглощения извлечений и СО рутина с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида (рисунок 1).

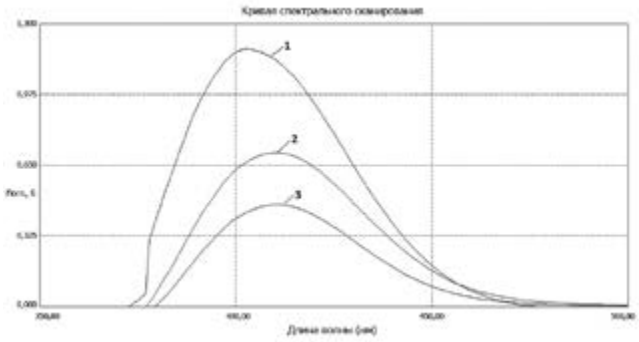


Рисунок 1. Спектры поглощения извлечения из листьев гинкго двулопастного (1), травы лабазника вязолистного (2) и раствора СО рутина (3) с алюминия хлоридом

Из приведенных данных (рисунок 1) следует, что максимум спектра поглощения извлечения листьев гинкго двулопастного находится при длине волны 406 нм, в то время как максимумы спектров поглощения раствора СО рутина и извлечения травы лабазника вязолистного находятся при длине волны 410 нм. Очевидно, что данную методику можно использовать для определения суммы флавоноидов травы лабазника вязолистного в пересчете на рутин. По данной методике нами было проанализировано сырье разного года сбора, статистически обработанные результаты количественного определения представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты количественного определения суммы флавоноидов: сырье разного года сбора (n=6)

Наименование сырья	Найдено суммы флавоноидов, год сбора		
	2012	2013	2014
Листья гинкго двулопастного	3,76±0,06	3,40±0,06	3,02±0,08
Трава лабазника вязолистного	2,42±0,07	2,32±0,12	2,53±0,09

Согласно ФС.2.5.0010.15 в листьях гинкго двулопастного содержание суммы флавоноидов должно быть не менее 0,5%, то есть используемое сырье независимо от времени сбора удовлетворяет требованиям настоящей ФС (таблица 1).

В соответствии с используемой методикой нами были проанализированы сухие экстракты, которые были получены на кафедре технологии лекарств из сырья, предоставленного ООО «Витаукт-пром», методом реперколяции спиртом этиловым 70% с последующей

сушкой под вакуумом при температуре 50 °С [2, 3]. Данные экстракты являются суммарными извлечениями, основными БАВ являются флавоноиды. В связи с тем, что по данной технологии экстракты получены впервые, представляет интерес задача определения содержания в них суммы флавоноидов и установления предварительных норм качества. Спектры поглощения растворов сухих экстрактов, полученных по методике, описанной выше, а также смеси экстрактов в соотношении 1:1 представлены на рисунке 2.

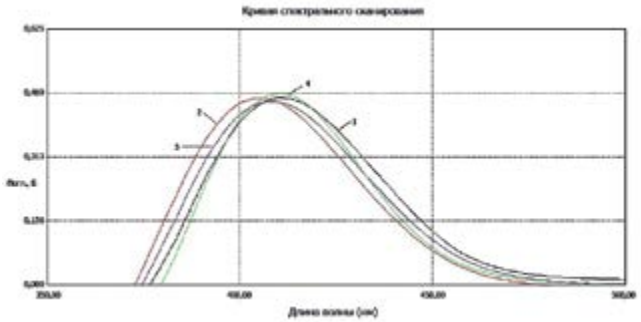


Рисунок 2. Спектры поглощения сухого экстракта листьев гинкго двулопастного (1), сухого экстракта травы лабазника вязолистного (2), смесь сухих экстрактов 1:1 (3) и раствора СО рутина (4) с алюминия хлоридом

Из приведенных данных следует, что спектры поглощения сухих экстрактов аналогичны спектрам извлечений из сырья, а максимум спектра поглощения смеси сухих экстрактов соответствует 408 нм, что еще раз может свидетельствовать о пригодности данной методики для анализа суммы флавоноидов в экстрактах гинкго двулопастного и травы лабазника вязолистного при совместном присутствии. Предварительно нами были подобраны оптимальные условия извлечения суммы флавоноидов из экстрактов. Оценку проводили по параметру влияния времени экстракции при нагревании и перемешивании: исходя из полученных данных, оптимальным, на наш взгляд, является экстракция при нагревании в течение 5 мин на водяной бане.

Статистически обработанные результаты шести параллельных определений содержания суммы флавоноидов в сухих экстрактах, полученных на кафедре технологии лекарств из данного сырья, представлены в таблице 2.

Из представленных результатов (таблица 2) можно предложить следующие нормы качества полученных сухих экстрактов: содержание суммы флавоноидов – не менее 11%. Очевидно, что для таблеток «Гинкготропил-форте», в которых сухие экстракты содержатся в количестве по 0,03 г [2], содержание суммы флавоноидов должно быть не менее 0,066 г в пересчете на среднюю массу таблетки.

Таблица 2.

Результаты определения суммы флавоноидов в сухих экстрактах

	Найдено суммы флавоноидов, год производства		
	2012	2013	2014
Сухой экстракт из листьев гинкго двулопастного	12,74±0,13	12,34±0,12	11,92±0,08
Сухой экстракт из травы лабазника вязолистного	12,18±0,08	11,58±0,07	11,95±0,10

Полученные оптимальные условия извлечения суммы флавоноидов из сухих экстрактов были использованы нами и для их извлечения из разработанных таблеток.

Следующим этапом исследования было проведение валидационной оценки разработанной методики по показателям: специфичность, линейность, прецизионность и правильность [14, 15].

Для валидируемой методики количественного определения должно быть экспериментально подтверждено, что присутствие сопутствующих компонентов не влияет непредусмотренным образом на результат анализа [14]. Оценку специфичности валидируемой методики проводили путем анализа модельных смесей таблеток известного состава. Предварительно был измерен спектр поглощения извлечения из таблеток, приготовленных без смеси сухих экстрактов, при этом наблюдалось отсутствие полосы поглощения в области от 400 до 450 нм, то есть вспомогательные вещества, а также глицин и кислота янтарная не мешают определению суммы флавоноидов.

Модельная смесь таблеток проанализирована по методике, описанной выше. Исходя из содержания суммы флавоноидов конкретных экстрактов (см. таблицу 3, 2014 г.), содержание суммы флавоноидов в модельной смеси должно быть в пределах 0,0072 г. Статистически обработанные результаты шести параллельных определений представлены в таблице 3.

Линейность методики определяли по итогам анализа серии растворов из таблеток «Гинкготропил-форте». Для этого готовили растворы по методике, указанной выше, и на анализ отмеривали 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 и 1,5 мл испытуемого раствора А. На рисунке 3 представлен график зависимости оптической плотности от содержания флавоноидов в растворе.

Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции **r≥0,99**, который составил 0,9995.

Таблица 3.

Результаты определения суммы флавоноидов в модельной смеси таблеток ($A_{ст}$=0,470)

Взято порошка таблеток модельной смеси, г	A_x	Найдено X, г	Метрологические характеристики
0,4940	0,614	0,00705	$\bar{X}$=0,00720 г
0,4984	0,636	0,00723	S=8,24 · 10^{-5}
0,5000	0,634	0,00719	$S_{\bar{X}}$=3,36 · 10^{-5}
0,4996	0,642	0,00730	$\Delta\bar{X}$=8,64 · 10^{-5}
0,5024	0,636	0,00719	ε = ±1,20%
0,5080	0,646	0,00722	

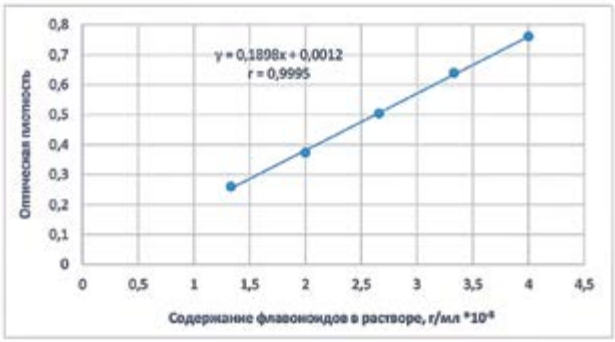


Рисунок 3. **График зависимости величины оптической плотности от содержания флавоноидов в растворе**

Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанная нами методика специфична.

Полученное уравнение (y=0,1898x+0,0012) позволяет сделать вывод о наличии линейной зависимости величины оптической плотности от концентрации флавоноидов в области концентраций от 1,33 × 10^{-5} до 4 × 10^{-5} г/мл. Правильность методики рассматривали как результат изучения линейности: если свободный член в уравнении статистически достоверно не отличается от нуля, то использование такой методики дает результаты, свободные от систематической ошибки. Согласно статистической обработке полученного уравнения коэффициент **b** имеет доверительный интервал 0,0105, а свободный член **a** значимо не отличается от нуля, т.к. его доверительный интервал равен 0,0297 (0,0012±0,0297). Ввиду того, что свободный член **a**=0, уравнение принимает вид y=0,1902x и предлагаемая методика не отягощена систематической погрешностью [14, 15].

Таким образом, данная методика является линейной и правильной.

Определение критерия прецизионности (сходимости) проводили на 6 параллельных определениях экспериментальной серии таблеток от 27.11.14 (таблица 4).

Таблица 4.

Результаты определения прецизионности методики количественного определения суммы флавоноидов в таблетках ($A_{ст}$=0,470)

Масса растертых таблеток, г	A_x	X, г	Метрологические характеристики
0,5010	0,640	0,00725	
0,4990	0,619	0,00704	$\bar{X}$=0,00715 г
0,5012	0,627	0,00710	SD=1,05 · 10^{-4}
0,5024	0,646	0,00730	RSD= ±1,54%
0,4980	0,620	0,00706	
0,5004	0,630	0,00714	

Критерии сходимости имеют значения SD= =1,05 × 10^{-4}, а RSD=±1,54%, что соответствует требуемому значению – не более 2,7% [16].

Определение промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности проводили два аналитика и в разные дни на двух спектрофотометрах, СФ-104 и СФ-2000 (таблица 5).

Таблица 5.

Результаты определения промежуточной прецизионности методики количественного определения суммы флавоноидов в таблетках ($A_{ст}$=0,470), n=6

	Прибор	Аналитик	Найдено		
			$\bar{X}$, г	SD	RSD
День1	СФ-104	Аналитик 1	0,00718	0,94 · 10^{-4}	1,34
	СФ-2000	Аналитик 2	0,00718	1,34 · 10^{-4}	1,95
День 2	СФ-2000	Аналитик 1	0,00713	1,53 · 10^{-4}	2,25
	СФ-104	Аналитик 2	0,00715	0,94 · 10^{-4}	1,38

Полученные результаты определения промежуточной прецизионности соответствуют требуемому значению – не более 2,7% [16].

Таким образом, предлагаемая методика валидна по критериям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность, что позволяет ее рекомендовать для определения суммы флавоноидов в таблетках «Гинкготропил-форте».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методика, предложенная ФС.2.5.0010.15 «Гинкго двулопастного листья», позволяет также определить сумму флавоноидов в траве лабазника вязолистного в пересчете на рутин. С помощью данной методики определено содержание суммы флавоноидов в листьях гинкго двулопастного и траве лабазника вязолистного, представленных ООО «Витаукт-пром».

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в сухих экстрактах из данного сырья и таблетках «Гинкготропил-форте». Анализ сухих экстрактов, полученных на кафедре технологии лекарств ПМФИ, позволяет предложить предварительную норму содержания суммы флавоноидов в экстрактах: не менее 11%.

Обоснована норма содержания суммы флавоноидов в таблетках «Гинкготропил-форте» – не менее 6 мг в пересчете на среднюю массу таблетки. Проведенная валидационная оценка показала, что предлагаемая методика валидна по показателям: специфичность, линейность, прецизионность и правильность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Описание препарата «Гинкготропил». URL: http://vitauct.ru/produktsiya/vsya-produktsiya/гинкотропил-ginkgotropil-detail.html (дата обращения 24.04.2016).
2. Н.Н. Крылов, Е.В. Компанцева, А.М. Шевченко. Обоснование состава и методик анализа сублингвальных таблеток на основе экстрактов гинкго, лабазника, глицина и янтарной кислоты // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 1. С. 84–91.
3. А.М. Шевченко и др. Технологические аспекты разработки сублингвальных таблеток «Гинкготропил-форте» // Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: сб. материалов 5-й Международной научно-практической телеконференции. 17 апреля 2015 г. – Белгород, 2015. С. 210–216.
4. British Pharmacopoeia 2009. V. II. – London: The Stationery Office, 2009. 10952 p.
5. European Pharmacopoeia, 8th edition. – Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines and Health Care of the Council of Europe (EDQM), 2012.
6. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2 / УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: Победа, 2008. 472 с.
7. Фармакопея США: USP 29: в 2 т.: пер. с англ. Т. 1. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 1720 с.
8. ФС.2.5.0010.15. Гинкго двулопастного листья // Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 3. – М., 2015. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3/HTML/#374 (дата обращения 27.03.2016).
9. ФСП 42-7870-06. Гинкго двулопастного экстракт сухой / ЗАО «Эвалар».
10. Д.Г. Буланкин. Исследование по стандартизации и разработке лекарственных средств на основе листьев гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.): автореф. дисс. … канд. фарм. наук. – Самара. 2011. 23 с.
11. ВФС 42-1777-87. Цветки лабазника вязолистного. – М. 1987. 8 с.
12. И.В. Шилова, И.А. Самылина, Н.И. Суслов и др. Разработка ноотропных средств на основе растений Сибири. – Томск: Печатная мануфактура, 2013. 267 с.
13. Л.К. Клышев, В.А. Бандюкова, Л.С. Алюкина. Флавоноиды растений. – Алма-Ата, 1978. 220 с.
14. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 1. – М. 2015.
15. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента // Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 1. – М. 2015. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#234 (дата обращения 27.03.2016).
16. Guidelines for standard method performance requirements. URL: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf (дата обращения 08.04.2016).

УДК 615.225.2

1 – ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14

1 – St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, 14, Prof. Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail:
aleksey.shadrin@pharminnotech.com

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ РАМИПРИЛА И ЛЕРКАНИДИПИНА ИЗ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

А.А. Шадрин[1]*, Е.В. Флисюк[1], И.Е. Смехова[1]

Резюме. В статье приведены результаты разработки состава и технологии комбинированного лекарственного препарата, содержащего рамиприл и лерканидипин, обеспечивающего кинетику растворения, эквивалентную кинетике растворения оригинального монопрепарата. Показаны сравнительные профили высвобождения данных активных фармацевтических субстанций. Обоснован выбор твердой лекарственной формы в виде двухслойных таблеток.

Ключевые слова: рамиприл, лерканидипин, двухслойные таблетки, кинетика растворения.

DISSOLUTION PROFILE STUDIES FOR RAMIPRIL AND LERCANIDIPINE FIXED-DOSE COMBINATION

A.A. Shadrin[1]*, E.V. Flisyuk[1], I.E. Smekhova[1]

Abstract. This article describes the results of the development of composition and technology of a combined drug, containing lercanidipine and ramipril, affording equivalent dissolution kinetics with original drugs. The comparative release profiles of the active pharmaceutical ingredients are shown. The choice of a solid dosage form in the form of bi-layer tablets was substantiated.

Keywords: ramipril, lercanidipine, bi-layer tablets, dissolution kinetics.

ВВЕДЕНИЕ

Абсорбция активной фармацевтической субстанции (АФС) из твердой дозированной формы при пероральном введении зависит от ее высвобождения из лекарственного препарата (ЛП), растворения или солюбилизации в физиологических условиях и проницаемости в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Вследствие критического характера первых двух из этих ступеней растворение *in vitro* может быть использовано для предсказания поведения АФС *in vivo* [1].

Испытание «Растворение» является как технологическим, так и биофармацевтическим методом оценки качества лекарственных препаратов, отражающим кинетику растворения АФС при высвобождении ее из лекарственной формы, то есть концентрацию вещества в растворе через определенный промежуток времени [2, 3]. Это испытание широко применяется для проведения сравнительных исследований лекарственных препаратов *in vitro* (сравнительный тест кинетики растворения, СТКР) с целью уменьшения объема исследований *in vivo*.

СТКР проводится на стадии разработки, например, в целях подтверждения правильности выбора состава препарата и пригодности процесса производства, что позволяет с большей вероятностью получить положительные результаты изучения биоэквивалентности *in vivo* [3, 4].

Результаты проверки высвобождения АФС *in vitro* в виде сопоставимых профилей растворения должны свидетельствовать о постоянстве качества ЛП в процессе производства и хранения, об эквивалентности дженерика препарату сравнения и т. п. [5].

Цель настоящей работы – проведение СТКР двухслойных таблеток, содержащих две АФС (рамиприл и лерканидипин), в среде растворения для контроля качества и обоснование выбора данной твердой лекарственной формы. Это исследование является актуальным, так как оно позволит подтвердить правильность выбора состава препарата.

Использование только среды контроля качества обусловлено показательностью профилей высвобождения лерканидипина, так как без добавления ПАВ в раствор переходит недостаточное количество АФС или не высвобождается вовсе (в случае среды растворения в виде фосфатного буферного раствора с pH 6,8).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

- Полисорбат-80 (твин-80), Merck, кат. № 8.17061.
- Хлористоводородная кислота, ХЧ, ОАО «Каустик», Россия.

Оборудование

- Тестер растворения Agilent 708-DS, Agilent Technologies, США.
- Хроматограф жидкостный Waters Alliance 2695, Waters, США, зав. № D07SM4864A.
- pH-метр лабораторный SevenEasy pH S20-K в комплекте с электродами, Mettler Toledo, Швейцария, зав. № 1227226080.

Стандартные образцы (СО)

- Лерканидипина гидрохлорид, Molcan, кат. № LCN00H, Канада, с. 150407. Количественное содержание – 99,4%.
- Рамиприл, U. S. Pharmacopeia, кат. № 1598303, США, с. R019T0. Количественное содержание – 99,6%.

Программное обеспечение

- Empower 2 Software, Waters Corporation, базовая лицензия: em7en01652.
- Microsoft Excel 2010, версия 14.0.7162.500.

Рамиприл и лерканидипин – лекарственные средства для лечения артериальной гипертензии.

Субстанция рамиприла представляет собой белый или почти белый порошок, малорастворимый в воде и хорошо растворимый в метаноле. Относится к I классу биофармацевтической классификационной системы (БКС) [6]. Субстанция лерканидипина (лерканидипина гидрохлорид) представляет собой желтый порошок, практически нерастворимый в воде и растворимый в метаноле. Относится ко II классу БКС [6].

Тестер растворения Agilent 708-DS

pH-метр лабораторный SevenEasy pH S20-K

Методика проведения сравнительного теста кинетики растворения

Исследование сравнительной кинетики растворения проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII (ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм») и «Руководству по экспертизе лекарственных средств», том III.

Выбор подходящих условий для проведения СТКР, которые способствуют постепенному и полному высвобождению АФС из лекарственной формы, был основан на рекомендациях FDA (для рамиприла) и экспериментальных данных: лерканидипин обладает низкой растворимостью и плохой смачиваемостью, поэтому в среду растворения добавили ПАВ и увеличили ее объем до 900 мл. Таким образом, для растворения двухкомпонентных таблеток использовали аппарат II «Лопастная мешалка» со скоростью вращения мешалки 50 об/мин, среда растворения – 0,3% раствор полисорбата-80 в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты объемом 900 мл и с температурой 37±0,5 °С. Точки отбора проб: 5 мин, 10 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин. Отобранную пробу объемом 10 мл (объем среды растворения возмещали тем же растворителем) фильтровали через мембранный фильтр (RC) с диаметром пор 0,45 мкм и без разбавления переносили в виалу хроматографа.

Для определения количества действующих веществ, перешедших в среду растворения, использовали метод ВЭЖХ. Колонку уравновешивали подвижной фазой (ПФ) до достижения стабильной базовой линии. Условия хроматографирования двухкомпонентных таблеток: колонка 250×4,6 мм, сорбент L1, 5 мкм [Luna C18(2) 100 Å, Phenomenex, США]; подвижная фаза – буферный раствор pH 3,0 (натрия перхлорат, Panreac, Испания, кат. № 134387, и хлорная кислота, Panreac, Испа-

ния, кат. № A0539) – ацетонитрил (Panreac, Испания, кат. № 361881) в объемном соотношении 42:58; скорость потока 0,7 мл/мин; температура колонки 40 °С; температура образцов 25 °С; детектор – УФ, 210 нм; объем вводимой пробы 50 мкл; изократический режим элюирования. Типичная хроматограмма представлена на рисунке 1.

Количество рамиприла и лерканидипина гидрохлорида, перешедших в среду растворения из таблетки (X, %), вычисляли по общей формуле (1):

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot L}, \quad (1)$$

где S – площадь пика АФС на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика АФС на хроматограмме раствора СО АФС; a_0 – навеска СО АФС, мг; P – содержание АФС в СО АФС, %; L – заявленное содержание АФС в таблетке, мг.

Препаратами сравнения при исследовании кинетики растворения являлись оригинальные препараты рамиприла и лерканидипина: Тритаце®, таблетки продолговатой формы с делительной риской, 5 мг, производства «Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ», Германия, серия L239, срок годности до 07.2018 (рамиприл), и Занидип®-Рекордати, круглые двояковыпуклые таблетки, покрытые пленочной оболочкой, с риской на одной стороне, 10 мг, производства «Рекордати Ирландия Лтд», Ирландия, серия ZB2M54, срок годности 11.2016 (лерканидипин). Их профили высвобождения представлены на рисунке 2.

При построении профилей высвобождения выполнялся ряд условий: учитывалось количество принимаемых в расчет точек (среднее значение из восьми временных точек); соблюдались одинаковые условия испытания сравниваемых ЛП и отбор проб; учитывалось значение коэффициента вариации для первой и последующих временных точек (относительное стандартное отклонение или коэффициент вариации для любого из сравниваемых препаратов не превышало 20% в первой временной точке и 10% во всех последующих).

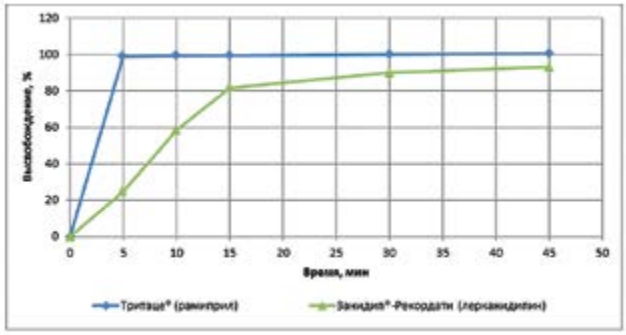


Рисунок 2. Профили высвобождения рамиприла и лерканидипина из оригинальных препаратов

Для сравнения профилей растворения использовался коэффициент подобия (f2), который рассчитывался по формуле (2):

$$f_2 = 50 \cdot \log\left[\left(1 + (1/n)\sum_{i=1}^{n}\left|R_t - T_t\right|^2\right)^{-0,5} \cdot 100\right], \quad (2)$$

где T_t – значение растворения исследуемого ЛП, в процентах, R_t – значение растворения референтного ЛП (препарата сравнения), n – число временных точек.

Кинетика растворения лекарственного вещества считается эквивалентной, если значение фактора сходимости f2 лежит в пределах от 50 до 100 [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объект исследования – двухкомпонентный лекарственный препарат для лечения артериальной гипертензии в виде двухслойной таблетки, покрытой пленочной оболочкой [8], где каждая АФС находится в отдельном слое с собственными вспомогательными веществами. Таким образом, готовый продукт фактически представляет собой две спрессованные вместе таблетки, покрытые сверху пленочной оболочкой. Технология производства двухслойных таблеток дает ряд преимуществ [9]:

– разделение АФС, которые являются несовместимыми;

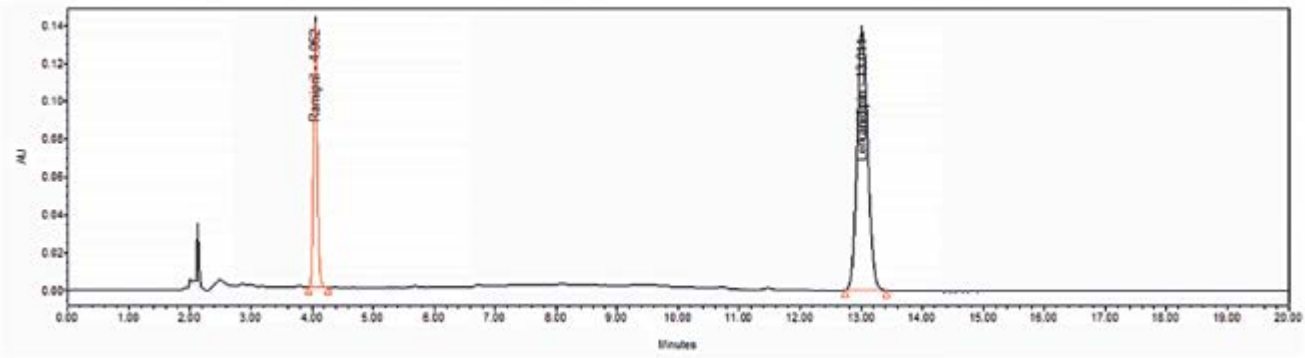


Рисунок 1. Типичная хроматограмма испытуемого раствора рамиприла и лерканидипина гидрохлорида

– разное время распада для каждого слоя;

– комбинация разных профилей высвобождения.

Перед разработкой состава и технологии двухслойной таблетки были изготовлены монотаблетки (содержащие одну АФС), воспроизводящие состав соответствующего оригинального препарата (препарата сравнения). Было установлено, что кинетика растворения рамиприла из воспроизведенных таблеток эквивалентна кинетике растворения Тритаце®. В то же время высвобождение лерканидипина из воспроизведенных таблеток составило менее 70% за 45 мин. Поэтому для улучшения его высвобождения в состав таблеток добавили солюбилизатор. Учитывалось также и то, что лекарственные средства с низкой растворимостью в воде вызывают дополнительные проблемы по причине недостаточной скорости и продолжительности их растворения в водной среде, включая желудочно-кишечные жидкости, что приводит к низкой абсорбции в большом круге кровообращения после перорального приема внутрь [10].

Решающим фактором при выборе подходящего поверхностно-активного вещества (ПАВ) являлось достижение необходимого профиля высвобождения АФС, подобного профилю препарата сравнения. Были изготовлены таблетки лерканидипина (монотаблетки), соответствующие составу препарата сравнения, но с добавлением одного из ПАВ [полисорбат-80 (твин-80), натрия лаурилсульфат или полоксамер].

Профили высвобождения леркандипина из таблеток, содержащих различные ПАВ, представлены на рисунке 3.

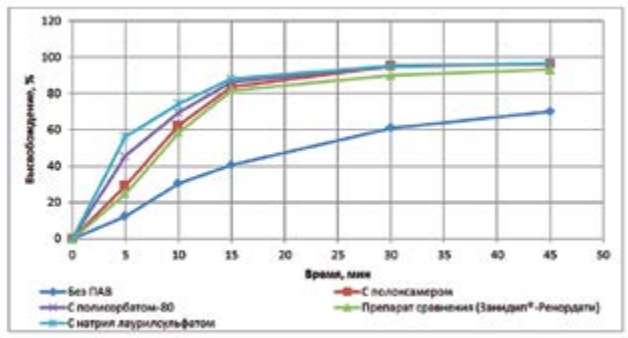


Рисунок 3. Профили высвобождения лерканидипина из препарата сравнения и монотаблеток, содержащих различные ПАВ

Анализ значений коэффициентов подобия (таблица 1) позволил для дальнейших исследований выбрать состав вспомогательных веществ таблеток, содержащих полоксамер.

Объектом настоящей разработки является двухкомпонентный лекарственный препарат, представляющий собой двухслойную таблетку, покрытую пленочной оболочкой. С целью обоснования выбора данной твердой лекарственной формы на основании сравнения профилей высвобождения действующих веществ были изготовлены однослойные двухкомпонентные таблетки в двух вариациях. В первом случае (образец № 1) за основу был взят состав препарата Тритаце® (рамиприл), к которому добавили субстанцию лерканидипина. Готовую таблетку покрыли пленочной оболочкой. Во втором случае (образец № 2) за основу был взят состав препарата Занидип®-Рекордати (лерканидипин), но с полоксамером и с добавлением субстанции рамиприла. Готовую таблетку также покрыли пленочной оболочкой. Однако, несмотря на одинаковые массы и формы однослойных таблеток, различие в качественном составе повлияло на такие характеристики, как прочность на излом и распадаемость в воде, что, в свою очередь, привело к снижению высвобождения рамиприла (рисунок 4) и, наоборот, повышению высвобождения лерканидипина (рисунок 5).

Таблица 1.

Значение коэффициентов подобия профилей высвобождения лерканидипина из таблеток, содержащих различные ПАВ (препарат сравнения Занидип®-Рекордати)

ПАВ	Без ПАВ	Полисорбат-80	Натрия лаурилсульфат	Полоксамер
Значение f2	27,3	47,7	39,4	70,3
Подобие	нет	нет	нет	да

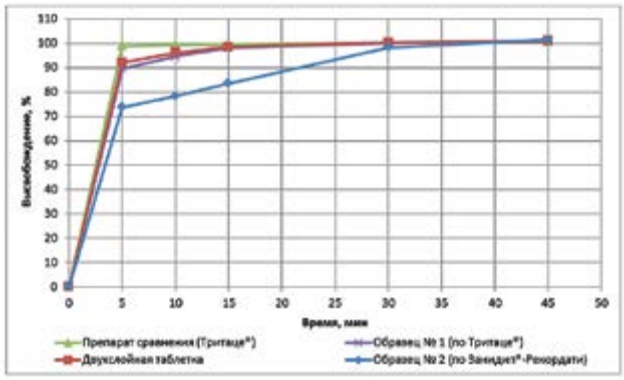


Рисунок 4. Профили высвобождения рамиприла из двухкомпонентных таблеток и препарата сравнения

В связи с тем, что из препарата сравнения, двухслойной таблетки и образца № 1 (однослойной таблетки) за 15 мин перешло в раствор более 85% рамиприла, кинетики растворения можно считать подобными без математической оценки [7]. Отличие профиля высвобождения рамиприла из двухслойной таблетки и образца № 1 от профиля высвобождения препарата сравнения в первые 10 мин связано, по-видимому, с тем, что объект исследования – таблетки, покрытые пленочной оболочкой, а препарат сравнения – таблет-

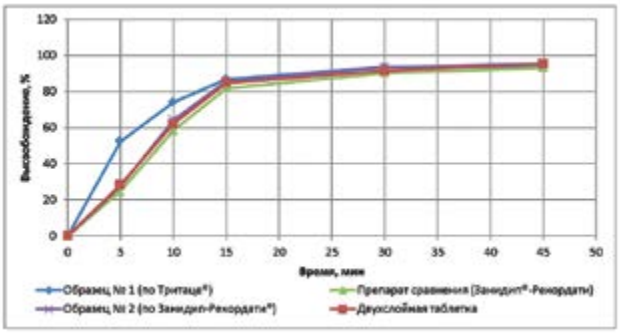


Рисунок 5. Профили высвобождения лерканидипина из двухкомпонентных таблеток и препарата сравнения

ки без оболочки. Это подтверждает наблюдение, что для ЛП I класса БКС, к которым относится рамиприл, высвобождение АФС лимитируется в первую очередь распадаемостью таблетки. Высвобождение рамиприла из образца № 2 в точке 15 – менее 85%, поэтому для него был рассчитан коэффициент подобия f2=39,3, что указывает на неэквивалентность его кинетики растворения.

Профили высвобождения лерканидипина из двухслойной таблетки и образца № 2 практически идентичны. Относительно быстрая распадаемость образца № 1 привела к повышению высвобождения лерканидипина в первых двух временных точках. Для оценки эквивалентности были рассчитаны коэффициенты подобия (таблица 2):

Таблица 2.

Значение коэффициентов подобия профилей высвобождения лерканидипина из двухкомпонентных таблеток

Тип таблетки	Образец № 1 (однослойная таблетка)	Образец № 2 (однослойная таблетка)	Двухслойная таблетка
Значение f2	42,3	70,5	76,0
Подобие	нет	да	да

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование двухслойной таблетки позволило разделить рамиприл и лерканидипин, поместив их в отдельные слои, что привело к достижению эквивалентности профилей высвобождения указанных АФС из исследуемого препарата профилям высвобождения из препаратов сравнения. Значение коэффициента подобия (f2) высвобождения лерканидипина из двухслойных таблеток – 76,0. Для рамиприла коэффициент подобия не рассчитывался, так как за 15 мин перешло в раствор более 85% АФС. Была доказана необходимость добавления в состав солюбилизатора, а также выбрано подходящее ПАВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. И.Е. Смехова, Ю.М. Перова, И.А. Кондратьева и др. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 50–61.
2. А.А. Свистунов, Г.В. Раменская, И.Е. Шохин. Испытание «Растворение» в фармацевтической практике. Современные подходы, концепции и биофармацевтические аспекты // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. 2011. № 11. С. 79.
3. А.Н. Миронов, Д.П. Ромодановский, Р.Р. Ниязов, Д.В. Горячев. Экспертные подходы к планированию и анализу результатов сравнительного теста кинетики растворения воспроизведенных лекарственных препаратов в твердых лекарственных формах с немедленным высвобождением // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2014. № 2. С. 3–4.
4. И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, Г.Ф. Василенко, Е.А. Малашенко. Оценка возможности замены исследований биоэквивалентности in vivo на изучение сравнительной кинетики растворения *in vitro* (процедура «биовейвер») при определении взаимозаменяемости лекарственных средств («дженериков») // Химико-фармацевтический журнал. 2011. Т. 45. № 2. С. 46–48.
5. I.E. Shohin, J.I. Kulinich, G.V. Ramenskaya, G.F. Vasilenko. Interchangeability evaluation of multisource ibuprofen drug products using biowaiver procedure // Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011. V. 73. № 4. P. 443–446.
6. Электронная база данных BCS. URL: http://www.tsrlinc.net/search.cfm (дата обращения 15.04.2016).
7. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том III. – М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014. 344 с.
8. А.А. Шадрин. Разработка технологии двухслойных таблеток, покрытых оболочкой, на основе фармацевтических субстанций – карбоновой кислоты и эфира карбоновой кислоты // Сборник материалов V Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 20-21 апреля 2015 г. – СПб.: СПХФА, 2015. С. 367–370.
9. Т. Хесс, А. Морозов. Двухслойные таблетки с EMDEX® / PROSOLV® EASYTAB // Фармацевтические технологии и упаковка. 2014. № 3(241). С. 24–25.
10. Патент Евразийского патентного ведомства № 021645 B1. Твердая дозированная форма в виде таблетки и способ ее приготовления / К. Евангелос и др.; заявитель и патентообл. «ФАРМАТЕН С.А.»; заявл. 23.07.2007; опубл. 31.08.2015. 13 с.

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

ВЫСТАВКА-ФОРУМ

ФармМедПром 2016:
демонстрация результатов реализации Государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013 – 2020 годы

Форум при участии профильных федеральных министерств и ведомств, региональных органов здравоохранения

Обсуждение результатов реализации Государственной программы и актуальных вопросов развития отрасли

Проводится в рамках 26-й международной выставки «Здравоохранение-2016»

Место проведения:
г. Москва
ЦВК «Экспоцентр»

По вопросам участия обращайтесь в Центр корпоративных коммуникаций S-GROUP
+7 499 340 25 11
am@sgr.com.ru

Актуальная информация:
pharmmedexpo.ru и фарммедпром.рф

S·GROUP

УДК 615.03

1 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, Москва, Научный проезд, 20, стр. 3

2 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

1 – Center of Pharmaceutical Analytics Ltd, 20, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: igorshohin@yandex.ru

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ (ДЕПАКИН® ХРОНО)

А.А. Львова[1], Ю.Е. Болдина[1], И.Е. Шохин[1]*, Т.Н. Комаров[1], Л.А. Меньшикова[2], Ю.В. Медведев[1,2]

Резюме. Изучена кинетика растворения препаратов вальпроевой кислоты в трех средах растворения: 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, цитратно-фосфатный буферный раствор с pH 6,8. Исследование проводилось на аппарате «Вращающаяся корзинка» при скорости вращения 75 об/мин. Временные точки отбора проб: 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 6 часов. Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. В среде 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты с pH 1,2 и ацетатного буферного раствора с pH 4,5 высвобождение происходит в незначительной степени, что связано с переходом вальпроата натрия в вальпроевую кислоту. Это существенно снижает ее растворимость и высвобождение, поэтому данные, полученные в указанных средах растворения, не учитывались. Оптимальной средой растворения был признан цитратно-фосфатный буферный раствор с pH 6,8, в котором достигается наилучшее высвобождение активного ингредиента, а также действующее вещество сохраняет свою структуру.

Ключевые слова: вальпроевая кислота, растворение, ВЭЖХ.

DISSOLUTION PROFILE STUDY FOR EXTENDED RELEASE VALPROIC ACID DOSAGE FORM (DEPAKINE® CHRONO)

A.A. Lvova[1], Yu.E. Boldina[1], I.E. Shohin[1]*, T.N. Komarov[1], L.A. Menshikova[2], Yu.V. Medvedev[1,2]

Abstract. Dissolution profile study for extended-release valproic acid preparations was performed in three dissolution media: 0.1 M hydrochloric acid, acetate buffer pH 4.5, citrate-phosphate buffer pH 6.8 using Apparatus 1 at 75 rpm. Time points were 1, 2, 3, 4, and 6 hours. Assay of released API was performed using HPLC-UV. API did not released or slightly released in 0.1 M hydrochloric acid and acetate buffer pH 4.5 because of low solubility of valproate in acid form. Recommended dissolution medium was citrate-phosphate buffer pH 6.8 which provides high solubility, stability and complete release of API.

Keywords: valproic acid, dissolution, HPLC.

ВВЕДЕНИЕ

«Руководство по экспертизе лекарственных средств» (том 1) описывает только рекомендации по исследованию кинетики растворения для лекарственных форм немедленного высвобождения (ЛФНВ). Исследования кинетики растворения для пролонгированных лекарственных средств обычно проводятся в тех же условиях, что и для ЛФНВ, если не обосновано иное [1].

При изучении кинетики растворения пролонгированных лекарственных препаратов наиболее часто используются: аппарат 1 («Вращающаяся корзинка», ВК), аппарат 2 («Лопастная мешалка», ЛМ). Условия исследования должны отражать физиологические условия в желудочно-кишечном тракте, поэтому рекомендуемая рабочая скорость вращения для ВК – 100 об/мин, для ЛМ – 50–75 об/мин. Выбор аппарата зависит от физико-химических свойств твердой дозированной лекарственной формы. Считается, что ЛМ больше подходит для оценки таблетированных ЛФ, ВК – для капсул и ЛФ, которые флотируют (всплывают) или медленно распадаются [2].

В качестве среды для растворения используют растворы, значения pH которых соответствуют показателям pH в разных отделах желудочно-кишечного тракта. Если высвобождение лекарственного вещества из таблетки или капсулы должно происходить в желудке, то данный препарат будет хорошо растворяться в буферном растворе с низким значением pH. Однако лекарственные вещества, входящие в состав препарата, имеют разные физико-химические свойства, поэтому для каждого лекарственного средства (ЛС) выбирают среду для растворения с учетом его химической структуры и состава вспомогательных веществ [3].

Временные точки для лекарственных форм замедленного высвобождения должны описывать весь профиль высвобождения, при этом точек отбора для пролонгированных ЛС обычно больше, чем для ЛФНВ [4].

Целью данного исследования являлось изучение кинетики растворения препаратов вальпроевой кислоты в трех средах растворения, моделирующих основные разделы ЖКТ, в которых происходит распадение, высвобождение и абсорбция активного ингредиента (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, цитратно-фосфатный буферный раствор с pH 6,8), с количественным определением методом ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемый препарат

Депакин® хроно, таблетки, покрытые оболочкой, пролонгированного действия, 500 мг («Санофи Винтроп Индустрия», Франция).

Состав: вальпроевая кислота 145,0 мг, вальпроат натрия 333,0 мг; вспомогательные вещества: кремния диоксид коллоидный безводный, гипромеллоза, этилцеллюлоза, сахаринат натрия, кремния диоксид коллоидный гидратированный; пленочная оболочка: гипромеллоза, дисперсия полиакрилата, макрогол 6000, тальк, титана диоксид.

Ингибитор ГАМК-трансферазы повышает содержание ГАМК в ЦНС, что обуславливает снижение порога возбудимости и уровня судорожной готовности моторных зон головного мозга. Препарат легко и полностью всасывается при приеме внутрь, биодоступность составляет около 100%, C_{max} – 2 ч, $T_{1/2}$ – 8 ч. Является противоэпилептическим средством широкого спектра действия [5].

В качестве действующего вещества исследуемое лекарственное средство содержит вальпроевую кислоту: 2-пропилвалериановую кислоту (в виде натриевой соли).

Структурная формула представлена на рисунке 1.

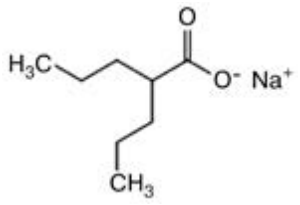


Рисунок 1. Структурная формула вальпроата натрия

Согласно опубликованным данным вальпроевая кислота относится ко 2 классу БКС [6], то есть является субстанцией с низкой растворимостью и высокой проницаемостью.

Оборудование

- прибор для проведения теста «Растворение» Agilent 708-DS Dissolution Apparatus, Agilent Technologies, США;
- жидкостной хроматограф Agilent 1290 с диодно-матричным детектором G4212A, Agilent Technologies, США.

Условия изучения кинетики растворения

При выборе условий теста кинетики растворения (ТКР) исходили из требований методических указаний Минздравсоцразвитие России «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств» (2008) (приложение 4) [7], «Руководства по экспертизе лекарственных средств», Т. I, 2013 г. [8], и рекомендаций FDA.

Исследование проводили на аппарате «Вращающаяся корзинка» при скорости вращения 75 об/мин при температуре 37±0,5 °С в трех средах растворения, моделирующих основные разделы ЖКТ, в которых происходит распадение, высвобождение и абсорбция активного ингредиента (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты с pH 1,2, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, цитратно-фосфатный буферный раствор с pH 6,8). Объем среды растворения – 900 мл. Временные точки отбора проб: 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 6 часов. Количественное определение высвободившегося вальпроата натрия проводили методом ВЭЖХ.

Приготовление сред растворения

0,1 М раствор хлористоводородной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 500 мл воды очищенной, 8,7 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводили объем раствора до 1000 мл водой очищенной и тщательно перемешивали.

0,2 М раствор уксусной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 200 мл воды очищенной, прибавляли 11,6 мл уксусной кислоты ледяной, давали раствору охладиться до комнатной температуры, доводили объем раствора до метки водой очищенной и тщательно перемешивали.

Ацетатный буферный раствор с pH 4,5

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 2,99 г натрия ацетата тригидрата и растворяли в 200 мл воды очищенной. К полученному раствору прибавляли 14 мл 0,2 М раствора уксусной кислоты, доводили объем раствора до метки водой очищенной и тщательно перемешивали. Измеряли pH раствора на pH-метре, при необходимости доводили pH до 4,5 0,2 М раствором уксусной кислоты или 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Раствор натрия фосфата двузамещенного

В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещали 71,5 г натрия фосфата двузамещенного двенадцативодного, добавляли 600 мл воды и перемешивали до растворения навески. Объем полученного раствора доводили водой до метки и перемешивали.

Раствор лимонной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещали 21,0 г лимонной кислоты, добавляли 600 мл воды и перемешивали до растворения навески. Объем полученного раствора доводили водой до метки и перемешивали.

Цитратно-фосфатный буферный раствор с pH 6,8

В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещали 773 мл раствора натрия фосфата двузамещенного и 227 мл раствора лимонной кислоты, перемешивали полученный раствор.

Измеряли pH раствора на pH-метре, при необходимости доводили значение pH до значения 6,8 раствором натрия фосфата двузамещенного или раствором лимонной кислоты.

Выполнение исследования

Тест «Растворение» проводили согласно ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение» [9] на аппарате «Вращающаяся корзинка» (Agilent 708-DS Dissolution Apparatus, США) при скорости вращения 75 об/мин. В каждый из 6 сосудов для растворения с 900 мл среды растворения, предварительно термостатированными при 37±0,5 °С, помещали по 1 таблетке исследуемого лекарственного средства Депакин® хроно. Спустя указанные промежутки времени проводили отбор 5 мл среды, которые незамедлительно восполняли таким же объемом среды растворения. Отобранные пробы фильтровали через мембранные фильтры Agilent Captiva Premium Syringe Filter® с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата (*испытуемый раствор*).

Количественное определение

Приготовление стандартного раствора

Около 80,0 мг стандартного образца вальпроата натрия помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 70 мл среды растворения. Содержимое колбы перемешивали до полного растворения навески, объем раствора доводили до метки тем же растворителем и перемешивали. Перед хроматографированием раствор фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Материал фильтра мембран – регенерированная целлюлоза.

Хроматографирование

Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290, оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, диодно-матричным детектором. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation (ver. B.04.03), Agilent Technologies, США. Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax Eclipse Plus C18, 250×4,6 мм, 5 мкм, при температуре 30 °С. В качестве подвижной фазы использовался фосфатный буферный раствор с pH 2,5 (A) / ацетонитрил (B) (60:40). Скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. Объем вводимой пробы – 50 мкл. Детектирование – УФ-детектор при длине волны 210 нм.

Жидкостной хроматограф Agilent 1290

Количество действующего вещества, перешедшего в раствор (X), в процентах от номинального содержания рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 900 \times P \times 100}{S_0 \times 100 \times L \times 100},$$

где S_0 – площадь пика вальпроата натрия на хроматограмме стандартного раствора; S – площадь пика вальпроата натрия на хроматограмме испытуемого раствора; a_0 – навеска стандартного образца вальпроата натрия, мг; P – содержание вальпроата натрия в стандартном образце, %; 900 – объем среды растворения, мл; L – номинальная дозировка препарата, мг.

Программное обеспечение

- валидированная автоматическая таблица Microsoft Excel для расчета значений высвобождения исследуемого ЛВ;
- валидированное программное обеспечение для жидкостного хроматографа Agilent 1290 (OpenLAB ChemStation Edition, версия A.01.04 [025], разработчик – Agilent OpenLAB).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Усредненные значения вальпроата натрия, высвободившегося в раствор из лекарственного средства Депакин® хроно, приведены в таблице 1 и на рисунке 2.

На рисунке 3 представлена типичная хроматограмма вальпроата натрия в среде растворения цитратно-фосфатный буферный раствор с pH 6,8.

Таблица 1.

Усредненные значения вальпроата натрия, высвободившегося в раствор из лекарственного средства Депакин® хроно, таблетки, покрытые оболочкой, пролонгированного действия, 500 мг (цитратно-фосфатный буферный раствор с pH 6,8)

Среда растворения / % высвобождения	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	6 ч
цитратно-фосфатный буферный раствор с pH 6,8	21,04	32,25	41,27	48,53	59,90
RSD, %	1,91	1,36	1,26	1,22	1,29

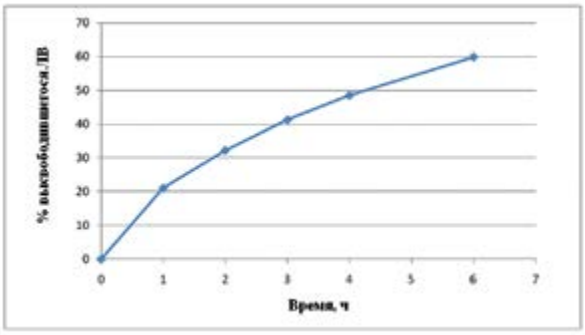


Рисунок 2. Профили высвобождения вальпроевой кислоты в среде растворения с pH 6,8

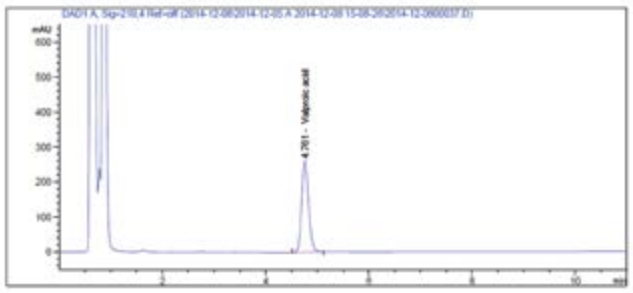


Рисунок 3. Хроматограмма пробы вальпроата натрия в цитратно-фосфатном буферном растворе с pH 6,8

Результаты исследования являются достоверными, поскольку согласно «Руководству по экспертизе лекарственных средств», Т. I, 2013 г., величина относительного стандартного отклонения (RSD, %) не должна превышать 10% для всех временных точек, за исключением первой временной точки.

В среде 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты с pH 1,2 и ацетатного буферного раствора с pH 4,5 высвобождение происходит в незначительной степени. В первую очередь это связано с переходом вальпроата натрия в вальпроевую кислоту, что приводит к снижению ее растворимости и высвобождения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен тест кинетики растворения препаратов вальпроевой кислоты в трех средах растворения, моделирующих основные разделы ЖКТ, в которых происходит распадение, высвобождение и абсорбция активного ингредиента (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты, ацетатный буферный раствор с pH 4,5, цитратно-фосфатный буферный раствор с pH 6,8), с количественным определением методом ВЭЖХ. По результатам исследования в среде 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты с pH 1,2 и ацетатного буферного раствора с pH 4,5 высвобождение происходит в незначительной степени. При проведении исследования следует учитывать то, что в средах растворения со значениями pH, близкими к значениям pH желудочного сока, вальпроат натрия переходит в неионизированную форму – вальпроевую кислоту, что существенно снижает ее растворимость и высвобождение.

ЛИТЕРАТУРА

1. И.Е. Шохин. Сравнительный тест кинетики растворения: актуальные аспекты выполнения испытания // Научно-практическая конференция с международным участием «Сравнительный тест кинетики растворения, фармакокинетика и биоэквивалентность: актуальные новости и взгляды». Светлые горы, М.О., 2014.
2. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. И.Е. Шохина. – М.: Перо, 2015. 320 с.
3. К.С. Давыдова, Ю.И. Кулинич, И.Е. Шохин. Тест «Растворение» в контроле качества ЛС // Ремедиум. 2010. № 5. С. 42.
4. FDA dissolution database. URL: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/index.cfm (дата обращения 15.07.2015).
5. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. 16-е изд. – М.: Новая волна, 2012. 1216 с.
6. A. Anil Kumar, T.E. Gopala Krishna Murthy, A. Prameela Rani. A concise review on oral pH independent controlled drug delivery system // World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. V. 3, Issue11, P. 311–324.
7. Методические указания Минздравсоцразвития России «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств» (приложение 4). – М., 2008.
8. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. – М.: Гриф и К., 2013. 328 с.
9. ОФС.1.4.2.0014.15. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм // Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд.
10. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. – Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research; 1997.

УДК 615.076.9; 615.072

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО АРХИВА

В.В. Шедько[1]*, Я.А. Гущин[1], А.А. Мужикян[1], М.Н. Макарова[1]

1 – ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Россия, Ленинградская обл., г.п. Кузьмоловский, б/н, корп. 245

1 – CJSC «SPA «HOUS OF PHARMACY», 245, Kuzmolovskiy, Vsevolozhskiy district, Leningrad region, 188663, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: Varjasha@yandex.ru
Тел./факс: (812) 603 24 33, 603 24 32
Тел.: 8 (931) 538 52 17

Резюме. При проведении доклинических исследований в России необходимым условием является соблюдение норм, установленных приказом Минздравсоцразвития России № 708 «Об утверждении правил лабораторной практики». Одним из важнейших аспектов качества выполняемых исследований является возможность реконструкции исследования после его завершения на основании архивированных материалов. Требованиями приказа Минздрава России № 354н от 06.06.2013 г. «О порядке проведения патологоанатомических вскрытий» предусмотрено хранение биологических материалов в 10% растворе формалина до окончания гистологического исследования, а также хранение микропрепаратов и парафиновых блоков в течение трех лет. В проведенном нами исследовании установлены и описаны наиболее часто встречаемые артифициальные изменения, возникающие в архивированном материале с течением времени при соблюдении рекомендаций по условиям хранения.

Ключевые слова: гистологический архив, ретроспективный анализ, доклинические исследования.

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF HISTOLOGIC ARCHIVE

V.V. Shedko[1]*, Ya.A. Gushchin[1], A.A. Muzhikyan[1], M.N. Makarova[1]

Abstract. Pre-clinical studies in Russia are required to be compliant with the Ministry of Health of Russia order N 708 «On approval of the rules of laboratory practice". One of the most important aspects of the quality of carried out research is possibility to reconstruct the study after its completion on the basis of archived materials. Order of Ministry of Health of Russia issued on 06.06.2013 N354n "On the procedure of autopsy" requires storage of biological materials in 10% formalin solution before the end of the histological study and also storage of micropreparations and paraffin blocks for 3 years. Our study identifies and describes the most frequently encountered artificial changes that occur in the archived material with the passage of time in compliance with the recommendations on storage conditions.

Keywords: histological archive, retrospective analysis, pre-clinical studies.

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с пунктом 9 статьи 3 федерального закона «Об архивном деле в Российской Федерации» [3] архивом является «учреждение или структурное подразделение организации, осуществляющее хранение, комплектование, учет и использование архивных документов».

ГОСТ 31882-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Организация и контроль архивов» дает следующее определение архива: «установленная зона или помещение… для безопасного хранения записей и данных». Обязательному хранению согласно этому документу подлежат, помимо записей на бумажных носителях, такие материалы, как влажные ткани, парафиновые блоки и прочее. Также в документе имеются рекомендации по сохранению материалов до тех пор, пока существует вероятность запроса от регулирующих органов на проведение аудитов. Данные рекомендации соответствуют приказу Минздравсоцразвития России № 708 «Об утверждении правил лабораторной практики». Требованиями приказа Минздрава России № 354н от 06.06.2013 г. «О порядке проведения патологоанатомических вскрытий» предусмотрено хранение биологических материалов в 10% растворе формалина до окончания гистологического исследования и хранение микропрепаратов и парафиновых блоков в течение трех лет [2, 5].

Вместе с тем в доступной литературе мы не обнаружили полных данных о сохранности гистологических образцов при хранении в 10% растворе формалина, в виде микропрепаратов и парафиновых блоков [6].

С учетом вышесказанного нами была поставлена задача оценить сохранность и качество архивируемого материала, получаемого в ходе комплектации архива и имеющего различную давность хранения.

В качестве наибольшего срока хранения был выбран промежуток времени, равный трем годам [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения ретроспективной валидации гистологического архива нами были отобраны влажный материал, фиксированный в 10% растворе формалина, гистологические блоки и микропрепараты на стеклах. Все перечисленные материалы были представлены одинаковым набором внутренних органов лабораторных животных и состояли из селезенки, печени, легких, кишечника, головного мозга, почек. Указанные архивные материалы были поделены нами на группы, соответствующие давности хранения. Для каждой временной группы было отобрано по 6 животных, чьи органы и ткани были представлены в виде влажного архива. Одному образцу с зафиксированными органами соответствовали 3 парафиновых блока с биоматериалом. Каждому парафиновому блоку соответствовало одно стекло с гистологическим препаратом, окрашенным стандартным красителем – гематоксилин-эозином. Наибольший срок хранения среди проанализированных нами материалов составил три года, наименьший – 3 месяца. В качестве контроля использовали свежий гистологический материал, не подвергавшийся хранению в гистологическом архиве. Степень выраженности обнаруженных артифициальных изменений в каждой временной группе оценивалась по сумме баллов, которые выставляли для каждого стекла или блока. Была использована шкала от 0 до 4, где 0 соответствовал отсутствию артефактов, а 4 – наиболее заметным дефектам в материале. Время хранения в архиве определяли согласно архивным журналам учета гистологического материала. Количественные характеристики исследуемых групп приведены в таблице 1. Микроскопию выполняли при помощи светооптического микроскопа Axio Scope (Германия). Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры AxioCam ICc1 (Германия).

Таблица 1.

Количественные характеристики исследуемого материала

Длительность хранения в архиве	Количество материала		
	Влажный	Блоки	Стекла
3 года	6	18	18
2,5 года	6	18	18
2 года	6	18	18
1,5 года	6	18	18
1 год	6	18	18
6 месяцев	6	18	18
3 месяца	6	18	18
Свежий, неархивированный материал	–	–	18

Необходимо отметить, что согласно имеющимся за три года показаниям психрометрического гигрометра отклонений от нормы параметров температуры и влажности не наблюдалось. Все перечисленные архивные материалы хранились изолированно друг от друга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате наших исследований установлено, что наиболее часто встречаемым артефактом, возникающим в процессе хранения биоматериала, зафиксированного в 10%-м растворе формалина, является формалиновый пигмент. Данный пигмент представляет собой мелкие, четко очерченные гранулы коричневого или черного цвета, расположенные, как правило, в эритроцитах или рядом с ними.

Для доказательства природы пигмента мы использовали метод сравнения вновь изготовленных нами срезов с исходными микропрепаратами. Такая методика позволила нам не прибегать к использованию специфических методов окраски, таких как окраска по Перлсу. Необходимо отметить, что при использовании метода сравнения важно изготавливать микропрепараты из тех органов и тканей, которым соответствуют уже имеющиеся гистологические микропрепараты сравнения.

В ходе микроскопии гистологических стекол мы обнаружили неодинаковую частоту встречаемости формалинового пигмента в различных органах: в большинстве случаев указанный пигмент встречался в селезенке, реже – в печени и легких, единичные отложения указанного пигмента наблюдались в головном мозге. При этом количество формалинового пигмента резко возрастало после 1,5–2 лет хранения материала, а максимума достигало в материале третьего года хранения (рисунок 1).

Для вновь изготовленных препаратов, чей срок хранения превышал 1,5 года, помимо отложений формалинового пигмента в тканях, нами были выявлены следы аутолиза тканей: распад микроструктур клеток, кариопикноз ядер, эозинофилия цитоплазмы. В кишеч-

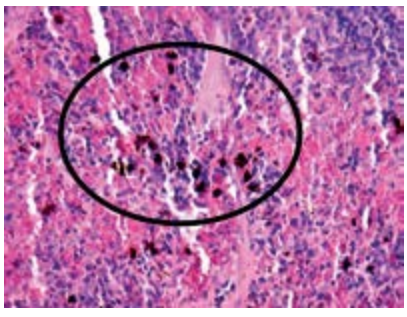


Рисунок 1. Селезенка. Вновь изготовленный микропрепарат из материала влажного архива. Срок хранения – 3 года. Область локализации формалинового пигмента выделена черным цветом. Характерна высокая концентрация пигмента. Ув. 200. Окраска ГЭ

ном эпителии часто наблюдалась вакуолизация цитоплазмы, в отдельных случаях лизису подвергались обширные площади ткани (рисунок 2). Указанные дефекты гистологических препаратов также имели прямую зависимость от срока хранения и были наиболее выражены у препаратов со сроком хранения 3 года. При оценке указанных дефектов мы также использовали метод сравнения с соответствующими гистологическими препаратами.

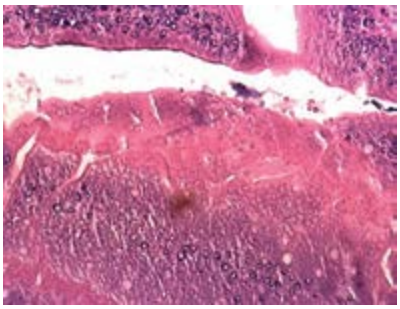


Рисунок 2. Тонкая кишка. Вновь изготовленный микропрепарат из материала влажного архива. Срок хранения – 3 года. Характерен лизис тканей тонкой кишки. Ув. 200. Окраска ГЭ

При изготовлении гистологических срезов из вновь вырезанного материала, хранившегося во влажном архиве свыше 1,5 лет, была отмечена чрезмерная фиксация, что сказывалось на качестве препаратов и выражалось в чрезмерном уплотнении и хрупкости материала. Указанные дефекты затрудняют изготовление срезов толщиной 3–5 мкм и приводят к утолщению срезов и к появлению разрывов и деформации материала (рисунок 3).

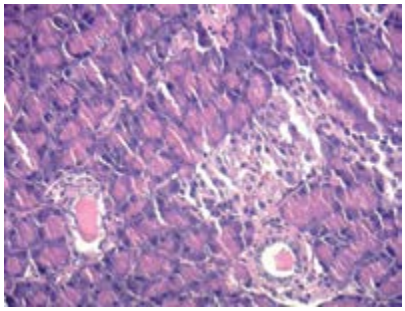


Рисунок 3. Печень. Вновь изготовленный микропрепарат из материала влажного архива. Срок хранения – 3 года. Трещины и разрывы в срезе. Ув. 100. Окраска ГЭ

При изготовлении микропрепаратов из парафиновых блоков, хранившихся более 2,5 лет, можно было наблюдать разрывы и трещины в срезах, что может быть связано со сроком хранения и обусловлено продолжающимся воздействием остаточного количества формальдегида [6]. При расплавлении с повторной заливкой биоматериала новым парафином и изготовлении микропрепаратов качество изготовленных срезов оценивалось как удовлетворительное.

В исследованных нами готовых микропрепаратах, хранившихся более 1,5 лет, наблюдалось отслоение покровных стекол и нарушение целостности заключенных срезов (рисунок 4). Артефакты можно было убрать при перезаключении препаратов (рисунок 5).

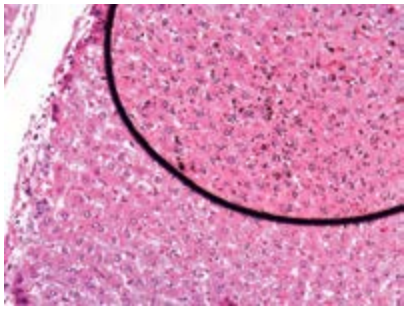


Рисунок 4. Печень. Готовый микропрепарат. Срок хранения – 2,5 года. Отслоение покровного стекла. Ув. 100. Окраска ГЭ

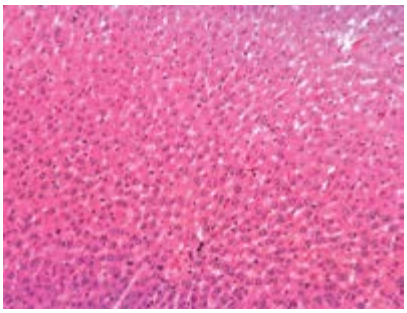


Рисунок 5. Печень. Готовый, перезаключенный микропрепарат. Срок хранения – 2,5 года. Ув. 100. Окраска ГЭ

В качестве эталонных микропрепаратов мы использовали «свежие», неархивированные гистологические стекла. В указанном материале не было выявлено каких-либо артифициальных изменений, отмеченных в материале с более долгими сроками хранения (рисунок 6, 7).

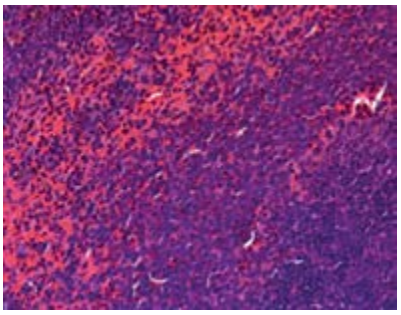


Рисунок 6. Селезенка. Свежий материал. Ув. 200. Окраска ГЭ

Нами установлено, что использованная тара для хранения влажного архива не оказывает влияния ни на сохранность тканей, ни на качество изготовленных срезов. Для гистологических контейнеров и герметичных полиэтиленовых пакетов выраженность артифициальных изменений была сопоставима.

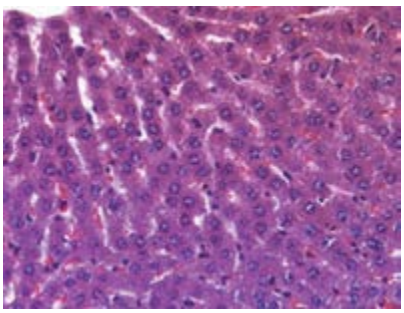


Рисунок 7. Печень. Свежий материал. Ув. 200. Окраска ГЭ

Выраженность артифициальных изменений, возникающих с течением времени, приведена в таблице 2.

Таблица 2.

Выраженность артифициальных изменений в архивном материале при различных сроках хранения (сумма баллов)

Срок хранения	Влажный архив			Готовые микропрепараты	Блочный архив
	Появление формалинового пигмента	Лизис структур	Уплотнение материала	Отслоение покровных стекол	Ухудшение качества парафина
3 года	33	11	22	7	11
2,5 года	26	10	18	6	11
2 года	17	5	6	3	3
1,5 года	10	3	2	0	0
1 год	8	0	0	0	0
6 месяцев	4	0	0	0	0
3 месяца	0	0	0	0	0
Свежий, неархивированный материал	0	0	0	0	0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы методом ретроспективной валидации были выявлены и оценены артефакты, возникающие при хранении материалов в гистологическом архиве. В готовых микропрепаратах, парафиновых блоках и вновь изготовленных срезах материала из влажного архива при сроках хранения до 1 года артифициальные изменения, связанные с хранением, отсутствовали. В материале влажного архива сроком хранения от 1 до 1,5 лет изменения носили единичный характер и были представлены появлением формалинового пигмента в ткани селезенки. В дальнейшем, при хранении от 1,5 до 3 лет, количество артефактов увеличивалось: возрастало отложение формалинового пигмента, а также отмечались лизис структур и уплотнение материала. В готовых микропрепаратах по истечении 2,5 лет хранения нами было установлено отслоение покровных стекол. В парафиновых блоках по истечении того же времени выявлялось ухудшение качества парафина, приводящее к изготовлению микропрепаратов с дефектами в виде разрывов и трещин в срезах. Выраженность установленных нами артефактов не зависела от вида упаковки влажного архива. При использовании гистологических контейнеров и в случае применения герметичных полиэтиленовых пакетов отмечались одинаковые по своему составу и количеству изменения, возникающие по прошествии одинакового времени. Необходимо отметить, что артефакты, проявляющиеся в готовых микропрепаратах со сроком хранения 2,5 года и выше, возможно расценивать как затрудняющие, но не нарушающие диагностику. При этом артефакты, возникающие во вновь изготовленных микропрепаратах из хранящихся в течение 2,5 лет парафиновых блоков, затрудняют изготовление качественных срезов и последующую диагностику, но могут быть исправлены при перезаливке материала. Таким образом, оптимальный срок хранения биоматериала влажного архива, фиксированного в 10% растворе формалина, составляет один год; для парафиновых блоков и микропрепаратов – два с половиной года, но при необходимости может быть увеличен до трех лет.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».
2. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 6 июня 2013 г. № 354н «О порядке проведения патологоанатомических вскрытий».
3. Федеральный закон от 22 октября 2004 г. № 125-ФЗ «Об архивном деле в Российской Федерации».
4. ГОСТ 31882-2012. Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Организация и контроль архивов.
5. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 12 мая 2010 г. № 346н «Об утверждении порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации».
6. А.Н. Ваганова. Гистотехнические решения для повышения качества препаратов нуклеиновых кислот, выделенных из парафиновых блоков // Гены & Клетки. 2014. № 2. С. 96–101.

УДК 615.21

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВОЙ МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ АЛКОГОЛЯ

Н.В. Ламанова[1]*, В.А. Баринов[2], Е.А. Рудько[1], А.В. Малинин[1]

1 – Федеральное государственное унитарное предприятие «Научный центр «Сигнал», 107014, Россия, г. Москва, ул. Нагатинская, 16А/5

2 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии ФМБА России», 192019, Россия, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

1 – FGUP Scientific Centre «Signal», 16A/5, Nagatinskay str., Moscow, 107014, Russia

2 – FGBUN «Institute of the Toxicology FMBA of Russia», 1, Bekhtereva str., St.-Petersburg, 192019, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: nevesenko26@yandex.ru

Резюме. Изучена фармакологическая активность комбинированного препарата на основе сухого экстракта бетулина, пиридоксина гидрохлорида, аскорбиновой и янтарной кислоты при наркозном действии этанола. Показано, что ежедневное применение комбинированного препарата на фоне субхронической алкогольной интоксикации предупреждает развитие резистентности к этиловому спирту. Как при однократном, так и при хроническом введении этанола изученный комбинированный препарат достоверно снижает его наркозное действие.

Ключевые слова: комбинированный препарат, бетулин, пиридоксина гидрохлорид, кислота аскорбиновая, кислота янтарная, токсическое действие алкоголя, алкогольный наркоз, субхроническая алкогольная интоксикация.

THE STUDY OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF NEW MULTICOMPONENT SYSTEM AT THE TOXIC EFFECT OF ALCOHOL

N.V. Lamanova[1]*, V.A. Barinov[2], E.A. Rud'ko[1], A.V. Malinin[1]

Abstract. The pharmacological activity of the combined formulation including ethanol-induced narcosis was studied. It is shown that the daily use of the combined formulation on the background of subchronic alcohol intoxication prevents the development of resistance to ethanol and reduces ethanol-induced narcosis both at single and prolonged administration.

Keywords: the combined formulation, toxic effect of alcohol, ethanol-induced narcosis, subchronic alcohol intoxication.

ВВЕДЕНИЕ

Алкоголизм, его распространенность и обусловленные им негативные социальные и медицинские последствия являются серьезной проблемой в системе здравоохранения. Как известно, употребление алкоголя приводит к нарушению регуляторных и зрительно-пространственных функций, снижению способностей к вербальному и невербальному абстрагированию, обучению, снижению концентрации внимания, нарушению памяти [1, 2].

В связи с этим поиск и разработка препаратов, оказывающих детоксицирующее и противоалкогольное действие, продолжает оставаться актуальной задачей фармацевтической науки. В настоящее время разработано и предложено множество лекарственных препаратов и биологически активных добавок, ослабляющих опьяняющее действие алкоголя, значительное количество которых относится к средствам растительного происхождения [3]. В качестве перспективных препаратов, обладающих способностью снижать токсическое действие алкоголя, также могут рассматриваться витамины и органические кислоты.

Так, в комплексной терапии острой алкогольной интоксикации с успехом применяются пиридоксина гидрохлорид (витамины B_6), цианокобаламин (витамин B_{12}) и аскорбиновая кислота (витамин С). Снижение опьяняющего действия алкоголя витаминами может быть объяснено как ускорением метаболизма самого этанола, так и их оптимизирующим влиянием на энергетический обмен в организме, в том числе в центральной нервной системе, а также их протекторным действием в отношении алкогольиндуцированных токсических поражений печени за счёт антиоксидантной активности [4–7].

После употребления спиртных напитков в крови повышается концентрация ацетальдегида, что приводит к нарушению окислительно-восстановительных процессов в организме и, соответственно, накоплению токсических продуктов разложения алкоголя. Как средство для нивелирования данного процесса хорошо зарекомендовала себя янтарная кислота, которая активизирует энергетический об-

мен в тканях, оказывает иммуномодулирующее действие, увеличивает сопротивляемость организма к стрессам. Кроме того, она обладает свойством повышать активность клеточного дыхания, укрепляет иммунитет и защищает организм от различных токсических отравлений [8, 9]. Увеличение концентрации янтарной кислоты в организме помогает справиться с интоксикацией и ускорить процесс окисления ацетальдегида [3].

Новым и весьма перспективным с точки зрения снижения алкогольной интоксикации биологически активным веществом растительного происхождения является бетулин – тритерпеноид, выделяемый из верхнего слоя коры берёзы (бересты). В многочисленных экспериментах бетулин обнаружил отчётливые гепатопротекторные, противовоспалительные, гиполипидемические, антиоксидантные, а также дезинтоксикационные свойства, при этом проявляя минимум отрицательных побочных эффектов [10–12]. Кроме того, в опытах на экспериментальных животных доказано, что применение бетулина значительно снижает уровень похмельного синдрома и предотвращает алкогольную интоксикацию [13].

На основании вышеизложенного в ходе проведенных исследований нами был разработан комбинированный препарат, включающий в свой состав сухой экстракт бетулина (ООО «БетулаФарм», Россия), пиридоксина гидрохлорид (Hubei Maxpharm Industries Co. Ltd, Китай), кислоту аскорбиновую (ОАО «Полисинтез», Россия), кислоту янтарную (ООО «Полисинтез», Россия) в соотношении 150,0:15,0:250,0:100,0 мг соответственно. Выбранная дозировка действующих веществ соответствует рекомендованным терапевтическим дозам официальной медицины. Пересчет доз с человека на лабораторных животных осуществляли в соответствии с требованиями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [14].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении фармакологической активности нового комбинированного препарата на основе сухого экстракта бетулина, пиридоксина гидрохлорида, аскорбиновой и янтарной кислоты при токсическом действии алкоголя по показателю продолжительности этанолового наркоза при субхронической алкогольной интоксикации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Противоалкогольную активность нового комбинированного препарата оценивали по данным теста «Оценка проявления антагонизма в отношении наркозного действия этанола» [3, 14, 15].

Эксперимент проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 280±50 г, полученных из питомника «Андреевка» (Московская область). Животные содержались в виварии в стандартных условиях при температуре 22±2 °С, 12-часовом световом цикле и свободном доступе к корму и воде. Содержание и обращение с экспериментальными животными соответствовали приказу МЗС РФ от 23.08.2010 № 708Н «Об утверждении правил лабораторной практики» и Директиве ЕП и СЕС от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. Перед исследованиями животных выдерживали в карантине в течение 7 дней с целью адаптации к условиям вивария, затем взвешивали и равномерно распределяли на 2 группы – «Контроль» и «Опыт» – по 10 животных в каждой группе. Эксперимент на крысах контрольной и опытной групп проводили параллельно.

Моделирование субхронической алкогольной интоксикации проводили путем внутрибрюшинного введения 25%-го раствора этанола в дозе 3 г/кг в пересчёте на чистый алкоголь (доза, вызывающая наркоз у крыс) в течение 21 дня каждые 3 дня. Объем вводимого этанола рассчитывался в зависимости от массы крысы.

Каждой из крыс группы «Опыт» ежедневно внутрижелудочно через зонд вводили водную взвесь испытуемого препарата в дозе 44 мг/кг. Крысам группы «Контроль» аналогично вводили изоэквивалентный объём дистиллированной воды.

В день введения этанола крысы опытных групп получали исследуемый препарат за 1 ч до применения этилового спирта. По такому же графику получали воду контрольные животные.

Для каждого животного опытной и контрольной группы после внутрибрюшинного введения этанола фиксировали показатели, характеризующие наркозное действие алкоголя: латентный период – время от введения этанола до наступления наркоза в секундах; продолжительность наркоза – время от наступления наркоза до его окончания в минутах. Критерием нахождения животного в наркозе являлось его боковое положение на горизонтальной плоскости.

Изучение продолжительности наркозного действия этанола проводили в 1-й и 21-й день эксперимента.

Результаты обрабатывались статистически при помощи пакета программ Microsoft Excel (ver. 97-2013, Microsoft Corporation, USA) и StatPlus (ver. 5.3.5, AnalystSoft Inc., USA) для Windows. Определяли среднее арифметическое ($\bar{x}$), ошибку среднего (m), различия между группами оценивали по критериям Вилкоксона и Манна – Уитни. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента было выявлено, что уже при однократном применении исследуемый препарат снижает наркозное действие этанола (таблица 1).

Таблица 1.

Влияние комбинированного препарата на наркозное действие этанола (3 г/кг при внутрибрюшинном введении) при однократном и продолжительном введении этанола

Группа	Контроль		Опыт	
	Латентный период, с $\bar{x} \pm m$	Продолжительность наркоза, мин $\bar{x} \pm m$	Латентный период, с $\bar{x} \pm m$	Продолжительность наркоза, мин $\bar{x} \pm m$
1-й день эксперимента	236,3 ± 67,2	151,0 ± 27,2	370,0 ± 125,9*	78,8 ± 13,9*
21-й день эксперимента	414,4 ± 136,1**	76,6 ± 15,4**	697,1 ± 232,3	91,5 ± 29,3

Примечание: $\bar{x}$ – среднее значение;
M – стандартная ошибка средней;
* – достоверное различие с группой «Контроль» ($p \leq 0,05$);
** – достоверное различие с показателями животных этой же группы в 1-й день эксперимента ($p \leq 0,05$);

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что предварительное однократное пероральное применение комбинированного препарата практически вдвое снижало наркозное действие этанола у животных из группы «Опыт». В 1-й день наркоз у группы «Контроль» после внутрибрюшинного введения этанола продолжался в среднем 151,0±27,2 мин, а у крыс, получивших предварительно за 1 ч комбинированный препарат, это время составило 78,8±13,9 мин при $p \leq 0,05$.

На 21-й день эксперимента у животных группы «Контроль» наблюдалось достоверное уменьшение продолжительности наркоза на 45% (с 151,0±27,2 до 76,6±15,4 мин) по сравнению с этими показателями той же группы в 1-й день эксперимента и повышение показателя латентного периода более чем в 1,75 раза. Это свидетельствует о том, что регулярное применение этанола привело к выработке резистентности к этиловому спирту. Ежедневное применение комбинированного препарата на фоне интоксикации этанолом предупреждало развитие этой резистентности. По результатам экспериментальных данных не отмечено достоверного различия показателей этанолового наркоза в 1-й и 21-й день эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе экспериментальных исследований показано, что разработанный комбинированный препарат, содержащий в своем составе бетулин, пиридоксина гидрохлорид, янтарную и аскорбиновую кислоты, перспективен в качестве фармакологического средства, снижающего токсическое действие алкоголя. Установлено, что он проявляет отчётливый антагонизм с этанолом по показателю продолжительности этанолового наркоза, снижая продолжительность наркоза по сравнению с контрольными животными, и достоверно повышает продолжительность латентного периода.

Установлено, что ежедневное применение нового комбинированного препарата на фоне субхронической алкогольной интоксикации предупреждает развитие резистентности к этанолу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л.Б. Лазебник, Л.Д. Фирсова. Алкогольная болезнь печени; психические и поведенческие расстройства в результате употребления алкоголя // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2009. № 3. С. 130–136.
2. Ю.П. Сиволап, И.В. Дамулин, В.А. Савченков и др. Когнитивные расстройства у лиц, злоупотребляющих алкоголем // Неврология. Психиатрия. 2007. № 3(22). С. 51.
3. Патент РФ № 2229304. МПК7 A 61 K 35/78, A 61 P 25/32. Средство протрезвляющего действия / Д.Н. Мясников, А. Кашлинский; заявители и патентообладатели Мясников Д.Н., Кашлинский А. – № 2003116624/152003116624/15; заявл. 05.06.2003; опубл. 27.05.2004.
4. Патент РФ № 2435415. (51) МПК A 23 L 1/30, A 23 L 1/302, A 61 K 36/00, A 61 P 25/32. Композиция биологически активных веществ на основе бетулина с регулируемой скоростью высвобождения компонентов для снижения степени алкогольного опьянения, предупреждения и снятия алкогольной интоксикации и похмельного синдрома. Заявитель и патентообладатель ЗАО «СНС-Фарма». – № 2009101508/13; заявл. 19.01.2009; опубл. 20.12.2011.
5. В.П. Нужный. Вега+ // Наркология. 2002. № 2. С. 45–48.
6. Э.С. Токаев, Н.П. Блохина, Е.А. Некрасова. Биологически активные вещества, улучшающие функци-

ональное состояние печени // Вопросы питания. 2007. Т. 76. № 4. С. 4–9.

7. О.А. Громова, И.Ю. Торшин, Е.Ю. Лисицына. Гепатопротекторные свойства витаминов в преконцепции и при беременности // Земский врач. 2011. № 4(8). С. 23–28.
8. В.В. Багметова, А.Н. Кривицкая, И.Н. Тюренков и др. Экспериментальное сравнение ноотропных свойств аналога ГАМК фенибута и его соли с янтарной кислотой // Вестник новых медицинских технологий. 2012. Т. XIX. № 4. С. 53–55.
9. Е.В. Никитина, Н.К. Романова. Янтарная кислота и ее соли как индивидуальные антиоксиданты и генопротекторы // Вестник Казанского технологического университета. 2010. № 10. С. 375–381.
10. О.Р. Грек, В.В. Иванова, М.А. Карпов и др. Гепатопротекторное действие водно-спиртового экстракта диспергированной бересты при остром отравлении парацетамолом // Медицина и образование в Сибири. 2014. № 5. С. 1–8.
11. Ю.К. Василенко, В.Ф. Семенченко, Л.М. Фролова и др. Фармакологические свойства тритерпеноидов коры березы // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1993. Т. 56. С. 53–55.
12. Ю.В. Легостаева. Фармакогностическое исследование бересты и перспективы ее использования в медицине: автореф. дисс. … к. фарм. н. – Самара. 2015. 24 с.
13. Патент РФ № 2183965. МПК7 А 61 К 35/78, А 61 Р 25/30. Способ профилактики и лечения алкогольной интоксикации / Г.В. Сироткин, Ю.И. Стернин; заявители и патентообладатели Г.В. Сироткин, Ю.И. Стернин. – № 2001117456/14; заявл. 27.06.2001; опубл. 27.06.2002.
14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
15. Патент РФ № 2407538. МПК7 А 61 К 35/78, А 61 Р 25/32. Средство, обладающее протрезвляющим действием при алкогольной интоксикации и снижающее концентрацию алкоголя в крови. Заявитель и патентообладатель ФГУ «Национальный научный центр наркологии федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию». – № 2009122279/15: заявл. 11.06.2009; опубл. 27.12.2010.

INTEGRA

НОВЫЙ ДОЗАТОР
EVOLVE
MANUAL PIPETTES
ОТ INTEGRA

Кол-во каналов	1	8	12
Диапазон измерений пипетирования	0,2–2 мкл 1–10 мкл 2–20 мкл 20–200 мкл 100–1000 мкл 500–5000 мкл	1–10 мкл 5–50 мкл 10–100 мкл 20–200 мкл	1–10 мкл 5–50 мкл 10–100 мкл 20–200 мкл

Пипетка EVOLVE от Integra – скорость выбора объема пробы в одно касание!

Pharmcontract group of companies
+7 (495) 252-00- 98 (ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
8 800 775-87-10 (БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
www.phct.ru
info@phct.ru

УДК 615.015.4

1 – ФГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, Трубецкая ул., 8, стр.2

2 – ФГБУ «Государственный Научный Центр Институт Иммунологии» Федерального Медико-Биологического Агентства России, 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, 24, корп. 2

1 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – National Research Center Institute of Immunology Federal Medical Biological Agency of Russia, 24/2, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail:
egorenkov.eugene@gmail.com
Тел.: +7 (916) 740 78 93

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ЛЕКАРСТВЕННОЙ АЛЛЕРГИЕЙ «КОКТЕЙЛЬНЫМ» МЕТОДОМ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ

Е.А. Егоренков[1,2]*, В.В. Смирнов[1,2], Т.Н. Мясникова[2], Т.С. Романова[2]

Резюме. Проведено исследование с целью определения активности основных ферментов метаболизма системы цитохрома Р450 «коктейльным» методом у пациентов, страдающих лекарственной аллергией с различными сопутствующими заболеваниями, и определения наличия зависимости между возникновением лекарственной аллергией и измененной активностью основных изоферментов CYP.

Ключевые слова: цитохром Р450, CYP, коктейльный метод, фенотипирование, лекарственная аллергия.

METABOLIC ACTIVITY STUDY IN PEOPLE WITH DRUG ALLERGY USING «COCKTAIL» PHENOTYPING METHOD

E.A. Egorenkov[1,2]*, V.V. Smirnov[1,2], T.N. Myasnikova[2], T.S. Romanova[2]

Abstract. Study of main CYP isoforms activity using «cocktail» method was conducted on patients suffered from drug allergy with different concurrent diseases in order to determine the presence of correlation between drug allergy appearance and changes in biotransformation activity.

Keywords: cytochrome P450, CYP, «cocktail» method, phenotyping, drug allergy.

ВВЕДЕНИЕ

Большинство лекарственных веществ, как и любых ксенобиотиков, попадающих в человеческий организм, подвергаются метаболизму с целью ускорения выведения из организма. Одной из основных систем метаболизма является система цитохрома Р450, которая представлена многочисленными изоферментами. Каждый из изоферментов обладает сродством к специфическим субстратам и выполняет определённую функцию в процессе метаболизма [1]. Активность изоферментов CYP отличается от человека к человеку и зависит не только от генетических факторов, а так же от пищевого рациона, сопутствующих заболеваний, принимаемых лекарственных веществ, общего состояния организма и многих других. В последнее время становится более актуальным вопрос определения активности метаболизма с целью минимизации риска возникновения различных нежелательных лекарственных явлений, которые могут быть вызваны как повышенной, так и пониженной активностью изоферментов CYP. [2]. Чаще всего в описанной литературе для определения активности изоферментов CYP *in vivo* используется метод фенотипирования, который заключается в прямом определении активности того или иного фермента метаболизма лекарственных средств по фармакокинетике его специфического («маркерного») субстрата и его метаболита [3]. Активность определяется путем измерения концентрации субстрата и его метаболита в плазме крови или в моче. На основании этих данных рассчитывается так называемое «метаболическое отношение», равное отношению концентрации субстрата к концентрации его метаболита [4]. Для совместного определения активности сразу нескольких изоферментов разрабатываются «коктейльные» методы, заключающиеся в одновременном приёме нескольких субстратов и параллельном определении активности изоферментов, метаболизирующих данные субстраты [5]. Лекарственная аллергия, являясь вторичной реакцией организма на лекарственные вещества, может проявляться такими неблагоприятными симптомами, как отёк Квинке, эритема, крапивница, анафилактичес-

кий шок. К группе риска развития лекарственной аллергии относятся люди с измененной активностью метаболизма, особенно при совместном приёме нескольких лекарственных средств [6]. Авторами был разработан собственный «коктейльный» метод, который использовался для определения наличия зависимости риска возникновения лекарственной аллергии от изменений в активности основных изоферментов системы цитохрома Р450.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимало участие 60 человек, мужчины и женщины от 15 до 85 лет, поделенных на 3 группы по 20 человек. В 1-ую группу входили пациенты с различными сопутсвующими патологиями (артроз, тиреотоксикоз, гастрит, ринит и др.), у которых возникла лекарственная аллергия на лекарственные вещества различных фармакологических групп. Во 2-ую группу входили пациенты с лекарственной аллергией на нестероидные противовоспалительные средства, которые им были назначены для лечения хронической сердечной недостаточности. 3-я группа – контрольная, в нее входили пациенты, у которых не имелась лекарственная аллергия в анамнезе. У пациентов 1-ой группы определялась активность изоферментов CYP3A4 и CYP2D6. У испытуемых из 2-ой и 3-ей группы определялась активность изоферментов CYP3A4, CYP2D6 и CYP2C9. Для определения активности CYP2C9 пациентам однократно назначался лозартан (25 мг). Определение активности CYP3A4 и CYP2D6 проводилось по специфическим эндогенным субстратам – кортизолу и пинолину. Таким образом, активность ферментов определялась по отношению концентраций в биожидкости (т.н. «метаболическое отношение») изучаемых пар субстрат/метаболит, а именно: лозартан/Е-3174 (CYP2C9), кортизол/6-β-гидроксикортизол (CYP3A4) и пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин (CYP2D6). Количественное определение веществ проводилось собственным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. В качестве исследуемой биожидкости использовалась моча, полученная через 4 ч после приёма лозартана. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы IBM SPSS Statistics, версия 23.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенной статистической обработки данных были получены следующие значения «метаболических отношений», приведённые в таблице 1.

Значения «метаболических отношений» изоферментов высоко вариативны, что говорит об изначальном различии активности данных изоферментов у каждого испытуемого.

Для выявления статистически значимых различий между значениями «метаболических отношений» между группами был проведён Т-тест для независимых выборок (a=0,05).

Таблица 1.

Полученные значения «метаболических отношений»

	«Метаболическое отношение»		
	CYP3A4	CYP2D6	CYP2C9
1-ая группа	5,014 ±2,357	1,242±0,710	–
2-ая группа	16,823±13,406	1,334±0,930	2,139±0,908
3-я группа	4,024±4,243	1,743±1,604	2,152±1,649

Таблица 2.

Результаты Т-теста для независимых выборок

Анализируемые пары	Значимость полученного t-критерия		
	CYP3A4	CYP2D6	CYP2C9
1-ая группа – контрольная группа	0,367	0,210	---
2-ая группа – контрольная группа	0,000	0,330	0,976
1-ая группа – 2-ая группа	0,000	0,728	---

Из полученных данных видно, что с 95% вероятностью имеются статистические различия в активности изофермента CYP3A4 между 1-ой группой и контрольной группой, а также 1-ой группой и 2-ой группой. Активность же других изоферментов статистически не отличается. Таким образом, хроническая сердечная недостаточность как патология может оказывать влияние на метаболическую активность изофермента CYP3A4. Данный изофермент участвует в биотрансформации порядка 70% известных лекарственных веществ, в том числе и нестероидные противовоспалительные средства [1]. Следовательно, на фоне измененной активности изофермента CYP3A4 ввви-

ду наличия такого сопутствующего заболевания, как хроническая сердечная недостаточность, могла произойти вторичная реакция организма на принимаемые препараты в виде лекарственной аллергии. Отсутствие статистически значимых различий в активности изоферментов между 1-ой и контрольной группами говорит о том, что измененная активность ферментов метаболизма – далеко не единственный фактор, вызывающий лекарственную аллергию. К тому же, в виду включения в 1-ую группу пациентов с различными заболеваниями, поражающими различные системы органов, так же подтверждается тот факт, что не каждое заболевание влияет на метаболическую активность организма. Для более детального исследования данного вопроса следует увеличить выборку испытуемых, имеющих в анамнезе лекарственную аллергию, а так же разделять их по группам в зависимости от заболевания и пораженной системы органов, с целью получения более информативных данных о влиянии соответствующих заболеваний на активность метаболизма человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённого исследования были получены данные о возможной зависимости между возникновением лекарственной аллергии и изменении активности изофермента CYP3A4. Так же полученные данные свидетельствуют о том, что такое заболевание, как хроническая сердечная недостаточность, может вносить изменения в активность метаболических процессов организма в целом, что следует учитывать при назначении лекарственных препаратов с целью минимизации риска возникновения различных нежелательных лекарственных реакций, в том числе лекарственной аллергии. С целью подтверждения полученных данных, а так же для выявления зависимости между изменением активности основных ферментов метаболизма цитохрома Р450 и возникновением лекарственной аллергии, следует провести дополнительные исследования с увеличенной выборкой и распределением испытуемых по группам в зависимости от сопутствующего заболевания. Разработанный и используемый в данной работе «коктейльный» метод определения активности изоферментов цитохрома Р450 получил подтверждение пригодности для рутинного определения активности метаболической системы пациентов в клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. В.Г. Кукес. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. – М.: Издательство «Реафарм», 2004. 144 с.
2. Е.А. Егоренков, В.В. Смирнов. «Коктейльные» методы определения метаболической активности изоферментов цитохрома р-450 *in vivo* с помощью биоаналитических методик: обзор существующих методик и перспектива их использования в клинической практике. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1 (14). С. 184–188.
3. C.F. Samer et al. Applications of CYP450 testing in the clinical setting // Molecular Diagnosis & Therapy. 2013. V. 17(3). P. 165–184.
4. Р.Х. Абдрашитов, А.Е. Петухов, В.В. Смирнов. Разработка и валидация биоаналитической методики количественного определения пинолина и его метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидробета-карболина с целью определения активности изофермента CYP2D6. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1 (14). С. 190–194.
5. Handbook of drug metabolism, Second Edition / Ed. by Paul G. Pearson and Larry C. Wienkers – Florida: CRC Press, 2008. 675 p.
6. Drug allergy: an updated practice parameter / Ed. by R. Solensky and D.A. Khan. Annals of allergy, asthma & immunology. 2010. V.10. P.273e1-e78.

ГОТОВЫЕ РЕШЕНИЯ ПО СОЗДАНИЮ И ОСНАЩЕНИЮ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ КЛИНИК (ВИВАРИЕВ) ПО СТАНДАРТАМ GLP

ВИВАРИЙ - ВАЖНАЯ ЧАСТЬ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИСПЫТАТЕЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ, ЗАНИМАЮЩИХСЯ РАЗРАБОТКОЙ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Ведущий химико-фармацевтический холдинг России ГК «Фармконтракт» оказывает широкий спект услуг по созданию вивария с нуля, проводит реконструкцию объекта, выполняя проектирование, строительно-монтажные работы и оснащая/переоснащая помещения соответствующим типом оборудования от известных мировых производителей, для проведения доклинических исследований инновационных лекарственных препаратов, дженериков, БАВ.

Помещения для содержания животных
SPF-животных и нестерильных конвенциональных животных

Биохимические и гематологические лаборатории

Гистологические лаборатории

Помещения для хранения фармацевтических субстанций и препаратов

Соответствующая международным стандартам GLP лаборатория доклинических испытаний позволяет проводить исследования по изучению токсикологических воздействий на живой организм, оценку эффективности действия разработанных молекул на патофизиологические состояния биологических тест-систем, фармакокинетики и фармакодинамики препаратов.

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 800 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
info@phct-group.com

УДК 615.03

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОКСИФЛОКСАЦИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ С УФ-ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Т.Н. Комаров[1]*, Ю.В. Медведев[1,2], И.Е. Шохин[1], Ю.Е. Болдина[1], А.А. Львова[1], Е.С. Мельников[1], Е.Н. Фишер[1,2], Р.В. Иванов[3], Р.Й. Максвитис[3]

1 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, 20, стр. 3

2 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8

3 – ООО «ЭР ЭНД ДИ ФАРМА», 115088, г. Москва, ул. Угрешская, 2, стр. 31

1 – Center of Pharmaceutical Analytics Ltd., 20, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

2 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

3 – R&D PHARMA Ltd., 2/31, Ugreshskaya str., Moscow, 115088, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: t.n.komarov@yandex.ru

Резюме. Разработана методика определения моксифлоксацина в плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с применением хроматографической системы Agilent 1290 Infinity II. Пробоподготовку проводили путем осаждения белков плазмы 50% раствором трифторуксусной кислоты. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность образцов. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 100–5000 нг/мл в плазме крови. Предел обнаружения методики составил 31 нг/мл. Разработанная методика может быть применена для фармакокинетических исследований моксифлоксцина, в том числе исследования биоэквивалентности.

Ключевые слова: моксифлоксацин, плазма, ВЭЖХ-УФ.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF MOXIFLOXACIN DETERMINATION IN HUMAN PLASMA BY HPLC-UV METHOD

T.N. Komarov[1]*, Yu.V. Medvedev[1,2], I.E. Shohin[1,2], Yu.E. Boldina[1], A.A. Lvova[1], E.S. Melnikov[1], E.N. Fisher[1,2], R.V. Ivanov[3], R.J. Maksvitis[3]

Abstract. A new method for determination of moxifloxacin in human plasma using HPLC with UV-detection is described. The sample preparation was made by protein precipitation by 50% trifluoracetic acid solution. The method was validated in terms of selectivity, calibration curve, accuracy, precision, lower limit of quantification, carry-over and stability. The analytical range was 100–5000 ng/mL. Limit of determination was 31 ng/mL. Method could be applied to moxifloxacin determination in plasma for PK and BE studies.

Keywords: moxifloxacin, plasma, HPLC-UV.

ВВЕДЕНИЕ

Моксифлоксацин (1-циклопропил-6-фтор-1,4-дигидро-8-метокси-7-[(4aS,7aS)-октагидро-6H-пирроло[3,4-b]пиридин-6-ил]-4-оксо-3-хинолин-карбоновая кислота (выпускается в виде гидрохлорида, м.м. 401,434 г/моль, pKa=5,69) – противомикробный препарат из группы фторхинолонов IV поколения, в основе которого лежит ядро хинолина, гетероцикла с одним гетероатомом азота пиридинового типа. Структурная формула моксифлоксацина приведена на рисунке 1.

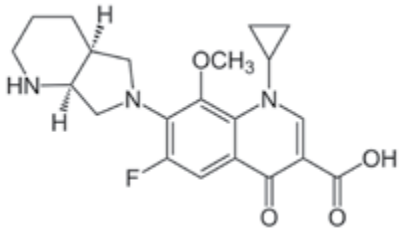


Рисунок 1. Структурная формула моксифлоксацина

Моксифлоксацин ингибирует топоизомеразу II и топоизомеразу IV, нарушает синтез ДНК микробной клетки. Моксифлоксацин активен в отношении большинства штаммов аэробных грамположительных микроорганизмов – *Enterococcus faecalis* (только штаммы, чувствительные к ванкомицину и гентамицину), *Staphylococcus aureus* (только метициллиночувствительные штаммы), *Streptococcus anginosus, Streptococcus constellatus, Streptococcus pneumoniae* (включая мультирезистентные штаммы), *Streptococcus pyogenes*; аэробных грамотрицательных микроорганизмов – *Enterobacter cloacae, Esherichia coli, Haemophilus influenzae, Haemophilus parainfluenzae, Klebsiella pneumoniae, Moraxella catarrhalis, Proteus mirabilis*, анаэробных микроорганизмов – *Bacteroides fragilis, Bacteroides thetaiotaomicron, Clostri-*

dium perfringens, Peptostreptococcus spp., а также других микроорганизмов – *Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae*.

Перекрестная резистентность между моксифлоксацином и другими классами противомикробных средств (включая макролиды, бета-лактамные антибиотики, аминогликозиды, тетрациклины) не известна [1].

Для количественного определения моксифлоксацина в плазме крови применяются методы ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием после осаждения белков хлорной кислотой (предел количественного определения – 125 нг/мл) [2], флуориметрическим детектированием с предколоночной дериватизацией 4-хлоро-7-нитробензодиоксазолом (предел количественного обнаружения – 15 нг/мл) [3], УФ-спектрофотометрическим детектированием после проведения жидкость-жидкостной экстракции (предел количественного обнаружения – 0,05 мкг/мл) [4]. Приведенные в литературе аналитические диапазоны данных методов позволяют считать их пригодными для фармакокинетических исследований препаратов моксифлоксацина. В описанных методиках в качестве внутреннего стандарта используются левофлоксацин, ципрофлоксацин. В качестве пробоподготовки применяют методы жидкость-жидкостной экстракции, осаждения белков.

Целью исследования было разработать и валидировать методику определения моксифлоксацина в плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-детектированием для проведения фармакокинетических исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity II, оснащенном 4-канальным градиентным насосом, автосамплером, термостатом колонок и диодно-матричным детектором. Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения ChemStation, ver. C 01.07, Agilent Technologies, США.

Условия хроматографирования

Колонка: Agilent Zorbax Eclipse Plus, 150×4,6 мм, 5 мкм, с предколонкой 12,5×4,6 мм, 5 мкм.

Температура термостата колонок: 60 °С.

Температура термостата автосамплера: 15 °С.

Подвижная фаза: элюент А: раствор кислоты трифторуксусной с pH 2,5, элюент В: ацетонитрил для ВЭЖХ, градиентное элюирование (схема представлена в таблице 1).

Таблица 1.

Градиентное элюирование

Время, мин	Элюент А, %	Элюент В, %
0,00	78	22
4,75	78	22
5,00	20	80
7,50	20	80
8,00	78	22
10,00	78	22

Скорость потока: 1,4 мл/мин.

Объем вводимой пробы: 10 мкл.

Время регистрации хроматограммы: 10 мин.

Время удерживания ципрофлоксацина (внутренний стандарт): около 2,0 мин.

Время удерживания моксифлоксацина: около 4,2 мин.

Детектирование: УФ-детектор при длине волны поглощения 291±2 нм.

Частота регистрации сигнала детектора: 2,5 Гц.

Растворы и реактивы

Моксифлоксацина гидрохлорид, субстанция-порошок; ципрофлоксацина гидрохлорид, стандартный образец USP; ацетонитрил (Scharlau, Испания, класс «для ВЭЖХ»); вода Milli-Q; кислота трифторуксусная (Acros Organic, Германия, класс «ос.ч.»).

Исходный раствор, стандартный раствор и рабочие растворы моксифлоксацина и ципрофлоксацина готовили путем растворения навески субстанции ацетонитрилом и хранили в морозильной камере при температуре от –45 °С до –50 °С.

Образцы холостой и исследуемой плазмы крови хранили в морозильнике для плазмы при температуре от –45 °С до –50 °С.

Пробоподготовка

К 600 мкл плазмы крови, помещённым в центрифужные пробирки вместимостью 1,5 мл, прибавляли 50 мкл раствора ципрофлоксацина в ацетонитриле (внутренний стандарт), прибавляли 300 мкл 50%-го раствора ТФУ, встряхивали на шейкере (Reax Top, Heidolph, Германия) в течение 10 мин, затем центрифугировали (Microspin-12, Biosan, Латвия) в течение 15 мин при 14500 об/мин, после чего отбирали 600 мкл надосадочной жидкости, которую переносили в виалы для хроматографа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики

Валидацию методики определения моксифлоксацина в плазме крови проводили на основании «Руководства по экспертизе лекарственных средств» [5], руководства по валидации биоаналитических методик FDA [6] и EMA [7] по следующим характеристикам:

- селективность;
- параметры пригодности хроматографической системы;
- калибровочная кривая (линейность);
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклами);
- предел количественного определения, предел обнаружения;
- перенос пробы;
- стабильность образцов (стабильность исходного и рабочих растворов аналита; стабильность замороженного и размороженного аналита, перемещенного из условий заморозки в комнатную температуру; краткосрочная стабильность аналита в матрице при комнатной температуре; долгосрочная стабильность аналита в матрице при низкотемпературной заморозке).

Селективность

Проводили анализ 6 образцов холостой плазмы из разных источников, образцов холостой плазмы с прибавлением стандартного раствора моксифлоксацина в диапазоне концентраций от 100 нг/мл до 5000 нг/мл, образцов холостой плазмы с прибавлением внутреннего стандарта без прибавления моксифлоксацина. На хроматограммах образцов холостой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания моксифлоксацина и ципрофлоксацина (внутренний стандарт). Соответствующие хроматограммы приведены на рисунках 2 и 3.

Калибровочная кривая

Проводили анализ 8 калибровочных образцов холостой плазмы с прибавлением стандартного раствора моксифлоксацина до получения концентраций: 100 нг/мл, 200 нг/мл, 500 нг/мл, 1000 нг/мл, 1500 нг/мл, 2000 нг/мл, 3000 нг/мл, 5000 нг/мл. Оценка линейности проводилась методом относительной калибровки по пику моксифлоксацина с применением ципрофлоксацина в качестве внутреннего стандарта. По полученным значениям были построены калибровочные графики (калибровочный график № 1 приведен на рисунке 4) совместно с уравнением калибровочной кривой.

Полученные коэффициенты корреляции соответствуют нормам (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в таблицах 2–4.

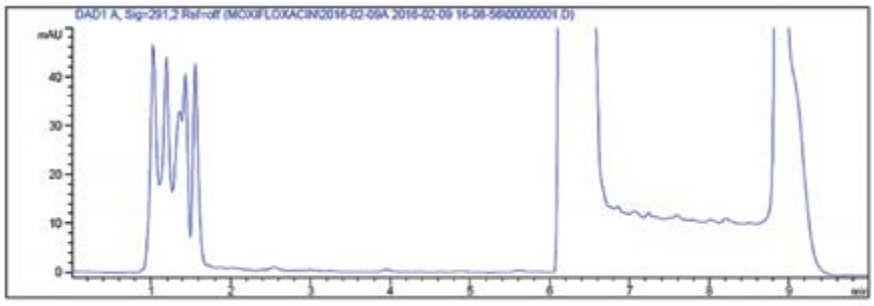


Рисунок 2. Хроматограмма образца холостой плазмы

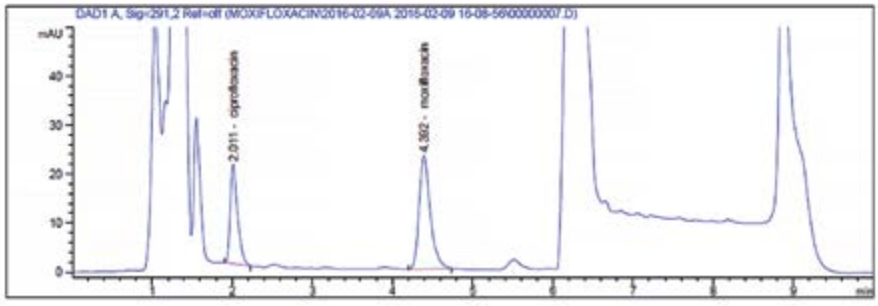


Рисунок 3. Хроматограмма образца холостой плазмы с прибавлением внутреннего стандарта (ципрофлоксацина) и моксифлоксацина (1500 нг/мл)

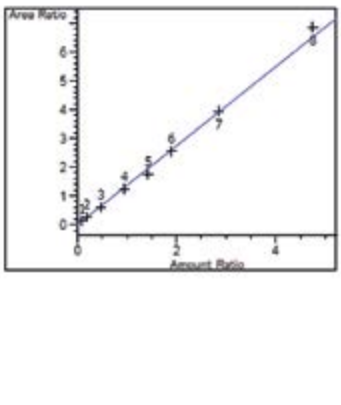


Рисунок 4. Калибровочный график № 1 зависимости отношения площадей пиков моксифлоксацина и внутреннего стандарта от отношения концентраций моксифлоксацина и внутреннего стандарта в плазме (коэффициент корреляции 0,99818)

Таблица 2.

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений, калибровочный график № 1

Концентрация фактическая, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	ε, %	Норма, не более %
100	114,482	14,48	20
200	204,882	2,44	15
500	468,601	6,28	15
1000	950,821	4,92	15
1500	1351,146	9,92	15
2000	1964,679	1,77	15
3000	3019,327	0,64	15
5000	5263,812	5,28	15

Таблица 3.

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений, калибровочный график № 2

Концентрация фактическая, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	ε, %	Норма, не более %
100	86,487	13,51	20
200	194,546	2,73	15
500	426,118	14,78	15
1000	943,421	5,66	15
1500	1316,039	12,26	15
2000	2162,635	8,13	15
3000	2791,134	6,96	15
5000	5407,066	8,14	15

Таблица 4.

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений, калибровочный график № 3

Концентрация фактическая, нг/мл	Концентрация рассчитанная, нг/мл	ε, %	Норма, не более %
100	108,163	8,16	20
200	216,273	8,14	15
500	446,072	11,52	15
1000	970,545	2,95	15
1500	1336,894	10,87	15
2000	2183,075	9,15	15
3000	2789,679	7,01	15
5000	5344,204	6,88	15

Точность и прецизионность

Проводили анализ 4 образцов холостой плазмы с прибавлением стандартных растворов моксифлоксацина до получения концентраций: 100 нг/мл, 500 нг/мл, 3000 нг/мл, 5000 нг/мл. Анализ проводили для 3 последовательностей по 5 образов для каждого уровня концентраций. Исследование проводили в течение 1-й последовательности (внутри цикла), 2-й и 3-й последовательностей (между циклами). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ε, %), приведенные в таблицах 5–7.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (точность) соответствуют нормам (не более 20% для нижнего диапазона линейности, не более 15% для остальных точек).

Предел количественного определения и предел обнаружения

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, точности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация моксифлоксацина в плазме, для которой возможно определение моксифлоксацина со значениями RSD и ε не более 20% в диапазоне линейной зависимости. Предел количественного определения методики составил 100 нг/мл.

За предел обнаружения принималось минимальное значение концентрации моксифлоксацина, для которого обнаруживались пики на хроматограммах,

Таблица 5.

Точность и прецизионность методики (внутри цикла)

введено (нг/мл)	найдено (нг/мл), посл.1	найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, %
100	114,48	97,561	12,300	12,61	2,44
	102,07				
	100,25				
	85,93				
	85,07				
500	468,60	455,491	17,203	3,78	8,90
	478,06				
	445,57				
	436,59				
	448,64				
3000	3019,33	2948,253	101,798	3,45	1,72
	3020,12				
	3028,17				
	2834,06				
	2839,59				
5000	5263,81	5264,297	104,356	1,98	5,29
	5220,66				
	5204,16				
	5188,74				
	5444,11				

Таблица 6.

Точность и прецизионность методики (между циклами 1)

введено (нг/мл)	найдено (нг/мл), посл. 2	найдено (нг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, %
100	86,49	92,485	9,805	10,60	7,52
	88,43				
	87,98				
	86,95				
	87,19				
500	426,12	439,168	20,720	4,72	12,17
	422,74				
	421,77				
	422,61				
	420,99				
3000	2791,13	2845,059	129,529	4,55	5,16
	2732,96				
	2729,75				
	2725,80				
	2729,68				
5000	5407,07	5310,797	87,313	1,64	6,22
	5358,51				
	5333,20				
	5341,77				
	5345,94				

соответствующие по времени удерживания пикам моксифлоксацина. Предел обнаружения методики составил 31 нг/мл.

Стабильность

Оценивалась стабильность анализируемого вещества в составе стандартных растворов, биологической матрицы при хранении, а также после пробоподготовки.

Стабильность была подтверждена для стандартных растворов моксифлоксацина (при хранении раствора в течение 4 недель при температуре от –45 °С до –50 °С), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 72 ч при анализе на следующий день). Образцы выдерживали 3 цикла заморозки-разморозки.

Перенос пробы

При последовательном вводе пробы с концентрацией моксифлоксацина 5000 нг/мл и холостой плазмы на хроматограмме холостой плазмы отсутствовали пики, соответствующие временам удерживания моксифлоксацина и ципрофлоксацина (внутренний стандарт). Перенос пробы отсутствовал.

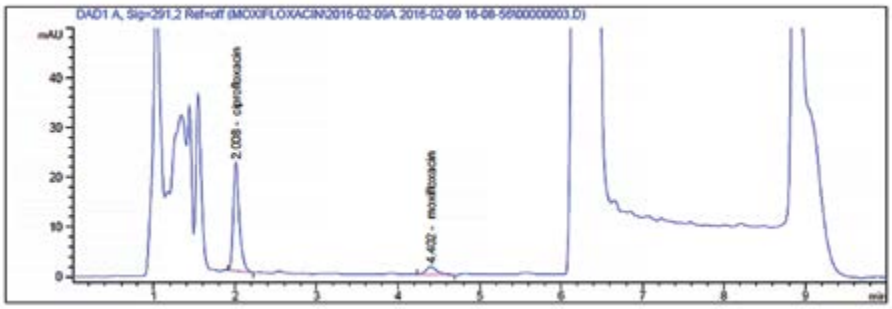


Рисунок 5. **Хроматограмма образца холостой плазмы с прибавлением внутреннего стандарта (ципрофлоксацина) и моксифлоксацина на уровне ПКО**

Таблица 7.

Точность и прецизионность методики (между циклами 2)

введено (нг/мл)	найдено (нг/мл), посл. 3	найдено (нг/мл), среднее значение (n=15)	S.D. (n=15)	RSD, % (n=15)	ε, %
100	108,16	97,911	6,777	6,92	2,09
	105,76				
	110,68				
	100,91				
	118,30				
500	446,07	441,651	21,910	4,96	11,67
	448,62				
	448,07				
	447,88				
	442,45				
3000	2789,68	2824,940	87,994	3,11	5,84
	2788,81				
	2778,34				
	2782,70				
	2783,98				
5000	5344,20	5320,395	138,760	2,61	6,41
	5340,16				
	5347,38				
	5331,73				
	5334,49				

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика определения моксифлоксацина в плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с применением хроматографической системы Agilent 1290 Infinity II. Методика была валидирована в соответствии с требованиями «Руководства по экспертизе лекарственных средств». Разработанная методика может быть применена для фармакокинетических исследований моксифлоксцина, в том числе исследования биоэквивалентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр лекарственных средств России: электронная версия. URL: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2812.htm (дата обращения 28.03.2016).
2. A.K. Hemanth Kumar, G. Ramachandran. Simple and rapid liquid chromatography method for determination of moxifloxacin in plasma // Journal of Chromatography B 2009. V. 877. P. 1205–1208.
3. S.T. Ulu. High-performance liquid chromatography assay for moxifloxacin: Pharmacokinetics in human plasma // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007. V. 43. Is. 1. P. 320–324.
4. Y.H. Xua, D. Lib, X.Y. Liua, Y.Z. Lia, J. Luc. High performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for moxifloxacin: Validation and application to a pharmacokinetic study in Chinese volunteers // Journal of Chromatography B. 2010. V. 878. P. 3437–3441.
5. Руководство по экспертизе лекарственных средств / Под. ред. проф. А.Н. Миронова. Т. I. – М.: Гриф и К, 2013. 328 с.
6. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2013.
7. Guideline on bioanalytical method validation (European medicines agency). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). – London. 2011.

УДК 615.07

1 – Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» Государственной службы Украины по лекарственным средствам (ГП «Фармакопейный центр»), 61085, Украина, г. Харьков, ул. Астрономическая, 33

2 – Национальный фармацевтический университет, 61168, Украина, г. Харьков, ул. Валентиновская, 4

1 – Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines, State Administration of Ukraine on Medicinal Products, 33, Astronomychna str., Kharkiv, 61085, Ukraine

2 – National University of Pharmacy, 4, Valentynivska str., Kharkiv, 61168, Ukraine

*** адресат для переписки:**
E-mail: leontiev@phukr.kharkov.ua; leontievd@yahoo.com
Тел.: +38 (057) 719 06 05

РОЛЬ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ: РЕГУЛЯТОРНЫЕ И МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Д.А. Леонтьев[1]*, Ю.В. Подпружников[2], Н.В. Воловик[1]

Резюме. Рассмотрены некоторые аспекты корректного использования стандартных образцов (СО) для обеспечения надежности заключения о качестве лекарственных средств (ЛС). Проведен анализ специфики использования СО с аттестованным значением содержания и субстанции/реактива, для которого номинальное содержание принимается за 100%. Рассмотрены статус и специфика использования фармакопейных СО. Проанализированы проблемы использования СО для нефармакопейных методик и нефармакопейных ЛС, проблемы обеспечения СО примесей и СО, необходимых для анализа лекарственного растительного сырья и готовых ЛС из него. Рассмотрены некоторые метрологические аспекты корректного использования СО, связанные с внедрением в фармации концепции неопределенности и использованием принципа незначимости.

Ключевые слова: лекарственные средства, заключение о качестве, стандартные образцы, неопределенность результатов, незначимость.

THE ROLE OF REFERENCE STANDARDS IN QUALITY ASSURANCE FOR MEDICINES: REGULATORY AND METROLOGICAL ASPECTS

D.A. Leontiev[1]*, Y.V. Podpruzhnikov[2], N.V. Volovyk[1]

Abstract. Some aspects of the adequate use of reference standards (RS) for making a reliable decision on the compliance of medicines are reviewed. An analysis of the specificity of using RS with the certified value and substance/reagent, for which the nominal value is considered to be 100%, is conducted. Status and specific character of using pharmacopoeial RS are considered. Issues of the use of RS for non-pharmacopoeial test methods as well as for non-pharmacopoeial medicines, problems of provision of RS for purity tests and RS for the analysis of herbal drugs and herbal drug preparations are analyzed. Some metrological aspects of the proper use of RS related to the implementation of the concept of uncertainty and the use of the principle of insignificance are discussed.

Keywords: medicines, decision on compliance, reference standards, uncertainty of results, insignificance.

ВВЕДЕНИЕ

Стандартные образцы (СО) чрезвычайно широко применяются в фармацевтическом анализе. Применение СО обеспечивает метрологическую сопоставимость и совместимость результатов анализа [1]. Сопоставимость результатов означает, что разные лаборатории при анализе одного и того же лекарственного средства (ЛС) дают заключение об одной и той же сущности, например о количественном содержании анальгина в готовом ЛС, имеющем в своем составе анальгин (и результат не искажен присутствием примесей, наличием других действующих или вспомогательных веществ и т.д.). Совместимость результатов означает, что полученный в разных лабораториях результат является по существу одним и тем же, то есть не была допущена грубая ошибка, образец был однородным, проанализированная проба была представительной и т.д. Без этого невозможно сделать обоснованное заключение о качестве ЛС.

Потребителя прежде всего интересует не результат анализа сам по себе, а заключение о качестве ЛС. Заключение о качестве должно быть надежным, то есть при выполнении анализа в различных лабораториях оно должно быть одним и тем же с высокой вероятностью. Для этого варьирование результата анализа, которое внутренне ему присуще, должно разумным образом соотноситься со спецификациями. То есть, во-первых, необходимо определить, по отношению к каким спецификациям какое варьирование является максимально допустимым, а во-вторых – контролировать фактическое варьирование результата. Поскольку спецификации обычно выражены интервалом, далее речь идет именно о расширенной неопределенности, то есть об интервале (Δ), в пределах которого с высокой надежностью находится истинное значение [2, 3].

Оценить варьирование результата (как максимально возможное для данной методики, так и фактическое для данного анали-

за) позволяет концепция неопределенности. Она дает инструменты для оценки варьирования конечного результата анализа исходя из варьирования, которое вносят составляющие аналитической системы – методика, прибор, аналитик, СО и т.д.

Фактически любой анализ опирается на цепочку последовательных калибровок. В фармацевтическом анализе в странах, где действуют правила GMP, принята следующая схема. Основой для сравнения служит официальный СО – фармакопейный (ФСО), то есть СО, который вводится в действие, поддерживается и распространяется соответствующей фармакопеей, национальной или международной. ФСО рассматривается GMP как первичный СО, то есть аттестованный без использования калибровки по другому СО. Лаборатория для выполнения рутинных анализов может откалибровать по ФСО свой вторичный СО (ВСО), что рассматривается как принятая лабораторная практика в GMP (GMP PIC/S, п. 11.19 [4]) и в фармакопеях (Европейская Фармакопея – EP, общая статья «Стандартные образцы» [5], Фармакопея США – USP, общая статья <1010> «Результаты анализа – интерпретация и обработка» [6]). Использование ВСО позволяет кардинальным образом снизить расход дорогих ФСО.

Выполнение анализа также является по своей сути калибровкой. Анализируемое ЛС при этом «калибруют» по СО. Неопределенность измерений неизбежно возрастает вместе с последовательностью калибровок, причем в этой последовательности результат каждой калибровки зависит от результата предыдущей калибровки. Поэтому говорят об иерархии калибровок и о цепочке метрологической прослеживаемости результатов. Чем ближе калибровка к опорному значению, тем более жесткие требования к ее неопределенности предъявляются, так как вносимая ошибка уже не может быть устранена на последующих звеньях калибровок.

Отметим, что обеспечение надежности заключения о качестве является основой обращения ЛС, особенно международного. Корректное использование СО играет в данном вопросе ключевую роль. Рассмотрим некоторые аспекты использования СО в фармацевтическом анализе, связанные с обеспечением качества результатов анализа.

СПЕЦИФИКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СО В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Использование аттестованных СО или реактивов/субстанций

В фармацевтическом анализе для количественных определений (КО) могут использоваться:

– аттестованные СО, то есть СО с установленным для данного применения значением содержания;

– субстанции/реактивы, соответствующие спецификациям, для которых содержание формально принимается равным 100%.

Если лаборатория использует ФСО и для рутинных анализов – откалиброванные по нему ВСО, то цепочка метрологической прослеживаемости результатов начинается от общепризнанного эталона. Это обеспечивает сопоставимость и совместимость результатов для всех лабораторий. Если лаборатория использует в качестве вещества сравнения реактив или субстанцию, а не СО, то цепочка метрологической прослеживаемости начинается и заканчивается в данной лаборатории. В этом случае имеется риск того, что результаты, полученные в различных лабораториях, будут несовместимы. Реактивы и субстанции изначально не предназначены для использования в качестве СО. Они могут использоваться в определенных случаях, однако для этого нужно сформулировать обоснованные критерии приемлемости: как минимум требования к чистоте, однородности, условиям хранения и сроку годности для данного применения, что является трудно решаемой и не всегда выполнимой задачей. В связи с этим в фармации для КО действующих веществ, консервантов и др. (то есть в разделе «Количественное определение») всегда используются ФСО. Субстанции/реактивы могут использоваться в качестве веществ сравнения в испытаниях, для которых метрологические требования существенно ниже. Это такие испытания, как определение чистоты (родственные примеси или остаточные органические растворители) и в некоторых случаях КО (с односторонним нормированием «не менее»), которое обычно используется для стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов из него.

ФСО – статус и специфика использования

Если имеется соответствующий ФСО, то он всегда имеет преимущество перед использованием субстанции/реактива в качестве вещества сравнения. В руководстве Q6B (п. 2.2.1) [7] указано: «Если имеется международный или национальный СО, СО (производителя) следует калибровать относительно него». В GMP EU 2014 г. в п. 6.20 [8] появилось уточнение: «Если существуют фармакопейные стандартные образцы из официально признанных источников, преимущественно их следует использовать в качестве первичных стандартных образцов, если другое не обосновано». То есть в данном случае, если имеется коммерчески доступный реактив или субстанция, корректнее использовать ФСО в качестве официального СО, а для рутинных анализов калибровать по данному ФСО реактив/субстанцию и использовать ее в качестве ВСО.

Отметим, что если предполагается использовать ФСО при контроле качества готовой продукции, то этот же ФСО необходимо использовать при валидации методики [9].

Ограничение использования ФСО (GMP EU: «если другое не обосновано») относится в первую очередь к предназначению и, соответственно, области применения ФСО. Фармакопеи подчеркивают, что данный ФСО гарантированно пригоден для испытаний/методик, описанных в данной фармакопее, и что для другого применения данный ФСО может быть непригодным [4, 10]. Например, СО Европейской Фармакопеи (EP), предназначенные только для идентификации, совершенно непригодны для КО. Так, в EP описана субстанция циталопрама. КО проводится титриметрически, без использования СО. EP CRS циталопрама предназначен для идентификации методом ИК-спектроскопии. Поэтому если в готовом ЛС (ГЛС) для КО используется хроматография или спектрофотометрия, то EP CRS для этого предназначения не пригоден. Более того, в общем случае ФСО, предназначенные для КО с использованием хроматографии, непригодны для КО спектрофотометрическими методами. Отметим, что это ограничение справедливо для любого СО, не только фармацевтического.

Производители инновационного препарата находятся в более сложной ситуации, чем производители препаратов-дженериков, поскольку для действующего вещества, находящегося под патентной защитой, ФСО отсутствует. Поэтому они должны разрабатывать свой первичный СО и доказывать регистрирующим органам (а затем и инспекции GMP), что данный СО корректно аттестован для предполагаемого применения.

Использование ФСО для пользователя имеет огромные преимущества перед разработкой первичного СО предприятия. При использовании ФСО информация о корректности его аттестации не предоставляется ни регистрирующим органам, ни инспекции GMP – достаточно просто ссылки, какой ФСО используется. Подчеркнем, что в документации важно указывать, ФСО какой именно фармакопеи используется. Так, в USP описаны ГЛС циталопрама, и USP RS предназначен для КО в ГЛС, в отличие от EP CRS.

Пользователь имеет право разрабатывать свои методики, отличающиеся от фармакопейных. В этом случае возникает проблема: пригодны ли имеющиеся ФСО для данного применения? Политика различных фармакопей в данном вопросе различна. USP просто заявляет, что их ФСО предназначены для использования в соответствии с показателями/методиками соответствующей фармакопеи, другое использование ФСО является ответственностью пользователя [7]. Отметим, что наибольшая потребность в СО для фармации – именно для контроля качества ГЛС при их выпуске и обращении. EP, в которой описаны только субстанции, приводит разъяснения/рекомендации в общей статье «Стандартные образцы» [4]: «СО EP с присвоенным количественным содержанием/активностью, предназначенные для КО субстанций, могут также быть пригодными для КО тех же субстанций в ГЛС, если:

– используется хроматографический метод КО, указанный в монографии на активную субстанцию;

– пользователь верифицирует применимость методики для конкретного лекарственного средства (отсутствие мешающих факторов);

– пробоподготовка (например, экстракция) валидирована для конкретного лекарственного средства;

– использование данного СО утверждено компетентным уполномоченным органом».

Таким образом, пользователь имеет право использовать свои методики вместо фармакопейных, но при этом остается непонятным, может он или нет использовать имеющиеся ФСО. Отметим, что в нефармацевтическом секторе в отношении СО действуют несколько иные правила (см. руководство ISO [11]). Для сертифицированных СО (Certified Reference Material, CRM) в сертификате представляется вся информация, необходимая для того, чтобы пользователь мог корректно использовать данный СО для своего применения. Т.е. CRM является «самодостаточным», а не жестко привязанным к фармакопейной методике анализа. Потребность в таких СО имеется и в фармацевтической отрасли. Например, контрольная лаборатория должна сделать заключение, является или нет данный образец фальсификатом. В этом случае лаборатория должна выбирать метод анализа на свое усмотрение, и информация о применимости СО является особенно важной.

В данном аспекте ФСО Государственной фармакопеи Украины (ГФУ) имеют существенное преимущество для пользователя. ФСО ГФУ, как и CRM, сопровождаются сертификатом, в котором приводится информация, необходимая для корректного использования ФСО ГФУ:

– детали аттестации (как установлено аттестованное значение);

– область применения:

- показатель качества, для которого используется ФСО ГФУ и метод анализа;
- максимально узкие допуски содержания для КО, для которых пригоден данный ФСО ГФУ;
- максимально допустимое значение неопределенности аттестованного значения $\max\Delta_{RS}$ и способ ее оценки;

– минимальная навеска, для которой была подтверждена однородность (в случае потенциальной неоднородности ФСО ГФУ).

Более того, при отпуске ФСО ГФУ отслеживается корректность их использования в методике пользователя и в случае необходимости проводится доаттестация ФСО ГФУ для нового применения. Таким образом, при использовании ФСО ГФУ пользователь получает достаточно детальное подтверждение от фармакопеи непосредственно в официальном сертификате на данный ФСО ГФУ о его пригодности для предназначения пользователя. Это является важным моментом для пользователя как при регистрации ЛС, так и при инспектировании со стороны GMP. Кроме того, нали-

чие сертификата на ФСО ГФУ упрощает пересечение границы.

Отметим принципиальную проблему, с которой сталкиваются производители дженериков, на которые нет соответствующих ФСО. Типичной ситуацией является закупка субстанций у зарубежных производителей и производство данным предприятием только ГЛС. Производитель субстанции в состоянии аттестовать свой первичный СО, так как он проводит синтез и при проведении государственной регистрации доказывал ее чистоту и адекватность методов контроля, устанавливал срок годности и т.д., то есть фактически проделывал комплекс работ, который входит в аттестацию первичного СО. Однако производитель субстанции не может обеспечить СО для производителя ГЛС в другой стране (для методов анализа и состава препаратов, о которых он не имеет информации). Тем более производителю готовых ЛС затруднительно аттестовать свой первичный СО, поскольку информации, предоставляемой для регистрации субстанции, недостаточно для аттестации первичного СО.

В связи с этим некоторые фармакопеи предоставляют СО, которые не используются в монографиях данной фармакопеи. Это ФСО USP и ГФУ. Наличие соответствующих USP RS отражено в каталоге (http://www.usp.org/reference-standards). Список ФСО ГФУ приведен на сайте http://www.sphu.org. Отметим, что новые ФСО ГФУ аттестуют по заявке пользователя (форма заявки приведена на сайте). При аттестации обеспечивается соответствие нового ФСО ГФУ предназначению, требуемому пользователю, аттестация проводится достаточно оперативно (1–2 месяца или меньше по согласованию с пользователем).

Проблема обеспечения СО примесей

На современном уровне контроля качества ЛС СО примесей, одной или нескольких, требуются для анализа практически любой субстанции или ГЛС – СО технологических примесей или продуктов деградации. При этом если для определения активного фармацевтического ингредиента нужен один СО, то для контроля чистоты в одном ЛС могут использоваться несколько разных СО. Если активный фармацевтический ингредиент практически всегда может быть аттестован производителем как ВСО из имеющейся для производства субстанции, то вещество сравнения для определения чистоты лаборатория, как правило, должна закупать. Поэтому вопрос обеспечения СО примесей является чрезвычайно важным и наиболее затратным. Как упоминалось выше, для определения чистоты могут использоваться соответствующие реактивы/субстанции, также могут использоваться нефармакопейные СО и, естественно, ФСО.

EP фактически дотирует стоимость СО примесей: стандартная стоимость упаковки EP CRS (€79 без НДС) в очень многих случаях меньше стоимости коммерчески доступного реактива / нефармакопейного СО. Однако, поскольку в EP не описаны ГЛС, часто EP CRS продуктов деградации, необходимых для определения чистоты ГЛС, отсутствуют.

В Фармакопее Британии (BP) дополнительно по сравнению с EP описаны ГЛС, поэтому в BP используются BP CRS примесей для анализа ГЛС: их каталожная стоимость составляет £97. Для анализа субстанций BP использует монографии EP.

USP опирается на свои монографии субстанций и ГЛС и, соответственно, имеет свои СО. USP RS примесей стоят достаточно дорого – свыше $800, то есть USP RS примесей на порядок дороже соответствующих СО EP и BP.

Существует целый ряд организаций, которые аттестуют нефармакопейные СО фармацевтических ингредиентов и примесей, для которых отсутствуют соответствующие ФСО. Наиболее известной является LGC [12], политикой которой является предложение пользователю всех примесей, которые описаны как потенциальные в фармакопеях (EP или USP), но для которых отсутствуют ФСО. Однако СО LGC примесей могут быть даже дороже, чем USP RS.

Большинство примесей, которые необходимы для контроля качества ЛС, не являются крупнотоннажными реактивами. Поэтому, если даже данное вещество является коммерчески доступным, очень часто его стоимость превышает стоимость USP RS и СО LGC.

Отметим, что в некоторых случаях именно стоимость СО примесей является критическим моментом. Например, для анализа таблеток клопидогреля сульфата в соответствии с монографией USP необходимы USP RS клопидогреля сульфата и примесей A, B и C, каталожная стоимость которых составляет в сумме около 3000$ (формально это на 1 анализ!). В фактическую стоимость для потребителя входят еще НДС и услуги посредника, в связи с чем стоимость возрастает еще примерно в 2 раза. Если производитель для дорогих ЛС еще в состоянии обеспечить такие затраты на СО, то при проведении государственного контроля качества ЛС контрольными лабораториями такие затраты нереальны. Вследствие этого даже на рынке стран со строгой регуляторной системой могут присутствовать ЛС худшего качества, чем требуется фармакопеей, как результат – пациент может оказаться незащищенным.

В связи с этим ГФУ аттестует СО для контроля примесей как для тех, которые имеются как ФСО в других фармакопеях, так и для тех, которые отсутствуют, в том числе для фармацевтических субстанций, которые не описаны в фармакопеях. В настоящий момент номенклатура ФСО ГФУ примесей составляет более 200 наименований. В 2015 г. было синтезировано и введено в действие более 30 новых ФСО ГФУ примесей. После того как ФСО ГФУ введен в номенклатуру, каталожная стоимость упаковки составляет около $50–$100.

Стоимость аттестации обычно составляет $500–$1000. Заказчику предоставляется 10 упаковок ФСО ГФУ. Можно видеть, что стоимость аттестации нового ФСО ГФУ может быть меньше стоимости 1 упаковки USP RS. Такая политика делает ФСО ГФУ примесей доступными для контроля качества ЛС не только для производителей ЛС, но и при обращении ЛС. В связи с этим в настоящее время страны ближнего зарубежья активно сотрудничают с ГП «Фармакопейный центр» по вопросам обеспечения ФСО примесей.

Проблема обеспечения СО для лекарственного растительного сырья (ЛРС) и препаратов из него

Для анализа растительного сырья в ведущих фармакопеях часто используется несколько реактивов или несколько ФСО. Это связано с тем, что в ЛРС зачастую нет одного вещества, которое отвечает за биологическую активность ЛС. Поэтому очень часто для одного вида ЛРС / ЛС из него определяется несколько «маркеров» (сигнальных компонентов). Стоимость данных веществ как реактивов часто гораздо выше стоимости ФСО. Отметим, что для ЛРС и препаратов из него стоимость СО особенно важна, так как обычно и само ЛРС, и препараты из него достаточно недорогие.

В то же время часто ЛРС и ЛС из него анализируют по фармакопейным монографиям, для которых описывается вид типичной хроматограммы. В этих случаях особенно выигрышным решением является использование аттестованного экстракта из соответствующего ЛРС, содержащего все сигнальные компоненты, которые необходимо определять. Отметим, что проблема чрезмерного использования СО неоднократно поднималась пользователями ЕР. Поэтому в тех случаях, где это возможно, ЕР начала вводить вместо СО индивидуальных веществ стандартизованные экстракты, например ЕР CRS экстракта расторопши (https://www.edqm.eu/en/news/reference-standards). Для Украины проблема обеспечения ФСО для ЛРС и ЛС из него стояла еще более остро, поэтому ГФУ первой начала вводить такие стандартизованные экстракты, как ФСО ГФУ. Для определения всех необходимых компонентов достаточно одной упаковки ФСО ГФУ. Поэтому затраты на использование ФСО ГФУ могут быть на порядок ниже, чем при использовании соответствующего набора индивидуальных ФСО или реактивов. В настоящее время аттестовано порядка 20 таких экстрактов. Весьма перспективной представляется замена такими СО индивидуальных веществ растительного происхождения, которые использовались в СССР. Например, наработка индивидуального вещества циммарина с приемлемой стоимостью для ФСО в настоящий момент представляется невозможной. В то же время аттестация соответствующего экстракта по биологической активности, которая определялась с использованием СО циммарина, не представляет затруднений.

Метрологические аспекты использования ФСО

Для того чтобы управлять рисками, связанными с принятием решения о качестве ЛС, выполняющая анализ лаборатория должна контролировать неопределенность результата анализа (Δ_{Test}). Неопределенность, вносимая собственно СО (Δ_{RS}), искажает результаты анализа, что уже никоим образом не может устранить лаборатория. Чтобы лаборатория могла контролировать Δ_{Test}, производитель СО должен контролировать Δ_{RS}. Для ФСО производитель – это соответствующий фармакопейный орган, который распространяет данные ФСО. Если лаборатория аттестует свои ВСО для выполнения рутинных анализов, то данная лаборатория также является производителем СО.

Для обеспечения надежности принятия заключения о качестве ЛС важнейшим является понятие максимально допустимой неопределенности ($\max\Delta$) и незначимости.

Варьирование конечного результата анализа (оценкой которого и является Δ_{Test}) является результирующей частных составляющих варьирования, вносимых компонентами аналитической системы. Это варьирования (неопределенности), вносимые аналитиком, собственно методикой анализа, аналитическим оборудованием, СО и др. Как указывалось выше, любой анализ опирается на цепочку калибровок, каждая из которых вносит свою неопределенность в конечный результат анализа. И в каждой калибровке участвует своя аналитическая система. Если изобразить графически влияние частных составляющих неопределенностей на конечный результат, то мы увидим разветвленную многоуровневую цепочку [2]. Собственно говоря, конечной целью лаборатории, которая выполняет анализ, является обеспечение приемлемого значения Δ_{Test}, то есть именно на последнем звене калибровок, которое непосредственно соотносится со спецификациями на ЛС. Оценить экспериментально все составляющие неопределенности практически всегда лаборатория не в состоянии. Например, лаборатория не может экспериментально оценить погрешность приписанного веса для сертифицированной гири, которая используется для калибровки весов, и т.д. То есть для оценки суммарной неопределенности необходимо иметь информацию о количественном вкладе существенных источников неопределенности и иметь методологию оценки суммарной неопределенности.

Такая методология была создана [2, 3]. Наиболее общим подходом является сведение баланса (или прогноз) неопределенности: по определенным правилам из отдельных составляющих Δ_i находится результирующая Δ_Σ (для СО это Δ_{RS}, для результата анализа это Δ_{Test} и т.д.). Имеется очень существенное упрощение оценки Δ_Σ. Если отдельная Δ_i достаточно мала по сравнению с Δ_Σ, то она не оказывает существенного

влияния на Δ_{Σ} и данную Δ_i можно просто не принимать в расчет при оценке Δ_{Σ}. В этом случае говорят, что Δ_i незначима по отношению к Δ_{Σ}.

Принцип незначимости может быть сформулирован из различных соображений. Важно, что для уровня надежности 95% (он используется по умолчанию в аналитической химии и в фармацевтическом анализе) незначимость означает выполнение соотношения [13–15]:

$$\Delta_i \leq 0{,}32 \times \Delta_{\Sigma}. \quad (1)$$

В общем случае считается, что Δ_{RS} может быть значима по отношению к Δ_{Test} (на такой подход ссылается ISO [16] и USP [17]). В таком случае для Δ_{Test} необходимо оценить баланс с учетом фактического значения Δ_{RS}. Однако, если Δ_{RS} является значимой по отношению к Δ_{Test}, это приводит к очень нежелательным последствиям с практической точки зрения:

– невыполнение незначимости Δ_{RS} для ФСО: при замене серии ФСО ЛС, которые были проанализированы с использованием предыдущей серии ФСО и признаны качественными (и которые уже находятся в обращении!), могут быть по результатам анализа с использованием новой серии данного ФСО с неприемлемо большим риском признаны некачественными. Если лаборатория использует ВСО, то после замены серии ФСО необходимо переаттестовывать по нему используемые ВСО независимо от того, вышел или нет на них срок годности. В данной ситуации ФСО различных фармакопей не будут взаимозаменяемыми, что создает проблему для международного обращения ЛС. Понятно, что такие «потребительские качества» ФСО ставят под сомнение целесообразность его использования.

– невыполнение незначимости Δ_{RS} для ВСО лаборатории: по результатам анализа, полученным с использованием ФСО и ВСО, с неприемлемо высокой вероятностью могут быть сделаны противоположные заключения о качестве ЛС. Точно так же замена серии ВСО с неприемлемо большой вероятностью может приводить к изменению заключения о качестве произведенного ЛС на противоположное. Если производитель знает об этих рисках, он, безусловно, вообще воздержится от использования такого ВСО.

Таким образом, можно утверждать, что для фармации единственно приемлемым решением является обеспечение незначимости Δ_{RS} по отношению к Δ_{Test} как для ФСО, так и для ВСО лаборатории.

Оценка фактического значения неопределенности (Δ_{Fact}) не имеет смысла без критерия: какое значение неопределенности является максимально допустимым (maxΔ, или целевая неопределенность, *англ.* U_{Target}). При этом maxΔ_{Test} определяется спецификациями на анализируемое ЛС, соответственно maxΔ_{RS} определяется предназначением (использованием) данного СО. В настоящее время к maxΔ_{Test} для КО в субстанциях и ГЛС фактически предъявляются одни и те же требования EP, USP и ГФУ [18–20]. Кроме того, эти же требования утверждены в Руководстве по валидации методик анализа лекарственных средств Российской Федерации [15]. В ГФУ введены также требования к другим базовым фармацевтическим испытаниям (таблица 1).

Таблица 1.

Рекомендации к максимально допустимой неопределенности результатов анализа (maxΔ_{Test}) для различных фармакопейных испытаний

Испытания	Требования к maxΔ_{Test}	Статус
Количественное определение (двустороннее нормирование): Субстанции	max$\Delta_{Test} \leq B_H - 100\%$	EP, USP, ГФУ, Россия*
Готовые ЛС	$\max\Delta_{Test} \leq \frac{B_H - B_L}{2} \times 0{,}32$	USP, ГФУ, Россия*
Количественное определение (одностороннее нормирование): Субстанции и готовые ЛС	max$\Delta_{Test} \leq 6{,}4\%$	ГФУ
Однородность содержания, растворение	max$\Delta_{Test} \leq 3\%$	ГФУ, Россия*
Сопутствующие примеси: Граничные испытания Количественные испытания	max$\Delta_{Test} \leq 16\%$ max$\Delta_{Test} \leq 5\%$	ГФУ, Россия*
Остаточные органические растворители	max$\Delta_{Test} \leq 16\%$	ГФУ, Россия*

Примечание: B_H – верхняя граница содержания по спецификации в %; B_L – нижняя граница содержания по спецификации в %.

*Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств [15].

Исходя из принципа незначимости (1), легко сформулировать требования к СО:

$$\max\Delta_{RS} \leq 0{,}32 \times \max\Delta_{Test}. \quad (2)$$

Отметим, что применение данного принципа к требованиям для результатов анализа различных испытаний (таблица 1) легко позволяет сформулировать метрологически обоснованные требования к возможности использования субстанций или реактивов без установленного значения содержания, принимая его за 100% (таблица 2).

Рассмотрим позицию различных фармакопей по отношению к концепции неопределенности и использованию принципа незначимости. EP заявляет, что при аттестации всех СО EP контролируется Δ_{RS} в соответствии с внутренними критериями, которые не сообщаются пользователю [21]. Δ_{RS} также не сообщается пользователю. Однако заявляется, что Δ_{RS} незначима для использования СО в соответствии с монографиями EP [4]. USP опубликовала ряд статей в своем печат-

ном органе [22, 23] и в научных журналах [24, 25]. В данных статьях аргументируется положение о том, что для обеспечения надлежащего качества СО необходимо использовать концепцию неопределенности. USP была начата программа аттестации USP CRS: CO, для которых, как и для CRS, указывается Δ_{RS}, способ ее оценки и др. Однако в настоящее время эта программа прекращена и все USP CRS исключены из каталога. ФСО ГФУ аттестуют с использованием концепции неопределенности, для них в сертификате указывается $max\Delta_{RS}$. Для всех ФСО ГФУ их Δ_{RS} незначима для предполагаемого использования, которое указывается в сертификате.

Таблица 2.

Метрологически обоснованные требования к возможности использования в качестве СО субстанций или реактивов без установленного значения содержания

Испытание	Требования к минимальной чистоте субстанции или реактива, для которых значение содержания принимается равным 100%
Количественное определение – одностороннее нормирование содержания	≥ 98%
Испытание на чистоту – количественное	≥ 98%
Испытание на чистоту – предельное	≥ 95%

Отметим, что лаборатории, контролирующие качество ЛС при их обращении (в США – FDA, в ЕС – OMCL), сертифицированы по ISO 17025 [26] и для них оценка неопределенности результата анализа является обязательной. Сертификация лабораторий производителей ЛС по ISO 17025 автоматически приводит к необходимости использования концепции неопределенности и в этих лабораториях. Таким образом, концепция неопределенности в фармацевтической отрасли находится на этапе внедрения, необходимость которого не вызывает сомнений.

Концепция неопределенности, которая сфокусирована на варьировании именно конечного результата анализа и его соотношении со спецификациями, позволяет выявить многочисленные нестыковки и недостаточность метрологического контроля, который применялся к отдельным метрологическим характеристикам отдельных компонентов аналитической системы. Например, в Европейском сообществе и в странах, ориентирующихся на данные принципы стандартизации, для ГЛС допуски содержания для КО ±5% принимаются компетентными органами без дальнейшего обоснования. В монографиях USP традиционно используются допуски содержания ±10%. Совершенно очевидно, что чем уже допуски содержания, тем жестче должны предъявляться требования к $max\Delta_{Test}$, к Δ_{RS}, к критериям валидации методик, к критериям квалификации оборудования и т.д. Поэтому у пользователя и у компетентных органов нет оснований считать, что в такой ситуации USP RS пригодны для КО в ГЛС с допусками ±5%. Более того, нет оснований считать, что методики USP из таких монографий являются валидированными для применения в ГЛС с допусками ±5%. Безусловно пригодными являются методики и USP RS, описанные в монографиях USP на ГЛС с допусками ±5%, однако такие монографии являются немногочисленными. Этот вывод имеет огромную практическую значимость и с точки зрения концепции неопределенности лежит на поверхности.

Еще один вывод, вытекающий из применения концепции неопределенности и имеющий огромную практическую значимость, сделала ЕР [27]: поскольку для количественных испытаний (к которым относятся и испытания на чистоту!) пользователю необходимо знать неопределенность, вносимую СО, а ЕР ее не сообщает, то СО ЕР не могут использоваться для аттестации ВСО, предназначенных для КО и для определения чистоты. Фактически СО ЕР могут использоваться только для аттестации ВСО для идентификации (идентификация методом спектрофотометрии в инфракрасной области) и для идентификации пиков хроматографическими методами. Естественно, такое ограничение существенно снижает потребительскую ценность СО ЕР. Отметим, что поскольку Δ_{RS} не сообщается и для USP RS, то это ограничение в полной мере относится и к ним.

Другая проблема связана с различием в метрологических требованиях к КО в субстанциях и ГЛС. Для субстанций, в которых для КО используется не титрование, а непрямые (сравнительные) методы анализа (хроматография, спектрофотометрия), то есть если для анализа используются СО, тогда в соответствии с подходом ЕР B_H должен составлять не менее 102%. Это означает, что $max\Delta_{Test}$ составляет 2%. ЕР заявляет, что для СО ЕР Δ_{RS} является незначимой для фармакопейного применения, то есть для анализа субстанций. Однако для ГЛС с допусками содержания ±5% незначимость Δ_{RS} означает более жесткие требования к СО, чем для анализа субстанций с B_H=102%. Таким образом, если для СО ЕР $max\Delta_{RS}$ не заявляется, то нет оснований считать, что СО ЕР пригодны для КО в ГЛС с допусками содержания ±5%.

Отметим, что ГФУ на настоящий момент является единственной фармакопеей, в которой концепция неопределенности используется систематически для обеспечения качества результатов анализа. Концепция неопределенности используется для обеспечения метрологической корректности методик анализа, в том числе и фармакопейных [28, 29], для валидации методик и испытаний [17, 30], для аттестации СО – ФСО ГФУ и ВСО лабораторий [31], для квалификации аналитического оборудования [32] и т.д. Самые первые ФСО ГФУ (1999 г.) [33] были аттестованы с использованием концепции неопределенности. ФСО ГФУ имеют важнейшие преимущества по сравнению с ФСО других фармакопей, для которых концепция неопределенности не реализована в явной форме:

– при замене серии ФСО ГФУ полученные ранее заключения о качестве ЛС с высокой надежностью остаются теми же, так как для ФСО ГФУ заявляется $max\Delta_{RS}$ и обеспечивается ее незначимость;

– ФСО ГФУ могут быть корректно использованы для аттестации ВСО лаборатории для КО и определения примесей по этой же причине. При замене серии ФСО ГФУ не требуется переаттестация имеющихся ВСО лаборатории.

Все ФСО ГФУ, предназначенные для КО, аттестуют исходя из наиболее жестких требований: все ФСО ГФУ предназначены для анализа ГЛС с допусками ±5%.

Отметим, что производитель заинтересован использовать при выпуске более жесткие спецификации, чем в течение срока годности ЛС, чтобы гарантировать качество произведенных им ЛС, которые в процессе обращения могут быть проконтролированы другой лабораторией [32]. Поскольку для ФСО ГФУ заявляется незначимость Δ_{RS} и в явном виде указывается, что это означает, то ФСО ГФУ совершенно обоснованно могут использоваться предприятиями для этой задачи. Получить такие гарантии качества ЛС с использованием СО, для которых нет информации о Δ_{RS}, с точки зрения концепции неопределенности невозможно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для обеспечения качества результатов анализа ЛС при использовании СО необходимо принимать во внимание метрологические аспекты.

Для количественного определения рекомендуется использовать только СО с присвоенным значением содержания. Использование субстанций или реактивов вместо СО возможно в испытаниях на чистоту и в случае одностороннего нормирования в количественном определении и должно быть метрологически обосновано.

Использование ФСО всегда имеет преимущество перед использованием первичного СО предприятия, субстанции или реактива.

Для корректного использования СО пользователь должен иметь информацию о неопределенности аттестованного значения. ФСО ГФУ аттестуют для анализа ЛС, не описанных в фармакопеях, что обеспечивает сопоставимость результатов анализа. Для ФСО ГФУ предоставляется информация о неопределенности и гарантируется ее незначимость для задач пользователя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Международный словарь по метрологии: основные и общие понятия и соответствующие термины / Всерос. науч.-исслед. ин-т метрологии им. Д.И. Менделеева, Белорус. гос. ин-т метрологии; пер. с англ. и фр. 2-е изд., испр. – СПб.: НПО «Профессионал», 2010. 82 с.
2. EURACHEM/CITAC Guide CG 4: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3rd ed. / Ed. by S. L. R. Ellison, A. Williams. – London: Laboratory of the Government Chemist, 2012. 133 p.
3. <5.3.N.1> Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр лікарських засобів», 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр лікарських засобів», 2015. Т. 1. С. 881–909.
4. PIC/S GMP Publications. Pharmaceutical Inspection Convention, Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme. URL: http://www.picscheme.org/publication.php (дата обращения 04.04.2016).
5. 5.12. Reference standards // European Pharmacopoeia, 8th ed., Suppl. 8.4. – Strasbourg : EDQM – Council of Europe, 2015. P. 4681–4684.
6. <1010> Analytical Data – Interpretation and Treatment // The United States Pharmacopeia. USP 36–NF 31. – Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Online Edition.
7. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (Q 6 B). Current Step 4 version. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). URL: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6B/Step4/Q6B_Guideline.pdf (дата обращения 22.03.16).
8. Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines. European Comission, DG Health and Food Safety, Public Health, EU Pharmaceutical Informations, EudraLex, V. 4. URL: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm (дата обращения 22.03.16).
9. Technical Guide for the Elaboration of Monographs, 7th ed. European Pharmacopoeia, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). – Strasbourg. 2015.
10. <11> USP REFERENCE STANDARDS // The United States Pharmacopeia. USP 38-NF 33. – Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2015. P. 93-96.
11. ISO Guide 34:2009(E): General requirements for the competence of reference material producers, 3rd ed. International Organization for Standardization. ISO copyright office. – Geneva. 2009.
12. S. Wood. Challenges associated with import and export of RS // Pharmaceutical Reference Standards. Proc. 11 th Int. Symp. organized by the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 3–4 September, 2012. – Strasbourg: Council of Europe. 2012. P. 22.

13. Standard ASME B89.7.3.1: Guidelines for decision rules: considering measurement uncertainty in determining conformance to specifications. American Society of Mechanical Engineers (ASME). New York, 2001. URL: http://www.asme.org/products/codes-standards/b89731-2001-guidelines-decision-rules-considering (дата обращения 05.03.2016).
14. 1251> Weighting on Analytical Balance // The United States Pharmacopeia. USP 39-NF 34S1 – Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2016. P. 1797–1803.
15. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна, М.А. Гетьмана, А.А. Малина. – М.: Спорт и культура, 2000. 2007. С. 192.
16. ISO Guide 34:2000(E): General requirements for the competence of reference material producers. International Organization for Standardization. ISO copyright office. – Geneva. 2000.
17. J. Weitzel. How to monitor reference substances for continuous fitness for purpose: novel approaches or solutions to challenges? // Pharmaceutical Reference Standards. Proc. 11th Int. Symp. organised by the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 3–4 September 2012. – Strasbourg: Council of Europe, 2012. P. 16.
18. A. G. J. Daas, J. H. McB Miller. Content limits in the European Pharmacopoeia // Pharmeuropa. 1997. V. 9 (1). P. 148–156.
19. <1200> Requirements for Compendial Validation // Pharmacopeial Forum. 2013. № 39(6). URL: http://www.usppf.com/pf/pub/index.html (дата обращения 05.03.16).
20. <5.3.N.2> Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр лікарських засобів», 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр лікарських засобів», 2015. Т. 1. С. 910–929.
21. S. Dressman, V. Egloff. Asked questions addressed to compendial organizations / Pharmaceutical Reference Standards. Proc. 11-th Int. Symp. organised by the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), 3–4 September 2012. – Strasbourg: EDQM, 2012. P. 23.
22. K. Byrialsen, E.M. Soerensen, U.M. Riber et al. Uncertainty Statements Regarding USP Reference Standards // Pharmacopoeial Forum. 2008. № 34(2). URL: www.uspph.com/pf/ (дата обращения 05.03.2016).
23. R.G. Manning, S. Lane, S. Dressman et al. The application of uncertainty to USP's reference standards program: certified reference materials // Pharmacopoeial Forum. 2007. V. 33 (6). P. 1300–1310.
24. R.L. Williams. Official USP Reference Standards: metrology concepts, overview, and scientific issues and opportunities // Jour. Pharm. Biomed. Anal. 2006. V. 40(1). P. 3–15.
25. W.F. Koch, W.W. Hauck, S.S. de Mars, R.L. Williams. Measurement science for food and drug monographs: toward a global system // Pharm. Res. 2010. V. 27(7). P. 1203–1207.
26. ISO/IEC 17025:2005: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization. ISO copyright office. – Geneva. 2005.
27. A.G. Daas, J.H. Miller. Relationship between content limits, system suitability for precision and acceptance. Rejection criteria for Assays using chromatographic methods // Pharmeuropa. 1999. V. 11(4). P. 571–577.
28. Д.А. Леонтьев, А.И. Гризодуб. Метрологический контроль результатов анализа: специфика применения концепции неопределенности в фармацевтическом анализе // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 4(5). С. 68–75.
29. А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, М.Г. Левин. Метрологические аспекты официальных методик контроля качества лекарственных средств. 1. Методики ВЭЖХ // Фізіологічно активні речовини. 2001. № 1(31). С. 32–44.
30. А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпружников. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта // Фармаком. 2004. № 3. С. 3–17.
31. Д.А. Леонтьев. Фармацевтические стандартные образцы // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества ЛС / Под ред. чл.- корр. НАН Украины В. П. Георгиевского. – Харьков: Изд-во НТМТ, 2012. Т. 3. С. 1064–1118.
32. Д.А. Леонтьев, А.И. Гризодуб, А.А. Зинченко и др. Квалификация лабораторного оборудования – метрологическая концепция. Сообщение 2. Реализация метрологической концепции для спектрофотометров УФ- и видимой областей спектра // Фармацевтическая отрасль. 2013. № 5(40). С. 106–110.
33. А.И. Гризодуб, М.Г. Левин М. Г., Д.А. Леонтьев и др. Аттестация стандартных образцов. Сообщение 1. Аттестация вторичных стандартных образцов для количественного хроматографического анализа лекарственных средств // Фармаком. 1999. № 2. С. 46–51.
34. Д.А. Леонтьев, А.И. Гризодуб. Метрологический контроль результатов анализа: требования к максимально допустимой неопределенности для количественного определения и гарантия качества продукции // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 3(8). С. 10–17.

КОМПЛЕКСНОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ ЛАБОРАТОРИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ

Досье на серию РФП - это ключевой документ, подтверждающий качество произведенного препарата. В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIII для подтверждения качества РФП необходимо проводить такие виды анализов, как высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, тонкослойная хроматография, гамма-спектрометрия, осмометрия, определение наличия бактериальных эндотоксинов, определение pH, объемной активности РФП с определением периода полураспада меточного радионуклида. Для указанных видов анализа в портфеле ГК «Фармконтракт» представлено соответствующее оборудование известных мировых производителей

ВЭЖХ-хроматограф Agilent Technologies
Определение радиохимической чистоты РФП, качественного и количественного наличия примесей

Газовый хроматограф Agilent Technologies
Определение содержания остаточных растворителей в РФП

pH-метр METTLER TOLEDO
Высокая точность определения кислотно-щелочного баланса анализируемого РФП

РЕЗУЛЬТАТЫ КАЖДОГО АНАЛИЗА – ЗАЛОГ УСПЕШНОГО ФОРМИРОВАНИЯ ДОСЬЕ НА СЕРИЮ РФП!

ГК «Фармконтракт» предлагает комплексные решения для лабораторий контроля качества РФП на основе оборудования ведущих мировых производителей, обеспечивающего оперативность и точность получения результатов с соблюдением требований защиты производственного персонала от ионизирующего излучения РФП

Специализированное защитное оборудование COMECER

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 800 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
info@phct-group.com

УДК 614.2:615.1

1 – ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450000, Россия, г. Уфа, ул. Ленина, 3

1 – Bashkir State Medical University, 3, Lenina str., Ufa, 450000, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: gaisarov@list.ru

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕЕСТРА ТИПОВЫХ ИНСТРУКЦИЙ ВЗАИМОЗАМЕНЯЕМЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЦЕЛЯХ УЛУЧШЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА

Г.Я. Ибрагимова[1], А.Х. Гайсаров[1]*, Р.В. Насыров[1]

Резюме. В статье проведен анализ правового регулирования возрастных ограничений по применению лекарственных препаратов у детей в Российской Федерации. Предложены способы преодоления правовой неопределенности между типовой инструкцией взаимозаменяемых лекарственных препаратов и инструкциями конкретных лекарственных препаратов, утвержденных при их государственной регистрации. Обоснована необходимость разработки перечня сведений, которые обязательно будут вноситься в типовую инструкцию взаимозаменяемых лекарственных препаратов. Исследованы перспективы использования реестра типовых инструкций взаимозаменяемых лекарственных препаратов в целях улучшения лекарственного обеспечения лиц детского возраста.

Ключевые слова: реестр типовых инструкций, лекарственные препараты, пациенты детского возраста.

THE PROSPECTS OF THE USING OF THE REGISTER OF THE STANDARD LABELS OF THE INTERCHANGEABLE MEDICINES TO IMPROVE OF DRUG SUPPLY OF PEDIATRIC PATIENTS

G.Ia. Ibragimova[1], A.Kh. Gaisarov[1]*, R.V. Nasyrov[1]

Abstract. In this article the current state of the legal regulation of age restriction for using of medicines in children in Russian Federation has been analyzed. The ways for addressing legal uncertainties between the register of the standard labels of the interchangeable medicines and labels of concrete medicines, approved at their state registration, have been offered. The necessity of development of the list of data for compulsory including in the register of the standard labels of the interchangeable medicines have been proved. The prospects of the using of the register of the standard labels of the interchangeable medicines to improve of drug supply of pediatric patients have been studied.

Keywords: the register of the standard labels, medicines, pediatric patients.

ВВЕДЕНИЕ

Применение лекарственных препаратов у лиц детского возраста в силу ряда причин имеет определенные особенности. При проведении фармакотерапии у детей остается нерешенной проблема назначения лекарственных препаратов не в соответствии с инструкцией по их медицинскому применению [1]. Одним из способов минимизации подобных назначений при использовании лекарственных препаратов является строгое соблюдение возрастных ограничений, установленных их производителями в инструкциях по медицинскому применению этих препаратов.

В настоящее время инструкция по медицинскому применению является единственным юридическим документом, устанавливающим особенности применения конкретного лекарственного препарата. Так, возможность применения лекарственного препарата у детей определяется только на основании утвержденной инструкции по медицинскому применению данного препарата. Согласно подпункту «к» пункта 5 части 4 статьи 18 Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (далее – ФЗ «Об обращении лекарственных средств») инструкция по медицинскому применению любого лекарственного препарата должна содержать «указание возможности и особенностей применения лекарственного препарата для медицинского применения… детьми…» [4].

Учитывая вышесказанное, можно сделать вывод, что в настоящее время возможна ситуация, когда лекарственные препараты с одинаковым международным непатентованным наименованием (далее – МНН), в той же лекарственной форме и дозировке, выпускаемые различными произ-

водителями, тем не менее отличаются по возможности и/или особенностям их применения у детей. В связи с этим анализ перспектив использования реестра типовых инструкций взаимозаменяемых лекарственных препаратов в целях улучшения лекарственного обеспечения пациентов детского возраста является актуальным.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходными материалами являлись тексты нормативных правовых актов Российской Федерации (Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Федерального закона от 05.04.2013 № 44-ФЗ «О контрактной системе в сфере закупок товаров, работ, услуг для обеспечения государственных и муниципальных нужд», приказа Минздрава России от 20.12.2012 № 1175н «Об утверждении порядка назначения и выписывания лекарственных препаратов, а также форм рецептурных бланков на лекарственные препараты, порядка оформления указанных бланков, их учета и хранения»), данные инструкций по медицинскому применению лекарственных препаратов, размещенных в онлайн-версии Государственного реестра лекарственных средств. В процессе исследования применялись грамматический и логический способы толкования нормативных правовых актов, а также анализ инструкций по медицинскому применению лекарственных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами был проведен анализ инструкций по медицинскому применению лекарственных препаратов по данным, представленным в онлайн-версии Государственного реестра лекарственных средств. Выявлено, что четыре зарегистрированных лекарственных препарата с МНН «калия и магния аспарагинат» в лекарственной форме «раствор для внутривенного введения» и с одинаковой дозировкой тем не менее имеют существенное различие в возможности их применения у лиц детского возраста: три из них разрешены для применения без возрастных ограничений, а четвертый запрещен для применения у лиц до 18 лет (таблица 1).

Похожая картина наблюдается для лекарственных препаратов со следующими МНН в различных лекарственных формах: «метамизол натрия», «дротаверин», «натрия тиосульфат» и др.

1 июля 2015 года вступило в силу множество поправок в ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Одной из них стало наделение федерального органа исполнительной власти (Министерства здравоохранения Российской Федерации) полномочием по формированию реестра типовых инструкций по медицинскому применению взаимозаменяемых лекарственных препаратов (пункт 22 статьи 5 ФЗ «Об обращении лекарственных средств»).

Пункт 12.3 статьи 4 ФЗ «Об обращении лекарственных средств» устанавливает определение взаимозаменяемого лекарственного препарата: это лекарственный препарат с доказанной терапевтической эквивалентностью или биоэквивалентностью в отношении референтного лекарственного препарата, имеющий эквивалентные ему качественный состав и количественный состав действующих веществ, состав вспомогательных веществ, лекарственную форму и способ введения [4]. При этом используемый в целях такого сравнения референтный лекарственный препарат определен как лекарственный препарат, который впервые зарегистрирован в Российской Федерации, качество, эффективность и безопасность

Таблица 1.

Возможность применения различных лекарственных препаратов с МНН «калия и магния аспарагинат» у лиц детского возраста

№ п/п	Торговое наименование	Производитель	Лекарственная форма и форма выпуска	Возможность применения у лиц детского возраста
1	«Аспаркам-L»	ОАО «Биосинтез», Россия	Раствор для внутривенного введения, ампулы 5/10 мл	Противопоказан лицам до 18 лет
2	«Панангин»	АО «Гедеон Рихтер», Венгрия	Раствор для внутривенного введения, ампулы 10 мл	Нет ограничений
3	«Аспаркам-Фармак»	ПАО «Фармак», Украина	Раствор для внутривенного введения, ампулы 5/10/20 мл	Нет ограничений
4	«Аспангин»	ЗАО «Брынцалов-А», Россия	Раствор для внутривенного введения, ампулы 5/10 мл	Нет ограничений

которого доказаны на основании результатов доклинических исследований лекарственных средств и клинических исследований лекарственных препаратов (пункт 11 статьи 4 ФЗ «Об обращении лекарственных средств) [4].

В настоящее время отсутствуют какие-либо нормативные правовые акты, утверждающие реестр типовых инструкций по медицинскому применению взаимозаменяемых лекарственных препаратов, а также порядок его разработки и ведения.

ПРЕОДОЛЕНИЕ ПРАВОВОЙ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ ПРИ СОЗДАНИИ РЕЕСТРА ТИПОВЫХ ИНСТРУКЦИЙ

Несомненно, действие типовых инструкций будет распространяться только на взаимозаменяемые лекарственные препараты, то есть препараты с доказанной терапевтической эквивалентностью или биоэквивалентностью в отношении референтного препарата. Однако необходимо отметить, что при создании реестра типовых инструкций нельзя допустить возникновения правовой неопределенности. Необходимо четко указать правовой статус типовых инструкций по медицинскому применению препаратов, то есть наличие или отсутствие их приоритета над инструкциями, утвержденными при государственной регистрации лекарственных препаратов и содержащимися в Государственном реестре лекарственных средств (далее – инструкции производителей препаратов). При этом возможны различные варианты:

I. Содержание типовой инструкции полностью совпадает с содержанием инструкций производителей препаратов. Другими словами, перечень сведений, вносимых в типовую инструкцию, будет соответствовать перечню сведений, вносимых в инструкции производителей препаратов. Данная ситуация будет возможна при законодательном закреплении полного соответствия инструкций производителей взаимозаменяемых препаратов инструкции производителя референтного препарата. В последующем при необходимости во все эти инструкции автоматически будут вноситься изменения. Например, если в отношении референтного препарата будет доказана возможность его применения у лиц с 12 лет и изменена его инструкция, то это изменение будет внесено также и в типовую инструкцию, и во все инструкции производителей взаимозаменяемых препаратов. Основная сложность здесь заключается в обеспечении одномоментного внесения необходимых изменений и в реестр типовых инструкций, и в Государственный реестр лекарственных средств.

II. Типовая инструкция не совпадает в полном объеме с инструкциями производителей препаратов. В этом случае во избежание правовой коллизии все сведения, имеющиеся в типовой инструкции, также должны содержаться в инструкциях всех аналогичных препаратов. В отношении остальных сведений будут допускаться различия между взаимозаменяемыми препаратами и референтным препаратом. Одномоментное внесение изменений во все эти инструкции будет допускаться только в рамках сведений, содержащихся в типовой инструкции.

По нашему мнению, первоочередная задача, которую необходимо решить, – это разработка перечня сведений, которые обязательно будут вноситься в типовую инструкцию по медицинскому применению взаимозаменяемых лекарственных препаратов. При этом одними из важнейших сведений, которые должны содержаться в типовой инструкции, являются возможность и особенности медицинского применения лекарственных препаратов у лиц детского возраста. Недопустима ситуация, когда лекарственные препараты с одинаковой терапевтической эквивалентностью или биоэквивалентностью имеют различные возрастные ограничения по медицинскому применению.

Существующие в настоящее время расхождения в возрастных ограничениях между препаратами с одинаковым МНН вызывают значительные сложности при осуществлении закупок лекарственных препаратов для медицинских организаций, оказывающих педиатрическую помощь, в том числе и в условиях чрезвычайных ситуаций. Не вызывает сомнений, что эффективность оказания медицинской помощи детям в условиях чрезвычайных ситуаций во многом зависит от обеспеченности лекарственными препаратами [2]. При этом государственная закупка лекарственных препаратов по общему правилу осуществляется по МНН [5]. Следовательно, в запасах (в том числе и в укладках), создаваемых на случай возникновения чрезвычайных ситуаций, могут встречаться различные торговые наименования лекарственных препаратов, имеющих одно МНН, но отличающихся по возрастным ограничениям. Все это может привести к негативным правовым последствиям для медицинских работников, оказывающих помощь пострадавшим детям. Очевидно, что медицинские работники должны быть уверены, что любой лекарственный препарат с данным МНН, находящийся в составе запасов, может быть применен у детей определенного возраста вне зависимости от того, какое у этого препарата торговое наименование.

Кроме того, затруднения возникают и при отпуске из аптечных организаций лекарственных препара-

тов, выписанных для лечения лиц детского возраста. Так как лекарственные препараты по общему правилу выписываются по МНН [3], увеличивается риск отпуска лекарственного препарата, не разрешенного для применения в данной возрастной группе. Включение в типовую инструкцию сведений о возможности и особенностях медицинского применения взаимозаменяемых лекарственных препаратов у детей позволит избежать правовой неопределенности и, следовательно, решит эту проблему.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выявлено, что в настоящее время в Российской Федерации возможность применения лекарственных препаратов у детей определяется только на основании инструкций по медицинскому применению данных препаратов, утвержденных при их государственной регистрации.

2. Показано, что в настоящее время в Российской Федерации ряд лекарственных препаратов, имеющих одинаковые международное непатентованное наименование, лекарственную форму и дозировку, выпускаемые различными производителями, тем не менее отличаются по возможности и/или особенностям их применения у детей. Одним из способов решения данной проблемы является учет возрастных ограничений по применению лекарственных препаратов у детей в реестре типовых инструкций взаимозаменяемых лекарственных препаратов, создание которого предусмотрено Федеральным законом от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

3. Предложены способы преодоления правовой неопределенности между типовой инструкцией взаимозаменяемых лекарственных препаратов и инструкциями конкретных лекарственных препаратов, утвержденных при их государственной регистрации и содержащихся в Государственном реестре лекарственных средств.

4. Обоснована необходимость разработки перечня сведений, которые обязательно будут вноситься в типовую инструкцию по медицинскому применению взаимозаменяемых лекарственных препаратов, при этом одним из таких сведений должна быть информация о возможности и особенностях применения лекарственных препаратов у детей.

5. Исследованы перспективы использования реестра типовых инструкций взаимозаменяемых лекарственных препаратов в целях улучшения лекарственного обеспечения лиц детского возраста, заключающиеся в устранении правовых неопределенностей в области закупки лекарственных препаратов (в том числе и предназначенных для оказания медицинской помощи детям, пострадавшим в условиях чрезвычайных ситуаций), отпуска из аптечных организаций лекарственных препаратов, выписанных пациентам детского возраста, а также медицинского применения лекарственных препаратов у детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. С.К. Зырянов, Ю.Б. Белоусов. Использование лекарств в педиатрии: есть ли проблемы? // Медицинские технологии. Оценка и выбор. 2011. № 2. С. 37–41.
2. Р.В. Насыров, Г.Я. Ибрагимова, А.Х. Гайсаров. Разработка функциональной модели формирования запасов медицинского имущества для оказания медицинской помощи лицам детского возраста, пораженным в условиях чрезвычайных ситуаций // Медицинский вестник Башкортостана. 2015. Т. 10. № 5(59). С. 5–9.
3. Приказ Минздрава России от 20.12.2012 № 1175н «Об утверждении порядка назначения и выписывания лекарственных препаратов, а также форм рецептурных бланков на лекарственные препараты, порядка оформления указанных бланков, их учета и хранения» (ред. от 30.06.2015) // Российская газета. 2013. № 142 (3 июля).
4. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (ред. от 29.12.2015) // Собрание законодательства РФ. 2010. № 16 (19 апреля). Ст. 1815.
5. Федеральный закон от 05.04.2013 № 44-ФЗ «О контрактной системе в сфере закупок товаров, работ, услуг для обеспечения государственных и муниципальных нужд» (ред. от 05.04.2016) // Собрание законодательства РФ. 2013. № 14 (8 апреля). Ст. 1652.

УДК 615.1;
616–053.2

1 – Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, 14/A, Professor Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: nemyatyh@yandex.ru

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

И.А. Наркевич[1], О.Д. Немятых[1]*, И.И. Басакина[1], Д.Д. Сиукаева[1]

Резюме. Обобщены принципы рациональной фармакотерапии в педиатрической практике, которые должны базироваться на особенностях фармакодинамических и фармакокинетических параметров в условиях воздействия лекарственных средств на детский организм. Установлено, что решение проблемы разработки высокоэффективных и безопасных лекарственных форм для детей невозможно без учета медицинских, фармацевтических и регуляторных аспектов.

Ключевые слова: фармацевтическая разработка, педиатрия, лекарственный препарат.

PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF DRUGS FOR PEDIATRIC PRACTICE: FUNDAMENTAL BASES AND SPECIFIC FEATURES

I.A. Narkevich[1], O.D. Nemyatykh[1]*, I.I. Basakina[1], D.D. Siukaeva[1]

Abstract. The principles of the rational pharmacotherapy in pediatric practice are generalized. It should take into account characteristics of pharmacokinetic and pharmacodynamic of drugs influences on the children organism. It is established, that solution of problem for development of high-potent and harmless pharmaceutical forms for children is impossible without including medical, pharmaceutical and regulatory aspects.

Keywords: pharmaceutical development, pediatrics, drug.

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних десятилетий проблема фармакотерапии в детской практике остается одной из самых актуальных и острых для медицины и фармации [1–6]. Это обусловлено тем, что, к сожалению, часто при выборе лекарственных препаратов недооцениваются или вовсе игнорируются этико-деонтологические принципы педиатрической фармакологии, а именно: многочисленные препараты, применяемые у взрослых, по аналогии используются в детской практике, что в условиях современного уровня развития фармацевтической области недопустимо.

Организм ребенка имеет ряд анатомо-физиологических особенностей, которые чаще всего и определяют его отличительную (по сравнению со взрослым) реакцию на введение ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов. Поэтому рекомендованные для взрослых принципы лечения и профилактики патологических состояний в детском возрасте не всегда оказываются эффективными и обоснованными и требуют взвешенного подхода.

На сегодняшний день многочисленными авторами [5, 7–11] выделен ряд особенностей организма ребенка, которые влияют на кинетику и метаболизм лекарственных средств у детей различных возрастных групп, что не может не отразиться на фармакотерапевтической эффективности последних. К таким особенностям относятся в первую очередь специфичность всасывания, которая обусловлена значениями pH желудочного сока, состоянием моторики желудочно-кишечного тракта, проницаемостью слизистых желудочно-кишечного тракта. Кроме того, известна низкая связывающая способность белков печени (лигандины) и плазмы крови, что увеличивает свободную (активную) фракцию лекарственных веществ и обуславливает коррекцию дозового режима применения лекарственных средств. Установлено относительное преимущество внеклеточной жидкости, что определяет особенности распределения в организме ребенка как водорастворимых, так и жирорастворимых лекарственных веществ. Важно отметить повышенную проницаемость мембранных структур капилляров, гематоэнцефалического барьера, что влияет на характер и уровень дистрибьюции лекарственных веществ по органам и тканям и требует особого внимания при проведении инфузионной терапии. Кроме того, замедленные

темпы функционирования ферментных систем, превращающих ксенобиотики в неактивные и водорастворимые формы (система микросомального окисления цитохрома Р-450-оксидазы печени, ферментные системы глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы, уридиндифосфатглюкозы-глюкуронилтрансферазы и др.), приводят к накоплению в организме активного лекарственного вещества. При этом низкие величины клубочковой фильтрации (30–40% от уровня взрослого организма), канальцевой секреции и реабсорбции, замедляющие процессы выведения лекарств и их метаболитов, способствуют задержке и накоплению лекарственных средств в организме. Незрелость гормональных систем, в том числе низкий уровень катехоламинов, наряду с пониженной чувствительностью тканевых рецепторов к гормонам, гормоноподобным и другим веществам с выраженным биологическим действием требует особого подхода к проведению гормоно- и противовоспалительной фармакотерапии у детей.

Все вышеперечисленное обуславливает специфику всасывания, связывания лекарственных веществ на этапе их биотранспорта, распределения в организме, а также определяет скорость метаболизма и элиминации.

БЕЗОПАСНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ПЕДИАТРИИ

Известно, что организм ребенка, особенно раннего возраста, характеризуется незрелостью (или отсутствием) ряда ферментных систем, играющих важную роль в биотрансформации многих лекарственных веществ. В частности, монооксигеназная система у новорожденных и детей младшего возраста настолько слаба, что период полувыведения эуфиллина составляет 100 ч, в то время как у взрослого всего 6; период полувыведения хлорамфеникола после введения препарата в дозе 5–25 мг/кг составляет в среднем 26 ч у младенцев и только 4 ч у детей 5-летнего возраста [8]. Одни лекарственные вещества мало инактивируются в организме детей (левомицетин), другие (салицилаты, парацетамол) – активно. Важно подчеркнуть, что метаболизм парацетамола у детей значительно отличается от взрослых: в результате биотрансформации не происходит образования токсичных метаболитов, что вызвано незрелостью цитохрома Р-450 [8, 12].

Установлено, что элиминация отдельных препаратов происходит медленнее (тетрациклин, мочевина), чем у взрослых, элиминация других (пенициллин) подобна таковой у взрослых. Следует отметить, что в организме ребенка катаболические эффекты глюкокортикоидов более выражены, а продукты метаболизма анаболических стероидов более токсичны. Ганглиоблокаторы практически не меняют уровня артериального давления у детей до 3 лет [8].

Замедленная биотрансформация объясняет тот факт, что дети достаточно чувствительны к препаратам, которые содержат анионы азотной кислоты (серебра нитрат), а также к анестезину, фенацетину, сульфаниламидам, которые при длительном применении могут привести к метгемоглобинемии. Недостаточная активность системы коэнзима А обуславливает развитие аллергических реакций на сульфаниламидные препараты и способствует формированию синдрома Reye, что проявляется прежде всего токсической энцефалопатией и жировой дегенерацией печени. При этом пролонгированные сульфаниламиды значительно более токсичны для детей (поражение печени, экссудативная полиморфная эритема слизистых оболочек и т.д.) [8, 13, 14].

Низкая концентрация белка в плазме крови младенцев и детей первых лет жизни (46–52 г/л по сравнению с 72–80 г/л у взрослых) приводит к увеличению свободной фракции лекарственного вещества и развитию побочных и токсических эффектов от обычных терапевтических доз. Именно этот факт и обуславливает высокую токсичность и гипербилирубинемию, стремительно развивающуюся на фоне приема производных салицилатов, сульфаниламидов, нитрофуранов, местных анестетиков, а также кофеина и викасола [8, 15].

Обсуждая вопросы безопасного применения лекарственных препаратов у детей, нельзя оставить без внимания возрастную динамику уровня проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), определяющего степень распределения последних в ликворе и центральной нервной системе. Известно, что в детском возрасте ГЭБ хорошо проницаем для подавляющего числа ксенобиотиков, в отличие от взрослых. Так, установлено, что через гематоэнцефалический барьер в раннем возрасте легко диффундируют метиленовый синий, хлорид калия, фосфор, глутаминовая кислота, фенобарбитал, морфин, билирубин [7–9]. Данное обстоятельство нужно учитывать при назначении этих лекарственных средств в детской практике.

Важно помнить, что лекарственные средства могут влиять на плод в случае способности фармакологически активных ингредиентов проникать через плацентарный барьер. В этой плоскости обращают на себя внимание тератогенные свойства (особенно в первые три месяца беременности) ряда лекарственных препаратов (противоопухолевые, наркотические, снотворные средства, средства для наркоза, антитиреоидные, сульфаниламидные средства, антибиотики группы тетрациклинов, аминогликозиды, левомицетин), которые плохо связываются с белками крови в силу их устойчивости к процессам диссоциации, ионизации или особенностей физико-химических свойств (жирорастворимые вещества с небольшой молекулярной массой). Тератогенным эффектом обладают антигистаминные препараты, природные и синтетические кортикостероиды, кортикотропин, салицилаты, кофе-

ин. Этанол даже в невысоких концентрациях вызывает «алкогольный синдром плода», характеризующийся врожденными дефектами и нарушениями умственного и физического развития детей.

Прием лекарственных препаратов беременной женщиной может также вызвать токсическое воздействие на плод, проявляющееся уже после его рождения (салицилаты вызывают геморрагические кровоизлияния, на фоне приема аминогликозидных антибиотиков может развиться глухота и др.). Примером могут служить также побочные реакции на диэтилстильбэстрол, который именно из-за отсроченной тератогенности запрещен к применению. В литературе известен термин «поведенческая тератогенность», предполагающий в качестве одной из причин асоциального поведения подростков прием женщиной во время беременности отдельных лекарственных препаратов [5, 7–9, 12–15].

В период грудного вскармливания лекарственные вещества могут поступать к ребенку с молоком матери. При этом важно знать, какие лекарственные средства экскретируются с грудным молоком, а какие – нет. Попадать в организм ребенка и оказывать фармакологический эффект, сходный с таковым для взрослых, могут как метаболиты (сибазон, левомицетин, изониазид), так и фармакологически активные соединения (аминазин, фенобарбитал, дифенин, резерпин, пропранолол, ацетилсалициловая кислота, неодикумарин, пенициллины, тетрациклин, фуросемид, наркотические анальгетики, этанол). Известно, что в грудном молоке в высоких концентрациях накапливаются тетрациклин, левомицетин, реализующие токсическое действие в отношении костной ткани и состава крови (апластическая анемия) ребенка. Важно также помнить, что некоторые лекарственные препараты (пенициллин, аминогликозиды) хорошо проникают в грудное молоко, однако попав к ребенку через рот, не всасываются в желудочно-кишечном тракте [8, 9].

Исходя из опасности развития побочных эффектов у грудных детей, ряд лекарственных препаратов (парацетамол, фенацетинсодержащие препараты, налидиксовая кислота, соли лития, радиоактивные соли кальция, йода, атропин, антикоагулянты, антитиреоидные препараты, антиметаболиты, бромиды, тетрациклин, наркотические анальгетики, метронидазол) беременным женщинам противопоказан. Необходима осторожность также при назначении барбитуратов, препаратов раувольфии, спорыньи, диазепама, препаратов золота, салицилатов, а также слабительных, сульфаниламидов [1, 7–9].

В последние годы фармакологи и клиницисты подчеркивают важность рационального дозирования лекарственных средств, применяемых в детской практике. Учитывая, что каждый период в жизни ребенка отличается своими особенностями формирования нервной, эндокринной, мышечной, сердечно-сосудистой и других систем, для получения желаемой реакции на лекарственный препарат необходимо рассчитать оптимальную дозу ксенобиотиков. На сегодняшний день разработаны общие принципы дозирования лекарств с учетом уровня реактивности организма, а именно: расчет препарата по весу, возрасту ребенка, как «доля от дозы взрослого», по дозис-фактору, объему распределения и поверхности тела ребенка и др. [2].

Таким образом, при фармацевтической разработке лекарственных средств для педиатрической практики необходимо учитывать особенности фармакодинамики и фармакокинетики действующего вещества у детей разных возрастных групп, а также возможность проявления побочного действия последних. Исходя из данных рассуждений, весьма значимой представляется коррекция доз лекарственных средств с учетом особенностей онтогенетического развития ребенка, анатомо-физиологических особенностей, а также характера и степени тяжести патологического процесса.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ В ПЕДИАТРИИ

Учитывая то обстоятельство, что фармакотерапия, в том числе и в детской практике, строится прежде всего на оценке безопасности лекарственных средств, отдельные аспекты фармакологической коррекции заболеваний в педиатрии имеют свои особенности. Так, антибактериальная терапия строится по принципу «выбора и тактики мягкого режима». Использование отдельных групп высокоактивных антибиотиков (тетрациклин, аминогликозиды) и химиотерапевтических средств (фторхинолоны) в педиатрической практике ограничено [7, 8, 16].

Результаты последних исследований указывают на приемлемый профиль безопасности, а также высокую эффективность ибупрофена и парацетамола. Рекомендуемые дозы парацетамола и ибупрофена для детей до 12 лет составляют 60 мг/кг/сут и 5–20 мг/кг/сут соответственно. Применение же широко известной ацетилсалициловой кислоты в педиатрической практике лимитировано. Важно подчеркнуть, что ацетилсалициловая кислота противопоказана детям с вирусной инфекцией или подозрением на нее в связи с возможным поражением слизистой оболочки желудка и развитием синдрома Reye, летальность при котором превышает 50%.

При разработке лекарственных препаратов для терапии острых кишечных инфекций следует иметь в виду, что в перечень возбудителей, при выделении которых проведение антибактериальной терапии является оправданным, входят *Shigella spp.*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*. Исходя из того, что штаммы возбудителей на сегодняшний день устойчивы к традиционным препаратам (тетрациклин, хлорамфеникол, налидиксовая кислота, ампициллин, ко-тримоксазол), рационально проводить фармакологическую коррекцию полусинтетическими пенициллинами с преимущественной активностью в отношении грамотрицательных

возбудителей, а также макролидами (азитромицин) [8]. При этом программа терапии диарейного синдрома у детей включает не только использование энтеросорбентов, но и лечебное питание (кисломолочные продукты, пищевые волокна), микробиологическую коррекцию (пре- и пробиотики, бактериофаги), а также предполагает назначение иммуномодуляторов (виферон, нуклеинат натрия, ликопид и др.) [7, 8].

На сегодняшний день установлено, что в случае гастродуоденальных заболеваний препаратами выбора для детской практики являются достаточно мягкие магнийсодержащие средства (маалокс), которые снижают интенсивность микробной колонизации верхних отделов пищеварительного тракта за счет повышения резистентности слизистой оболочки желудка и кишечника. Эрадикацию *Helicobacter pylory* у детей до 12 лет рекомендуется проводить с помощью фуразолидона и фурагина, проявляющих высокую эффективность в отличие от традиционно используемого метронидазола, в отношении которого сформирована микробная резистентность. Стоит отметить, что для современной педиатрии неоспоримым представляется тот факт, что фармакотерапия заболеваний желудочно-кишечного тракта полностью исключает применение тетрациклина [2].

Учитывая анатомо-физиологические особенности кожи младенцев и детей младших возрастных групп (в первую очередь высокую биодоступность ксенобиотиков при трансдермальном введении), в состав лекарственных форм для наружного применения не рекомендуется вводить вещества, обладающие токсическим действием (борная кислота), способствующие ускорению процессов эксфолиации, меняющие ее проницаемость, нарушающие тепло- и газообмен (салициловая кислота, гидроксикислоты, вазелин, парафин, ланолин и др.), а также обладающие раздражающим действием (ментол, анестезин, деготь, калия перманганат) [1].

Особенно актуальна в педиатрии проблема полипрагмазии: риск осложнений повышается при назначении одновременно нескольких лекарственных средств на фоне физиологически обусловленного замедленного метаболизма. Так, на сегодняшний день установлено, что в случае комбинированной терапии антибиотиками, жаропонижающими, антигистаминными препаратами и иммуностимуляторами на фоне вирусных заболеваний процент аллергизации намного выше, чем при раздельном использовании химиотерапевтических средств в лечении бактериальных инфекций. Установлено, что некоторые лекарственные средства влияют на усвоение и биотрансформацию витаминов, особенно жирорастворимых. Так, известно, что слабительные, холестирамин и ему подобные липидснижающие препараты нарушают абсорбцию витаминов А, Д, Е; противосудорожные средства, антибиотики, используемые для эрадикации *H. pylory*, существенно изменяют метаболизм витамина К и других водорастворимых витаминов [8].

ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ДЛЯ ДЕТЕЙ

Нельзя оставить без внимания то обстоятельство, что фармакотерапия в педиатрии допускает использование препаратов в стандартных лекарственных формах (капсулы, таблетки, мази, суппозитории, растворы для парентерального введения, глазные и назальные капли, сборы и др.). Однако современный уровень развития медицины требует использования лекарственных средств в виде специальных детских лекарственных форм, обеспечивающих возрастное дозирование действующего вещества, эффективность и удобство использования. На сегодняшний день в педиатрической практике широко применяют препараты в виде корригированных сиропов, суспензий, пастилок, водорастворимых порошков, гранул и таблеток с приятным вкусом.

Кроме того, фармацевтическая промышленность выпускает лекарственные формы для ингаляций, при использовании которых происходит автоматическая координация актов вдоха и введения препарата, что очень важно в детской практике; доставка действующих веществ в легкие осуществляется с помощью устройств для ингаляции, таких как небулайзеры, аэролайзеры, спинхалеры, турбохалеры, ротахалеры и др. [2, 17–19].

Исходя из тезиса относительно приемлемых вкусовых свойств лекарственной формы как одного из ключевых критериев, которые позволяют использовать препарат в педиатрии, а также результатов исследований, которые указывают на возможность разработки лекарственных средств на основе кондитерских изделий, довольно перспективным представляется создание и внедрение в медицинскую практику лекарственных карамелей, мармелада, желе и т.д. [20].

Таким образом, среди факторов, определяющих степень и характер воздействия фармакологически активных веществ на детский организм, ключевое место занимает вид лекарственной формы, что в значительной мере влияет на биодоступность препарата за счет варьирования уровня и интенсивности протекания процессов всасывания, связывания с белками крови, распределения и элиминации [7]. Особенности рыночного сегмента обуславливают достаточно высокий уровень требований, предъявляемых к препаратам для педиатрии, к которым в первую очередь относят высокую биодоступность с оптимально выраженным фармакотерапевтическим эффектом, использование только высококачественных субстанций и адекватный подбор вспомогательных веществ соответственно возрасту. При этом действие лекарственного средства должно проявляться на фоне минимального риска развития побочных реакций. В свете данных рассуждений особую значимость приобретают также органолептические аспекты применения препарата (приятный вкус, запах, привлекательный внешний вид).

Важно подчеркнуть требование об отсутствии действующих веществ, влияющих на рост и развитие тканей, снижающих иммунитет или являющихся токсичными (тетрациклин и др.). В качестве вспомогательных веществ для детских лекарственных форм можно использовать только индифферентные, преимущественно натуральные продукты, которые разрешены к применению в медицинской практике. Исходя из этого, в состав лекарственных средств не рекомендуется вводить сахар (глюкозу) и этанол. В данной плоскости обращает на себя внимание принципиальная позиция фармацевтических компаний ряда стран (Великобритания, Дания, Австрия, страны мусульманского мира), выпускающих лекарственные препараты для педиатрической практики без содержания этанола, смертельная доза которого в концентрации 95% для детей младшего возраста составляет лишь 10 мл (рисунок 1, таблица 1).

Таблица 1.

Максимально допустимые концентрации этанола в препаратах для педиатрии

Возраст ребенка	Концентрация этанола, %
младше 6 лет	0,5
6–12 лет	5
старше 12 лет	10

Учитывая достаточно высокий риск передозировки лекарственных средств у детей, установлены требования о наличии дозирующего устройства в препаратах многократного использования (аэрозоли, сиропы, суспензии и т.п.) и невозможности самостоятельного употребления лекарственного средства детьми (особенно в случае содержания сильнодействующих веществ) [2, 8, 16] .

В последнее время в значительной степени увеличился интерес к аспекту бактериологической чистоты лекарственных форм, в том числе предназначенных для новорожденных и младенцев. Важно отметить, что опасность микробной контаминации обусловлена как возможной пирогенной реакцией, так и вероятной модификацией лекарственного вещества в токсичный продукт.

Рисунок 1. **Побочное действие этанола на организм ребенка**

Лекарственные формы для новорожденных и жидкие лекарственные препараты, предназначенные для детей первого года жизни, должны быть стерильными (или приготовленными в асептических условиях). В рассматриваемом аспекте особую опасность несут мягкие лекарственные формы, а также сиропы, микстуры, которые имеют высокую концентрацию углеводов и/или содержат вытяжки из лекарственного растительного сырья и являются хорошим субстратом для развития микроорганизмов [2, 8] .

Следовательно, в качестве промежуточного итога можно прийти к заключению, что лекарственные формы, в которых выпускаются сегодня препараты для педиатрической практики, достаточно разнообразны, что, в свою очередь, позволяет обеспечить высокоэффективную и безопасную фармакологическую коррекцию патологических состояний различного генеза. Однако на практике провести рациональную фармакотерапию довольно сложно: на сегодняшний день насыщенность фармацевтического рынка препаратами с детскими дозировками и удобными для применения в педиатрии формами выпуска недостаточна. Несмотря на то, что за последние десятилетия ассортимент детских лекарственных форм расширился, менее 50% препаратов имеет установленную эффективность и безопасность у детей, что, в свою очередь, обуславливает нерациональные (off label, unlicensed drug) назначения и обеспечивает довольно высокие показатели (до 10%) госпитализации в результате медикаментозных осложнений [5, 6, 21, 22].

РЕГУЛЯТОРНЫЕ АСПЕКТЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ

Анализ базисных основ фармацевтической разработки и регулирования обращения препаратов для педиатрии в разрезе международного рынка показал, что в мировой практике отсутствует единый подход, однако фармацевтические производители ряда стран мотивированы проводить хорошо спланированные, надлежащим образом организованные, этически оправданные клинические исследования с участием детей. Так, регуляторная политика в США основана на предоставлении разработчикам детских препаратов различных преференций, а также обязательном характере педиатрических исследований (таблица 2). Ключевой вектор в фармацевтической разработке препаратов для европейской педиатрии направлен в сторону регламентации порядка проведения клинических исследований (таблицы 3, 4). В Японии действующие до 2000 г. руководства по клиническим исследованиям «Руководство по разработке лекарственных средств для педиатрического использования» и «Общие положения для клинических исследований новых лекарственных средств» сегодня заменены требованиями ICH E11. Следует подчеркнуть, что при предоставлении данных клинических исследований в педиатрии срок регистрации лекарственного средства может продлеваться до 10 лет [23–36].

Таблица 2.

Ключевые этапы формирования регуляторной политики в разрезе разработки детских лекарственных препаратов в США

1994	**Pediatric Labeling Rule**
	Попытка улучшения существующих инструкций по применению лекарственного средства за счет обязательства производителей пересмотреть имеющиеся инструкции в отношении данных применения у детей и подать соответствующие поправки (Педиатрическое правило Кесслера).
1997	**Pediatric Rule** **FDAMA: Food and Drug Administration Modernization Act**
	Принятие Закона о модернизации и ответственности Федерального управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств [предоставление возможности 6-месячного продления срока эксклюзивности данных в качестве награды производителю за проведение детских клинических исследований и разработку детских лекарственных форм («педиатрическая эксклюзивность»)].
2002	**BPCA: Best Pharmaceutical For Children Act**
	Закон продлевает действие программы поощрения детских клинических исследований еще на 5 лет, а также устанавливает механизм, посредством которого можно проводить детские клинические исследования.
2003	**PREA: Pediatric Research Equity Act**
	В соответствии с PREA производители обязаны подавать данные детских клинических исследований для всех новых лекарственных средств, новых показаний к применению, новых дозировок, режимов дозирования и способов введения, при этом заявка на регистрацию должна содержать данные для оценки безопасности и эффективности лекарственных средств и обоснования режима дозирования и способа введения для каждой педиатрической категории пациентов. Разрешалось экстраполировать данные эффективности клинических исследований у взрослых, если такая экстраполяция подкреплялась соответствующими детскими исследованиями фармакокинетики, фармакодинамики и безопасности. В определенных случаях производитель мог получить полный или частичный отказ от этого требования или отсрочку проведения детских клинических исследований.
2007	**FDAAA: Food and Drug Administration Amendments Act (Закон о внесении изменений Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств)**
	Закон FDAA продлевает действие двух основных законов: BPCA и PREA.

Таблица 3.

Ключевые этапы формирования регуляторной политики в разрезе разработки детских лекарственных препаратов в Европе

1997	**EMEA Round Table**
	Европейская комиссия Европейского агентства по лекарственным средствам (EMEA) организовала круглый стол экспертов для обсуждения проблем детских лекарственных средств. Одной из рекомендаций круглого стола было осознание необходимости усиления законодательства, особенно посредством введения системы экономических стимулов, к проведению детских клинических исследований.
1998	**ICH Discussion**
	Европейская комиссия инициировала международное обсуждение проблем детских клинических исследований в рамках работы Международной конференции по гармонизации технических требований для регистрации медицинских препаратов, предназначенных для людей. Эта международная организация работает над гармонизацией регуляторных требований Европейского союза, США и Японии в отношении регистрации ЛС.
2000	**Guideline ICH E11** Руководство ICH E11 «Клинические исследования лекарственных средств в педиатрической популяции».
	В руководстве ICH E11 были рассмотрены следующие аспекты проведения педиатрических клинических исследований: • факторы, влияющие на содержание программы исследований; • типы клинических исследований; • этические вопросы в педиатрических исследованиях.
2002	**Consultation Paper**
	Публикация Европейской комиссией для обсуждения документа «Лучшие лекарственные средства для детей – предложение по законодательным действиям в отношении педиатрических препаратов».
2006	**Pediatric Regulation Agreed**
	Согласование документа «Лучшие лекарственные средства для детей – предложение по законодательным действиям в отношении педиатрических препаратов».
2007	**Pediatric Regulation Into Force**
	Вступление в силу документа «Лучшие лекарственные средства для детей – предложение по законодательным действиям в отношении педиатрических препаратов».

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что в 2007 г. сформирован педиатрический кластер, который является этической и научной основой для планирования и проведения педиатрических исследований (рисунок 2). При этом на протяжении периода с 2007 по 2016 гг. в рамках кластера состоялось 129 обсуждений актуальных аспектов разработки детских

Таблица 4.

Сравнительный анализ регуляторной политики в разрезе разработки детских лекарственных препаратов ЕС и США

	ЕС	США
Регуляторный орган	Европейское агентство по оценке лекарственных средств (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)	Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration)
Комитет по детям	Педиатрический комитет (Paediatric Committee)	Педиатрический комитет (Pediatric Review Committee)
Введение в действие	2007	2007
Педиатрическое законодательство	European Pediatric Regulation	BPCA, PREA
Основной документ	План педиатрических исследований	Письменный запрос FDA
Область применения	Лекарственные и иммунобиологические препараты	Лекарственные препараты
Инициатор педиатрического плана	Компания-разработчик	Требование FDA
Неклинические исследования	Должны включаться	Могут включаться
Характеристика препарата	Полная характеристика продукта, включая описание лекарственных форм для различных возрастных групп	Декларация о разработке лекарственных форм для различных возрастных групп

Рисунок 2. Структура международного педиатрического кластера

лекарственных форм, а также произведен обмен информацией по 400 объектам [37].

На сегодняшний день в России принят национальный стандарт рационального использования лекарственных препаратов в педиатрии [21]. При этом следует отметить, что гарантией полного представления о профиле безопасности лекарственного средства у детей может служить только сочетание клинических исследований в детской популяции с эффективно функционирующей системой фармаконадзора в стране.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, обобщая все вышеизложенное, следует отметить, что принципы рациональной фармакотерапии в педиатрической практике должны строиться исключительно с учетом особенностей реактивности детского организма, что в значительной мере ограничит возможность развития прямых побочных реакций и позволит провести максимально эффективное и безопасное лечение. Решение проблемы рациональной фармакологической коррекции детских заболеваний лежит в плоскости как медицинских, так и биофармацевтических аспектов, в том числе с учетом новейших достижений фармацевтической технологии, что, в свою очередь, обеспечит наличие на российском фармацевтическом рынке широкого ассортимента лекарственных форм, которые соответствуют приемлемым для педиатрии терапевтическим концепциям. При этом модели государственного регулирования обращения препаратов для детей требуют взвешенного и научно обоснованного подхода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д.І. Дмитрієвський, О.Д. Немятих. Розробка лікарських препаратів для педіатрії: реалії та перспективи // Фармаком. 2008. № 3. С. 41–46.
2. O.P. Gudzenko, O.D. Nemyatykh, I.I. Basakina. The invention of drugs for pediatrics: reality and prospects // The Pharma Innovation Journal. 2014. V. 2. № 12. P. 36–41.
3. С.С. Завидова, Л.С. Намазова-Баранова, С.В. Тополянская. Клинические исследования лекарственных препаратов в педиатрии: проблемы и достижения // Педиатрическая фармакология. 2010. Т. 7. № 1. С. 6–14.
4. G.L. Kearns et al. Developmental pharmacology – drug disposition, action and therapy in infants and children // N Eng J Med. 2003. V. 349(12). P. 1157–1167.
5. И.В. Василевский. Клиническая фармакология и педиатрическая практика // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. 2014. № 6(12) С. 5–23.

6. А.Р. Титова и др. Нерегламентированное (off-label) применение лекарственных препаратов в педиатрической практике: нерешенные проблемы // Педиатрическая фармакология. 2015. № 12(3). С. 304–308.
7. И.Б. Михайлов. Основы фармакотерапии детей и взрослых: Руководство для врачей. – М.: АСТ; СПб: Сова, 2005. 798 с.
8. Л.В. Савченкова, О.Д. Немятих. Фармакотерапія в педіатрії: особливості, небезпека і перспективи // Клінічна фармація. 2008. Т. 12. № 2. С. 4–10.
9. А.И. Тенцова. Возрастные лекарства. – М. 1983. 63 с.
10. I.H. Bartelink, C.M.A. Rademaker, A.F.A.M. Schobben. Guidelines on Paediatric Dosing on the Basis of Developmental Physiology and Pharmacokinetic Considerations // Clin. Pharmacokinet. 2006. № 45. P. 1077–1097.
11. Клинические рекомендации. Педиатрия / Под. ред. А.А. Баранова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005.
12. B. Gitanjali. Essential medicines for children: Should we focus on a priority list of medicines for the present? // J Pharmacol Pharmacother. 2011. № 2(1). P. 1–2.
13. R. Kaushal, D. Goldmann, C. Keohane. Adverse drug events in pediatric outpatients // Ambulatory Pediatrics. 2007. V. 7. P. 383–389.
14. K.L. Easton-Carter, C.B. Chapman, J.A. Brien. Adverse drug reactions in paediatrics // Journal of Pharmacy Practice and Research. 2007. V. 33. P. 106–110.
15. A. Clavenna, M. Bonati. Adverse drug reactions in childhood: a review of prospective studies and safety alerts // Arch Dis Child. 2009. V. 94. P. 724–728.
16. J. Bellis, J. Kirkham, S. Thiesen. Adverse drug reactions and off-label and unlicensed medicines in children // BMC Medicine. 2013. V. 11. P. 238.
17. А.А. Баранов и др. Рациональная фармакотерапия в педиатрии и педиатрический формуляр лекарственных средств // Медицинские технологии. Оценка и выбор. 2011. № 2. С. 50–53.
18. J. Swarbrick. Encyclopedia of pharmaceutical technology. – New York; London. 2007. 4128 p.
19. British Pharmacopoeia. – London. 1998. 1204-1207.
20. Патент № 53209 Україна, МПК A61K 36/00. Лікувально-профілактичний засіб на основі ехінацеї у формі желе / Д.І. Дмитрієвський, О.Д. Немятих. – № u201004476; заявл. 16.04.2010; опубл. 27.09.2010. 5 с.
21. Российский национальный педиатрический формуляр / Под ред. А.А. Баранова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. 912 с.
22. Справочная информация: лекарства, предназначенные для детей. URL: http://www.who.int/childmedicines/media/backgrounder/BG1/ru/ (дата обращения 06.06.2016).
23. L. Cuzzolin L, A. Atzei, V. Fanos. Off-label and unlicensed prescribing for newborns and children in different settings: a review of the literature and a consideration about drug safety // Expert Opinion on Drug Safety. 2006. V. 5(5). P. 703–718.
24. И.В. Смоленов. Педиатрические клинические исследования: от поощрений – к регуляторным требованиям // Педиатрическая фармакология. 2010. Т. 7. № 4. С. 7–11.
25. L. Lindell-Osuagw et al. Off-label and unlicensed drug prescribing in three paediatric wards in Finland and review of the international literature // J. of Clin. Pharm. and Therap. 2009. V. 34(3). P. 277–287.
26. E. Schirm et al. Lack of appropriate formulations of medicines for children in the community // Acta Paediatrica. 2003. V. 92(12). P. 1486–1489.
27. J. Zisowsky, A. Krause, J. Dingemanse. Drug Development for Pediatric Populations: Regulatory Aspects // Pharmaceutics. 2010. № 2. P. 364–388.
28. J.L. Blumer. Off-label Uses of Drugs in Children // Pediatrics. 1999. № 104. P. 598–602.
29. P. Auby. Pharmaceutical research in paediatric populations and the new EU Paediatric Legislation: an industry perspective // Child Adolescent Psychiat. Ment. Health. 2008. № 2. P. 38.
30. O. Dewit, R. Tiner. Working with the pharmaceutical industry in relation to paediatric clinical trials. A British perspective // Paediatr. Perinat. Drug Ther. 2008. № 8. P. 140–144.
31. E. Manolis, G. Pons. Proposals for model-based paediatric medicinal development within the current European Union regulatory framework // Br. J. Clin. Pharmacol. 2009. № 68. P. 493–501.
32. G.F. Egger et al. A Comparative Review of Waivers Granted in Pediatric Drug Development by FDA and EMA from 2007-2013 // Therapeutic Innovation & Regulatory Science. 2016. May. P. 1–9.
33. L. Cuzzolin, A. Zaccaron, V. Fanos. Unlicensed and off label uses of drugs in paediatrics: a review of the literature // Fund Clin Pharmacol. 2003. V. 17. P. 125–131.
34. I. Choonara, S. Conroy. Unlicensed and off-label drug use in children: implications for safety // Drug Saf. 2002. V. 25(1). P. 1–5.
35. A. Neubert, H. Dormann, J. Weiss. The impact of unlicensed and off-label drug use on adverse drug reactions in paediatric patients // Drug Saf. 2004. V. 27(13). P. 1059–1067.
36. M. Miller, K. Robinson, L. Lubomski. Medication errors in paediatric care: a systematic review of epidemiology and an evaluation of evidence supporting reduction strategy recommendations // Qual Saf Health Care. 2007. V. 16(2). P. 116–126.
37. International Collaboration / Pediatric Cluster. URL: http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/PediatricTherapeuticsResearch/ucm106621.htm (дата обращения 03.06.2016).

УДК 661.12;
658.562;
615.07

ОБЗОР, ХАРАКТЕРИСТИКА И АНАЛИЗ ПОСЛЕДНИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТРЕБОВАНИЯХ GMP

Ю.В. Подпружников[1], В.Н. Шестаков[2]*

1 – Национальный фармацевтический университет, 61168, Украина, г. Харьков, ул. Валентиновская, 4

2 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик», 109044, Россия, г. Москва, Лавров переулок, 6

2 – National University of Pharmacy, 4, Valentynivska str., Kharkiv, 61168, Ukraine

2 – The State Institution «State Institute of Drugs and Good Practices», 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: shestakov@gilsinp.ru
Тел.: 8 (495) 676 43 60

Резюме. Регуляторные требования в сфере промышленного производства постоянно повышаются, что находит отражение в правилах надлежащей производственной практики. В обзоре дана характеристика и проведен анализ изменений в правилах GMP, касающихся персонала, помещений и оборудования, производства, контроля качества, работы с рекламациями и отзывами, а также новых редакций приложений по квалификации и валидации, подтверждению уполномоченным лицом соответствия серии продукции с целью ее выпуска. Для содействия интерпретации и внедрению этих новаций как в практику предприятий-производителей, так и в перспективе в работу регуляторных органов были проанализированы также сопутствующие информационные источники. В обзоре представлены рекомендации относительно приоритетов и точек приложения усилий по внедрению рассмотренных изменений.

Ключевые слова: надлежащая производственная практика, изменения в требованиях, валидация, перекрестная контаминация.

REVIEW, CHARACTERISTICS AND ANALYSIS OF THE LAST CHANGES IN THE GMP REQUIREMENTS

Yu.V. Podpruznikov[1], V.N. Shestakov[2]*

Abstract. The regulatory requirements are constantly increasing in the medicines manufacturing sphere, which is reflected in the good manufacturing practice rules. The changes in the GMP regulations relating to personnel, premises and equipment, production, quality control, complaints, quality defects and product recalls, as well as a new version of qualification and validation annex and certification by a Qualified Person and batch release annex have been characterized and analyzed in a review. The related information sources have also been analyzed in order to facilitate the interpretation and implementation of these innovations in the practice of company-producers and, in the long term, the work of the regulatory authorities. The review provides recommendations on the priorities and points of application of efforts to implement the changes discussed.

Keywords: Good Manufacturing Practice, changes in the requirements, validation, cross-contamination.

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы гармонизации нормативных требований к производству лекарственных средств (ЛС) являются актуальными как для Российской Федерации, так и для государств-членов ЕАЭС, особенно в преддверии общего рынка обращения медикаментов в рамках ЕАЭС. Основой для гармонизации этих требований являются правила GMP ЕС [1] и отвечающие им правила GMP Организации по сотрудничеству фармацевтических инспекций (PIC/S) [2].

Характерной особенностью правил GMP является то, что они достаточно быстро изменяются. При этом изменения в GMP ЕС вносятся практически ежегодно. В Российской Федерации после утверждения Минпромторгом правил надлежащей производственной практики в 2013 году изменения в текст этих правил не вносились. Новая редакция, учитывающая ряд нижеперечисленных в данном обзоре изменений, существует в виде проекта правил надлежащей производственной практики ЕАЭС, опубликованного в 2015 году [3].

Изменения требований GMP связаны с развитием научно-технического прогресса в технологии, методах контроля и системах обеспечения производств, а также с разработкой и выводом на рынок лекарственных препаратов следующих поколений, совершенствованием систем контроля технологического процесса и продукции, введением новых требований в фармакопеи и проч. Ни одна из прочих надлежащих практик не изменяется настолько быстро, как GMP. Изменения, вносимые в GMP ЕС, касаются как основных глав GMP, так и приложений, в том числе могут изменяться содержание и количество приложений, их нумерация, структура самого документа и его содержание. Сложность поддержания нормативной базы в актуальном состоянии заключается в том, что эти изменения необходимо отслеживать и внедрять в установленные сроки, что необходимо как для промышленности, так и для регуляторных органов. Чтобы это обеспечить, необходима систематическая работа по отслеживанию и имплементации этих изменений в национальные GMP. Наличие гармонизиро-

ваной нормативной базы в сфере фармацевтического производства необходимо для дальнейшего развития российской фармацевтической промышленности, расширения географии экспорта.

В последние годы количество изменений в GMP становится еще больше, причем эти изменения захватывают как структуру документа, так и его содержание, включая модификацию концептуальных основ GMP [4]. Со времени принятия в 2013 году российских правил GMP в виде обязательного для исполнения приказа Минпромторга № 916 [5] в GMP ЕС и PIC/S были внесены значительные изменения. Эти изменения касаются очень важных требований к персоналу, помещениям и оборудованию, производству, контролю качества, работе с рекламациями и отзывами продукции. Были приняты новые редакции приложений по квалификации и валидации, а также по подтверждению уполномоченным лицом соответствия серии продукции с целью ее выпуска.

Настоящий обзор посвящен разбору, характеристике и анализу последних наиболее важных изменений в требованиях правил надлежащей производственной практики. При этом будут также охарактеризованы сопутствующие документы, которые послужили первопричиной указанных изменений, а также документы, позволяющие легче понять и внедрить эти новации как в практику предприятий-производителей, так и – после утверждения обновленной нормативной базы в установленном порядке – в работу регуляторных органов.

ПЕРСОНАЛ

Основные изменения, которые были внесены в главу «Персонал», связаны с дальнейшей имплементацией положений документа ICH Q10 «Фармацевтическая система качества» [6] в соответствующие разделы GMP. Так, в новой редакции главы подчеркивается ответственность именно высшего руководства предприятия за эффективное функционирование фармацевтической системы качества (ФСК) и за достижение целей в области качества. В частности, высшее руководство несет ответственность за обеспечение достаточных и надлежащих ресурсов (человеческих, финансовых, материальных, технических средств и оборудования), чтобы внедрить и поддерживать ФСК и постоянно ее улучшать.

Высшее руководство должно установить политику в области качества, которая описывает общие цели и направления деятельности организации в отношении качества и должна обеспечить постоянное соответствие и эффективность системы управления качеством и соблюдение GMP посредством участия в управленческих проверках (иногда их называют анализом со стороны руководства).

Впервые в GMP ЕС говорится о целесообразности наличия руководителя подразделения по обеспечению качества, который вместе с руководителем производства, руководителем службы контроля качества и уполномоченным лицом относится к руководящему (ключевому) персоналу. Указанные руководители имеют общие или совместно выполняемые обязанности, относящиеся к качеству, включая, в частности, разработку, эффективное осуществление, мониторинг и поддержание ФСК.

Внесенные в главу изменения предусматривают обучение персонала теории и практике системы управления качеством. Это обучение дополняет обучение правилам GMP и обучение соответственно закрепленным за персоналом обязанностям, которое ранее считалось достаточным. Отмечается, что указанной системой обучения должны быть охвачены не только сотрудники подразделений производства и контроля качества, но и персонал, отвечающий за хранение лекарственных средств (ЛС).

В ныне действующую редакцию главы «Персонал» GMP ЕС было внесено требование относительно консультантов, которые привлекаются предприятием для проведения определенных работ или услуг, связанных с производством ЛС. Отмечается, что консультанты должны иметь соответствующее образование, подготовку и опыт работы или любое их сочетание для того, чтобы консультировать по вопросам, для решения которых они привлекаются. Следует вести записи с указанием имени, адреса и квалификации консультантов, а также типа предоставляемых ими услуг.

Внесенные в главу «Персонал» изменения свидетельствуют о дальнейшей имплементации ряда положений стандартов ISO [7] в обязательные требования GMP, то есть речь идет о продолжении тенденции к постепенной интеграции этих систем менеджмента качества, начало которому было положено в документе «Фармацевтическое качество XXI века» [8].

ПОМЕЩЕНИЯ И ОБОРУДОВАНИЕ

Особое внимание в GMP уделяется предотвращению перекрестной контаминации, так как считается, что это один из наиболее опасных факторов негативного воздействия на пациента. Существовавшие ранее требования в отношении необходимости выделения в отдельные производства некоторых ЛС были неоднозначными. Такие обособленные помещения и системы их обеспечения требовались при производстве пенициллинов и биологических препаратов, содержащих живые микроорганизмы. Кроме этого, в одних и тех же помещениях не допускалось производство «отдельных видов антибиотиков, определенных гормонов, цитотоксинов, высокоактивных ЛС и продукции, не являющейся ЛС». Кроме неоднозначности в понятиях

«отдельные» и «определенные», правила GMP допускали «в исключительных случаях» производство таких ЛС по принципу «кампаний» при соблюдении специальных мер предосторожности и проведении необходимой валидации. При такой формулировке требований было неясно как для промышленности, так и для регуляторов, какие же это «определенные» препараты и какие могут быть «исключительные случаи».

Следует отметить, что нормативная правовая база РФ в этом отношении содержит более четкие и однозначные требования. В действующем Положении о лицензировании производства лекарственных средств [9], указаны группы препаратов (в частности, бета-лактамные антибиотики, гормоны, цитостатики, иммунобиологические медицинские препараты и ряд других), требующие специального выделения в отдельное производство, то есть это те препараты, которые не должны выпускаться по совмещенной схеме с другими группами ЛС (иногда такое производство называют многоцелевым).

Практика жесткого запрещения производства пенициллинов по совмещенной схеме с иными классами ЛС существует в США начиная с 70-х годов прошлого столетия. Там этот запрет имеет статус федерального закона [10] и должен неукоснительно соблюдаться производителями. В производстве пенициллинов требуется раздельный от других классов ЛС поток материалов, специально предназначенные помещения, оборудование, системы нагревания, вентиляции и кондиционирования воздуха (HVAC) и задействованный в данном производстве персонал. Американская система нормативных правовых актов, когда все обязательные требования должны быть прописаны именно в законах, имеет свои преимущества и недостатки. К последним относится то, что законодательные нормы при возникновении необходимости невозможно поменять оперативно – на их изменения зачастую уходят годы и десятки лет. То же произошло и с запретом производства пенициллинов по совмещенной схеме. В современном медикаментозном арсенале, кроме пенициллинов, существуют еще четыре класса бета-лактамных антибиотиков (цефалоспорины, пенемы, карбацефемы и монобактамы), которые также имеют побочное сенсибилизирующее действие. Однако формально законодательное ограничение, действующее в отношении пенициллинов, на иные классы бета-лактамов в США не распространяется. Чтобы как-то исправить эту ситуацию, Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) было разработано руководство для промышленности в отношении производства бета-лактамных антибиотиков, которые не относятся к пенициллинам [11]. В этом руководстве рекомендуется разделять производство каждого отдельного класса бета-лактамных антибиотиков аналогично тому, как это требуется при выделении производства пенициллинов. Однако данное руководство не является обязательным (то есть это так называемые ожидания инспекторов), и инспектор FDA США, встречая совмещенное производство непенициллиновых бета-лактамов с обычными группами ЛС, не имеет права зафиксировать никакого нарушения (на уровне закона нарушений нет).

В изменениях к главе 3 GMP ЕС 2015 года отражены приоритеты по предотвращению перекрестной контаминации, которая должна быть исключена для всех выпускаемых ЛС, начиная с этапов проектирования и эксплуатации производственных помещений. Меры по предотвращению перекрестной контаминации должны быть соизмеримы с рисками (под риском понимается риск для пациента, который должен быть минимизирован). Отмечается, что препараты не должны производиться на одном и том же производственном участке (то есть по совмещенной схеме), если имеет место хотя бы одно из следующих обстоятельств:

1) риск перекрестной контаминаации не может должным образом ограничиваться организационными и/или техническими мероприятиями;

2) научные данные по токсикологической оценке не подтверждают контролируемый уровень риска (например, аллергизирующее действие высокосенсибилизирующих веществ, таких как бета-лактамы);

3) необходимые пределы остаточных количеств, полученные путем токсикологической оценки, не могут быть определены с помощью валидированной аналитической методики.

Если хотя бы одно из вышеперечисленных обстоятельств имеет место, следует выделить такие производства в отдельные (изолированные, специализированные) участки с собственными инженерными системами. Степень такого выделения (участок в целом, либо специализированная автономная зона, либо отдельные единицы оборудования или отдельные его части) должна быть обоснована производителем. При этом во главу угла ставится безопасность пациента и ненанесение ему никакого вреда за счет возможных остаточных количеств препаратов на производственной линии. В свою очередь, возможность производства препаратов по совмещенной схеме должна обосновываться исходя из дозы и токсикологического воздействия используемых активных фармацевтических субстанций (АФС). Для оценки такого токсикологического воздействия АФС на пациентов в часть III GMP ЕС с июня 2015 года был введен в действие новый документ «Руководство по установлению пределов воздействия на здоровье для их использования в идентификации рисков при совмещенном про-

изводстве» [12]. Некоторые положения нового руководства будут рассмотрены ниже.

Принятые производителем решения в отношении предотвращения перекрестной контаминации являются критически важными в рамках GMP, поэтому они подвергаются тщательной проверке со стороны инспекторов GMP в процессе инспектирования производства. Более подробно технические и организационные мероприятия по предотвращению перекрестной контаминации изложены в главе 5 GMP и будут рассмотрены ниже.

ПРОИЗВОДСТВО

В современной версии 5 главы GMP ЕС концепция предотвращения перекрестной контаминации кардинально изменилась по сравнению с подходом, который применялся ранее. Современные требования GMP основаны на предотвращении рисков для пациента. Результат процесса управления рисками для качества служит основанием для определения необходимости и степени, в которой помещения и оборудование должны быть специализированы (выделены) для конкретного ЛС или группы ЛС. При оценке рисков следует использовать учет дозы и токсикологическую оценку всех АФС, которые используются в совмещенном производстве. Это, в свою очередь, предполагает применение предела, основанного на допустимом воздействии на здоровье (Permitted Daily Exposure, PDE). Для того чтобы подробно разъяснить применение данного критерия и изложить методологию расчета предела допустимого воздействия (PDE), Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) было разработано и введено в действие новое руководство [12]. PDE представляет собой дозу по конкретным АФС, которая вряд ли вызовет неблагоприятный для пациента эффект при воздействии на него такой дозы ежедневно в течение всей жизни. На указанный критерий ссылается новая (2015 года) редакция глав 3 и 5, а также приложения 15 GMP [1]. Новой обязанностью производителя является проведение оценки значений PDE для всей номенклатуры препаратов, выпускаемых на производственной площадке по совмещенной схеме. В руководстве [12] приведен формат отчета по оценке величины PDE и отмечается, что он оформляется в такой форме, чтобы облегчить работу инспекторов GMP с этим отчетом. В этом руководстве [12], описывающем современный подход к оценке рисков перекрестной контаминации, особое внимание уделяется не конкретным классам АФС, а именно видам и степени их токсикологического действия. Соответственно в качестве наиболее опасных выделяют АФС, которые имеют высокосенсибилизирующее действие, канцерогенный эффект, генотоксичное действие, а также вещества, влияющие на репродуктивную функцию и/или развитие плода.

Как указывалось выше, к наиболее опасным контаминантам с высокосенсибилизирующим действием относятся антибиотики бета-лактамного ряда. Очень опасной является также контаминация лекарственных препаратов, предназначенных для инъекций, и лекарственных препаратов, принимаемых в больших дозах и/или длительное время.

Для предотвращения перекрестной контаминации современные правила GMP предусматривают целый арсенал технических и организационных мер. Рекомендуемые технические мероприятия:

- специализированные технические средства (помещения и оборудование);
- автономные производственные зоны с отдельным технологическим оборудованием и HVAC, возможно, с другими инженерными системами;
- соответствующий дизайн техпроцесса, помещений и оборудования, минимизирующий возможности перекрестной контаминации в процессе производства, технического обслуживания и уборки;
- «закрытые системы» для обработки и передачи материалов/продукции между единицами оборудования;
- физические барьерные системы, в том числе изоляторы;
- контролируемое удаление пыли вблизи источника загрязнения (например, местная вытяжка);
- специализированное оборудование или контактирующие с препаратом отдельные его части, которые трудно очистить (например, фильтры), ремонтный инструментарий;
- использование одноразовых технологий;
- использование оборудования, сконструированного для облегчения очистки;
- воздушные шлюзы и каскад давления;
- минимизация риска контаминации, связанного с рециркуляцией недостаточно очищенного воздуха;
- использование автоматизированных систем очистки на месте с валидированной эффективностью;
- для обычных общих зон стирки – разделение моечного оборудования, зон сушки и хранения спецодежды.

К организационным мероприятиям по предотвращению перекрестной контаминации относятся:

- производство кампаниями (циклами производства, разделенными во времени) с последующей очисткой с использованием валидированных процедур;

- хранение спецодежды внутри зон, где обрабатывается продукция, создающая особенно большой риск перекрестной контаминации;
- проверка степени очистки после каждой кампании по выпуску препарата для обнаружения остатков препаратов, представляющих высокий риск;
- контроль очистки поверхностей, не контактирующих с продукцией, и мониторинг состояния воздуха;
- специальные меры по обращению с отходами, загрязненными промывными водами, и загрязненной спецодеждой;
- регистрация случаев утечки, аварий или отклонений от процедур;
- очистка помещений и оборудования сама по себе не должна представлять риска перекрестной контаминации;
- подробные записи по очистке, использование этикеток со статусом «очищено» в помещениях и на оборудовании;
- использование общих прачечных по принципу кампаний;
- контроль поведения персонала во время работы для обеспечения эффективности обучения и выполнения соответствующего контроля процесса.

Как правило, для предотвращения перекрестной контаминации нельзя ограничиться только одним из вышеперечисленных мероприятий, обычно задействуются сразу несколько технических и организационных мероприятий. Решение о необходимости и степени, в которой помещения и оборудование должны быть специализированы для конкретного препарата или группы препаратов, принимает производитель, при этом должна использоваться методология управления рисками [13]. Эффективность мероприятий по предотвращению перекрестной контаминации следует периодически проверять в соответствии с установленными процедурами.

Как уже отмечалось выше, регуляторные требования постоянно идут по пути увеличения их строгости. Так, в новой (2015 года) редакции 5 главы GMP ЕС содержится однозначное требование к производителям готовых лекарственных средств (ГЛС) о необходимости проведения ими обязательных аудитов производителей и поставщиков субстанций с целью оценки степени соответствия последних требованиям GMP (производителей АФС) или надлежащей дистрибьюторской практики (Good Distribution Practice, GDP). Производитель ГЛС проводит такие аудиты либо самостоятельно, либо с помощью организации, действующей по его поручению в соответствии с договором. Аудиты должны быть соответствующей продолжительности и масштаба, для того чтобы произвести полную и четкую оценку соответствия требованиям GMP или GDP. Дальнейшие аудиты необходимо проводить с интервалами, которые определяются на основе управления рисками.

Отметим, что правила GDP, гармонизированные с международными, в России разработаны Минздравом и находятся в данный момент на согласовании с другими министерствами и ведомствами. Отдельные правила GDP для АФС не разработаны (хотя вряд ли в России есть необходимость в таких дополнительных правилах, если учесть действующую в РФ систему лицензирования фармдеятельности и регистрации ЛС).

Требование об обязательном проведении аудитов мест производства АФС является логичным продолжением введенного с 2013 года в ЕС требования о сопровождении письменным подтверждением всех поставок субстанций, импортируемых из третьих стран. Такое подтверждение выдает регуляторный орган страны-экспортера, и там указывается, что производство субстанции(ий) соответствует GMP, регулярно инспектируется и при возникновении проблем с качеством субстанции(ий) об этом незамедлительно будут уведомлены регуляторные органы ЕС. Форма такого подтверждения входит отдельным документом в часть III GMP ЕС [1]. Отметим, что законодательством Российской Федерации и других государств-членов ЕАЭС и СНГ указанная форма такого подтверждения не предусмотрена, поэтому данный документ не может использоваться как обязательный в границах юрисдикции этих стран. В новых требованиях 5 главы GMP отмечается, что уровень надзора за производителями сырья должен быть пропорционален рискам, связанным с отдельными видами сырья (учитывая источник, технологию производства, цепь поставок и его использование в составе ГЛС). В отношении вспомогательных веществ, используемых в производстве ГЛС, в требованиях GMP также произошли существенные изменения. В современном представлении производителям ГЛС следует контролировать производителей и поставщиков вспомогательных веществ. Для этого нужно использовать подход, основанный на документированной оценке рисков, который описан в новом руководстве, включенном в 2016 году в часть III GMP [14]. В новых требованиях GMP отмечается, что закупке и контролю первичных и печатных упаковочных материалов необходимо уделить такое же внимание, как и исходному сырью.

Несмотря на то, что производители субстанций подвергаются указанным выше процедурам аудитов, оценки и утверждения, производитель ГЛС обя-

зан организовать и осуществлять входной контроль всего поступающего на предприятия сырья и материалов. В производстве могут использоваться только сырье и материалы, прошедшие такой контроль и получившие разрешение на использование в соответствии с существующей внутренней процедурой. По каждой субстанции следует оформлять отчеты о цепи поставок, которые позволяют обеспечить прослеживаемость такой цепи и предотвратить фальсификацию. В соответствии с современными требованиями GMP при проведении входного контроля необходимо обеспечивать идентификацию каждого тарного места с поступившим сырьем. Технически это можно проводить с использованием современных экспрессных неразрушающих методов контроля (например, спектроскопии в ближней инфракрасной области, рамановской спектроскопии [15]) или путем отбора проб из каждой емкости и проведения тестов идентификации для каждой из отдельных отобранных проб. Исключения из этого, предусмотренные приложением 8 GMP, заключаются в проведении аудита производителя субстанции и достижении на этой основе уверенности в соблюдении им требований GMP. Однако, если такое сырье используется для производства парентеральных ЛС, идентификацию содержимого каждого поступившего на предприятие тарного места все равно необходимо выполнять. Производитель ГЛС также может ослабить входной контроль, то есть не проводить весь объем испытаний, а опираться на данные, представленные в сертификатах качества на поступающее сырье. Возможность уменьшения производителем ГЛС объема входного контроля предусмотрена нынешней редакцией 5 главы GMP ЕС, однако следует отметить, что такое уменьшение испытаний и тестов при входном контроле сырья должно соответствовать содержанию регистрационного досье на ГЛС. При этом производитель ГЛС перед уменьшением объема входного контроля субстанции обязан предварительно провести аудит лаборатории предприятия – производителя АФС и убедиться в ее компетентности и соответствии требованиям GMP. Сделать это можно как самостоятельно, так и с привлечением внешних специалистов. При принятии результатов сертификата, сопровождающего поставленные серии АФС, следует также учитывать неизменность характеристик сырья при его транспортировании и хранении на всех этапах цепи поставок. Также принимают во внимание имеющийся опыт работы с данным поставщиком и результаты проведенного полного контроля поставленных ранее серий АФС. Для эффективного контроля качества сырья даже при уменьшенном объеме входных тестов и испытаний производитель ГЛС обязан проводить полный контроль качества этого сырья с определенной периодичностью, основанной на оценке рисков.

Следует обратить внимание на новое по своему содержанию регуляторное требование, введенное в GMP ЕС в 2015 году. Это требование связано с тем, чтобы не допустить дефицита в медикаментозном обеспечении населения. Новое требование заключается в том, что производитель ГЛС обязан уведомлять держателя РУ, а тот, в свою очередь, уведомляет регуляторный орган о каких-либо ограничениях в производственных процессах, которые могут привести к нештатным ограничениям поставок ЛС в гражданский оборот.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В октябре 2014 года в требованиях 6 главы GMP ЕС «Контроль качества» произошел ряд изменений. При этом некоторые изменения (те, которые не требуют существенных ресурсов на их внедрение) кажутся нам незначительными, а ряд изменений, напротив, потребует от производителей проведения серьезных мероприятий для разработки и внедрения соответствующих процедур. Работа по реализации выполнения последних требований осложняется тем, что GMP, как правило, указывает, что должно быть сделано, но не как это выполнить. Поэтому мы попытаемся не только охарактеризовать наиболее существенные изменения в требованиях, но и обсудить сопутствующие документы, в которых можно найти методическую основу для облегчения внедрения новых требований.

К незначительным, по нашему мнению, изменениям относятся следующие:

- необходимо выявлять негативные тенденции в изменениях критических показателей качества ЛС, при котором используются статистические методы;
- план отбора репрезентативных проб для проведения испытаний должен быть статистически обоснованным и учитывать принципы управления рисками для качества;
- следует обеспечить корректную маркировку отобранных образцов, их защиту при доставке в лабораторию;
- степень и глубина контроля качества реактивов должна зависеть от уровня их влияния на результаты испытаний сырья, промежуточных продуктов или ГЛС;
- наряду с указанием даты приготовления лабораторных реактивов, растворов, стандартных образцов и питательных сред в их маркировке при необходимости следует указывать дату вскрытия первичной упаковки.

В части проведения микробиологических испытаний в текст главы 6 был введен ряд требований, которые, по нашему мнению, не представляют для производителя ЛС особых трудностей. По сути, эти требования содержались либо в условиях проведения фармакопейных испытаний, либо в действующих нормативных документах по организации и эксплуатации лабораторий микробиологического контроля. Добросовестный производитель в подавляющем большинстве их выполнял и до того, как они были в явном виде внесены в текст правил GMP.

Тем не менее перечислим такие новые для правил GMP требования, как:

- лабораторное оборудование не следует перемещать между зонами высокого риска (то есть между микробиологической лабораторией, а особенно – «заразной» ее зоной) и иными подразделениями;
- необходимо наличие отдельного инструментария для отбора проб веществ, которые являются источником высокого риска контаминации;
- следует располагать микробиологические лаборатории таким образом, чтобы свести к минимуму риск перекрестной контаминации;
- питательные среды должны готовиться в соответствии с требованиями их производителей, перед использованием питательных сред должны быть исследованы их характеристики (в первую очередь это касается ростовых свойств);
- сроки хранения питательных сред в процессе их использования должны быть установлены, научно обоснованы и задокументированы;
- использованные питательные среды и тест-штаммы должны подвергаться деконтаминации в соответствии с СОП и уничтожаться таким образом, чтобы предотвратить перекрестную контаминацию и гарантировать отсутствие остатков контаминантов. Убивочный автоклав следует располагать не в том помещении, в котором проводится стерилизация.

Более подробно требования к лабораториям микробиологического контроля (в том числе контроля стерильности) приведены в рекомендациях ВОЗ [16], которые также можно использовать как информационно-методический материал для усовершенствования работы таких лабораторий.

В современной редакции GMP ЕС подчеркивается важность использования именно фармакопейных стандартных образцов (СО) при контроле качества ЛС с применением конкретной монографии фармакопеи. Исключение из этого, то есть использование вторичных СО (аттестованных с применением фармакопейных СО в качестве первичных), возможно, только если это разрешено соответствующим уполномоченным органом и данное положение внесено в регистрационное досье. В случае использования вторичных, или рабочих, СО на предприятии должна иметься документально оформленная внутренняя процедура (например, СОП) по их аттестации, а сам ход их аттестации должен быть прослеживаемым. Отметим, что, с точки зрения инспекторов GMP, наличие и использование производителем ЛС в процессе контрольных операций надлежащих СО, а также прослеживаемость всех результатов аттестации вторичных СО является критически важным. Если данное требование лабораторией не соблюдается, то нет уверенности в достоверности и объективности результатов, полученных при контроле качества ЛС.

Наиболее важными, с нашей точки зрения, являются изменения в требованиях 6 главы GMP, связанные с верификацией и трансфером (переносом, передачей) аналитических методик. Это принципиально новые требования в сфере GMP, которые могут вызвать значительные затруднения для предприятий-производителей в процессе выполнения данных требований, особенно на первых порах их внедрения. Поэтому мы постараемся дать достаточно развернутую характеристику указанным новым положениям GMP ЕС, в том числе с привлечением сопутствующих информационных источников.

В соответствии с изменениями в главе 6 GMP ЕС лаборатория, которая использует методику испытаний и не провела ее первоначальную валидацию (а это касается, в свою очередь, и фармакопейных методик), должна верифицировать пригодность этой методики. Если раньше в GMP содержалось требование о необходимости проведения валидации всех без исключения аналитических методик, то согласно требованиям GMP США компендиальные (фармакопейные) методики не должны быть валидированы, а требуют верификации, то есть подтверждения того, что данная методика применима в конкретных условиях для конкретного объекта анализа. Такие же положения в отношении проведения именно не валидации, а верификации фармакопейных методик содержатся в ряде фармакопей [17, 18]. В отличие от ревалидации процедура повторной верификации нормативными документами не требуется.

Таким образом, произошедшие изменения в отдельных положениях GMP в определенной мере гармонизируют требования GMP ЕС и инспекторатов, входящих в PIC/S, с фармакопейными требованиями и практикой FDA США в части верификации фармакопейных методик.

По определению монографии USP <1226> верификация фармакопейной методики – это оценка того,

может ли эта методика использоваться по назначению в фактических условиях ее применения по отношению к определенной субстанции или ГЛС [17]. Согласно монографии Государственной фармакопеи Украины (ГФУ) 5.3.N.2 «Валидация аналитических методик и испытаний» верификация должна экспериментально подтвердить то, что данная лаборатория способна корректно воспроизвести фармакопейную методику или испытание (то есть для конкретного аналитического оборудования, для данных используемых реактивов, в данных условиях лабораторной среды, при выполнении анализа аналитиками данной лаборатории и т.п.) [17]. Успешно проведенная верификация предоставляет документальное подтверждение и уверенность в том, что фармакопейная методика действительно может использоваться в конкретной лаборатории для анализа конкретного ГЛС или субстанции. Верификация отличается от валидации аналитических методик тем, что проверяются не все, а отдельные валидационные характеристики. С одной стороны, это уменьшает объемы валидационных работ, с другой – требует от производителя ЛС определения того, какие именно валидационные характеристики являются наиболее значимыми, чтобы доказать пригодность методики. Требования к объему верификации должны учитывать наличие опыта у персонала, сложность методики, используемого оборудования и анализируемого объекта.

Для верификации методик предельного определения примесей USP <1226> рекомендует применять характеристики «специфичность» и «предел обнаружения» [17]. Если проводится количественный контроль примесей, то вместо характеристики «предел обнаружения» определяется предел количественного определения, к этим характеристикам следует добавлять также определение параметра «прецизионность». В указанной выше монографии ГФУ отмечается, что «для контроля качества готовых лекарственных средств фармакопейные методики могут использоваться только после подтверждения... метрологических характеристик методики (например, правильности, линейности или прецизионности методики)» [18]. К сожалению, Фармакопея США не содержит рекомендаций в отношении валидационных характеристик, которые целесообразно применять при проведении количественного определения. По мнению ряда ведущих специалистов, такими характеристиками могут быть «специфичность», «линейность» и «прецизионность» [19]. Отметим, что вопрос перечня необходимых валидационных характеристик, которые исследуются при количественном определении, нуждается в дальнейшей методической проработке.

Проведение верификации для базовых фармакопейных методов не считается необходимым. К таким методам относятся, например, «Потеря в массе при высушивании», «Общая зола», «Кислотное число», простые инструментальные методы и тому подобное. Для того чтобы выяснить, какие методы считаются простыми и какие методики, основанные на этих методах, не требуют верификации, целесообразно обратиться к монографии USP <1058> [20]. Согласно приведенной в этой монографии классификации аналитического оборудования по группам сложности, к простым методам можно отнести оборудование, которое входит в группы A (вспомогательное лабораторное оборудование, такое как магнитные мешалки, центрифуги, ультразвуковые бани и проч.) и B (термометры, pH-метры, рефрактометры и проч.). Верификация фармакопейных методик планируется, проводится и документируется аналогично тому, как это делается при валидации аналитических методик. Для проведения верификации необходимо обеспечить наличие компетентного персонала, соответствующего оборудования, инфраструктуры, реактивов, стандартных образцов и иных составляющих для проведения испытания. Работы по верификации проводятся таким же порядком в отношении планирования и документального оформления, как и иные работы в сфере квалификации и валидации. В случае, если предварительно установленные критерии приемлемости не выполняются и методика не пригодна для анализа данного объекта в конкретной лаборатории, требуется разработка иной методики (то есть не фармакопейной или после существенной модификации) и затем уже ее полная валидация.

Другим принципиально новым требованием GMP является необходимость проведения трансфера аналитических методик. Это положение является логичным распространением требований GMP на все процедуры в сфере производства, которые могут влиять на качество, эффективность и безопасность ЛС. Согласно приведенной в дополнении 2 к документу ICH Q10 [6] схеме модели фармацевтической системы качества, область GMP охватывает трансфер технологии производства препаратов. Это соответствует положениям ФСК о том, что свойства ЛС, заложенные на этапе разработки согласно требованиям ICH Q8 [21], должны неизменно воспроизводиться на этапе промышленного полномасштабного производства. Однако на сегодняшний момент в тексте правил GMP не существует нормативных оснований для проверки инспекторами работ, производимых в части трансфера технологий. Тем не менее мы считаем, что регуляторные требования в сфере GMP должны покрывать вопросы трансфера технологий и изменение требований GMP в данном направлении следует ожидать в недалеком будущем. Первый шаг к установлению таких требований сделан уже сейчас, ведь, по сути, аналитические методики – это инстру-

мент (поддерживающий процесс), сопровождающий основной процесс – трансфер технологий.

Трансфер аналитических методик (TAP) – документированная процедура, которая делает правомочной принимающую лабораторию (receiving laboratory, RL) применять методику, созданную в другой лаборатории, и которая, соответственно, передает эту методику (transferring laboratory, TL). Речь в рамках трансфера может идти о двух лабораториях, либо подразделениях, либо организациях. То есть о месте (например, лаборатории), где методика была разработана, и месте, где она внедряется для ее текущего, то есть рутинного, использования по своему назначению.

Организация, передающая методику, должна удостовериться, что в принимающей лаборатории есть все условия для использования методики по назначению. TAP подтверждает соответствующий уровень навыков RL относительно указанной методики, а также возможность выполнять в этой лаборатории методику, которая передается, в соответствии с ее предназначением. Согласно требованиям GMP передаваемая методика должна быть полностью провалидована в TL до проведения самого трансфера. В главе 6 GMP приводится минимальное содержание протокола TAP и отмечается, что отклонения от протокола должны быть зафиксированы и расследованы до завершения процесса трансфера.

Протокол трансфера методики должен содержать как минимум следующее:

- перечень выполняемых испытаний и методик, подлежащих передаче;
- дополнительные требования к обучению персонала;
- указание стандартов и образцов для испытаний;
- любые специальные условия транспортировки и хранения образцов;
- критерии приемлемости, которые должны быть основаны на текущих валидационных исследованиях и связаны с установленными требованиями.

В отчете о трансфере должны указываться сравнительные результаты процесса и при необходимости области, требующие дальнейшей повторной валидации методики. Более подробно техническая сторона процедуры TAP описана в монографии USP <1224> [22], которая предусматривает один из следующих вариантов проведения TAP:

1) сравнительные испытания однородных образцов одних и тех же серий ЛС или специально изготовленных модельных образцов в двух лабораториях (передающей и принимающей);
2) совместное проведение валидации методики двумя или более лабораториями;
3) полная или частичная валидация методики в RL;
4) обоснованное решение не проводить TAP.

Объем работ, связанных с трансфером методики, должен быть основан на анализе рисков, при этом принимается во внимание опыт и знания принимающей лаборатории, сложность продукции и самой методики.

Указанная монография USP содержит рекомендации по организационным мероприятиям, способствующим успешному трансферу. Среди таких мероприятий: проведение тренинга в RL сотрудниками TL; предыдущая (до проведения официального трансфера) апробация методики в TL; предоставление RL подробной методики, стандартных образцов, отчетов о валидации, оказание помощи при трансфере; обеспеченность RL квалифицированным персоналом, средствами измерения, прошедшими квалификацию, другими необходимыми ресурсами. При всей полезности информации указанная монография не содержит рекомендаций, например, в отношении количества образцов (она может быть разной для разных типов методик) и статистически обоснованных требований успешности трансфера. Некоторые рекомендации по этому поводу содержатся в техническом докладе ВОЗ по трансферу технологий, где обсуждается также TAP [23]. В документе рассматривается самый распространенный вариант осуществления трансфера сравнительные испытания однородных образцов в двух лабораториях – TL и RL. Даются рекомендации по количеству испытуемых образцов и проводимых параллельных определений для методик различного предназначения, приводятся возможные критерии приемлемости. Так, например, для трансфера методики количественного определения с участием двух лабораторий рекомендуется, чтобы были проанализированы не менее 18 образцов в каждой лаборатории (3 параллельных образца двумя аналитиками в трех повторностях). В качестве критериев приемлемости рекомендуется использовать как прямые методы (сравнение средних результатов и дисперсий), так и статистические, основанные на t-критерии. Однако приведенные критерии требуют более детальной проработки и обоснования на основе фармакопейных подходов к статистической обработке результатов, полученных при использовании разных методик. Несколько иной подход к трансферу, основанный на анализе пяти образцов в TL и RL и сопоставлении полученных результатов, описан в монографии [24].

Работы по трансферу методик планируются, регистрируются и оформляются в виде отчетов в таком же порядке, как и работы по проведению валидации.

ПРЕТЕНЗИИ, ДЕФЕКТЫ КАЧЕСТВА И ОТЗЫВЫ ПРОДУКЦИИ

В главе 8 GMP ЕС, которая 1 марта 2015 года была введена в действие в новой редакции, существенно изменилось не только название (добавилось «дефекты качества»), но и содержание. Суть основных изменений в этой главе заключается в том, что при расследовании претензий и дефектов качества, а также принятии соответствующих решений по отзыву продукции необходимо применять принципы управления рисками для качества, чтобы исключить или минимизировать ущерб для пациента. Эти же принципы следует применять при выявлении причин рекламаций, а также при осуществлении корректирующих или предупреждающих мероприятий. Особое внимание обращается на степень дефекта качества и уровень его опасности для пациента. Вводятся дополнительные обязательства по информированию уполномоченных органов о претензиях, дефектах качества и отзывах ЛС.

В соответствии с новой редакцией главы 8 GMP ЕС процедура рассмотрения претензий и дефектов качества должна включать:

- описание потенциального дефекта качества;
- определение значимости (то есть класса) дефекта (при этом возможна проверка контрольных и/или архивных образцов ЛС, а также обзор документации по производству, сертификации или дистрибьюции серии);
- запрос образца или его возврат от заявителя, при необходимости – оценка этого образца;
- оценку риска(ов), который представляет дефект качества, в зависимости от серьезности и значимости этого дефекта;
- процесс принятия решений по снижению риска в сети дистрибьюции посредством отзыва серии или всей продукции и другие действия;
- оценку воздействия отзыва на доступность ЛС на рынке;
- внутренние и внешние коммуникации;
- выявление основной причины (основных причин) дефекта (если истинная причина не может быть выявлена, то определяют наиболее вероятную причину);
- определение соответствующих корректирующих и предупреждающих действий (CAPA), оценка их эффективности.

Как видно из приведенного алгоритма действий, одним из основных этапов является установление значимости дефекта. Требования GMP в явном виде такой классификации не содержат, поэтому нам необходимо обратиться к сопутствующим документам, чтобы понять возможную интерпретацию появляющихся новых требований.

В документах ЕС и PIC/S [25, 26] существует градация возможных дефектов ЛС. Введенная система градации (классы I, II, III) дефектов ЛС предполагает, что чем дефект опаснее для человека, тем более интенсивные и срочные меры реагирования предпринимаются, включая отзыв дефектного ЛС из обращения. В соответствии с такой системой под дефектом I класса понимают дефект, в результате которого ЛС может привести к смерти пациента или к тяжелым последствиям для его здоровья. К такого рода дефектам в соответствии с международными нормами относятся:

- неправильная маркировка ЛС в отношении его названия;
- неправильное указание дозировки, что может привести к серьезным медицинским последствиям;
- отсутствие стерильности инъекционных или офтальмологических ЛС;
- наличие в одной упаковке разных лекарственных препаратов;
- химическая контаминация с серьезными медицинскими последствиями;
- один из активных ингредиентов в многокомпонентном лекарственном средстве иной, чем должен быть, что может иметь серьезные медицинские последствия.

Дефекты ЛС II класса могут повлечь за собой ненадлежащее лечение, или вызвать развитие заболевания, но это те дефекты, которые не относятся к I классу. Среди таких дефектов следующие:

- ошибки в маркировке (например, неправильный или отсутствующий текст или рисунок);
- недостаточность информации или ошибки в сведениях, содержащихся в листке-вкладыше или инструкции по медицинскому применению;
- микробиологическая контаминация нестерильных ЛС с возможными серьезными медицинскими последствиями;
- химическая, физическая контаминация (содержание примесей, перекрестная контаминация, загрязнение посторонними частицами);
- перепутывание вторичной упаковки;
- несоответствие спецификациям (например, количественное определение, объем или масса содержимого, проблемы со стабильностью);

- негерметичность первичной упаковки препаратов (таких как цитостатики, сильнодействующие препараты, лекарственных средства, которые должны быть защищены от детей), что может вызвать серьезные медицинские последствия.

К наименее опасным относятся дефекты III класса, которые не могут причинить значительного вреда здоровью. Среди таких дефектов:

- негерметичность первичной упаковки нестерильных ЛС;
- незначительные отклонения либо ошибки в маркировке (несоответствие размера шрифта, изменение внешнего вида упаковки и проч.); международные нормы к этому же классу относят такие дефекты, как ненанесение либо ошибки в нанесении номера серии и срока годности ЛС;
- несоответствие методов контроля качества ЛС требованиям фармакопеи или спецификаций (разделы «Упаковка», «Маркировка» и проч.).

Приведенная выше классификация необходима для того, чтобы производитель (а в соответствующих случаях и регуляторный орган) мог срочно сообщить об обнаруженном дефекте и предпринять необходимые действия по отзыву продукции. При этом дефект I класса предполагает быстрое уведомление о нем в течение 1 суток следующего круга субъектов: держателя регистрационного удостоверения, территориальные органы госконтроля, субъектов хозяйствования в сфере обращения лекарственных средств, уполномоченные органы Европейского союза, членов PIC/S, импортеров, в страны которых могла попасть серия недоброкачественного ЛС. Срочное уведомление рассылается письмами, электронной почтой, публикуется в средствах массовой информации. В случае дефекта II класса уведомление о нем рассылается также в течение 24 ч и также может включать предписание о запрещении обращения и о срочном отзыве недоброкачественной продукции. Дефекты III класса не влекут за собой необходимости срочных уведомлений, решение о запрещении обращения таких ЛС и об их изъятии путем возврата производителю принимается в текущем режиме.

Исходя из вышеизложенного, система работы с претензиями (рекламациями) предприятия – производителя ЛС также должна учитывать приведенную классификацию дефектов.

Процедура работы с рекламациями неразрывно связана с процедурой организации и проведения отзыва продукции, наличие которой является одним из обязательных требований в рамках GMP.

Если в процессе рассмотрения претензии (рекламации) выясняется, что в обращение действительно попала некачественная продукция, то необходимо произвести отзыв такой продукции из обращения. Решение об этом может принять сам производитель, либо отзыв может проводиться во исполнение предписания уполномоченных органов. Система организации и проведения отзыва продукции должна предусматривать осуществление отзыва оперативно и в любое (как в рабочее, так и в нерабочее) время. Это требование обусловлено тем, что при обнаружении дефектов класса I и II необходимо как можно быстрее отозвать всю недоброкачественную продукцию, причем не только у оптовых покупателей и аптек, но и из больниц и у отдельных пациентов.

Порядок отзыва продукции должен быть описан в утвержденной предприятием процедуре. Должен быть определен работник, ответственный за своевременный отзыв продукции с рынка, имеющий право привлекать необходимый персонал. Этот работник должен быть независим от подразделений реализации и маркетинга, ему должна быть доступна информация об организациях оптовой торговли и прямых заказчиках (адреса, номера телефонов/факсов в рабочее и в нерабочее время, номера серий и объемы поставок), включая экспортные поставки. При высокой опасности дефектов качества в целях защиты здоровья населения может быть необходимо начать операции по отзыву еще до установления истинной причины и всей значимости дефекта качества, а также до информирования уполномоченных органов.

О процессе отзыва должно быть проинформировано уполномоченное лицо, если оно лично не организовывает эту процедуру, а также уполномоченные органы в сфере обращения ЛС. Если недоброкачественная серия ЛС была экспортирована, то компетентные органы всех стран, куда могла быть направлена эта продукция, должны быть немедленно проинформированы о принятии решения об отзыве серии в связи с подозрением или обнаружением несоответствия ее качества.

Отозванную продукцию следует промаркировать и хранить отдельно в безопасной зоне вплоть до принятия решения о ее дальнейшем использовании или уничтожении. Окончательный отчет об отзыве должен содержать материальный баланс между количеством поставленной и возвращенной продукции. В рамках фармацевтической системы качества производителя должна регулярно анализироваться эффективность мероприятий по отзыву продукции.

В новой, 2015 года, редакции главы 8 GMP отзывы воспринимаются как средство уменьшения рисков для пациента. Однако бывают случаи, когда отсутствие препарата на рынке негативно повлияет на его доступность. Чтобы этого не произошло, производителю следует оценить, насколько дефект значим и какой риск будет большим – от создания дефицита препарата в системе здравоохранения или неизъятия серии ЛС с

незначительным дефектом из обращения. Если после консультаций с уполномоченным органом принимается второе решение, то в качестве средства для снижения риска может использоваться выпуск предупредительных сообщений для медицинских работников в отношении использования ими потенциально дефектной серии. Однако такие действия следует рассматривать в индивидуальном порядке и в обязательном порядке согласовывать с уполномоченными органами. Также необходимо информирование производителем владельца регистрационного удостоверения (если это иное лицо) и всех уполномоченных органов исполнительной власти, если дефект качества может привести к отзыву или ограничению поставок продукции.

ПРИЛОЖЕНИЕ 15. КВАЛИФИКАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ

Новая редакция приложения 15 GMP ЕС «Qualification and Validation» вступила в силу 1 октября прошлого года. Одновременно с этим была изменена редакция приложения 15 GMP PIC/S [2], что свидетельствует об одновременном распространении новых требований на территории, которые значительно шире, чем Европейский союз, поскольку в PIC/S в настоящее время входят 48 регуляторных органов из стран, находящихся на 5 континентах Земли. Основными причинами разработки и внедрения новой редакции приложения 15 является то, что:

- предыдущая версия была принята в 2001 году; с тех пор произошли значительные изменения в сфере производства и регуляторной среде;
- необходимо было учесть изменения в других частях и главах GMP; в приложении 11 «Компьютеризованные системы», а также содержание документов ICH Q8, Q9, Q10 и Q11.

Принципиальным изменением в регуляторных требованиях к квалификации и валидации является то, что они должны охватывать уже все стадии жизненного цикла продукта и процесса. Такая деятельность должна проводиться от начальной разработки через стадию трансфера технологий к промышленному производству (или эксплуатации, если речь идет о технических средствах), вплоть до завершения такого выпуска ЛС на предприятии. Этот принцип применим к помещениям, оборудованию, инженерным системам обеспечения и технологическим процессам. В общих требованиях к организации и проведению работ по квалификации и валидации отмечается, что необходимо применять подход, основанный на управлении рисками для качества. Для определения области проведения и объема работ должна проводиться оценка рисков по объектам квалификации или валидации. Чрезвычайно важной регуляторной новацией является то, что ретроспективная валидация больше не считается приемлемым подходом. В качестве возможных этапов квалификации технических средств рассматриваются не только общеупотребительные DQ, IQ, OQ, PQ, но и спецификация требований пользователя (User requirements specification, URS), а также приемочные испытания у производителя и/или получателя оборудования: так называемые «Factory acceptance testing» (FAT) и «Site acceptance testing» (SAT) соответственно.

При определении основных характеристик технических средств на этапе URS закладываются основные элементы качества, риски GMP сводятся до приемлемого уровня. Спецификация требований пользователя является ориентиром при проведении всех работ по квалификации и валидации.

Модель органнизации и проведения квалификационных работ, фактически предлагаемая новой редакцией приложения 15, основывается на документах Международного общества фармацевтического инжиниринга ISPE [27]. Это так называемая V-образная (от латинской буквы «V», которую напоминает вид рисунка) схема проведения работ по квалификации. Однако в зависимости от объекта квалификации приведенный набор этапов квалификации может изменяться. Допускается также совмещение различных этапов квалификации (например, IQ и OQ) в одну стадию.

В новой редакции приложения 15 уделяется внимание проведению повторной квалификации (реквалификации) технических средств, оборудования и систем обеспечения. Периодичность проведения реквалификации должна быть обоснована.

Наиболее существенные изменения произошли в части организации и проведения работ по валидации технологических процессов. Эти изменения отражают достижения научно-технического прогресса и инновационную модель развития фармацевтической промышленности. При характеристике видов проведения валидации отмечается, что приемлемой является перспективная валидация. Проводить работы в виде сопутствующей валидации (ретроспективная валидация уже вообще неприемлема) разрешается в исключительных случаях, если существует однозначное преимущество пользы по сравнению с риском для пациента. Решение производителя о проведении сопутствующей валидации должно быть обоснованным, задокументированным и утвержденным уполномоченным на это персоналом. В качестве возможных подходов к осуществлению валидации процесса рассматриваются:

- традиционный – производство и оценка ряда (но не менее трех) последовательных серий ЛС при обычных условиях, обоснование производителем количества отобранных серий и образцов с применением принципов QRM для обеспечения достаточного количества данных для оценки вариабельности и тенденций;

- постоянная верификация процесса (continuous process verification) как альтернатива традиционному подходу (применим к ЛС, разработанным по принципу «качество путем разработки» [21]); должна быть обоснована и регулярно оценена стратегия контроля, а в качестве инструментов реализации этого подхода рекомендуется применять процессно-аналитическую технологию и мультивариантный статистический контроль процесса;
- комбинированный (гибридный) – комбинация традиционного подхода и постоянной верификации процесса (применяется, если есть понимание и исчерпывающая информация о препарате и процессе, полученная на основании опыта производства и данных по производству предыдущих серий).

Отметим, что несколько ранее подобные подходы к валидации процесса производства были описаны в документах FDA [28] и EMA [29]. Независимо от подхода к валидации, который выбирает производитель, новым обязательным требованием является текущая верификация процесса в течение всего жизненного цикла препарата. Целью текущей верификации процесса является подтверждение выводов о допустимой вариабельности и приемлемых возможностях данного процесса, предоставление гарантии его контролируемого состояния. При указанной деятельности следует использовать инструменты статистического анализа. Вся деятельность по текущей верификации процесса планируется, протоколируется и оформляется в виде отчетов.

Кроме вышеупомянутых сверхважных изменений новые регуляторные требования предъявляются к верификации транспортировки. Маршруты доставки ЛС должны быть определены, для верификации транспортировки ЛС следует уделять внимание влиянию сезонных факторов. Для рассмотрения влияния возможных нештатных ситуаций при транспортировке ЛС следует провести оценку рисков. Очень серьезной регуляторной новацией является необходимость непрерывного мониторинга и регистрации всех климатических условий окружающей среды, которые могут повлиять на ЛС при транспортировке.

Определенное внимание уделяется валидации упаковки исходя из того, что параметры работы оборудования могут иметь существенное влияние на сохранность ЛС, особенно это важно в отношении первичной упаковки. Отмечается, что оборудование для упаковки готовых ЛС и нерасфасованной продукции в первичную и вторичную упаковку должно пройти квалификацию, при этом последняя должна охватывать максимальный диапазон рабочих параметров.

Впервые в нормативной практике в сфере GMP уделяется также внимание валидации микробиологических методик (ранее условия проведения этих испытаний содержались исключительно в фармакопеях).

В рамках последних изменений в требованиях GMP по предупреждению перекрестной контаминации особое значение приобретает валидация очистки. Новые требования по данному вопросу заключаются в том, что при обосновании допустимых остаточных количеств препаратов следует использовать критерий, основанный на токсикологической оценке ЛС, производимых по совмещенному принципу. Для проведения такой оценки следует пользоваться новым руководством [12].

Нами было проведено теоретическое сопоставление и практическая апробация строгости нового и существующих критериев очистки и показано, что в подавляющем большинстве случаев критерий, основанный на токсикологической оценке, является менее строгим, чем существовавшие ранее [30]. Новый критерий есть смысл использовать для нормирования пределов примесей лишь при производстве высокотоксичных ЛС по совмещенной схеме с низкотоксичными, что противоречит регуляторным требованиям. Тем не менее мы рекомендуем производителям провести расчет с использованием нового, а также традиционно применяемых критериев и выбрать для текущего режима производства наиболее строгий из полученных пределов.

Проведенный анализ свидетельствует о том, что изменения в требованиях надлежащей производственной практики, касающихся квалификации и валидации, чрезвычайно важны, а их имплементация требует значительных усилий предприятий – производителей ЛС, возможно, с привлечением внешних специалистов.

ПРИЛОЖЕНИЕ 16. ПОДТВЕРЖДЕНИЕ УПОЛНОМОЧЕННЫМ ЛИЦОМ СООТВЕТСТВИЯ СЕРИИ ПРОДУКЦИИ С ЦЕЛЬЮ ЕЕ ВЫПУСКА

Сложность характеристики приложения 16 GMP и изменений к нему состоит в том, что в нем содержится ряд правовых норм, специфических именно для законодательства ЕС и нехарактерных для законодательства других стран. В частности, это касается требований к импорту ЛС, когда импортер в ЕС фактически приравнен по своему лицензионному статусу к производителю ЛС. Кроме этого, субъекты, с которыми взаимодействуют уполномоченные лица [это могут быть иные уполномоченные лица (УЛ), предприятия-производители, дистрибьюторы и проч.], поделены на три

категории в зависимости от места их расположения. Масштаб и глубина контрольных мероприятий при этом зависят от того, находится ли субъект внутри ЕС, либо в странах, с которыми ЕС заключил соглашения о взаимном признании, или в иных третьих странах (в последнем случае глубина контроля ЛС наибольшая). Основные требования наличия у предприятия УЛ и его обязанностей по посерийному подтверждению соответствия ЛС и выпуску их в реализацию изложены во второй главе GMP. Приложение 16 характеризует подробно все шаги процедуры, описывает действия УЛ и его взаимодействие с другими субъектами процесса с опорой на законодательные нормы ЕС и содержит еще ряд других положений. Учитывая такую ситуацию, правила GMP, принятые в рамках PIC/S [2], полностью гармонизированы с GMP ЕС, исключая приложение 16 (оно фигурирует как «пустое», имеющее только название, но с отсутствующим содержанием). В Украине, где начиная с 2001 года правила GMP переиздавались 9 раз с целью поддержания их в актуальном состоянии по отношению к GMP ЕС, статус приложения 16 до 2016 года был рекомендательным [31], при том что надлежащая производственная практика стала здесь обязательным лицензионным требованием начиная с 2009 года. Именно потому, что вышеуказанные нормы ЕС противоречат действующим в РФ нормативным правовым актам, в приложении 16 российских правил GMP [5] отсутствуют подразделы 6 и 7 GMP ЕС (соответственно смещена нумерация подразделов). Такое отклонение не является ошибкой, а вызвано вышеуказанными объективными причинами (один из авторов настоящего обзора непосредственно участвовал в подготовке проекта текстов как российских, так и украинских правил GMP и достаточно глубоко проработал данный вопрос).

Несмотря на вышеуказанные трудности, охарактеризуем изменения, которые совсем недавно произошли в указанном приложении GMP ЕС. Новая версия приложения 16 GMP ЕС вступила в действие 15 апреля 2016 года. Принятые изменения отражают глобализацию цепи поставок ЛС и внедрение новой стратегии контроля качества. В новую редакцию приложения внедрены ряд положений триады документов ICH Q8, Q9 и Q10, а также подходы к их интерпретации регуляторными органами.

Новая редакция приложения распространяется не только на промышленно выпускаемые ЛС, но и на препараты для клинических исследований.

В общих требованиях отмечается, что окончательную ответственность за безопасность, качество и эффективность ГЛС в течение всего его жизненного цикла несет держатель регистрационного удостоверения. При этом УЛ несет ответственность за обеспечение того, что каждая отдельная серия была произведена и проверена в соответствии с действующим законодательством, требованиями регистрационного досье и надлежащей производственной практики.

В новой редакции дано более четкое представление этапов процесса выпуска серии ЛС, которые включают:

1) проверку производства и проведение испытаний серии в соответствии с установленными процедурами;
2) подтверждение УЛ соответствия серии готовой продукции, означающие, что серия произведена с соблюдением требований GMP и соответствует требованиям регистрационного досье (этот этап является выпуском серии по характеристике качества);
3) передачу в товарный запас и/или экспорт серии готовой продукции с учетом выполненного предыдущего этапа.

Важной частью приложения являются специальные требования к УЛ. Отмечается, что УЛ, участвующее в подтверждении соответствия серии, должно иметь детальные знания о стадиях производства, за которые оно берет на себя ответственность. УЛ должно иметь свидетельство своего постоянного обучения, касающегося выпускаемого вида продукции, производственных процессов, технических достижений и изменений в требованиях GMP.

При контрактном производстве порядок взаимодействия УЛ предприятия, осуществляющего конечный выпуск, с УЛ контрактного производителя остался практически неизменным. Некоторые требования в этой сфере сформулированы более четко. От УЛ контрактной площадки требуется подтверждение того, что проведенные операции соответствовали требованиям GMP и условиям договора с указанием конкретной сферы ответственности исполнителя (ранее в GMP существовала норма о том, что УЛ лишь может, а сейчас – обязано давать указанное подтверждение). Если УЛ выдает подтверждение соответствия требованиям регистрационного досье, то это УЛ должно иметь доступ к необходимым положениям этого регистрационного досье.

Особое внимание в новой редакции приложения уделяется отбору образцов на производственной площадке предприятия-экспортера, которое находится в третьих странах. Отмечается, что отбор образцов должен проводиться на основе методологии управления рисками для качества. В приложении подробно описаны аспекты, которые должны учитываться при отборе образцов в третьих странах. Однако, как отмечалось выше, эти процедуры являются специфическими именно для законодательства ЕС, поэтому мы считаем нецелесообразным давать подробную их характеристику в настоящем обзоре.

В рамках проведения УЛ подтверждения соответствия и выпуска серии этот руководитель полагается на эффективную фармацевтическую систему качества. Ряд полномочий УЛ может быть делегирован специально обученному персоналу. Отмечается, что УЛ несет ответственность за выполнение следующих требований:

1) вся деятельность по производству и испытаниям ЛС проводится в соответствии с требованиями GMP;
2) вся цепочка поставок АФС и ГЛС до стадии подтверждения соответствия документирована и доступна для УЛ (включая производственные площадки по производству АФС и упаковочных материалов для ЛС и любых других критичных материалов);
3) были проведены аудиты всех производственных площадок, участвующих в производстве и испытаниях ЛС и АФС, отчеты об аудитах доступны для УЛ;
4) все места производства, контроля качества и сертификации соответствуют условиям регистрационного досье в данной стране;
5) вся деятельность по производству и контролю качества согласуется с описанной в регистрационном досье;
6) источник поставок и спецификации на исходное сырье и упаковочные материалы, используемые в серии ГЛС, соответствуют регистрационному досье; в наличии системы управления качеством поставщика, что обеспечивает поставку материалов только необходимого качества;
7) АФС были произведены в соответствии с требованиями GMP, а их дистрибьюция осуществлялась согласно требованиям GDP для АФС;
8) импорт АФС, используемых в производстве ГЛС, соответствует законодательным положениям страны-импортера;
9) вспомогательные вещества, используемые в производстве ГЛС, произведены в соответствии с определенными (применимыми к данному производству) требованиями GMP;
10) статус всех материалов, используемых в производстве серии, соответствует условиям регистрационного досье в отношении губчатой энцефалопатии животных (если такое требование применимо);
11) все записи являются полными и одобрены соответствующим персоналом, в процессе производства были выполнены все необходимые контроли и проверки;
12) все производственные процессы и процедуры контроля качества остаются в валидированном состоянии, персонал соответственно обучен и квалифицирован;
13) данные по испытаниям ГЛС соответствуют спецификации готового продукта, описанной в регистрационном досье, или программе выпуска в реальном времени (если это разрешено);
14) любые постмаркетинговые обязательства, касающиеся производства или испытания продукции, были выполнены; данные продолжающегося изучения стабильности продолжают подтверждать требования спецификации;
15) было оценено влияние любого изменения в производстве продукции или процедурах испытаний и завершены любые дополнительные проверки и испытания;
16) все исследования, относящиеся к выпускаемой серии (в том числе оценка трендов и выходов за границы спецификации) были завершены в такой степени, чтобы сделать вывод о соответствии серии спецификации;
17) любые имеющиеся претензии, расследования или отзывы не ставят под сомнение возможность подтверждения соответствия серии;
18) в наличии необходимые технические соглашения;
19) выполняется запланированная программа самоинспекций;
20) в наличии необходимые механизмы дистрибьюции и доставки ЛС;
21) предприняты меры по обеспечению безопасности упаковки (если таковые требуются нормативными правовыми актами).

Всю деятельность по подтверждению соответствия и выпуску серии УЛ должно регистрировать в реестре или подобном документе, предназначенном для этого. Записи должны подтвердить, что каждая серия соответствует требованиям нормативных правовых актов. Записи должны делаться своевременно и должны быть доступны уполномоченному органу в течение периода, указанного в нормативных требованиях, но не менее пяти лет.

Новая редакция приложения 16 GMP ЕС уделяет особое внимание вопросам оценки УЛ результатов аудитов, проводимых в рамках привлечения к такой деятельности сторонней организации по договору. Выбор аудиторов и контроль за их деятельностью проводится в соответствии с требованиями главы 7 правил GMP. Отмечается, что такие аудиторские отчеты должны содержать всю необходимую информацию об объекте аудита и утверждаться УЛ.

Одним из важнейших аспектов подтверждения соответствия и выпуска серии является оценка отклонений. Такие отклонения могут затрагивать как технологический процесс, так и процедуры контроля качества ЛС. Новая редакция рассматриваемого приложения оговаривает условия, при которых допущенное отклонение не будет препятствовать выпуску серии в гражданский оборот. Первым из таких условий является безусловное соответствие данной серии спецификации (ФСП, аналитической нормативной документации или иной документации по контролю качества), установленной при государственной регистрации ЛС. Допущенное незапланированное отклонение должно быть тщательно расследовано, его первопричина должна быть установлена и устранена.

Влияние отклонения в технологическом процессе или процедурах контроля качества должно быть оценено в соответствии с процессом управления рисками для качества.

Этот процесс в данном случае должен включать в себя следующее:

1) оценку потенциального воздействия отклонения на качество, эффективность и безопасность данной серии (серий) и вывод о том, что влияние на указанные факторы незначительно;

2) рассмотрение вопроса о включении данной серии (серий) в программу текущего испытания стабильности;

3) в случае биологических ЛС особое внимание следует уделить тому, что любые отклонения от утвержденного процесса могут иметь необлагоприятное влияние на безопасность и эффективность.

В заключении приложения уделяется внимание финальной процедуре выпуска серии в обращение. Отмечается, что такой посерийный выпуск возможен лишь после подтверждения УЛ соответствия данных серий. До такого подтверждения серия должна оставаться на месте производства или доставляться в статусе «карантин» на другую площадку, которая имеет соответствующее разрешение регуляторного органа. Должно быть гарантировано, что серии, не получившие разрешение на выпуск, не передаются в товарный запас. Такими мерами могут быть физическое разделение продукции и соответствующая маркировка или электронные средства контроля с использованием валидированных компьютеризированных систем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регуляторные требования в сфере промышленного производства лекарственных средств постоянно повышаются, что находит свое отражение в правилах надлежащей производственной практики.

Наличие гармонизированной нормативной базы в сфере фармацевтического производства необходимо для дальнейшего развития фармацевтической промышленности, расширения географии экспорта.

В данном обзоре дана характеристика и проведен анализ изменений в требованиях отдельных глав и приложений GMP, которые произошли со времени принятия в 2013 году российских правил надлежащей производственной практики. Для содействия интерпретации и внедрению этих новаций как в практику предприятий-производителей, так и – после утверждения обновленной нормативной базы – в работу регуляторных органов был также проведен анализ сопутствующих информационных источников. В обзоре представлен ряд рекомендаций в отношении приоритетов и точек приложения усилий по внедрению рассмотренных изменений.

ЛИТЕРАТУРА

1. The rules governing medicinal products in the European Union. Volume 4. Good manufacturing practice (GMP) Guidelines. URL: http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm (дата обращения 03.06.2016).
2. Guide to good manufacturing practice for medicinal products. PIC/S GMP Guide. PE 009-12. URL: http://www.picscheme.org/publication.php (дата обращения 05.06.2016).
3. Правила надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза (проект от 06.05.2015 г.). URL: http://www.eurasiancommission.org/ru/nae/news/Pages/07-05-2015-2.aspx (дата обращения 25.06.2016).
4. Ю.В. Подпружников, А.А. Ишмухаметов, А.С. Немченко и др. Хрестоматия фармацевтического качества / Под ред. А.А. Ишмухаметова. – М.: РЕМЕДИУМ. 2015. 432 с.
5. Правила надлежащей производственной практики. Утверждены приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 14 июня 2013 г. № 916 (с изменениями).
6. Q10: Pharmaceutical Quality System. URL: http://www.ich.org/ (дата обращения 05.06.2016).
7. Quality Management Systems. Requirements: ISO 9001:2015. URL: http://www.iso.org (дата обращения 04.06.2016).
8. Pharmaceutical Quality for the 21st Century A Risk-Based Approach Progress Report. Department of Health and Human Services U.S. Food and Drug

Administration, May 2007. URL: http://www.fda.gov/ (дата обращения 07.06.2016).

9. Положение о лицензировании производства лекарственных средств. Утверждено постановлением Правительства РФ № 686 от 06 июля 2012 (в ред. от 15.04.2013).
10. Code of Federal Regulations Title 21 – Food and Drugs. Chapter I – Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Subchapter C – Drugs: general. PART 211 – Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals. Subpart C – Buildings and Facilities Sec. 211.42 Design and construction features. URL: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=211.42 (дата обращения 05.06.2016).
11. FDA Guidance for Industry «Non-Penicillin Beta-Lactam Drugs: A CGMP Framework for Preventing Cross-Contamination». April 2013. URL: http://www.fda.gov/ (дата обращения 05.06.2016).
12. Guideline on setting health based exposure limits for use in risk identification in the manufacture of different medicinal products in shared facilities. EMA/CHMP/ CVMP/ SWP/169430/2012. European Medicines Agency
13. Q9: Quality risk management. URL: http://www.ich.org/ (дата обращения 25.01.2016).
14. Guidelines of 19 March 2015 on the formalised risk assessment for ascertaining the appropriate good manufacturing practice for excipients of medicinal products for human use (Text with EEA relevance) (2015/C 95/02) // Official Journal of the European Union. 21.3.2015.
15. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.: в 3-х т. Т. 1 – М.: ФЭМБ, 2015. 1470 с. URL: http://femb.ru/feml (дата обращения 21.06.2016).
16. WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories, Annex 2. WHO Technical Report Series, No. 961, 2011. URL: http://apps.who.int/ (дата обращения 05.06.2016).
17. <1226> General Information / Verification of Compendial Procedures // The United States Pharmacopeia. USP 37. – Rockville: The United States Pharmacopeial Convention.
18. <5.3.N.2> Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр лікарських засобів», 2-е вид. – Харків: Український науковий фармакопейний центр лікарських засобів, 2015. Т. 2. С. 910–929.
19. L. Huber. Implementing New USP Chapters for Analytical Method Validation // LabCompliance. March 2010. URL: http://www.ivtnetwork.com/ (дата обращения 21.06.2016).
20. <1058> General Information / Analytical instrument qualification // The United States Pharmacopeia. USP 37. – Rockville: The United States Pharmacopeial Convention.
21. Q8: Pharmaceutical development. URL: http://www.ich.org/ (дата обращения 25.01.2016).
22. <1224> General Information / Transfer of Analytical Procedures // The United States Pharmacopeia. USP 37. – Rockville: The United States Pharmacopeial Convention.
23. WHO guidelines on transfer of technology in pharmaceutical manufacturing WHO Technical Report Series. No. 961. 2011. Annex 7. URL: http://www.who.int. (дата обращения 21.06.2016).
24. А.И. Гризодуб. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. – Харьков: Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств, 2016. 396 с.
25. Procedure for Handling Rapid Alerts Arising from Quality Defects. Date of adoption 31 January 2010. European Medicines Agency.
26. Procedure for handling rapid alerts and recalls arising from quality defects. Standard operating procedure PI 010-4. URL: http://www.picscheme.org/publication.php (дата обращения 05.06.2016).
27. GAMP Guide for Validation of Automated Systems, GAMP4. ISPE (GAMP Forum), 2001. URL: http://www.ispe.org (дата обращения 21.06.2016).
28. FDA Guidance for Industry «Process Validation: General Principles and Practices». Rev.1. January 2011. URL: http://www.fda.gov/ (дата обращения 21.06.2016).
29. Guideline on process validation for finished products – information and data to be provided in regulatory submissions. EMA/CHMP/CVMP/QWP/BWP/70278/ 2012-Rev1. European Medicines Agency. URL: http://ec.europa.eu/ (дата обращения 21.06.2016).
30. Ю.В. Подпружников. Сравнительный анализ критериев очистки в производстве лекарственных средств // Ремедиум. 2016. № 3. С. 46–51.
31. Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2015. – Київ: Міністерство охорони здоров'я України, 2015. 315 с

CPhI worldwide

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

ПРИГЛАШАЕМ РОССИЙСКИЕ КОМПАНИИ ПРИНЯТЬ УЧАСТИЕ В КОЛЛЕКТИВНОЙ ЭКСПОЗИЦИИ ПОД ЭГИДОЙ МИНПРОМТОРГА РОССИИ

ВЕДУЩАЯ МИРОВАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ПЛОЩАДКА

36 000
СПЕЦИАЛИСТОВ ФАРМИНДУСТРИИ

БОЛЕЕ 2 500
ЭКСПОНЕНТОВ

БОЛЕЕ 150 СТРАН

БОЛЕЕ 100 БЕСПЛАТНЫХ
ИНДУСТРИАЛЬНЫХ СЕМИНАРОВ

CPHI ОБЪЕДИНЯЕТ ЭКСПЕРТОВ И НОВАТОРОВ ФАРМИНДУСТРИИ

По вопросам участия обращайтесь
в Центр корпоративных коммуникаций S-GROUP
ABRAMOVA@SGR.COM.RU
+7(499)340-25-11

S·GROUP

Актуальная информация:
PHARMMEDEXPO.RU
ФАРММЕДПРОМ.РФ

ГИПЕРКУБ
ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР «СКОЛКОВО»

1 ДЕКАБРЯ 2016

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

ПЕРВЫЙ
МЕЖДУНАРОДНЫЙ
ФОРУМ
РЕАБИЛИТАЦИОННОЙ
ИНДУСТРИИ

НАДЕЖДА НА ТЕХНОЛОГИИ

По вопросам участия обращайтесь в Центр корпоративных коммуникаций S-GROUP
+7 499 340 25 11
ot@sgr.com.ru

S·GROUP

Актуальная информация:
pharmmedexpo.ru
фарммедпром.рф

УДК 614.27; 615.11

1 – ЗАО «Ретиноиды», 111123, Россия, г. Москва, ул. Плеханова, 2/46, стр. 5

1 – JSC «Retinoids», b. 5, 2/46, Plekhanova str., Moscow, 111123, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: guzev3@yandex.ru

ГАЛЕН И ЕГО ЗНАНИЯ В ОБЛАСТИ ЛЕКАРСТВОВЕДЕНИЯ

К.С. Гузев[1]*

Резюме. В работе представлены литературные данные о познаниях К. Галена в лекарствоведении. Источником информации служили материалы, опубликованные в отечественной и зарубежной литературе.

Ключевые слова: Гален, римский врач, философ, лекарствоведение, история медицины и фармации.

GALEN AND HIS KNOWLEDGE IN THE FIELD OF PHARMACOLOGY

K.S. Guzev[1]*

Abstract. The paper presents the literature data on the knowledge K. Galen in pharmacology. The source of information is the materials published in domestic and foreign literature.

Keywords: Galen, Roman physician. philosopher, pharmacology, history of medicine and pharmacy.

ВВЕДЕНИЕ

Гален, согласно мнению всех авторов, писавших о нём, был выдающимся врачом, вклад которого в медицину переоценить невозможно. Общепринято считать, что основную роль он сыграл в развитии анатомии. В учебниках по этому предмету римскому врачу обязательно посвящается целая глава. Примером может служить классический учебник анатомии человека под редакцией М.Г. Привеса и сотр. [1]. Из других медицинских специальностей, обязанных Галену своим развитием, называют физиологию и фармакологию, но в учебниках по этим предметам имя Галена не упоминается. По-видимому, по мнению современных физиологов и фармакологов, его роль в становлении этих дисциплин не так значительна, как считают историки медицины. Однако есть раздел медицины, которым Гален специально не занимался, а вклад учёного в его развитие считается решающим. Я имею в виду фармацию. Во всех учебниках по фармации, и в частности по фармацевтической технологии, заслуги Галена обязательно отмечаются [2, 3]. Следует сказать, что во II в. фармации как науки не было и врачи сами готовили лекарства для своих пациентов. Первое разделение врачей на тех, кто лечит, и тех, кто готовит лекарства, произошло в VIII в. на Востоке.

Таким образом, первые фармацевты появились через 600 лет после смерти Галена. Тогда что же для становления фармации как науки сделал великий римский врач? Для ответа на этот вопрос нужно проследить, что именно знал Гален о лекарствах, об их приготовлении и применении.

Г.И. Маддисон так описывает это в своей диссертации на звание магистра фармации: «Врачи тогдашнего времени, большею частью, сами готовили назначенные ими для больных лекарства. Число лекарственных препаратов, применяемых врачами, было ещё невелико, и приготовление их не было сопряжено со сложными продолжительными манипуляциями, врачи сами готовили и раздавали их больным. С увеличением числа лекарственных средств и по мере появления новых форм, более сложного приготовления, по мере того, как сведения о сырых лекарственных веществах всё больше увеличивались, для правильного приготовления лекарств уже требовался известный запас специальных знаний и сведений. Выделение фармации из медицины в отдельную дисциплину становилось совершенно естественным. И фактически это произошло в 765 году при Халифе Альманзоре, когда в Багдаде была устроена первая публичная аптека, в которой специальными лицами приготовлялись назначенные врачами лекарства» [4].

ГАЛЕН И ЛЕКАРСТВОВЕДЕНИЕ

Первые знания по лекарствоведению Гален получил в своём родном городе, обучаясь этому искусству у ведущих врачей Пергамской медицинской школы. Наставником Галена по фармакологии был Эсхрион (*Aeschrion)* из Пергама (150 от р. Х.), обучение у которого продолжалось около 4 лет. Затем Гален предпринял путешествие в Коринф, где изучал фармакологию и лекарствоведение под руководством Нумезиана. Позднее он в течение продолжительного времени путешествовал по Малой Азии, где, следуя вниз по ликийскому

СТАТЬЯ ПРИВЕДЕНА В АВТОРСКОЙ РЕДАКЦИИ

берегу (средиземноморский берег современной Турции), разыскивал чёрный янтарь, лигнит, а в Палестине – асфальт [5, 6].

Чёрный янтарь *– это органическая горная порода, которая является разновидностью каменного угля. В разные времена в разных странах ему давали и другие названия:* ***гишер, гагат*** *(от греч. gagatēs),* ***чёрная яшма****. Плавится при нагревании выше 100 °С.*

Лигнит *(от лат. lignum – дерево, древесина) – осадочная порода. Горючее полезное ископаемое, слабообугленная древесина в пластах бурого угля, сохранившая строение тканей; в США и некоторых европейских странах – слабоуглефицированный бурый уголь.*

Асфа́льт *(от греч. asphaltos – горная смола) – смесь битумов (60–75% – в природном горном асфальте, 13–60 % – в искусственном) с минеральными материалами [7].*

Л. Менье утверждает, что после окончания обучения в Александрийской школе Гален посещает Сирию, Палестину, Кипр и государства Мёртвого моря. Эти путешествия были предприняты им для более детального изучения действия целебных трав, минералов, металлов, смол, пряностей, а также других известных в то время лекарственных препаратов и антидотов [8]. Из представленных данных видно, что Гален с самого начала врачебной деятельности серьёзно относился к изучению действия лекарств и посвящал этому много времени.

О глубине познания Галеном действия лекарств той эпохи можно судить по его трудам. В них часто встречаются ссылки на известных учёных прошлых времён. Так, С. Ковнер (1888), изучая труды Галена, обнаружил в них упоминание в первую очередь трудов Гиппократа и Платона, а также некоторых последователей Александрийской школы. С их работами Гален мог познакомиться во время обучения в этой школе. Среди них наиболее известными были:

- *Heraclides* из Тарента (240 до р. Х). Производил опыты с лекарственными веществами. Способствовал усовершенствованию фармакологии. При этом он мало внимания обращал на новые лекарственные средства, стараясь в основном выяснить эффекты испытанных средств. Особое внимание учёный обращал на применение опия. В результате им были разработаны показания для его применения и составлено множество содержащих его рецептов.
- *Appolonicus Empiricus* из Антиохии (230 до р. Х.) и, вероятно, сын его Appolonicus Biblas (210 до р. Х.) – авторы сочинений о лекарствах.
- *Mithridatis Magni Eupator* из Понта (124–64 до р. Х). Производил опыты с ядами на преступниках и на самом себе. Изобрёл универсальное противоядие, состоящее из 54 ингредиентов. Это противоядие, названное митридатом, пользовалось известностью в течение многих веков. Оставил после себя сочинения о ядах и противоядиях.
- *Krateuas* (70 до р. Х.) – ботаник и фармаколог. Оставил после себя сочинение о лекарствах, иллюстрированное цветными рисунками.
- *Cleopatra* (69–30 до р. Х.) написала следующие сочинения: «О сохранении красоты и накожных болезнях», в котором были представлены рецепты по косметологии, и «О женских болезнях».
- *Nikander* из Колофона (136 до р. Х.) – его перу принадлежат следующие труды: «Об отравлениях и их лечении» и «О предохранительных средствах против отравления внутренними ядами».
- *Heras* из Каппадокии (30 до р. Х.) оставил после себя книгу о лекарствах под названием «Narthex», где подробно описаны их действие и способы приготовления.
- *Antonius Musa* (10 от р. Х.) составил несколько сочинений о лекарствах, которые Гален считал одними из лучших.
- *Soranus* Старший из Эфеса (100 от р. Х.) разрабатывал разные направления медицины. Гален часто рекомендовал его средства.
- *Aulus Cornelius Celsus* из Рима или Вероны (25–30 до р. Х. – 45–50 от р. Х.) составил обширную энциклопедию, охватившую многие части естествознания. Наиболее полно до нашего времени дошла часть, посвящённая медицине. В двух книгах Цельс описывает лекарства и способы их применения. Имеется также раздел, в котором содержатся способы приготовления некоторых лекарственных форм: пластырей, мазей, лепёшек, пессарий, пилюль, болюсов и проч. В его книгах представлено обилие фармацевтических средств и довольно сложных снадобий.

Портрет Галена

- *Pamphylos Migmatopoles* (14–38 от р. Х.) предложил средство против лишая, состоящее из мышьяка, сандала, жжёной меди и кантарид.
- *Andromachus-отец* из Крита (I в. от р. Х.) известен стихотворным сочинением о териаке Митридата, который он усовершенствовал.
- *Andromachus-сын* изобрёл 24 средства против кровотечений, ушных и зубных болей.
- *Pedaclus (Pedanius) Dioskorides* из Аназарба в Киликии (Африка) (40–90 от р. Х.). Главными сочинениями Диоскорида, с которыми Гален, несомненно, был знаком, являются 8 книг. Назовём некоторые из них: «Об ароматических средствах, маслах, мазях, деревьях и добываемых из них соках, смолах и плодах», «О животных средствах» (мёд, молоко, жир), «О средствах из овощей», «О кореньях, добываемых из растений соках, травах и семенах», «О других травах и соках», «О виноградниках, винах и минеральных веществах». Диоскорид оставил после себя полное систематизированное описание всех известных в то время медикаментов, приготовленных из компонентов, принадлежащих трём царствам природы, с объяснением их действия на человека. Также он дал синонимы этих средств, привёл сведения об их местонахождении и признаках неподдельности. В его трудах встречается также описание лекарств, приготовленных из металлов – ртути, свинцовых белил, препаратов меди и др. [5].

Нельзя не упомянуть и о родоначальнике ботаники Феофрасте (Теофрасте) из Эроса (о. Лесбос), жившем в 372–288 гг. до н. э. Его труд «Исследование о растениях» служил настольной книгой многим естествоиспытателям древности, и врачам в частности [9].

Таковы знания о лекарствах, существовавшие до Галена, на них он опирался в своей работе.

Картина из учебника Т. С. Сорокиной «История медицины», в двух томах

Ю.К. Сандер утверждает, что перу Галена принадлежали обширные труды в области фармации [10], однако нам не удалось их обнаружить. Наиболее известные трактаты Галена по лекарствоведению перечислены в диссертации Л. Израельсона на звание магистра фармации [11]. К ним относятся:

«De simplicium medicamentorum tempeamentis et facultatibus» («О простых лекарственных средствах и их применении»);

«De compositione medicamentorum secundum locos» («О сложных лекарственных средствах»);

«De compositione medicamentorum secundum genera» («О сложных медикаментах местного применения»;

« De Antidotis» («Противоядия»).

Л. Израельсон классифицировал все простые лекарственные средства, цитируемые Галеном в трактатах. Для удобства мы обобщили эти сведения в виде таблицы, сопоставив их с аналогичными данными других врачей той эпохи.

Таблица 1.

Количество простых медикаментов, которые Гиппократ, К. Цельс, Плиний Старший и К. Гален использовали во врачебной практике

Происхождение медикамента	Гиппократ, 460–356 гг. до н. э.	К. Цельс, 25–30 гг. до н. э. – 45–50 гг. н. э.	Плиний Старший, 22/23–79 гг. н. э.	К. Гален, 129–210 н. э.
	Количество наименований, шт.			
I. Растительное царство	255	172	129	473
II. Минеральное царство	15*	35	30	63
III. Животное царство (млекопитающие, птицы, рыбы)	35	10	109	19
IV. Препараты моря или солёных вод (беспозвоночные)	17	2	1	3
Итого	322	219	269	558

Примечание: * – данные из труда Гиппократа «О ранах».

Как видно из представленных в таблице данных, Гален в своей врачебной практике использовал более пятисот компонентов, получаемых из различных «царств». Из них наиболее широкое применение нашли представители растительного царства, которых в его работах насчитывалось 473 вида. Затем шли средства минерального происхождения, при этом из

них уже в начале II в. применялись 34 наименования, являющиеся производными металлов [11]. Чтобы понять, много это или мало, сравним эти данные с аналогичным ассортиментом других врачей. Наиболее подходящими для этого, с нашей точки зрения, являются наборы простых лекарственных средств, применяемых Корнелиусом Цельсом и Плинием Старшим, жившими примерно в одно и то же время. В этой же таблице мы привели и некоторые данные о простых лекарственных средствах, которые использовал основоположник греческой медицины Гиппократ.

В трудах Гиппократа перечислено около 255 лекарственных растений и около 15 лечебных средств минерального царства, 35 средств из животного царства и 17 средств, получаемых из моря. Их можно рассматривать как некую базу медикаментов, дошедших до нас из прошлой эпохи [12]. Детальное знакомство с работой W.G. Spenser показало, что у К. Цельса также в качестве составных частей лекарств преобладали представители растительного царства – всего 172 наименования. Количество минеральных ингредиентов было относительно невелико и составляло 35 позиций. Препараты животного происхождения насчитывали лишь 10 наименований [13]. В практике Плиния Старшего – последователя К. Цельса – количество лекарственных растений составляло 129 видов, а минеральные ингредиенты были представлены 30 наименованиями. Особого внимания заслуживает тот факт, что Плиний Старший в отличие от Цельса, да и от самого Галена, широко использовал компоненты из животного царства, и прежде всего большое количество разнообразных морских и земных животных [14].

Таким образом, очевидно, что Гален аккумулировал в себе знания предыдущих врачей о лекарствах. Он ввёл в перечень множество неизвестных ранее лекарственных растений и значительно расширил применение в медицине производных различных металлов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из изложенного выше следует, что Гален не только имел обширные знания о лечебных свойствах тех или иных веществ, но и с успехом применял эти вещества для лечения своих пациентов. Мы считаем, что неоценимая роль Галена в развитии сначала лекарствоведения, а впоследствии фармакологии и фармации заключается прежде всего в том, что он собрал и обобщил знания о лекарствах, добытые его предшественниками и современниками, скрупулёзно проверил их действие на человека, дополнил этот перечень новыми эффективными средствами, появившимися уже в его время, и, оформив эти знания в виде записей, передал их следующим поколениям врачей. Благодаря тому, что его труды сначала попали в руки арабских врачей, затем были переведены на европейские языки и в итоге почти в неизменённом состоянии дошли до нас, мы можем по достоинству оценить колоссальный вклад римского врача, внесённый им в развитие как медицины в целом, так и отдельных её дисциплин, включая фармацию. Более конкретно о вкладе Галена в фармацию мы расскажем в третьей части работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. М.Г. Привес, Н.К. Лысенков, В.И. Бушкович. Анатомия человека. Изд. 6-е, доп. и перераб. – Л.: Медицина, 1968. 670 с.
2. И.А. Муравьёв. Технология лекарств. Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Медицина, 1971. – 752 с.
3. И.И. Левинштейн. История фармации и организация фармацевтического дела. – М.: Медицина, 1939. 223 с.
4. Г.И. Маддиссон. К вопросу о «Галеновых» препаратах. Экспериментальные и критические данные для оценки доброкачественности и констатирования фальсификации их: дисс. … магистра фармации. – Одесса, 1908. 37 с.
5. С. Ковнер. Очерки истории медицины. Вып. третий (От Платона до Галена). 1888. 436 с.
6. Гален. Сочинения. Т. 1 / Под общ. ред., сост., вступ. ст. и комм. Д.А. Балалыкина; пер. с древнегр. А.П. Щегловой; науч. ред. А.П. Щегловой, Н.П. Шок. – М.: Весть, 2014. 656 с.
7. H. Hager. Руководство к фармацевтической и медико-химической практике. В 5 томах с дополнением 6-го / Под ред. и с дополнениями проф. В.К. Анрепа и А.В. Пеля. – С-Петербург. 1889.
8. Л. Менье. История медицины / Пер. с фр. д-ра И.А. Оксёнова. – М.; Л. 1926. С. 54–63.
9. Феофраст. Исследование о растениях / Античная историческая библиотека. – Рязань: Александрия, 2005. 560 с.
10. Ю.К. Сандер. Технология галеновых препаратов. – Л.: Медгиз (Ленинградское отд.), 1950. С. 5–9.
11. L. Israelson. Die «materia medica» des Klaudios Salenos: inaugural-dis-sertation doctors der Medcin. – Juriev. 1894. 208 p.
12. Гиппократ. Сочинения. Т. 3 / Пер. с греч. проф. В.И. Руднева; ред. и примеч. проф. В.П. Карпова. – М.;Л.: Медгиз, 1941. 360 с.
13. W.G. Spenser. Celsus. De medicina. In 3 volumes. – London. 1961.
14. Византийский медицинский трактат XI–XV вв. / Пер. с древнегр., вступ. статья, комментарий, указатели Г.Г. Литаврина. Серия: Византийская библиотека. – СПб.: Алетейя, 1997. 157 с.
15. К.С. Гузев. О Галене (страницы жизни и черты личности в истории потомков) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1(14). С. 238–244.

Международная конференция

GEP-RUSSIA 2016

Надлежащая инженерная практика

Москва 27-28 сентября

Тема конференции:

Производство твердых лекарственных форм – современные подходы и технические решения

Организатор:

favea

+7 499 550 68 01

conf@gep-russia.ru

Информационная поддержка:

Новости GMP

BIOTEK

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ОТРАСЛЬ
Pharmaceutical Industry Review

Pharmika.Ru

Чистые Помещения и технологические среды

Фармацевтические технологии и упаковка
Лекарства по GMP
БИЗНЕС

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ обозрение Казахстана
www.pharmreview.kz

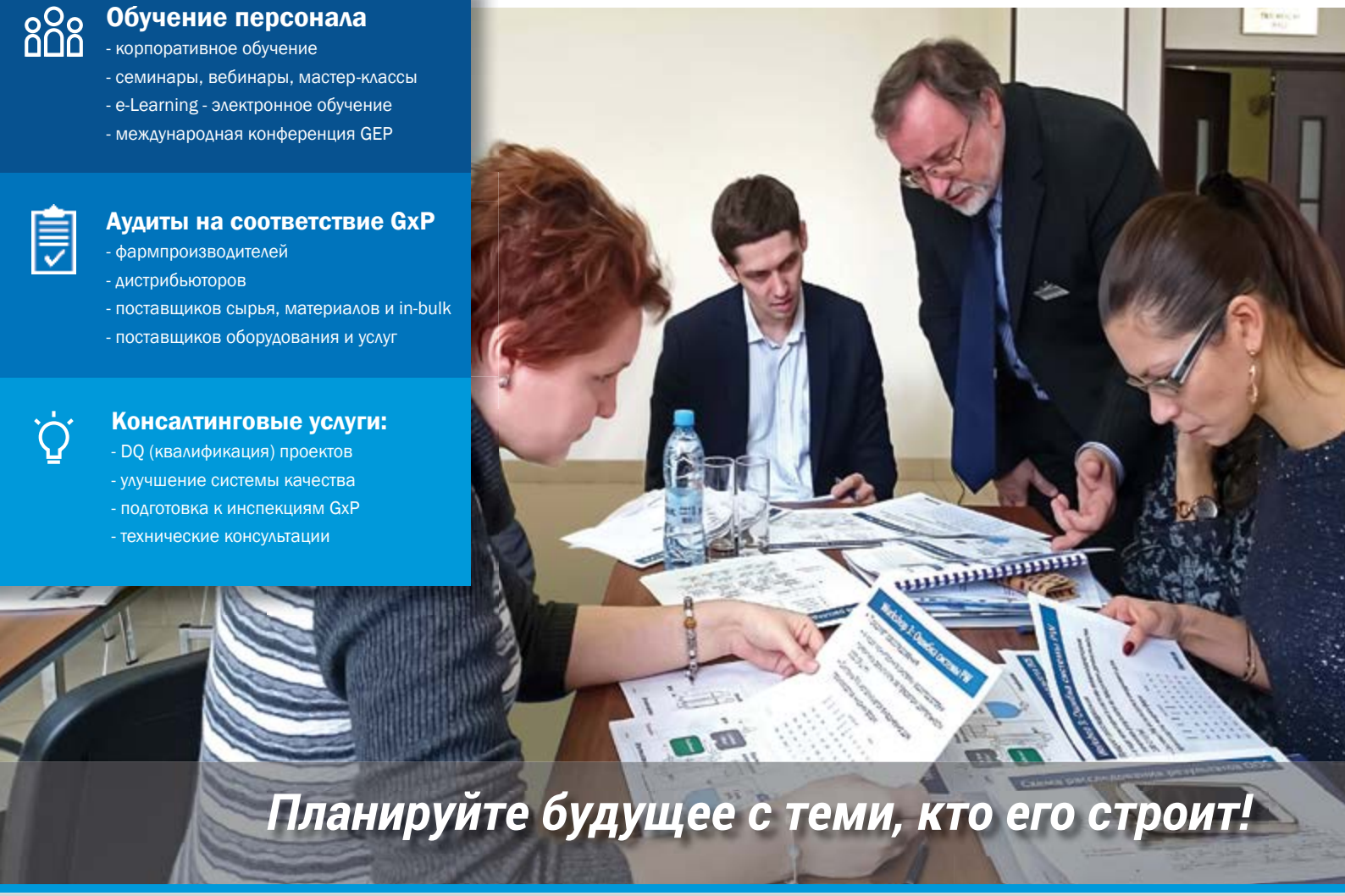
favea

Инжиниринг - Технологии - Инновации

Обучение персонала
- корпоративное обучение
- семинары, вебинары, мастер-классы
- e-Learning - электронное обучение
- международная конференция GEP

Аудиты на соответствие GxP
- фармпроизводителей
- дистрибьюторов
- поставщиков сырья, материалов и in-bulk
- поставщиков оборудования и услуг

Консалтинговые услуги:
- DQ (квалификация) проектов
- улучшение системы качества
- подготовка к инспекциям GxP
- технические консультации



Планируйте будущее с теми, кто его строит!

"В каждом из подразделений компании FAVEA работают специалисты высочайшего уровня"

Максим Хамет
Председатель совета директоров
FAVEA Group

"Наши эксперты несут знания, полученные в крупнейших фармацевтических международных корпорациях"

Христос Чанаклис
Генеральный директор
FAVEA Group

"e-Learning - это эффективный способ системного обучения сотрудников всех категорий на производстве"

Зденек Павелек
Директор по управлению качеством FAVEA Group

Актуальные курсы e-Learning
- ✓ GMP - Общие требования
- ✓ GMP - Производство стерильных лекарственных средств
- ✓ GMP - Валидация и квалификация
- ✓ GEP - Надлежащая инженерная практика
- ✓ СКОРО! - GDP - Надлежащая дистрибьюторская практика

Фармацевтические проекты по стандартам GMP

FAVEA - ведущая европейская инжиниринговая компания, занимающаяся проектированием и реализацией фармацевтических производств "под ключ"

Телефон
+7 499 550 68 01

E-mail
info@favea.org

Веб-сайт
www.favea.org

KINEMATICA AG
Dispersing and Mixing Technology

ЛИНЕЙКА ДИСПЕРГАТОРОВ ПРОИЗВОДСТВА КОМПАНИИ KINEMATICA ДЛЯ ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННОЙ ОБРАБОТКИ ПОРОШКОВ

Материал предоставлен компанией KINEMATICA AG

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении более 50 лет компания KINEMATICA является надежным партнером мирового уровня по производству и поставке оборудования для задач диспергирования. С линейкой диспергаторов **MEGATRON® MT-VPC/VPR** производитель рад представить эффективное устройство диспергирования с функцией внесения порошка. Благодаря эффективной системе увлажнения и большому выбору диспергирующих генераторов устройство подходит для широкого применения в химической, фармацевтической, косметической, пищевой промышленности, а также в сфере биотехнологий.

ПРИНЦИП РАБОТЫ ДИСПЕРГАТОРОВ MEGATRON® MT-VPC/VPR

Запатентованная линейка диспергаторов с функцией внесения порошка MEGATRON® может справиться практически с любой задачей обработки порошка. Внесение порошка осуществляется за счет создания сильного вакуума. Создаваемый вакуум с высокой мощностью всасывания действует на продукт независимо от циркуляции жидкости и давления на выходе, а также создает специальную геометрию движения порошка в рабочей камере, которая предотвращает образование комков.

Диспергатор серии **MEGATRON® MT-VPC** был разработан для непрерывного процесса, в рамках которого обработка продукта осуществляется за один проход. Рецептура регулируется путем дозирования порошка и жидкости в необходимых пропорциях, а рабочий объем не ограничивается за счет непрерывности процесса. После втягивания обрабатываемого порошка с помощью вакуума, создаваемого вращающимся ротором, происходит предварительное смешивание порошка с жидкостью, а также обработка генератором, установленным в рабочей камере.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

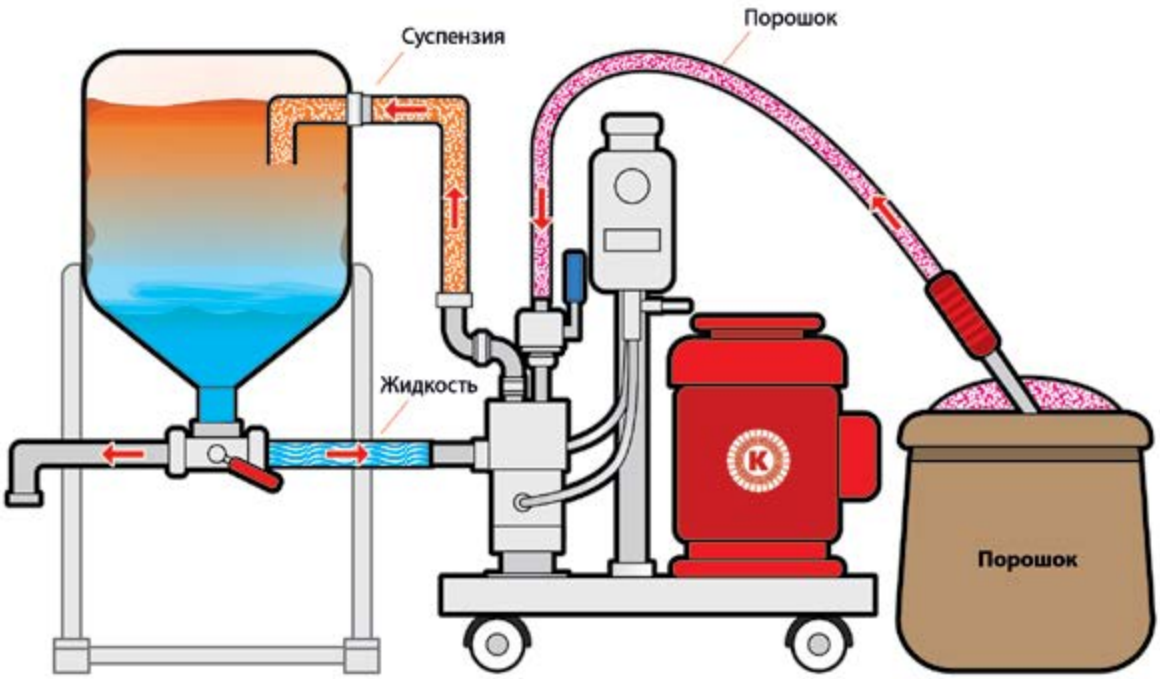


Рисунок 1. **Схематический принцип работы диспергатора серии MT-VPC/MT-VPR**

Диспергатор серии **MEGATRON® MT-VPR** оснащается промежуточной емкостью и предназначен для обработки продукта в режиме рециркуляции, то есть для производства продукта с заданным соотношением количества порошка и жидкого компонента. Обрабатываемый порошок всасывается в рабочую камеру с помощью вакуума, создаваемого вращающимся ротором, предварительно смешивается с жидкостью перед обработкой диспергирующим генератором.

Линейка проточных диспергаторов **MEGATRON® MT-VPC/VPR** охватывает устройства различных размеров с производительностью от 1000 л/ч до 80’000 л/ч при работе с водой независимо от используемого генератора.

ПРЕИМУЩЕСТВА ДИСПЕРГАТОРОВ ЛИНЕЙКИ MEGATRON® MT-VPC/VPR

Новая система идеально подходит для эффективного перемешивания порошков с жидкими продуктами без образования пыли благодаря высокому вакууму. Мощность всасывания позволяет предотвратить нежелательное образование комков. Совмещение процессов всасывания порошка, предварительного увлажнения и диспергирования с помощью технологии «ротор-статор» позволяет значительно упростить процесс обработки и улучшить качество готового продукта. Диспергаторы серии **MEGATRON® MT-VPC/VPR** подходят также для обработки тяжелых, например металлосодержащих, порошков.

ОСНОВНЫЕ ТЕХНИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДИСПЕРГАТОРОВ MEGATRON® MT-VPC/VPR

- Проточные диспергаторы позволяют эффективно втягивать порошок в рабочую камеру и выполнять процесс гомогенизации и диспергирования.
- Подходят для работы как с легкими, так и с тяжелыми порошками.
- Максимальный вакуум при втягивании порошка достигает 25 мбар.
- Стандартное давление – до 10 бар, опционально возможно увеличение давления
- Стандартная рабочая температура – до 90 °C, опционально может быть увеличена.
- Вязкость – от аналогичной воде до вязкости пастообразных продуктов.

KINEMATICA AG
Dispersing and Mixing Technology

НОВАЯ СЕРИЯ ПОСУДОМОЕЧНЫХ МАШИН ДЛЯ ЛАБОРАТОРИЙ MIELE PROFESSIONAL PG 85

Материал предоставлен компанией Miele

АННОТАЦИЯ

Получение воспроизводимых результатов анализов предполагает прежде всего обеспечение высокого качества как самого лабораторного стекла, так и технологии его обработки. Упор при этом делается на широко зарекомендовавшее себя качество Miele: тщательно разработанная конструкция оборудования и высококачественные материалы. При разработке решений для обработки лабораторного стекла Miele Professional в течение длительного времени тесно сотрудничает со специалистами научно-исследовательских лабораторий и известными производителями лабораторной посуды. Результатом

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

такого доверительного и инновационного сотрудничества является создание оборудования и разработка методов подготовки, отвечающих самым взыскательным требованиям, предъявляемым к любому виду обрабатываемой посуды. Автоматы для мойки и дезинфекции Miele Professional отличаются инновационными технологиями в повседневном применении в самых притязательных лабораторных условиях. Высокая производительность (до 130 инжекторов для размещения узкогорлой лабораторной посуды), разнообразные принадлежности и применяемые на практике технологии обеспечивают получение исключительно высоких результатов, в том числе и в специальных случаях применения. Благодаря этим параметрам обеспечивается быстрое приведение в готовность лабораторного стекла. Исключительно высокая производительность обеспечивает большие эксплуатационные преимущества: оборудование компании Miele Professional работает быстро, основательно, экономично.

ВВЕДЕНИЕ

В 2016 году независимая семейная компания Miele выпустила новые лабораторные автоматы для мойки и дезинфекции с революционными технологиями. Автоматы для мойки и дезинфекции новой серии – **PG 8583, PG 8593** и **PG 8583 CD** – потребляют меньше воды, электроэнергии и моющих средств. При этом не просто сохраняют, но в разы повышают производительность. Например, по сравнению с предшественниками у машин нового поколения почти на 400% увеличено количество обрабатываемых за один цикл круглодонных колб и флаконов (объемом 50–100 мл).

Ядром новой серии автоматов для мойки и дезинфекции шириной 60 и 90 см является инновационная интеллектуальная система мойки, которая регулирует давление промывки на каждом этапе выполнения программы в зависимости от поставленной задачи. Другая особенность новых встраиваемых моек – модульная система загрузочных устройств для обработки лабораторной посуды различной формы.

Новинки и особенности посудомоечных машин Miele Professional

- Запатентованный циркуляционный насос с переменной скоростью (3 режима) регулирует давление воды в зависимости от этапа выполняемой программы. Это ощутимо снижает расход воды и электроэнергии — экономия по сравнению с предыдущим поколением достигает 45% в зависимости от программы и требований.
- Все нагревательные элементы интегрированы в насос, что снижает вероятность образования отложений в моечной камере. В сочетании с особо гладкими швами моечной камеры, выполненными методом лазерной сварки, это устанавливает новый стандарт в области гигиены. А высокая скорость нагрева воды нового насоса сокращает время выполнения программ.
- Оптимизирована подача воды и воздуха для сушки в загрузочные тележки. Теперь она осуществляется со стороны задней стенки машины. Промывочный раствор по горизонтальной направляющей подводится к распылителю с малыми потерями, что обеспечивает эффективное использование ресурсов.

Особенность: вентили неиспользуемых соединений корзин закрываются автоматически, что предотвращает потери давления в системе мойки и снижает общий расход воды. Автоматическая система управления давлением и работой распылителей контролирует выполнение программы обработки и своевременно предупреждает пользователя о возникающих отклонениях.

Функция сушки

Сушка в машинах нового поколения отличается сочетанием эффективности и удобства управления. После завершения последнего этапа мойки водяной пар отводится из моечной камеры в конденсатор пара на задней стороне машины. В машинах с системой **EcoDry** после завершения программы автоматически открывается дверь, когда температура в моечной ка-

мере становится ниже 70 °C. Благодаря этому оставшийся горячий и влажный воздух быстро выходит из моечной камеры, обеспечивая надежную сушку и быстрое охлаждение обрабатываемой посуды.

В моделях с функцией сушки **DryPlus** оставшаяся в моечной камере влага захватывается нагретым воздухом сушки и отводится наружу через новый конденсатор пара, отличающийся особой экономичностью. При этом высокоэффективный воздушный фильтр HEPA класса H13 не допускает попадания частиц пыли из окружающего воздуха в систему сушки и их отложения на обрабатываемой посуде.

Все машины оснащены новой функцией **AutoClose**, обеспечивающей автоматическое закрывание и надежное запирание двери после ее легкого касания. Новая запатентованная емкость для соли расположена в дверце, а не в моечной камере, как раньше, что значительно улучшает эргономику и облегчает работу оператора.

PerfectPureSensor

Остатки химических средств, то есть тончайшие отложения на лабораторной посуде, могут отрицательно повлиять на результаты анализов. Для исключения этого компания Miele разработала новую запатентованную систему измерения электропроводности PerfectPureSensor. Путем измерения электропроводности нежелательные примеси в ополаскивающем растворе (например, растворенные соли щелочных или кислотных химических средств) могут быть точно определены и уменьшены до предельного значения, которое устанавливает сам пользователь. При этом наличие остаточных загрязнений определяется путем измерения электропроводности раствора при ополаскивании. Измерение и контроль осуществляются автоматически с помощью системы, не требующей техобслуживания. Замеры ведутся с крайне низкими допусками в диапазоне 5–40 мкСм/см и 40–100 мкСм/см. Так, например, можно регулировать количество необходимых ополаскиваний для достижения нужного значения: если при заключительной проверке заданная пользователем электропроводность не достигается, то автоматически выполняются дополнительные ополаскивания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новая серия автоматов для мойки и дезинфекции Miele обеспечивает обработку лабораторной посуды и принадлежностей, соответствующую требованиям по чистоте для анализов. Как и всей продукции Miele, ей присущи высокая производительность и надлежащее качество. Высококачественная техника, ежедневно оправдывающая ожидания специалистов, заслужила большое доверие профессионалов: по данным независимого института Mercuri International, 97% всех клиентов компании снова приобретают оборудование марки Miele Professional, ведь оборудование этой фирмы устанавливает стандарты надёжности, производительности, простоты использования, энергоэффективности, дизайна и обслуживания. Такой подход соответствует принципу «Всё лучше и лучше», выгравированному основателями компании Карлом Миле и Райнхардом Цинканном на первых машинах.

BINDER
Best conditions for your success

МОРОЗИЛЬНЫЙ ШКАФ СВЕРХГЛУБОКОЙ ЗАМОРОЗКИ С ПРИНЦИПОМ МНОГОСТУПЕНЧАТОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ ПРОБ

Материал предоставлен компанией BINDER GmbH

ВВЕДЕНИЕ

В сфере гистологии необходимо хранить пробы в течение долгого промежутка времени. Чтобы хранить гистологические пробы тканей в оптимальных условиях, британская исследовательская лаборатория Propath выбрала морозильные шкафы сверхглубокой заморозки BINDER.

Propath является одной из ведущих лабораторий в Европе, работающей в области гистопатологии и молекулярной патологии. Основное внимание исследователей сосредоточено на доклинических тестах безопасности лекарственных средств, химических веществ и изделий медицинского назначения, а также на поддержке токсикологических исследований и оценке новых терапевтических антител. Соответствующая стандарту GLP лаборатория имеет более чем 30-летний опыт в области нормативных и научных исследований. Среди её клиентов – представители фармацевтической и биофармацевтической промышленности, химические и агрохимические компании, а также исследовательские центры и организации.

Исследования в борьбе против инфекций и рака – это основная область, где гистопатология и молекулярная патология играют главную роль. В частности, в диагностировании рака гистопатология является лучшим методом. Оба эти направления являются приоритетными для института исследования патологий.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ИССЛЕДОВАНИЕ В ОБЛАСТИ ГИСТОПАТОЛОГИИ

Образцы тканей, как правило, предоставляются в виде биопсии или операционного препарата. Затем тканевые срезы окрашивают с помощью специальных техник и изучают под микроскопом. Гистологические срезы, как правило, обеспечивают высокую точность диагноза. Например, метод используется для идентификации и классификации опухолевых клеток, а также для раннего выявления злокачественных новообразований. Ультрасовременные методы позволяют ставить гистологические диагнозы на основе крохотных срезов ткани.

Молекулярная патология является новейшей специальной дисциплиной в патологии и является одним из ключевых направлений современной диагностики. Комплексное применение молекулярной биологии и морфологических методов исследования клеток и тканей позволяет получить очень конкретную информацию по типу, причине, прогнозу и лечению широкого спектра заболеваний.

Задачей исследований Propath является доклиническая оценка безопасности новых препаратов и лекарственных препаратов, а также получение чётких, высококачественных закономерностей и воспроизводимых результатов.

ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Все исследования в области гистопатологии требуют возможности хранения образцов в течение длительных периодов времени. Образцы часто остаются замороженными при температуре до –86 °C на протяжении длительного промежутка времени: от нескольких недель до нескольких лет. Система охлаждения должна быть чрезвычайно надежной, так как в противном случае будет невозможно выполнить информативный всесторонний анализ. Для хранения образцов человеческих тканей для токсикологических исследований лаборатория Propath выбрала морозильные шкафы серии UF V от BINDER. «Удобное

Рисунок 2. **Высокий уровень безопасности благодаря контролю доступа с помощью RFID**

Рисунок 3. Морозильный шкаф сверхглубокой заморозки UF V 500

размещение и хранение проб тканей в морозильном шкафу и простая в использовании система являются ключевыми факторами в нашей работе, – объясняет Стюарт Джонс, директор по молекулярной патологии Propath. – Но самое главное, оборудование должно быть абсолютно надёжным, с услугой по замене в экстренном случае и резервной системой безопасности. Именно поэтому мы выбрали BINDER». Оборудование базируется на принципе многоступенчатой безопасности, которая гарантирует чрезвычайно высокий уровень безопасности. Кроме того, персонализированный контроль доступа к образцам с помощью технологии RFID стал решающим фактором при выборе оборудования BINDER. Благодаря этой технологии высокочувствительные образцы защищены от несанкционированного доступа. Только работники, прошедшие аккредитацию руководителя лаборатории, способны открыть морозильный шкаф, используя именную карту доступа.

Еще одним важным преимуществом BINDER для Propath стал тот факт, что у морозильных камер есть функция считывания данных. Это даёт возможность наблюдения за температурой в течение длительных периодов времени, а также обеспечивает всесторонний подход в отношении анализа данных.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

1. Надежное размещение и хранение проб при –80 °C.
2. Простая эксплуатация шкафа.
3. Абсолютная надежность шкафа с услугой по замене в экстренном случае и резервной системой безопасности.
4. Защита от несанкционированного доступа неавторизованных лиц.

РЕШЕНИЕ BINDER

Морозильный шкаф сверхглубокой заморозки BINDER серии UF V 500 для безопасного долговременного хранения при –86 °C.

Открытие электромагнитного дверного замка простым нажатием кнопки.

Принцип многоступенчатой безопасности с услугой по замене в экстренном случае и сохранением данных.

Персонализированный контроль доступа с помощью технологии RFID защищает от несанкционированного доступа посторонних лиц.

ПРЕИМУЩЕСТВА

1. Открытие двери простым нажатием кнопки.
2. Технология считывания радиометок RFID для персонализированного контроля доступа с встроенным сохранением протокола пользователя.
3. Data Logger для температуры с USB-разъемом.
4. 24/7/365 услуги по замене при заключении соглашения на техническое обслуживание.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Биотехнология.
2. Фармацевтическая промышленность.
3. Больницы / университетские клиники.

СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К РЕАЛИАЦИИ МЕТОДИК ТИТРОВАНИЯ ПРИ АНАЛИЗЕ ФАРМАЦЕВИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

АВТОР

В. Шунтиков,

Руководитель направления Metrohm
АО «АВРОРА»

ВВЕДЕНИЕ

Титрование, применяемое на протяжении веков, до сих пор не утратило своей значимости и актуальности среди аналитических методов. Не является исключением и контроль качества лекарственных средств. Методики титрования находят широкое применение в различных фармакопеях (российской, европейской, американской и т.д.) и фармацевтических статьях.

Автоматический титратор – инструмент, позволяющий реализовать методы титрования на новом уровне точности, скорости, удобства и производительности. Для российских лабораторий контроля качества или разработки лекарственных средств наиболее актуальной задачей является реализация различных методик титрования на одном приборе. На практике это значит, что автоматический титратор должен обеспечивать максимальный уровень точности и удобства, а также безопасности (с точки зрения ошибок оператора) при переходе от методики к методике. В настоящей статье рассмотрено применение автоматических титраторов Metrohm для проведения анализов по различным фармацевтическим методикам.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ НЕСКОЛЬКИХ МЕТОДИК ТИТРОВАНИЯ

На сегодняшний день даже простейшие автоматические титраторы позволяют проводить анализ по множеству различных методик. С другой стороны, это зачастую сопряжено с дополнительными затратами времени сотрудников лаборатории, рисками возникновения ошибки, а следовательно, получением менее точных результатов. Например, при смене кислоты на щелочь не требуется замена электрода, но требуется тщательная промывка бюретки, так как остатки реактивов могут повлиять на концентрацию раствора и, следовательно, на результат анализа. Наиболее правильным является использование отдельной бюретки под каждый из используемых титрантов.

Другой важный этап перехода между методами – выбор подходящего электрода. Например, кислотно-основное и осадительное титрование предусматривает использование различных электродов (стеклянного и серебряного соответственно). Следовательно, источником ошибки при анализе может быть неправильный выбор электрода либо ошибка при его подключении.

Современные модели титраторов позволяют избежать многих ошибок при проведении анализов и минимизировать время перехода между методиками. Данная статья описывает возможности современных приборов на примере автоматического титратора 907 Titrando производства Metrohm (рисунок 1). Помимо указанных методик используемый прибор также позволяет проводить определение влаги методом волюмометрического титрования по Карлу Фишеру.

Рисунок 1. **Общий вид автоматического титратора 907 Titrando**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование

С целью максимальной автоматизации анализа добавление всех вспомогательных растворов проводится с помощью систем дозирования автоматического титратора. Все дозирующие устройства, предназначенные для титрования, подключены напрямую к прибору 907 Titrando, а предназначенные для дозирования – к модулю 846 Dosing Interface. Для каждой методики имеется отдельный стенд на основе магнитной мешалки 801 Magnetic Stirrer. На сенсорной панели настроены 6 клавиш быстрого запуска: три – для проведения анализа и три – для установки используемого титра раствора (рисунок 1). Для анализа кетоконазола и сульфаниламида анализ проводят в термостатируемой ячейке с использованием температурных датчиков Pt1000. Все основные элементы прибора указаны в таблице 1. Используемые для анализа электроды и их подключение указаны в таблице 2.

Таблица 1.

Использованное оборудование и дозирующие устройства

Наименование	Количество
Автоматический титратор 907 Titrando	1
Дозирующее устройство 800 Dosino	7
Магнитная мешалка 801 Magnetic Stirrer	3
Сенсорная панель 900 Touch Contol	1
Дозирующая бюретка 5 мл	1
Дозирующая бюретка 10 мл	1
Дозирующая бюретка 20 мл	4
Дозирующая бюретка 50 мл	1
Термостат	1

Таблица 2.

Использованные электроды и их подключение

Наименование	Аналит	Разъем
Pt Titrode 6.0431.100	Сульфаниламид	1 F
Optrode 6.1115.000	Сульфат магния	2 F
iSolvotrode 6.0279.300	Кетоконазол	1 iConnect
Температурный датчик Pt1000	Сульфаниламид Кетоконазол	1 B x 2

МЕТОДИКА АНАЛИЗА

Определение сульфаниламида

Перед анализом устанавливают температуру термостата на 5 °C. Взвешивают 90–110 мг образца и добавляют в термостатируемую ячейку. С помощью бюреток к образцу автоматически добавляют 7,5 мл w(HCl)=20% и 42,5 мл дистиллированной воды, а также 2 мл c(KBr)=2,5 моль/л. После того как температура

раствора установится ниже 13 °C, проводят титрование с с($NaNO_2$)=0,1 моль/л до достижения первой точки эквивалентности.

Определение сульфата магния согласно Ph. Eur и USP

Навеску 0,150 г образца переносят в стакан для титрования и растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Добавляют около 0,1 г аскорбиновой кислоты, 10 мл буферного раствора NH_3/NH_4Cl и 0,15 мл индикатора эриохром черный Т. Проводят титрование с с(Na_2ЭДТА)=0,1 моль/л до достижения первой точки эквивалентности.

Определение кетоконазола согласно Ph. Eur

Отмеряют 20 мл образца и добавляют в термостатируемую ячейку для титрования.

Титрование проводится при охлаждении ячейки до 20 °C с помощью термостата. Проводят титрование с с($HClO_4$)=0,1 моль/л.

ОБСУЖДЕНИЕ И РЕЗУЛЬТАТЫ

Для реализации трех различных методик не требовалось осуществление каких-либо дополнительных манипуляций с прибором. Запуск каждого метода осуществляется выбором соответствующей клавиши на управляющей панели прибора. Кроме того, указанная конфигурация позволяет реализовать еще одну методику, например определение воды методом волюмометрического титрования по Карлу Фишеру.

Кривые титрования (рисунок 2) всех титрований получены в режиме реального времени, а в сформированном отчете отображены результаты измерений (включая статистические данные) и указаны все основные параметры системы. Полученные данные (таблица 3) говорят о высокой точности полученных результатов (СКО в пределах 0,20–0,26%).

Таблица 3.

Результаты анализов

Содержание, % (ср. знач)	СКО, %	N
Сульфаниламид		
100,94	0,23	5
Сульфат магния		
99,19	0,20	6
Кетоконазол		
99,28	0,26	3

Использование нескольких дозирующих блоков позволяет проводить полностью автоматическое добавление вспомогательных растворов (растворителей, буферов и т.д.), что уменьшает трудозатраты и положительным образом сказывается на точности получаемых результатов. На примере добавления деионизованной воды показано, что одинаковые реагенты могут быть добавлены из одной бюретки. Кроме того, данная конфигурация может быть использована и для реализации других методик окислительно-восстановительного, комплексонометрического или неводного кислотно-основного титрования. Для указанных целей могут быть использованы имеющиеся алгоритмы и параметры анализа с коррекцией расчетных формул.

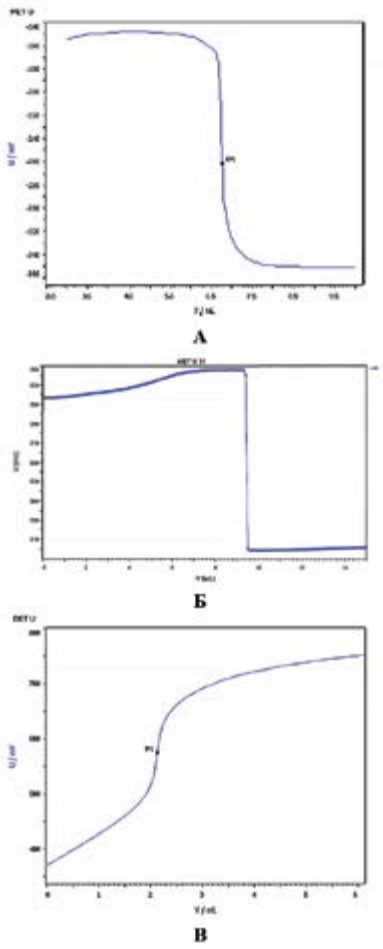


Рисунок 2. Примеры кривых титрования: А) сульфаниламида; Б) сульфата магния; В) кетоконазола

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере автоматического титратора 907 Titrando от Metrohm показана возможность реализации методик определения сульфаниламида, сульфата магния и кетоконазола. Для перехода между анализами не требуется проведение каких-либо манипуляций с конфигурацией самого прибора и запуск анализа осуществляется нажатием соответствующей клавиши быстрого запуска. Полученные в ходе анализа результаты обладают высокими метрологическими характеристиками. Кроме того, указанная конфигурация прибора может быть дооснащена дополнительными модулями для проведения определения влаги волюмометрическим титрованием по К. Фишеру либо реализации других титриметрических методик анализа.

ЭФФЕКТИВНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ВЭЖХ ДЛЯ ЛЮБОЙ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ

Материал предоставлен компанией Agilent Technologies

АННОТАЦИЯ

Более 50 лет Agilent Technologies занимается инновациями и вносит весомый вклад в развитие технологий ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС. Разрабатываемые компанией решения базируются на трех аспектах эффективности: аналитической, инструментальной эффективности лаборатории, обеспечивая успех во всех начинаниях. Так, 50-летний опыт разработки инновационного высококачественного оборудования обеспечивает максимальную эффективность разделения и детектирования вне зависимости от области применения, а передовые приборные комплексы от одного производителя позволяют подняться на новый уровень эксплуатационных возможностей, обеспечивающий универсальность, высочайшую пропускную способность и безопасность. Оборудование Agilent Technologies, разработанное с учетом будущих изменений, сочетается с универсальностью программного обеспечения и обслуживания, что является залогом непрерывной эксплуатации и высочайшей степени защиты вложений.

ВВЕДЕНИЕ

Система ВЭЖХ Agilent InfinityLab решает широкий диапазон задач жидкостной хроматографии от рутинного анализа до новейших исследований, и позволяет достичь высочайшей эффективности работы. В частности, ВЭЖХ-платформы зарекомендовали себя как надежные приборы, которые в сочетании с новейшими технологиями колонок и передовыми расходными материалами гарантируют надежное разделение и непревзойденные характеристики детектирования для достижения максимальной надежности ежедневных результатов. Более того, простота использования колонок и превосходная логистика проб – от подачи до анализа данных – сокращают продолжительность цикла анализа и обеспечивают максимальную эффективность использования прибора. Данный аспект в комплексе с беспрепятственным переносом методик позволяет провести интеграцию оборудования Agilent Technologies в существующую инфраструктуру, что в свою очередь, приводит к максимальной производительности. Таким образом, семейство приборов Agilent InfinityLab обеспечивает высокую эффективность лабораторных процессов.

Agilent Technologies

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ПОЛУЧЕНИЕ ДОСТОВЕРНЫХ ЕЖЕДНЕВНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Подача растворителя

Четырехканальный насос Agilent 1260 Infinity II, обеспечивающий давление до 600 бар, идеально подходит для колонок InfinityLab Poroshell 120. Отсутствие пульсаций, стабильность и высокоточные и воспроизводимые градиенты позволяют получить более высокую чувствительность и надежные результаты времен удерживания, тогда как на колонках с более мелкими частицами можно получить ускоренное разделение и увеличенное разрешение. Возможность использования до четырех растворителей обеспечивает максимальную гибкость автоматического смешивания растворителей как при рутинном поточном анализе, так и при решении исследовательских задач. Прочные материалы выдерживают даже самые сложные варианты применения и позволяют поддерживать работоспособность насоса в течение многих лет, что сводит к минимуму время простоя и сокращает эксплуатационные расходы.

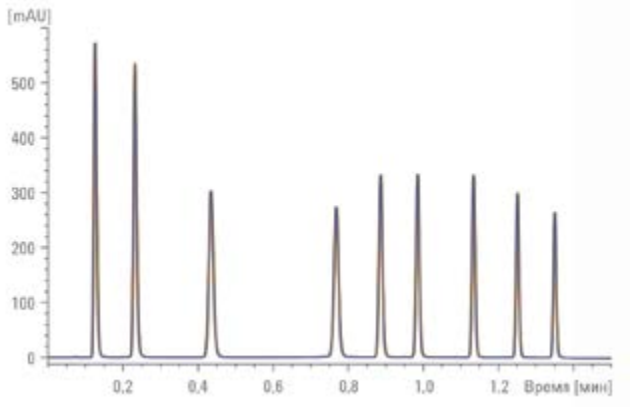


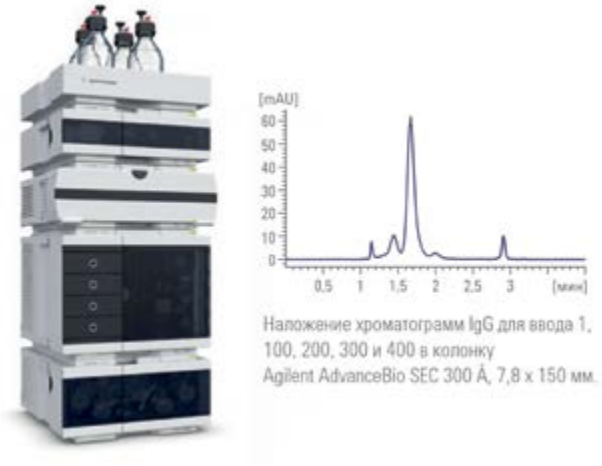
Рисунок 1. Пример анализа с 20 параллельными вводами. Получено значение ОСО времени удерживания 0,187% для 0,232 мин и 0,086% для 0,887 мин

Система ВЭЖХ 1260 Infinity Bio-inert

Для анализа биологических образцов или областей применения, требующих экстремальных значений pH, рекомендуется использовать четырехканальный насос на основе титана, чрезвычайно устойчивый к коррозии. В сочетании с другими модулями 1260 Infinity II Bio-inert можно сконфигурировать уникальную систему Agilent с полностью безметаллическим путем потока пробы и диапазоном мощностей до 600 бар при скорости до 5 мл/мин с диапазоном объема единичного ввода пробы 0-100 мкл.

Биоинертные ВЭЖХ представляют собой специализированное решение Agilent Technologies для анализа больших биомолекул. Безметаллический путь потока пробы обеспечивает целостность биомолекул,

сводя к минимуму неспецифические поверхностные взаимодействия и увеличивая срок службы колонки. Новые биоинертные теплообменники и кран выбора для четырех колонок поддерживают многофакторный анализ без замены колонок между анализами. Программное обеспечение Agilent Buffer Advisor и инструменты анализа данных для конкретных аналитических задач помогут легко решить проблемы анализа биопрепаратов.



Наложение хроматограмм IgG для ввода 1, 100, 200, 300 и 400 в колонку Agilent AdvanceBio SEC 300 Å, 7,8 x 150 мм

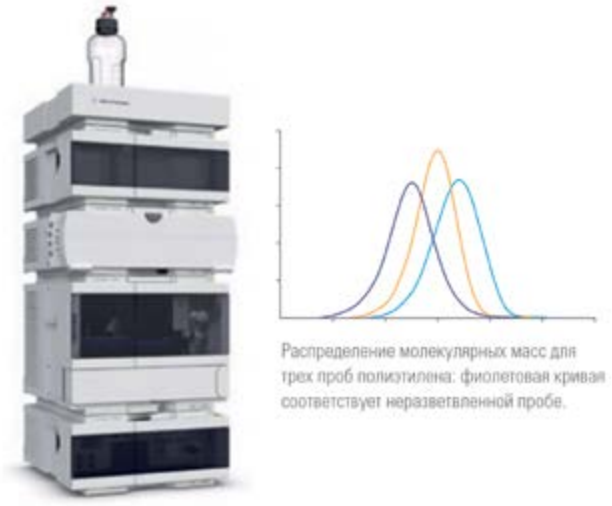
Разделение с высоким разрешением

Колонки InfinityLab Poroshell 120 обеспечивают быстрое и надежное разделение с высоким разрешением при давлении до 600 бар и лучше всего работают с ВЭЖХ 1260 Infinity II. Каждая колонка снабжена постоянно установленным идентификационным маркером, запрограммированным с подробными сведениями о фазе и размерах. При использовании можно проверять тип установленной колонки, а также отслеживать историю использования колонки, обеспечивая дополнительную достоверность и безопасность рутинного анализа. Фитинги InfinityLab Quick Connect гарантируют пользователям надежные, герметичные соединения благодаря использованию инновационного пружинного механизма с нулевым мертвым объемом даже после сотен повторных подключений.

Благодаря широкому диапазону возможностей детектирования увеличенная скорость передачи данных позволяет регистрировать даже самые узкие пики с помощью сверхвысокопроизводительных ВЭЖХ-систем. Высокочувствительные проточные кюветы для детектора на диодной матрице позволяют обнаруживать самые незначительные концентрации проб.

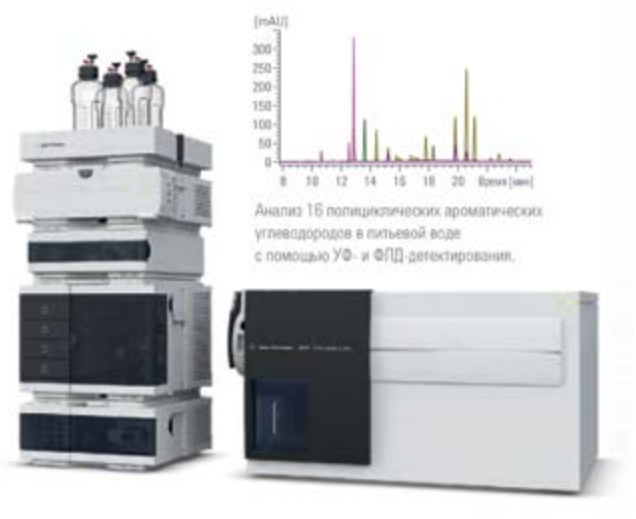
Кроме того, для детекторов на диодной матрице и флуоресцентных детекторов доступны специальные биоинертные проточные кюветы, гарантирующие безопасный сбор данных для биологических проб.

Универсальность ВЭЖХ 1260 Infinity II позволяет предложить пользователям широчайший портфель хроматографических решений, обеспечивая непревзойденные возможности для выполнения конкретных задач разделения. В частности, для ГПХ Agilent 1260 Infinity II является экономичным решением при проведении рутинного анализа полимеров с помощью обычного разделения методом гель-проникающей хроматографии с использованием рефрактометрического, спектрофотометрического или испарительного детектирования по светорассеянию. Идеально подходящий для детектора рефрактометрического типа новый изократический насос 1260 Infinity II позволяет выбирать любой из трех различных растворителей, а встроенный блок дегазации обеспечивает улучшенную стабильность базовой линии.



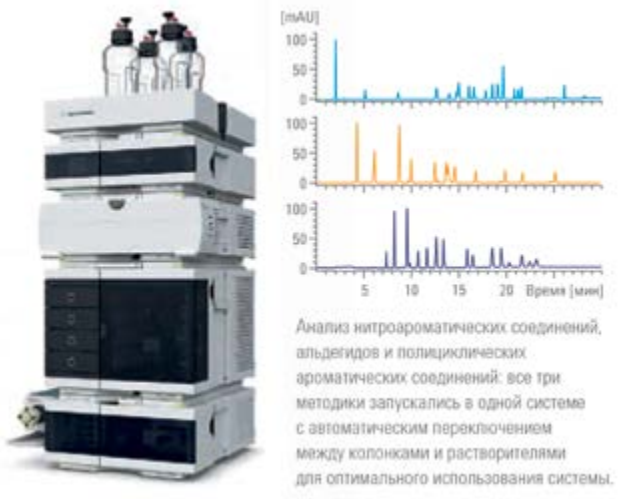
Распределение молекулярных масс для трех проб полиэтилена: фиолетовая кривая соответствует неразветвленной пробе.

Если требуется обогатить аналиты, удалить компоненты матрицы или снизить пределы обнаружения, модульная конструкция онлайн-ТФЭ-решений Agilent позволяет гибко адаптировать существующие системы в соответствии практически с любой аналитической задачей ВЭЖХ. Комбинируя многофункциональный модуль Flexible Cube Agilent 1290 Infinity, в котором размещаются многоразовые патроны для ТФЭ и один или два клапана переключения, с трехквадрупольной системой для ВЭЖХ-МС серии 6400, можно переместиться в новое измерение детектирования сверхнизких, следовых уровней аналитов.



Анализ 16 полициклических ароматических углеводородов в питьевой воде с помощью УФ- и ФЛД-детектирования.

Решение для разработки методик Agilent 1260 Infinity II поставляется в состоянии полной готовности и предназначено для автоматизированного доступа более чем к 600 уникальным наборам условий разделения ВЭЖХ. Различные комбинации неподвижных



Анализ нитроароматических соединений, альдегидов и полициклических ароматических соединений: все три методики запускались в одной системе с автоматическим переключением между колонками и растворителями для оптимального использования системы.

фаз и растворителей позволяют определить оптимальные условия разделения для вашей области использования. Программное обеспечение Agilent Method Scouting Wizard позволяет создавать все необходимые методы и последовательности за считанные минуты. Мощные отчеты позволяют быстро определить наиболее подходящие условия.

Эффективная подача проб

ВЭЖХ 1260 Infinity II предлагает высокую гибкость, позволяющую обрабатывать несколько контейнеров с пробами. Просто вставьте лоток для проб или весь выдвижной ящик в многопозиционное устройство ввода с удобным доступом и отправьте свои образцы на анализ с помощью интуитивного графического программного интерфейса. Можно обрабатывать сотни или даже тысячи проб без ручного обслуживания. Уникальный автосамплер с опцией двойного инжекционного порта позволяет выполнять этапы обработки проб параллельно с анализом других проб, что значительно сокращает общую продолжительность цикла анализа.

Многоколоночный термостат 1260 Infinity II вмещает до четырех колонок длиной 30 см и обеспечивает прямой доступ к каждой колонке с помощью крана-переключателя InfinityLab Quick Change. При этом автоматизированное выполнение методик происходит без отсоединения и повторного подсоединения колонок. Несъемные одноразовые метки для всех четырех колонок регистрируют их идентичность и полную историю использования, обеспечивая соответствие нормативным требованиям. Функция отслеживания колонок позволяет также предотвратить сбои при анализе важных последовательностей или избежать несоответствия неподвижных фаз, растворителей и температур.

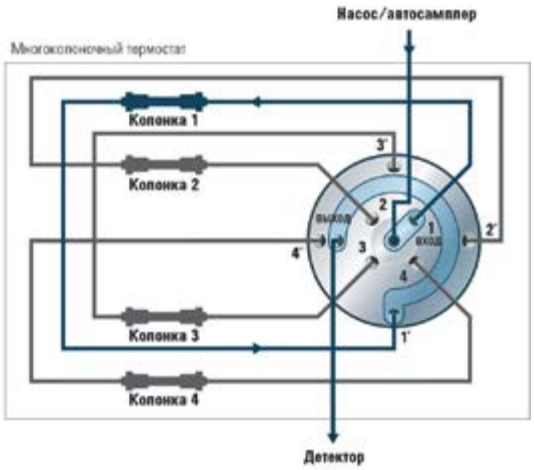
Отделение для колонок с удобным доступом упрощает и ускоряет замену колонок благодаря фитингам колонок InfinityLab Quick Connect. Теплообменники InfinityLab Quick Connect нового поколения также могут быть легко подсоединены или заменены.

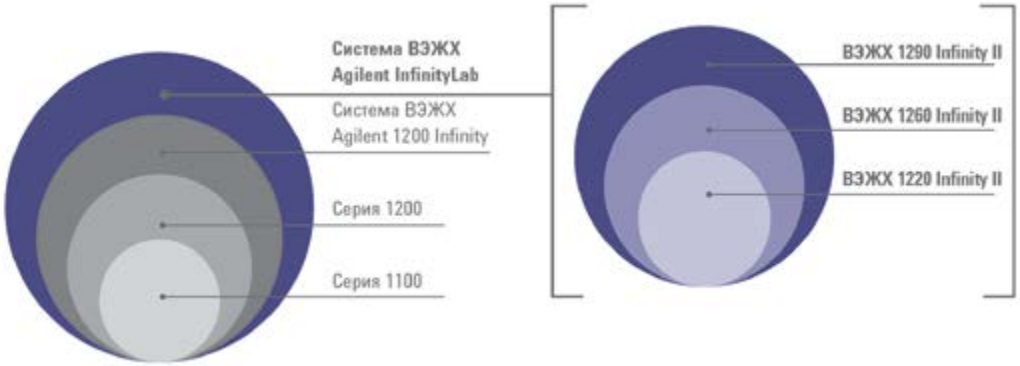
Рисунок 2. Конструкция автосамплера Agilent 1260 Infinity II Multisampler

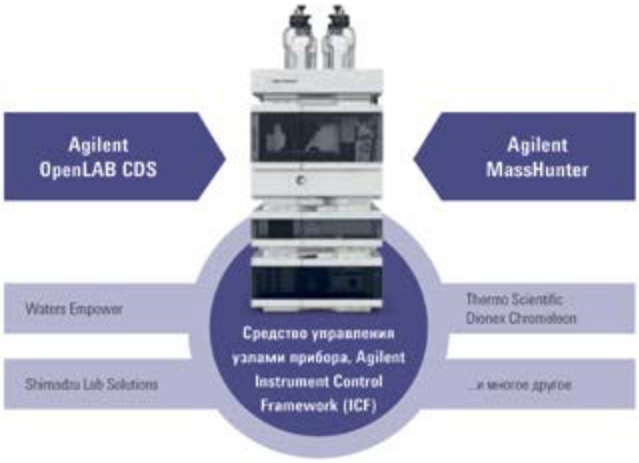
Интеграция приборов Agilent Technologies в существующую инфраструктуру лаборатории

Полностью поддерживая усовершенствование технологий ВЭЖХ, компания Agilent Technologies чрезвычайно серьезно относится к вопросам совместимости с существующим оборудованием. Вкладывая средства в приобретение прибора ВЭЖХ серии InfinityLab, можно быть уверенным в его свободной интеграции в любой лаборатории, использующей системы ВЭЖХ Agilent Technologies. Более того, самые сложные модели Agilent Technologies поддерживают все методики, которые могут выполняться на более доступных приборах ВЭЖХ серии InfinityLab.

Оптимальную работу ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II обеспечивает управление с помощью программного обеспечения OpenLAB CDS или MassHunter. Технология Agilent ICF (управление узлами прибора) предоставляет сторонним поставщикам систем сбора и обработки хроматографических данных (CDS) или рабочих станций простой способ поддержки ВЭЖХ 1260 Infinity II. Тем самым происходит беспрепятственная интеграция ВЭЖХ 1260 Infinity II в существующую сис-







тему CDS с доступом ко множеству расширенных возможностей и функций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Серия ВЭЖХ Agilent InfinityLab – это уникальный выбор оборудования для жидкостной хроматографии, позволяющий решать самые разнообразные задачи, от рутинного анализа до новейших исследований. Более того, инструменты серии InfinityLab LC идеально сочетаются с колонками и расходными материалами InfinityLab, что обеспечивает гармоничную совместную работу всех компонентов, позволяя оптимизировать процессы жидкостной хроматографии.

Серия InfinityLab для ВЭЖХ обеспечивает плавный перенос существующих или будущих методик. Полная совместимость методик позволяет анализировать пробы, не изменяя условий. ВЭЖХ 1290 Infinity II позволяет переносить методики, разработанные на жидкостных хроматографах других производителей, а серия InfinityLab для ВЭЖХ предоставляет платформу, с помощью которой можно создать свое решение. Оборудование также может быть задействовано в качестве базисного приборного комплекса для использования в различных областях применения. Оптимизируйте хроматографические исследования с помощью системы разработки методов 1290 Infinity II, а затем без сбоев в работе перенесите методики в область рутинных анализов с помощью уникальной интеллектуальной системы эмуляции методик (ISET) от Agilent Technologies.

Системы детектирования Agilent обеспечивают 10-кратное повышение чувствительности по сравнению с традиционными детекторами на диодной матрице и 30-кратное расширение линейного диапазона. Высокая производительность серии InfinityLab для ВЭЖХ превосходит все ожидания в отношении эффективности и универсальности хроматографического разделения. Именно поэтому день за днем десятки тысяч лабораторий по всему миру используют оборудование Agilent Technologies для получения достоверных результатов. По всему миру интенсивно используется более 150 000 систем ВЭЖХ, обеспечивающих высокое качество, производительность и надежность. «Это оборудование просто безотказно», – так пользователи отзываются о самых популярных в мире приборах Agilent Technologies для жидкостной хроматографии. Для максимальной продолжительности безотказной работы и увеличения промежутков между проведениями техобслуживания используются детали высокого качества. Более того, встроенные современные инструменты диагностики и техобслуживания гарантируют надежную и безопасную работу.

- Полный контроль утечек в каждом модуле.
- Интеллектуальные модули, реализованные через сеть CAN.
- Уникальные радиочастотные идентификационные метки на лампах детекторов, проточных кюветах, колонках и головках кранов.
- Удобный доступ с передней панели ко всем деталям, предназначенным для техобслуживания пользователем.
- Одиночное подключение LAN/PC.
- Безвинтовое крепление электронной платы.
- Продуманная диагностика обеспечивает максимальную продолжительность безотказной работы.

СИСТЕМЫ ИЗМЕЛЬЧЕНИЯ И МИКРОНИЗАЦИИ ОТ FPS

Материал предоставлен компанией FPS

АННОТАЦИЯ

Компания FPS специализируется на разработке и производстве оборудования для тонкого размола, а также различных типов барьерных систем для широкого спектра промышленных задач. Технические решения по микронизации от FPS обеспечивают широкие возможности тонкого измельчения и включают в себя как струйные, так и механические мельницы.

ВВЕДЕНИЕ

Основные принципы процесса микронизации базируются на применении сжатого газа (воздуха или азота) под давлением от 2 до 12 атм (изб), столкновениях типа «частица – частица», статической классификации частиц по фракциям, отсутствии движущихся деталей и изотермическом режиме. Как правило, в ходе микронизации высокоскоростная струя газа разгоняет частицы в размольной камере.

Параметры процесса микронизации:

- Химико-физические характеристики продукта (PSD, влажность, плотность, наличие инородных включений).
- Геометрия размольной камеры (габаритные размеры и форма, количество расширительных сопел, классификатор).
- Рабочая температура.
- Технологический газ (тип, относительная влажность).
- Удельная энергия (отношение давления технологического газа к скорости загрузки твердых частиц).
- Начальный размер частиц: 1 мм (макс.).
- Конечный размер частиц: вплоть до D90 <3 мкм.

Системы микронизации FPS базируются на трех различных технологиях: спиральные струйные мельницы, мельницы петлевого типа (QMill) и роторно-штифтовые мельницы (PinMill).

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

СПИРАЛЬНЫЕ СТРУЙНЫЕ МЕЛЬНИЦЫ

Уменьшение размера частиц в спиральных струйных мельницах происходит за счет столкновений частиц продукта, предварительно разогнанных струей газа до высоких скоростей. Обычно использование данной технологии позволяет получить целевые значения PSD D90 <3 мкм. В спиральных струйных мельницах сжатый газ (воздух или азот) подается под давлением от 2 до 12 атм (изб). Разгон частиц продукта происходит в размольной камере. Столкновение типа «частица – частица» позволяет провести фрагментацию частиц продукта и их статическую классификацию по фракциям.

Среди преимуществ мельниц данного типа стоит отметить высокий уровень предотвращения контаминации за счет легкости очистки и валидации.

Более того, отсутствие движущихся механических деталей обеспечивает значительное снижение загрязнения продуктами эрозии рабочих поверхностей. Помимо этого, в мельнице поддерживается постоянная температура.

Серия струйных мельниц может дополняться специальной системой загрузки (волюметрической или гравиметрической), устройствами сбора готового продукта и фильтрации отходящего газового потока.

Оборудование легко встраивается в изоляторы FPS, позволяя обрабатывать высокоактивные или стерильные продукты.

В линейке FPS представлены такие типы спиральных струйных мельниц, которые станут идеальным решением как для научно-исследовательских лабораторий, специализирующихся на разработке новых веществ, которым требуется микронизировать небольшие объемы продукта, так и для пилотного производства, на котором требуется обрабатывать партии продукта от 3 г до 10 кг, и для производственных предприятий, где требуется универсально и эффективно обрабатывать большие объемы продукта.

МЕЛЬНИЦЫ QMILL

Мельницы QMill являются альтернативой механическим мельницам. Взаимозаменяемые, со спиральными струйными мельницами, мельницы серии QMill – фармацевтическая альтернатива штифтовым и молотковым мельницам. В отличие от механических мельниц эти мельницы струйного типа могут на входе принимать частицы большого размера, а на выходе выпускать частицы размером до 20 мкм.

Оборудование	Размер загрузки	Производительность	Потребление газа	
			7 атм (изб)	12 атм (изб)
PILOTMILL-ZERO	10–200 мг	–	0,67 нм^3/ч	1,15 нм^3/ч
LABOMILL / PILOTMILL-1	0,2–100 г	3–80 г/ч	5,0 нм^3/ч	8,6 нм^3/ч
PILOTMILL-2	1 г – 3 кг	5 г/ч – 1 кг/ч	11,6 нм^3/ч	19,8 нм^3/ч
PILOTMILL-3	3 кг – 10 кг	50 г/ч – 5 кг/ч	14,4 нм^3/ч	24,7 нм^3/ч
PILOTMILL-4	5 г – 60 кг	50 г/ч – 18 кг/ч	22,0 нм^3/ч	37,8 нм^3/ч
PILOTMILL-5	100 г – 100 кг	0,2–30 кг/ч	46,5 нм^3/ч	79,7 м^3/ч
PILOTMILL-6	500 г – 250 кг	0,25–50 кг/ч	61,6 нм^3/ч	105,6 нм^3/ч
PROMILL-8	2–1000 кг	0,5–80 кг/ч	119 нм^3/ч	205 нм^3/ч
PROMILL-12	5–2500 кг	5–200 кг/ч	249 нм^3/ч	427 нм^3/ч
PROMILL-16	20–5000 кг	10–400 кг/ч	444 нм^3/ч	761 нм^3/ч
PROMILL-20	50–10000 кг	20–800 кг/ч	725 нм^3/ч	1240 нм^3/ч

Оборудование	Размер загрузки	Производительность	Потребление газа	
			7 атм (изб)	12 атм (изб)
QMILL-2	1 г – 3 кг	0,01–1 кг/ч	11,4 м³/ч	19,5 м³/ч
QMILL-6	100 г – 100 кг	0,2–30 кг/ч	42,8 м³/ч	73,4 м³/ч
QMILL-8	1–500 кг	0,5–50 кг/ч	67 м³/ч	115 м³/ч
QMILL-10	5–2500 кг	2–150 кг/ч	188 м³/ч	322 м³/ч
QMILL-14	10–5000 кг	5–300 кг/ч	401 м³/ч	687 м³/ч

Мельницы типа QMill находят широкое применение в трех областях: R&D-лаборатории (научно-исследовательская деятельность), которым необходимо микронизировать небольшое количество продукта – от 1 г до нескольких килограмм, пилотное производство, где осуществляется микронизация партии продукта размером от 1 до 500 кг, и промышленное производство, на котором требуется обрабатывать большие объемы продукта.

Механические мельницы и мультимелющие платформы

Механические мельницы разработаны для измельчения агломератов в фармацевтических, химических и пищевых продуктах. Тонина помола продукта в них зависит от таких факторов, как химические и физические свойства обрабатываемого продукта, скорость вращения и скорость загрузки продукта в измельчительную камеру, которая определяет количество продукта внутри камеры, температура технологического процесса и применяемый тип рабочих элементов измельчительной камеры (штифты, режущие пластины, молотки, лезвия).

Мультимелющая платформа – система, которая может включать в себя несколько типов мельниц: спиральные струйные, штифтовые (PinMill), петлевые (QMill), конические и молотковые. Интеграция инновационных мелющих станций с взаимозаменяемыми размольными головками в единую платформу с использованием различных технологий позволяет проводить процессы измельчения в исследовательских и пилотных подразделениях и обрабатывать продукты класса OEB4/5 при использовании совместно с барьерной системой FPS. Более того, мультимелющая платформа может быть укомплектована криогенным теплообменником, что позволит проводить измельчение при температурах до –100 °C.

Как и механические мельницы, мультимелющие платформы могут встраиваться внутрь изолятора. Обычно в барьерных системах устанавливаются универсальные механические мельницы, конические мельницы, спиральные струйные мельницы и мельницы типа QMills.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все типы мельниц производства FPS могут применяться как в условиях небольшой лаборатории, так и на промышленном производстве. Однако если спиральные струйные мельницы позволяют добиться финального распределения частиц <30 мкм, то мельницы типа QMill и PinMill позволяют получить частицы размером 30–100 мкм.

EXPLORISR – НОВАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ СИСТЕМА ОТ КОМПАНИИ KÖTTERMANN

Материал предоставлен компанией Köttermann

АННОТАЦИЯ

Немецкая компания Köttermann – ведущий производитель лабораторной мебели, который на протяжении более 65 лет символизирует высшее качество «Сделано в Германии» и исключительный уровень технического обслуживания, специализируясь на лучших интеллектуальных решениях в области лабораторной вентиляции и мебели для фармацевтических, производственных и научно-исследовательских лабораторий. Ежегодно Köttermann производит на собственных площадях (14 000 м^2) около 2000 вытяжных шкафов, осуществляет переработку 2000 тонн стали, проводит окраску 1000 м^2 комплектующих в день, используя в общей сложности около 50 т порошковых красителей в год. Компания сертифицирована по DIN EN ISO 14001 как первая в индустрии компания. Девизом компании является выработка совместно с клиентами оптимальных интеллектуальных решений для безопасности лабораторий.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ВВЕДЕНИЕ

Новая лабораторная система EXPLORISR – продукт, который возник на основе накопленных знаний Köttermann и последних требований клиентов. Имеющая, как и прежде, модульную структуру, новая лабораторная система стала еще более функциональной, надежной и продуманной. В ее основе лежит концепция лабораторного оборудования, разработанная в точном соответствии с потребностями и уровнем затрат клиента. При этом качество и безопасность находятся на самом высоком уровне. Создавая EXPLORISR, специалисты Köttermann учли растущие потребности в модульности системы и комфорте ее использования. Кроме того, в новой системе снова сделана особая ставка на сталь. Этот прочный материал является не только необычайно долговечным и полностью перерабатываемым, с точки зрения безопасности он практически не имеет себе равных, ведь сталь значительно снижает пожарную нагрузку в лаборатории, а также почти не подвержена загрязнениям. Компания Köttermann уделила должное внимание дизайну, ведь функциональность и эстетичность должны идеально дополнять друг друга, чтобы сотрудники будущей лаборатории комфортно чувствовали себя на своем рабочем месте.

EXPLORIS® – СИСТЕМА, ПРОДУМАННАЯ ДО МЕЛОЧЕЙ

Довольно часто стимулом к дальнейшему развитию является то, что на первый взгляд кажется мелочью. Поэтому в Köttermann всегда максимально внимательны там, где можно что-то улучшить. Накопленный опыт и предложения клиентов позволили представить EXPLORISR как лучшую на текущий момент лабораторную систему.

Преимущества EXPLORIS®:

- плавность и бесшумность: удобные выдвижные механизмы с пневматической втягивающей автоматикой и смягчением закрытия;
- стальные компоненты: прочность, долговечность со сниженной пожарной нагрузкой;
- четкие линии и прозрачность: четкие очертания и прозрачные компоненты сервисных стоек устанавливают акценты, комфортные для визуального восприятия;
- эстетичность и обзорность: мебельные ручки, выполненные из высококачественных материалов, имеют привлекательный дизайн и оснащены специальной ячейкой для обозначения содержимого;
- гармоничное сочетание цветов: идеально согласованные друг с другом тона обеспечивают приятную рабочую атмосферу;
- многогранность: типичная восьмиугольная форма устанавливает эстетический акцент и, кроме того, обеспечивает функциональные преимущества.

Благодаря этому EXPLORIS® – качество, которое видно и слышно, начиная с материала – стали. Прочная, гигиеничная, со сниженной пожарной нагрузкой сталь необычайно долговечна и подвергается практически полной переработке. Стремление к качеству Köttermann видно во всем, например в бесшумных дверях и выдвижных ящиках, которые закрываются тихо и плавно благодаря пневматической втягивающей автоматике и смягчающим их ход механизмам.

EXPLORIS® – БОЛЬШЕ, ЧЕМ ПРОСТО ЭСТЕТИКА

Играет ли дизайн в лаборатории важную роль? В Köttermann считают, что это так. Поэтому при разработке EXPLORISR Köttermann обратилась к услугам дизайнерского бюро, широко признанного на международном уровне. Ведь гармоничная и приятная обстановка положительно сказывается на результатах работы. Однако хороший дизайн всегда должен быть еще и функциональным. Лучший тому пример – типичная восьмиугольная форма лабораторных столов. Или прозрачные компоненты сервисных стоек, которые обеспечивают обзорность в лаборатории. Новые мебельные ручки не только имеют привлекательный внешний вид, но и идеально обхватываются рукой. Куда ни посмотришь, везде форма и функциональность удачно дополняют друг друга.

Более того, с учетом постоянно меняющихся требований к работе в лаборатории и потребностей работающих в ней людей лабораторная система EXPLORISR сконструирована таким образом, чтобы всегда соответствовать этим изменениям: благодаря идеям, обеспечивающим высокую степень модульности. Все столы с универсальным каркасом при монтаже можно настраивать на необходимую высоту: от 720 до 950 мм. При этом сами каркасы могут быть двух типов (C или A), что позволяет обеспечить то пространство для ног, которое будет наиболее удобным. Сервисное снабжение осуществляется через кассеты, которые можно заполнить, заменить или установить позднее по своему усмотрению. Таким образом, созданная лаборатория будет отвечать всем индивидуальным требованиям клиента, касающимся модульности.

Наряду с регулируемыми по высоте каркасами столов Köttermann предлагает вытяжные шкафы

с удобными для спины и оснащенными электрической регулировкой высоты столешницами. Подъемный экран вытяжных шкафов реагирует уже на легкое прикосновение либо приводится в действие педалью, устанавливаемой опционально. А навесные сервисные панели с телескопическими креплениями обеспечивают приборы всем необходимым сверху, освобождая стол для работы. Такие продуманные до мелочей детали существенно облегчают сотрудникам выполнение ежедневных задач.

СИСТЕМА БЕЗОПАСНОСТИ

Учитывая самые современные требования к безопасности в лаборатории система EXPLORISR включает в себя технологию FWF-90, гарантирующую дополнительную безопасность при хранении ЛВЖ и горючих веществ. Однако еще более безопасной работу в лаборатории делают «умные» компоненты оснащения, прежде всего в зоне вытяжных шкафов. Будь то серийный контроллер подъемного экрана EXPLORIS AutoProtect^{R} для автоматического закрытия или опциональная защитная световая решетка

EXPLORIS CloseGuard^{R} для блокировки процесса закрытия при обнаружении препятствий – одна из заранее продуманных Köttermann деталей, обеспечивающих безопасность. Для полного контроля применяются датчики и «умная» электроника. Так, система EXPLORIS AirMonitor^{R} попеременно измеряет объемный поток либо скорость поступления воздуха, контролируя таким образом безопасность вытяжного шкафа в соответствии с множеством международных стандартов. Предлагаемый опционально температурный датчик для вытяжного шкафа

Рисунок 1. Исследовательский центр Дармштадского университета. Лабораторный комплекс, работающий в сфере фундаментальных и прикладных исследований в области химии, медицины, биологии

Рисунок 2. Darmstadt / Германия. Всемирная группа по работе, исследованиям, изобретениям в области фармацевтики и химии

обеспечивает защиту от термической перегрузки. Особые усилия в сфере инноваций Köttermann направила на создание новой электроники вытяжных шкафов. За простым в использовании сенсорным экраном спрятан полноценный компьютер, управляющий множеством функциональных компонентов: от подъемного экрана, системы контроля отводимого воздуха и переключаемых и программируемых извне розеток до удаленной диагностики с возможностью считывания и изменения параметров посредством встроенного USB-интерфейса. Технология устанавливает стандарты в лаборатории в точном соответствии с ожиданиями клиента.

НОВЫЕ РЕШЕНИЯ MERCK В ОБЛАСТИ ЦЕНТРАЛИЗОВАННОЙ ВОДОПОДГОТОВКИ

Материал предоставлен компанией Merck

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы технология электродеионизации становится все более востребованной в процессе водоподготовки. Существует ряд общепризнанных лидеров в области разработки этой технологии. К сожалению, только несколько из них создают собственные лабораторные системы. Одной их этих компаний была Millipore, которая в 2010 году ушла под крыло немецкого научно-технологического гиганта Merck, образовав новое подразделение Merck Life Science.

Более 30 лет научно-исследовательский отдел систем очистки воды Merck Life Science, расположенный в штаб-квартире в пригороде Парижа, занимается совершенствованием технологии электродеионизации. Ученым компании понадобилось 10 лет, чтобы создать первые компактные системы очистки с технологией электродеионизации.

Отличительной особенностью модулей электродеионизации Merck является их устойчивость к жесткой воде, что позволяет им работать в штатном режиме в большинстве регионов Российской Федерации.

Венцом разработок инженеров Merck стала новая система Elix® Large, представленная в июле 2016 года, – спустя 13 лет после анонса предыдущего поколения. Инженеры компании учли предыдущий опыт создания систем, современные тенденции развития технологий очистки воды и систем контроля ее качества, а также пожелания пользователей и проектных организаций. В результате появилось целостное решение для получения, хранения и распределения чистой воды. Было переработано 90% узлов и агрегатов, что существенно повысило надежность систем.

Сердцем системы являются мембраны обратного осмоса и модуль электродеионизации 5-го поколения. Такая комбинация позволяет получать чистую воду (10–15 МОм·см или 0,1–0,065 мкСм/см при 25 °С) с низким содержание общего органического углерода (<30 мкг/л TOC). Ультрафиолетовая лампа на последнем этапе очистки поддерживает уровень бактерий ниже 10 КОЕ/мл.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Помимо стандартного контроля сопротивления/проводимости воды типа 2, системы очистки Merck позволяют контролировать уровень органического углерода в петле распределения в реальном времени.

Системы Elix® выпускаются в четырех модификациях с разной производительностью – 40, 80, 120 и 150 литров чистой воды в час. Кроме того, системы являются модульными, то есть по мере необходимости одну систему можно дополнять второй и третьей, получая, таким образом, производительность 300 или 450 литров в час или до 9000 литров в сутки в варианте с Elix® 150.

Качество воды соответствует международным стандартам на воду очищенную и воду для лабораторного анализа (вода типа 2 по ISO 3696, ASTM D1193, ГОСТ Р 52501-2005).

Теперь система не только контролирует процесс очистки, но и имеет возможность корректировать его в автоматическом режиме. Это позволяет продлить ресурс внутренних элементов, поддерживать постоянную производительность, независимо от температуры водопроводной воды и минимизировать количество сбрасываемой воды. Такая технология была применена впервые.

Чистая вода накапливается в 500-литровой системе хранения и распределения, которая обеспечивает сохранность воды и ее распределение по потребителям. Емкость имеет санитарное исполнение. Помимо стандартной конфигурации есть опциональные решения для использования в фармацевтической, биотехнологической и пищевой промышленности, а также в микроэлектронике.

- Насос в санитарном исполнении с частотно-регулируемым приводом позволяет поддерживать постоянную скорость потока при разборе воды.
- Ультрафиолетовая лампа 254 нм и душирующее устройство в резервуаре предотвращают образование биопленки и размножение бактерий, снижая частоту санитарных обработок резервуара.
- Стерилизующий фильтр и ультрафиолетовая лампа 254 нм в петле рециркуляции задерживают бактерии и механические примеси.
- Воздушные фильтры имеют не только мембрану 0,22 мкм для защиты резервуара от бактерий из воздуха, но и средства поглощения CO_2 и летучей органики, позволяя максимально сохранить качество воды при ее хранении.

При необходимости использования нестандартных емкостей, насосов, датчиков, клапанов и т.п., система комплектуется специальным блоком, который позволяет ей взаимодействовать с оборудованием других производителей.

Контроль и управление процессами очистки, хранения и распределения воды осуществляется непосредственно системой. Пользователь взаимодействует с большим сенсорным экраном, на котором

отображается вся необходимая информация. Меню системы русифицировано, что существенно упрощает его использование. Инженеры серьезно потрудились над тем, чтобы сделать его действительно интуитивно понятным и логичным. Появился раздел с наглядными подсказками по обслуживанию системы, поэтому теперь большинство процедур могут выполняться любыми сотрудниками без привлечения инженерной службы.

Инженерам Merck удалось снизить уровень шума ниже 50 дБ, что делает комфортной работу даже в непосредственной близости от системы.

Мировые тенденции к переходу на цифровые технологии подтолкнули разработчиков к обеспечению онлайн-доступа ко всем параметрам и настройкам системы не только с помощью компьютера, но и со смартфонов и планшетов. Пользователю не потребуется покупать или устанавливать дополнительное программное обеспечение. Все, что нужно сделать, – подключить систему к локальной сети и настроить доступ.

Система Elix® может быть интегрирована с лабораторными информационными системами (ЛИС), а также с автоматизированными системами управления зданиями (АСУЗ), упрощая контроль за процессами и позволяя мгновенно передавать информацию о параметрах процессов очистки, хранения и распределения и о нештатных ситуациях.

Компания Merck занимается валидацией своих систем очистки воды на фармацевтических предприятиях всего мира с 1999 года. Инженеры компании являются сертифицированными специалистами, которые могут проводить квалификационные работы IQ/OQ в России и странах СНГ. Процессы IQ/OQ занимают порядка 10–12 часов и включают в себя не только полную проверку узлов системы очистки, но и моделирование нештатных ситуаций с последующей фиксацией результатов срабатывания сигналов тревоги. Такой подход гарантирует, что пользователь получит сигнал о любой нештатной ситуации, что позволит своевременно среагировать и устранить проблему.

Инженеры компании Merck оказывают всестороннюю поддержку на этапах проектирования, установки, обучения и послепродажного обслуживания. Также компания предлагает ряд сервисных контрактов, включающих ежегодные профилактические визиты и реквалификацию систем, работающих в среде GMP.

Отдельное внимание уделяется проектным организациям. Компания Merck создала удобный инструмент для получения чертежей любых стандартных решений в формате .dwg, который позволяет выбрать нужную конфигурацию и вставить ее в общий чертеж проекта.

Система Elix® является новым продуктом, предоставляющим пользователям уникальные решения и возможности для построения современной линии подготовки воды.

ВОЗМОЖНОСТИ МНОГОПАРАМЕТРОВЫХ ЦИТОМЕТРОВ С ФУНКЦИЕЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Материал предоставлен компанией GE Healthcare

АННОТАЦИЯ

Система визуализации клеток Cytell™ от компании GE Healthcare использовалась для изучения механизма воздействия четырех хорошо изученных испытуемых веществ на клеточный цикл посредством многопараметрического анализа, включающего в себя определение жизнеспособности клеток, содержания ДНК, фазового перехода G1/S и фосфорилируемого гистона H3. Высокий уровень детализации, полученный от выбранной комбинации конечных точек клеточного цикла, помог установить точную точку блокады фазы клеточного цикла и лучше охарактеризовать клеточную реакцию на введенные вещества.

ВВЕДЕНИЕ

Преобладающее большинство противоопухолевых лекарственных препаратов обладают механизмом действия, который в определенный момент времени нарушает прогрессию клеточного цикла. Поэтому при разработке новых лекарственных препаратов требуется использование оборудования и реагентов, надежно и эффективно идентифицирующих препараты с необходимым ингибирующим действием на клеточный цикл. Отличительным преимуществом цитометров с функцией визуализации клеток является возможность записи множества точек в формате многолуночного планшета без многочисленных шагов обработки, которые требуются при более традиционном подходе.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

В данной статье изучено влияние четырех испытуемых веществ на клеточный цикл с использованием многопараметрического анализа, который сочетает в себе определение жизнеспособности клеток, содержания ДНК, фазового перехода G1/S и фосфорилируемого гистона H3. Во всем процессе исследования от этапа посева до проведения многопараметрического анализа для подсчета количества клеток и определения их жизнеспособности использовалась система визуализации клеток Cytell™ от GE Healthcare. Готовые к использованию настраиваемые приложения (BioApps), являющиеся частью системы, позволили проводить непрерывную обработку образцов – от визуализации до автоматического отображения результатов.

МЕТОДЫ

Культивирование клеток и их обработка исследуемыми соединениями

Клеточная линия U-2 OS, содержащая маркер клеточного цикла G1S (G1S-CCPM), культивировалась в присутствии генетицина для поддержания экспрессии стабильно трансфицированного EGFP-меченого репортерного белка. Изменения в нуклео-цитоплазматической локализации и интенсивности флуоресценции G1S-CCPM репортерного белка могут использоваться для определения количества клеток в G1-фазе клеточного цикла [1, 2]. Перед посевом в планшеты клетки G1S-CCPM трипсинизировались в колбе в течение 5 мин при температуре 37 °C и 5% CO_2. После центрифугирования и повторного суспендирования в питательной среде анализировалась аликвота клеток на предметном стекле Cytell™ Quick Count Slide с использованием соответствующего приложения Quick Count BioApp и реагентов Cytell™ Quick Count/Viability для быстрого подсчета / определения жизнеспособности клеток. На основании результатов анализа делался посев клеток концентрацией 6000 жизнеспособных клеток на лунку в черные 96-луночные микропланшеты (Greiner Bio-One), содержащие 150 мкл среды D-MEM на лунку, обогащенную 10% сывороткой и 1% пенициллин-стрептомицином (Life Technologies).

После инкубирования в течение ночи в каждую лунку добавляли по 50 мкл 4-кратного стокового раствора исследуемых препаратов в разных концентрациях. Для обработки засеянных в 96-луночные микропланшеты клеток были использованы четыре хорошо изученных соединения с различным механизмом действия. Оценка воздействия соединений на клетки проводилась после инкубации в течение ночи путем определения жизнеспособности (комплект Cytell™ Cell Viability), содержания ДНК (комплект Cytell™ Cell Cycle), интенсивности внутриклеточной флуоресценции и локализации EGFP-меченого репортера (клеточная линия G1S-CCPM), а также статуса фосфорилирования гистона H3 [3].

Были выбраны следующие четыре соединения (все от компании Sigma-Aldrich): препятствующий полимеризации микротрубочек нокодазол[1], блокирующий митоз; ингибитор синтеза ДНК мимозин, ингибирующий позднее прохождение клетки по G1-фазе; ингибитор гистондеацетилазы энтиностат[1] [4], отличающийся множеством эффектов, среди которых ингибирование синтеза ДНК и индукция апоптоза; и амиодарон[1], соединение положительного контроля, которое, согласно предыдущим исследованиям, в высоких дозах цитотоксично для клеток G1S-CCPM.

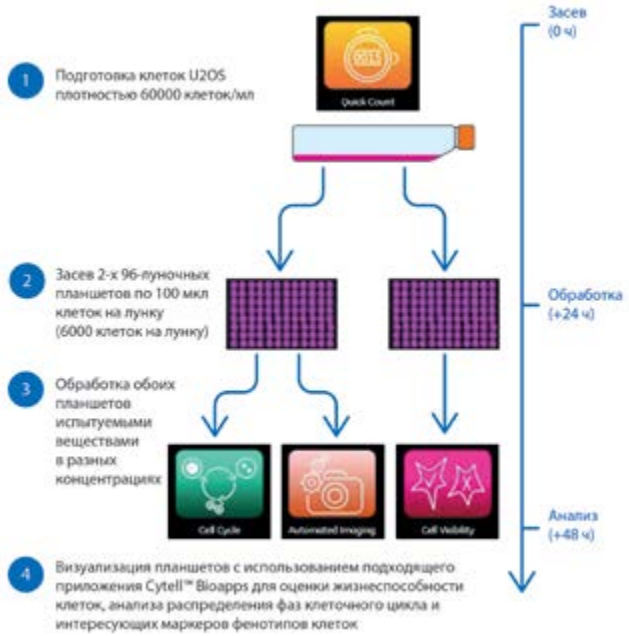


Рисунок 1. Обзор экспериментального рабочего процесса. С помощью приложения Quick Count BioApp подсчитывалось количество клеток, потом происходил засев клеток в два реплицированных планшета и обработка клеток испытуемым соединением в течение 24 ч, а затем проводился анализ с использованием комплекта Cytell™ Cell Cycle или комплекта Cytell™ Cell Viability. Визуализация и анализ осуществлялись с помощью соответствующего приложения BioApp

Анализ жизнеспособности клеток

После 24 ч инкубирования с соединением в каждую лунку добавлялись реагенты комплекта Cytell™ Cell Viability, а затем планшет снова помещали в инкубатор на 45 мин. Комплект содержит проникающие и не проникающие через мембрану ядерные красители для определения общего количества клеток и количества мертвых клеток соответственно. После инкубирования клетки визуализировали и анализировали за один прием с помощью системы Cytell™ и приложения Cytell™ Cell Viability BioApp.

[1]Нокодазол, энтиностат, амиодарон – это очень опасные вещества, обращаться с которыми необходимо в соответствии с паспортом безопасности вещества (MSDS) и локальными инструкциями по технике безопасности в лаборатории.

Установление фазы клеточного цикла путем определения содержания ДНК

Содержание ДНК в ядре клетки предсказуемо меняется в течение клеточного цикла: клетки в фазах G2 и M имеют в два раза больше ДНК, чем клетки в фазе G1, а клетки в S-фазе, претерпевающие синтез ДНК, имеют промежуточное количество.

Действие комплекта Cytell™ Cell Cycle основано на данном явлении: проникающий через мембрану ядерный краситель позволяет на основании интенсивности флуоресцентного окрашивания области ядра определить фазу клеточного цикла живых или фиксированных клеток. Перед анализом с использованием системы Cytell™ ядерный краситель реагент G добавляли к клеткам в итоговой концентрации 1×, окрашивание проводилось в течение 45 мин при температуре 37 °C и 5% CO_2. Захват изображения, анализ и результаты визуализации проводились как однопроцессная операция с применением приложения Cell Cycle BioApp (рисунок 2).

Окрашивание фосфогистона H3

Фосфорилирование гистона H3 – это хорошо изученный маркер митоза [3]. Для обнаружения фосфорилированных гистонов H3 фиксированные и пермеабилизированные клетки окрашивались антифосфогистонными H3 антителами и детектировались с использованием вторичных антител Alexa Fluor™ 647 (Life Technologies). Образцы визуализировались с применением приложения Cytell™ Automated Imaging BioApp и анализировались с использованием исследовательского программного обеспечения IN Cell Investigator, поставляемого компанией GE Healthcare вместе с системой анализа клеток IN Cell.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Жизнеспособность клеток

Анализ жизнеспособности клеток применяется для выявления различий между соединениями, ингибирующими рост клеток и тем самым вызывающими цитотоксичность. Все соединения в данном исследовании вызывали уменьшение абсолютного количества клеток, но только амиодарон и в меньшей степени энтиностат вызывали явную цитотоксичность, определяемую по процентному содержанию мертвых клеток, обнаруженных в каждом конкретном случае (рисунок 4). Снижение количества клеток, наблюдаемое при обработке мимозином и нокодазолом, предположительно связано с блокадой цитокинеза в течение 24 ч инкубирования, учитывая, что в этот период не было уменьшения числа клеток, связанного с их гибелью.

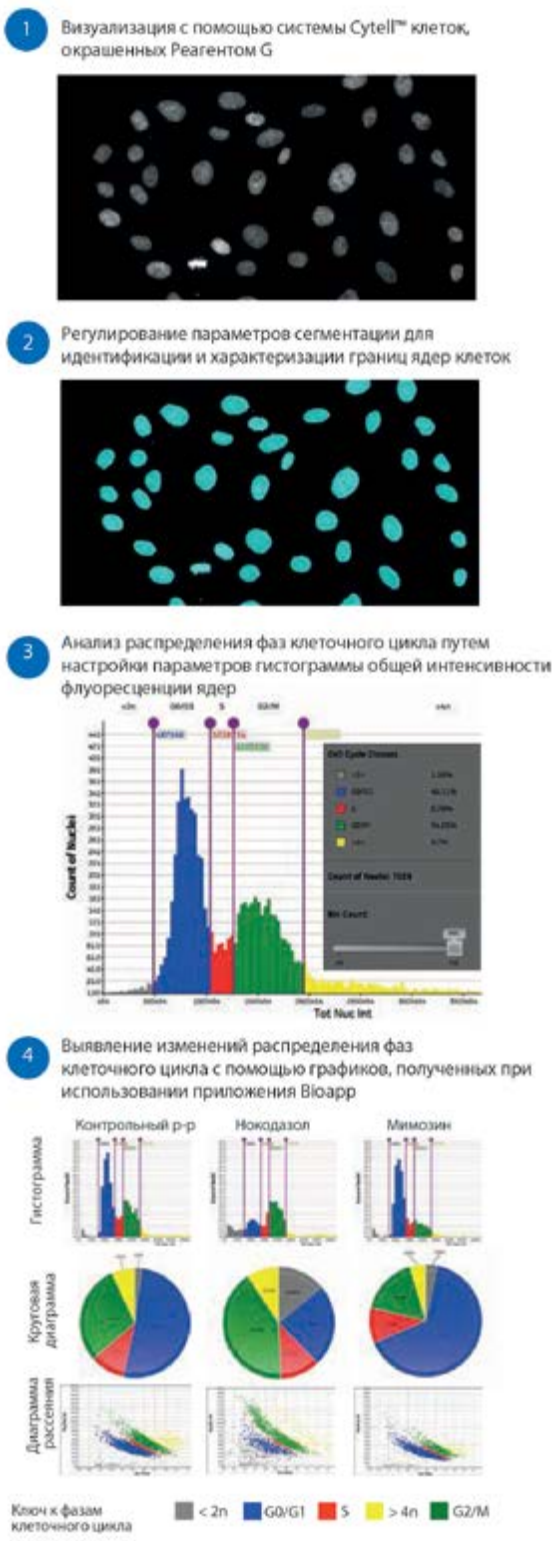


Рисунок 2. Краткое изложение принципа действия Cell Cycle BioApp. Данные представлены в виде графиков для упрощения идентификации изменений в распределении фаз клеточного цикла, вызванных воздействием испытуемых веществ. В секторную диаграмму можно добавлять дополнительные факторы путем выбора опций, позволяющих установить размер секторной диаграммы пропорционально количеству анализируемых клеток. При необходимости данные можно отобразить в виде аналитических таблиц по лункам и клеткам, что позволит проводить дополнительную обработку данных или построение графиков

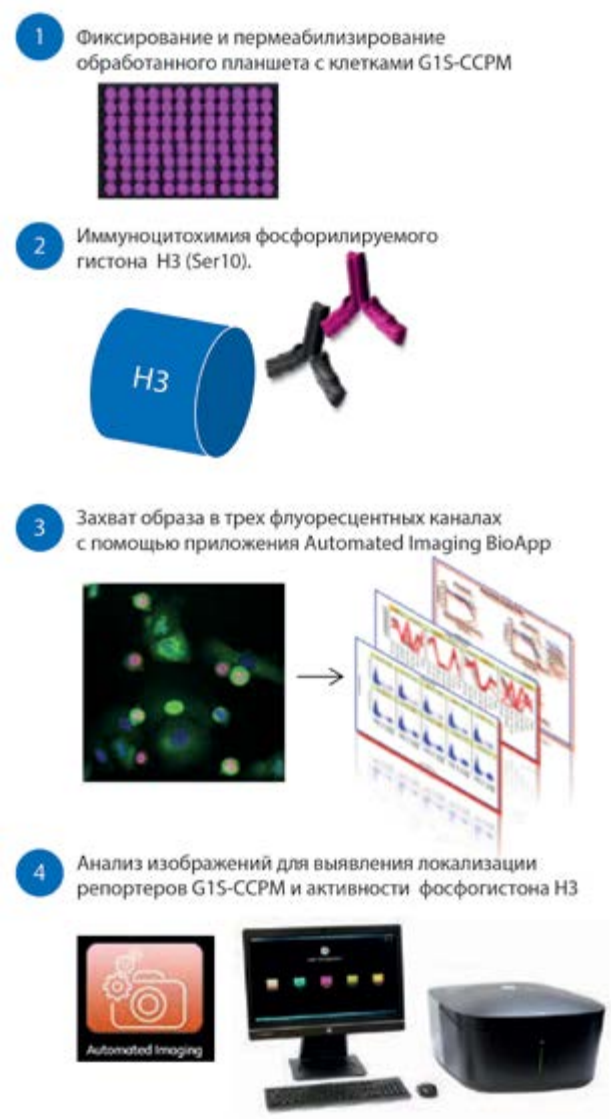


Рисунок 3. **Процесс работы при использовании приложения Automated Imaging BioApp для захвата многоканального изображения для дальнейшего анализа**

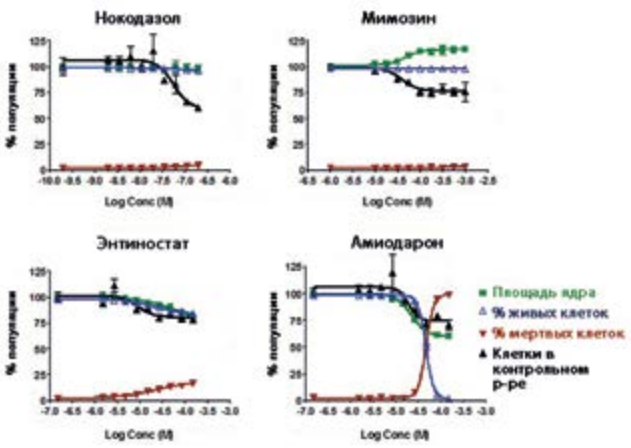


Рисунок 4. **Анализ жизнеспособности клеток после 24 ч инкубации. Наличие таких морфологических параметров ядра, как его площадь, обеспечивают основу для дальнейшего подсчета количества клеток и оценки их жизнеспособности**

Оценка клеточного цикла путем определения содержания ДНК

В данном анализе распределение фаз клеточного цикла определялось с помощью фиксированных клеток, окрашенных при использовании комплекта Cytell™ Cell Cycle. Как показано на рисунке 5, нокодазол индуцировал уменьшение популяции клеток G0/G1 и пропорциональное увеличение клеток G2/M. Это происходило наряду с общим уменьшением количества клеток. И наоборот, мимозин вызывал пропорциональное снижение количества клеток G2/M и увеличение количества клеток в G0/G1. Принимая во внимание наблюдаемое при анализе жизнеспособности клеток увеличение площади ядра (рисунок 4), можно сделать вывод о том, что связанные с цитокинезом изменения морфологии ядра, например увеличение его площади, не обязательно указывают на увеличение общего содержания ДНК в клетке. Энтиностат индуцирует похожие, но менее выраженные изменения количества клеток по сравнению с нокодазолом. В дополнение при более высоких концентрациях происходит изменение отношения клеток в фазе G1 к G2/M, поскольку соединение становится более цитотоксичным, как видно из анализа жизнеспособности клеток (рисунок 4). Изменения параметров клеточного цикла, вызванные обработкой амиодароном, заметны только при значительно более цитотоксичных концентрациях, что подтверждает предположение о том, что эти изменения не являются специфическими для блокады фазы клеточного цикла.

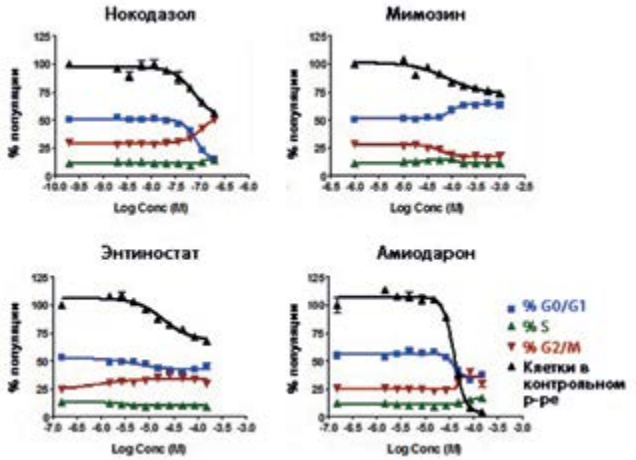


Рисунок 5. **Распределение фаз клеточного цикла, определяемое с помощью приложения Cytell™ Cell Cycle BioApp после инкубации с испытуемым соединением в течение 24 ч**

Локализация репортера G1S-CCPM и окрашивание фосфогистона H3

Для дальнейшего получения более подробной информации о природе изменений клеточного цикла, вызванных воздействием соединений, экспрессиро-

ванные с EGFP-меченым G1S-CCPM репортером клетки были окрашены на присутствие фосфорилируемых форм гистона H3. Нокодазол индуцировал явное увеличение доли окрашивания фосфогистона H3 в общем количестве клеточной популяции, что является индикатором митотического блока (рисунок 6 и 7). По сравнению с необработанным контрольным образцом мимозин не продемонстрировал каких-либо изменений в локализации G1S-CCPM (ядерно-цитоплазматическое отношение, Nuc:Cyt), что скорее указывает не на подавление клеток G1, а на отсутствие перехода в фазу G2/M, связанное с ингибированием фазы S (синтез ДНК). Энтиностат показал заметное увеличение отношения G1S-CCPM Nuc:Cyt, из которого можно сделать вывод о высокой доли клеток в фазе G1 по сравнению с необработанным контрольным образцом (рисунки 6 и 8). Амиодарон вызвал значительное снижение количества клеток, связанное цитотоксичностью при высоких концентрациях; существенное увеличение отношения G1S-CCPM Nuc:Cyt присутствует только при сравнительно высоких концентрациях, где ожидается острая цитотоксичность.

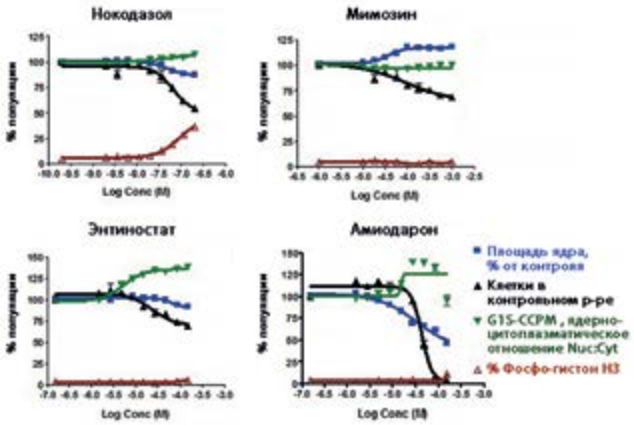


Рисунок 6. **Диаграмма, показывающая дозозависимый эффект испытуемых веществ на площадь ядра, количество клеток, локализацию G1S-CCPM и фосфогистон H3**

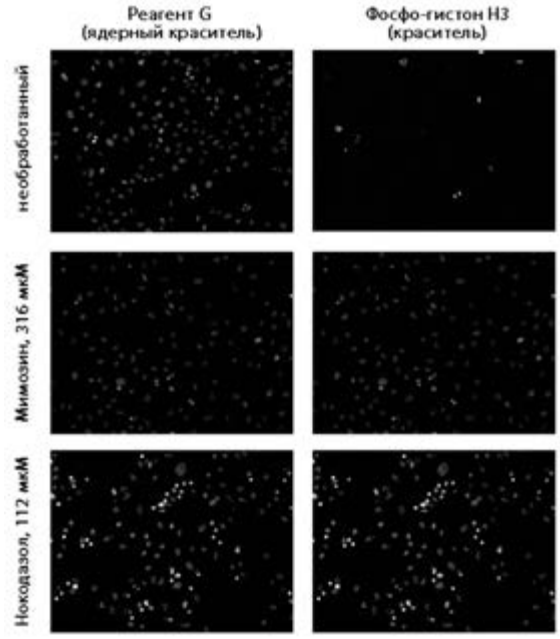


Рисунок 7. **Окрашивание фосфогистона H3 обнаруживает, что обработка нокодазолом вызывает увеличение количества клеток, блокированных в митозе, а при обработке мимозином происходит потеря интенсивности окрашивания положительных клеток фосфогистона H3.**

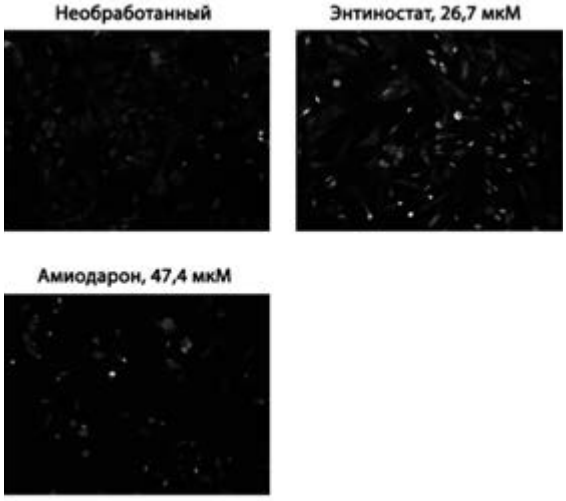


Рисунок 8. **Полученные при использовании Cytell™ изображения репортера G1S-CCPM, показывающие увеличение его ядерной локализации в результате обработки энтиностатом. Обработка амиодароном также вызывает увеличение ядерной локализации G1S, но с сопутствующей цитотоксичностью, которая отличает природу ответной реакции на амиодарон от энтиностата**

Анализ характеристик клеточной реакции

Несмотря на то, что многопараметрический анализ дает возможность получить больший объем данных, его бывает сложно визуализировать и интерпретировать как единое целое. Для решения данной проблемы можно графически отобразить полученные данные в виде тепловых карт или профилей (рисунок 9), одновременно визуализируя множество индикаторных параметров. Представленная данным способом многопараметрическая информация обеспечит получение более подробных данных для последующего формирования выводов. В частности, ингибитор гистондеацетилазы 1 (HDAC1) энтиностат вызывает явную блокаду G2/M, в том числе увеличение ядерной локализации репортера G1S-CCPM, что указывает на блокаду G1. Несмотря на кажущуюся противоречивость результатов, они сопоставимы с гипотезой, что энтиностат вызывает скорее ингибирование инициации синтеза ДНК, чем прямое ингибирование синтеза ДНК. Как видно на мимозине, известном ингибиторе синтеза ДНК, вещества, вызывающие прямое ингибирование синтеза ДНК, являются причино снижения доли клеток в фазе G2/M. Кривая дозовой зависимости энтиностата для клеточного цикла (рисунок 5) также имеет множество фаз. Сначала изменения в распре-

делении фаз клеточного цикла очевидны, но при более высоких концентрациях наблюдается увеличение гибели клеток, видимой в анализе жизнеспособности клеток (рисунок 4).

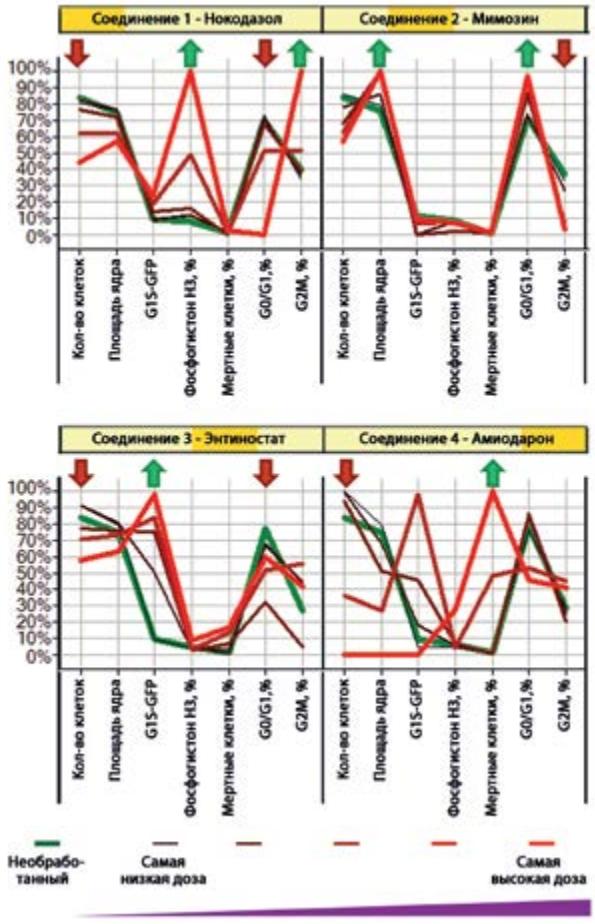


Рисунок 9. График, резюмирующий клеточную реакцию G1S-CCPM на испытуемые вещества. Стрелками выделены существенные отклонения от значений для необработанных контрольных образцов. Необработанные образцы представлены зеленой линией (-), а возрастающая доза испытуемых веществ представлена красной линией, которая в зависимости от концентрации становится толще и ярче (описано в цветовом обозначении). Значительные изменения параметров выделены фигурными стрелками выше графика.

Умение интерпретировать степень цитотоксичности также полезно при формировании заключений относительно важности наблюдаемого отклика с учетом влияния на клеточный цикл. Амиодарон является примером лекарственного препарата, который вызывает увеличение ядерно-цитоплазматического отношения G1S-CCPM, свидетельствующего о блокаде в G1. Тем не менее с этим увеличением совпадает снижение жизнеспособности клеток, определяемое по увеличению количества мертвых клеток (рисунок 4). Из этого можно сделать вывод, что основная причина изменения отношения может быть цитотоксической, а не истинной блокадой клеточного цикла. Такая степень детализации более явно выражена при параллельном определении множества параметров для более полного описания биологической реакции. Такое многопараметрическое профилирование обеспечивает лучшую классификацию пригодных и непригодных веществ, что способствует принятию правильных решений при проведении скрининга соединений.

Больший уровень детализации клеток для выявления дополнительной информации

Полученные с помощью системы Cytell™ изображения также можно анализировать с помощью других программных платформ для анализа изображений, например ImageJ (NIH) и IN Cell Investigator. В данном исследовании было использовано программное обеспечение IN Cell Investigator, что обусловлено его встроенными ссылками на инструменты визуализации данных. Данные по количеству клеток графически отображены с использованием аналитического метода Spotfire (полученного путем применения программного обеспечения IN Cell Investigator), который допускает визуализацию разрозненных субпопуляций внутри всей клеточной популяции. Повышение концентрации нокодазола увеличивает отношение позитивных ядер фосфогистона H3 (рисунок 10), моделируя блокаду митоза. Характерной особенностью необработанных клеток является популяция ядер с довольно низкой интенсивностью окрашивания фосфогистона Ser 10, которая все еще выше средней фоновой интенсивности для пробы. Эта популяция также показывает низкое отношение Nuc:Cyt G1S-CCPM, сопоставимое с клетками, находящимися в фазе G2. Из этого можно сделать вывод, что, вероятно, эта популяция включает клетки, входящие в профазу, которые инициируют процесс конденсации ДНК в готовых к митотическому делению хроматидах. Интересно заметить, что обработка энтиностатом приводит к снижению этой популяции (красные стрелки, рисунок 10), а также вызывает видоизмененное распределение более интенсивно окрашенных популяций положительных ядер фосфогистона (зеленые прямоугольники, рисунок 10). Это показывает, что ингибирование энтиностатом HDAC может привести к изменению уровня фосфорилирования гистона по отношению к фазе клеточного цикла. Не наблюдалось никакого влияния амиодарона на субцитотоксичных уровнях концентрации на дистрибуцию клеток. Данные, представленные на рисунке 10, демонстрируют потенциальное преимущество использования многопараметрического анализа данных на уровне одиночных клеток для визуализации деталей, которые могут быть не замечены при использовании более традиционных подходов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система визуализации клеток Cytell™ использовалась для характеризации четырех веществ, имеющих различные механизмы действия на клеточный цикл. Объединив данные по оценке жизнеспособности клеток и результаты анализа распределения фаз клеточного цикла с использованием нескольких неза-

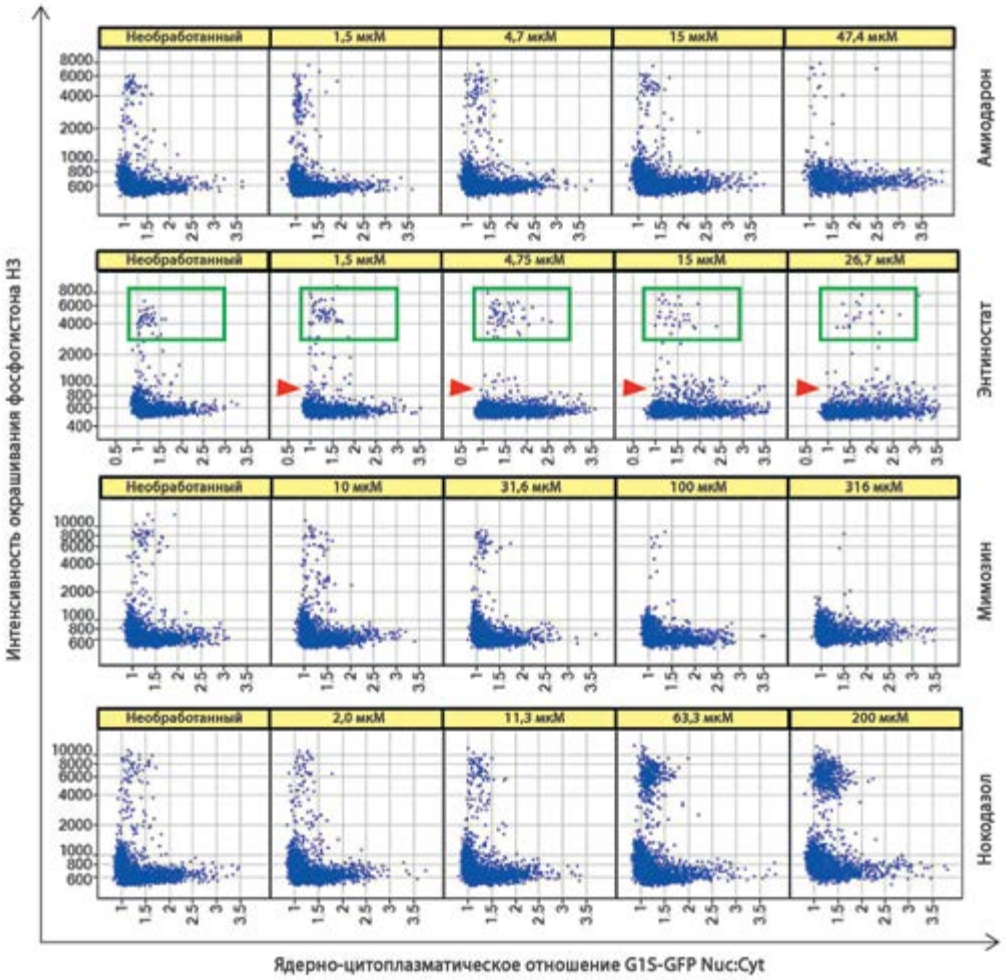


Рисунок 10. Диаграмма разброса клеток, сравнивающая уровни интенсивности окрашивания фосфогистона с отношением G1S-CCPM Nuc:Cyt. Популяция положительных ядер фосфогистона H3 отчетливо возрастает при увеличении дозы нокодазола, в то время как изменения в распределении окрашенных ядер, обработанных возрастающей дозой энтиностата, были едва заметны. Они выделены снижением популяции фосфогистона H3(▶) и изменением в распределении фосфогистона H3 с учетом отношения G1S-CCPM Nuc:Cyt (эквивалентная площадь заключена в зеленые прямоугольники для выделения изменения распределения □)

висимых маркеров, можно получить комплексную информацию о механизме действия вещества. Например, подострая концентрация энтиностата вызывает дозозависимое увеличение доли клеток фазы G2/M клеточного цикла. Тем не менее при высоких концентрациях заметна обратная тенденция, которая соответствует процентному увеличению количества мертвых клеток. Таким образом, увеличение маркеров для оценки жизнеспособности клеток и контрольных точек для определения завершения каждой фазы клеточного цикла позволяет более глубоко изучать сложные клеточные механизмы. Детально описанный в данной статье рабочий процесс, проводимый в течение трех дней одним оператором, иллюстрирует целесообразность использования комплексного решения, обеспечивающего одновременный многопараметрический анализ и клеточную визуализацию сверхвысокого разрешения. Проведение этого процесса при использовании других подходов, например проточной цитометрии, потребовало бы больше этапов обработки и технических специалистов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gu. Jinming et al. Cell cycle-dependent regulation of a human DNA helicase that Localizes in DNA damage foci. Mol. Biol. Cell 15(7), 3320–3332 (2004).
2. S. Stubbs et al. G1/S checkpoint reporting. Poster presented at the 11th Annual Conference of the Society for Biomolecular Screening, Geneva, Switzerland (11–15 September 2005). https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314742967685/litdocG1Scheckpoint_SBS2005_20110831014201.pdf
3. C. Prigent, S. Dimitrov. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? J. Cell Sci. 116, 3677–3685 (2003).
4. J. Jaboin et al. MS-27-275, an Inhibitor of histone deacetylase, has marked *in vitro* and *in vivo* antitumor activity against pediatric solid tumors. Cancer Research 62, 6108–6115 (2002).

ПЕРИОДИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК CHO С ПОДПИТКОЙ В НАСТОЛЬНОМ БИОРЕАКТОРЕ MINIFORS ОТ INFORS HT

Материал предоставлен компанией INFORS HT

ВВЕДЕНИЕ

Использование настольных биореакторов обеспечивает простую оптимизацию разрабатываемого процесса культивирования животных клеток. Описанный в статье пример культивирования клеток CHO (Chinese Hamster Ovary) в настольном биореакторе Minifors Cell (INFORS HT, CH-Bottmingen) показывает преимущества процесса периодического культивирования с подпиткой для оптимизации производства SEAP.

В биотехнологии клеточная линия CHO используется довольно часто. В данной экспериментальной работе, проводимой группой профессора M. Фуссэнэггера (Dr. M. Fussenegger) Швейцарской высшей технической школы (ETH, Цюрих), использовались клоны CHO XM-111. Эти клоны были трансфицированы с экспрессионным вектором, кодирующим ген рекомбинантного белка SEAP (выделенная щелочная фосфатаза), и контролировались тетрациклином с использованием промотора PhCMV-1. Использование экспрессионных векторов позволяет проводить произвольную экспрессию двух генов посредством промотора. Это, в свою очередь, позволяет производить SEAP в виде процесса, состоящего из непродуктивной фазы роста, за которой следует ингибированная пролиферацией производственная фаза, основанная на замене сред без тетрациклина.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БИОРЕАКТОРА MINIFORS CELL

- Емкость для культивирования объемом 2,5 л (доступна емкость объемом 5 л).
- Обработка газообразным O_2, воздухом и CO_2.
- Охладитель отработанных газов, стандартная комплектация.
- 4 перистальтических насоса с автоклавируемыми головками.
- Температурный контроль посредством термоблока для нагрева и охлаждения.
- Контроль pO_2 и pH.
- Регистрация текущих параметров с помощью программного обеспечения Iris.
- Система пробоотбора, стандартная комплектация.
- Опциональный контроль уровня пены.
- Доступны различные разбрызгиватели и импеллеры.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Процесс производства SEAP проходил в течение нескольких дней, для культивирования клеток CHO XM-111 использовался биореактор Minifors Cell объемом 2,5 л (INFORS HT, CH-Bottmingen).

a) Среда

В фазе роста клеток CHO использовали бессывороточную и безбелковую среду HP-1 (Cell Culture Technologies GmbH), а в производственной фазе использовали среду HP-5. Питательная среда HP-1 была обогащена 2 г/л Pluronic F-68 и 2,5 г/л тетрациклином. В среду HP-5 был добавлен 2 г/л Pluronic F-68.

b) Настройка параметров Minifors Cell

Для обеспечения оптимальных условий роста поддерживалась температура 37 °C. На четвертый день для производства белков SEAP температуру снижали до 30 °C. Для регулирования значений pO_2 на уровне 50% проводилась аэрация газа со скоростью до 0,03 vvm. Дополнительно в свободное пространство над жидкостью подавался воздух со скоростью 0,3 vvm. Значение pH 7,2 регулировалось с помощью дополнительной подачи CO_2 через разбрызгиватель. Оптимальное распределение взвеси клеток было достигнуто при скорости смешивания 100 об/мин.

Рисунок 1. Биореактор Minifors Cell

ПЕРИОДИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ С ПОДПИТКОЙ

Для получения более высокой концентрации клеток использовали метод периодического культивирования с подпиткой. В культуру регулярно добавлялась свежая среда, что предотвращало нехватку питательных веществ.

Начальный объем культуры CHO в биореакторе Minifors Cell составлял 600 мл, подпитка культуры проводилась 300 мл среды HP-1 в течение первого дня (30 ч), а также во второй день (46 ч). Дополнительно во второй день (54 ч) проводилась подпитка 400 мл среды.

Замена питательной среды HP-1 на HP-5 для производственной фазы проводилась на третий день (65 ч). Для замедления пролиферации в этот момент дополнительно снижали температуру с 37 °C до 30 °C.

АНАЛИЗ

a) Параметры анализа

Концентрацию жизнеспособных клеток ежедневно определяли с использованием прибора NucleoCounter YC 100 (Chemometec). Анализ роста и производства субстратов выполняли при помощи анализатора Bioprofile 100 Plus (Nova Biomedical).

b) Формулы

Для расчета максимальной скорости роста μ_{max} и времени удвоения t_d использовали следующую формулу:

$$\mu_{max} = \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{(t_2 - t_1)}[h^{-1}]; \quad t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}}[h].$$

Активность SEAP анализируют фотометрически по увеличению наклона перехода субстрата. Активность SEAP в единицу времени определяли по следующему уравнению:

$$SEAP\ \ Activity = \frac{\Delta_{405nm}/\min}{\varepsilon \cdot d \cdot V} = 2{,}4 \cdot \frac{\Delta A_{405nm}}{\min},$$

где x – концентрация клеток на мл; T – длительность процесса $\Delta A_{405нм}$ – абсорбция при 405 нм; ε – коэффициент оптической плотности; *V* – объем образца; *d* – диаметр камеры.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оптимизации производства SEAP в клетках CHO XM-111 проводилось периодическое культивирование с подпиткой с использованием биореактора Multifors Cell. Во время культивирования клеток CHO XM-111 ежедневно отбирали образцы для определения концентрации клеток, потребления субстрата и производства/активности белка SEAP.

В первый день концентрация клеток увеличивалась от концентрации инокулята $5{,}1\times10^5$ клеток/мл до $1{,}1\times10^6$ клеток/мл. На третий день до момента замены среды концентрация клеток увеличивалась до $2{,}55\times10^6$ клеток/мл. После замены среды на пятый день была достигнута максимальная концентрация клеток $3{,}15\times10^6$ клеток/мл. После этого начиналась фаза уменьшения. На момент замены среды жизнеспособность клеток снизилась с 99,2% до 94,7%. Культивирование клеток продолжалось до уровня жизнеспособности 18,2% и концентрации $3{,}9\times10^5$ клеток/мл (рисунок 2).

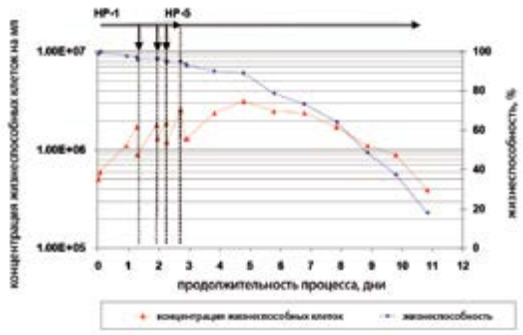


Рисунок 2. Концентрация и жизнеспособность клеток

Для расчета максимальной скорости роста μ_{max} и времени удвоения t_d проводился анализ во время фазы роста между 54 ч (2-й день) и 65 ч (3-й день). Была определена скорость роста 0,040 в час и время удвоения 17,43 ч.

Концентрации глюкозы и глутамина показаны на рисунке 3. Оба субстрата выполняли функцию источников энергии для клеток CHO и потреблялись во время роста. При уменьшении концентраций глюкозы и глутамина происходил рост концентраций образующихся лактата и аммиака. Данные показывают, что способ подпитки позволил оптимизировать наиболее важные метаболические параметры для культивирования клеток CHO в биореакторе Minifors Cell объемом 2,5 л (рисунок 3).

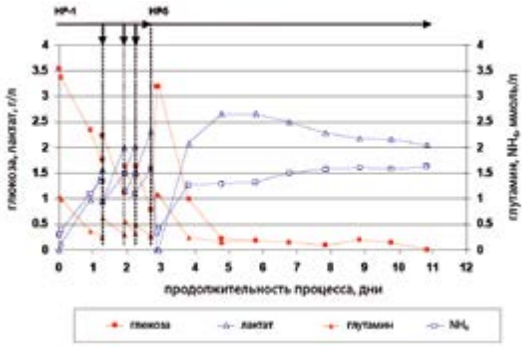


Рисунок 3. Сравнение концентраций глюкозы и глутамина с концентрациями аммиака и лактата

После перехода на третий день на среду HP-5 началось образование SEAP, которое достигло максимальной активности 12,36 ед/мл на 11-й день (рисунок 4).

Регистрация параметров в режиме реального времени с помощью программного обеспечения Iris обеспечила мониторинг таких контрольных параметров, как pH и pO_2. Мониторинг ключевых параметров позволяет контролировать весь процесс культивирования и показывает все изменения значений во время процесса. Возможные отклонения измерений температуры и pO_2 могут быть вызваны добавлением свежей среды (подпитки) (рисунок 5).

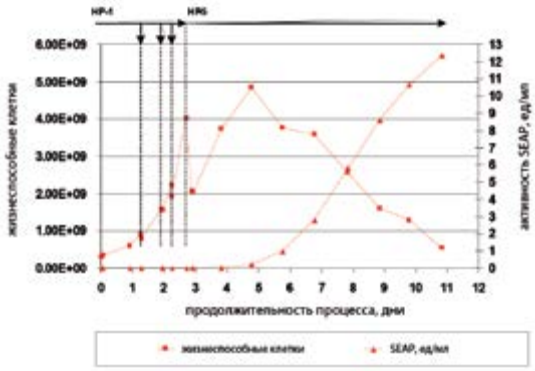


Рисунок 4. Активность SEAP

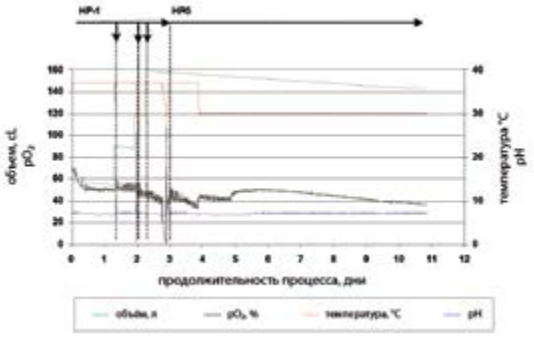


Рисунок 5. Объем, температура, значения pH и pO_2 по отношению к продолжительности процесса в днях

Значения pO_2 регулировались путем обработки культур смесью двух газов, воздуха и кислорода, и поддерживались на уровне 40% и 50%, а параллельная подача CO_2 обеспечивала стабильный pH 7,2. Таким образом, поддерживались хорошо адаптированные условия роста культивируемых клеток и последующего производства SEAP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Периодическое культивирование с подпиткой клеток CHO XM-111 проводилось в течение 11 дней.

На пятый день культивирования была достигнута максимальная концентрация клеток $3{,}15\times10^6$ клеток/мл с 90% жизнеспособностью (общее количество клеток $4{,}85\times10^9$).

Переход на другую питательную среду и изменение температуры позволяет оптимизировать производство SEAP.

Активность SEAP наблюдалась на 11-й день при 12,36 единицы на мл.

Регистрация наиболее важных метаболических параметров (pH, pO_2, скорость мешалки и температуры) позволяет контролировать процесс культивирования путем оптимизации параметров в качестве стандартной возможности.

ОЦЕНКА СЛЕДОВЫХ КОЛИЧЕСТВ МЕТАЛЛОВ В ВОДЕ, ПОЛУЧЕННОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ ВОДОПОДГОТОВКИ THERMO™ SCIENTIFIC™ BARNSTEAD™ GENPURE™ UV/UF-TOC

АВТОР

Дэвид Филлипс,

доктор наук, Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC

Джули Фостер,

доктор наук, Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC

АННОТАЦИЯ

Лабораторная вода, очищенная с помощью системы очистки воды Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™ UV/UF-TOC, была проанализирована на содержание 40 элементов М. Реутц и Р. Брайтмайер в Analytik für Technik und Umwelt GmbH, Herrenberg, Germany.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективная многократная очистка особо важна для получения ультрачистой воды (воды типа 1) со следовыми концентрациями ионов. Такая вода необходима для многих аналитических процедур. Хотя ультрачистая вода, удельное сопротивление которой составляет 18,2 МОм·см, теоретически не содержит ионов, она все же может содержать их концентрации на уровне частей на триллион (ч./трлн). Для многих научных применений данное содержание находится ниже пределов обнаружения и не оказывает влияние на результаты. Поскольку современные аналитические приборы продолжают отодвигать границы сверхнизкой чувствительности, делая возможным элементный анализ образцов на уровне концентраций частей на триллион, необходимо соблюдать предельную осторожность, чтобы образец не был загрязнен во время подготовки, хранения или использования.

Система водоподготовки для получения воды типа 1 в соответствии с ASTM [1] предназначена исключительно для получения воды, удельное сопротивление которой составляет 18,0 МОм·см и которая содержит <50 ч./млрд общего органического углерода (total organic carbon, TOC) согласно стандарту. Поскольку аналитические приложения становятся более чувствительными к концентрациям уровня частей на триллион ионов, системы водоподготовки продвинулись вперед в способности к удалению остаточного содержания ионов.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Для обеспечения сверхнизкого уровня ионов в ультрачистой воде, полученной с использованием Barnstead™ GenPure™, система водоподготовки применяет несколько технологий очистки, поскольку ионы могут быть попросту растворены в воде или связаны в качестве лиганда с органическими веществами в исходной воде (рисунок 1). Когда исходная вода поступает в систему, она подвергается воздействию ультрафиолетового излучения. Двухчастотная лампа (185/254 нм) будет окислять органические примеси в очищаемой воде, высвобождая присутствующие металлолиганды.

На следующем этапе очистки используется ионообменный картридж, где ионные примеси блокируются в ионообменной смоле. Картридж системы GenPure™ UV/UF-TOC применяет высококачественную ионообменную смолу (полупроводниковая чистота) для эффективного и стабильного получения ультрачистой воды с удельным сопротивлением 18,2 МОм·см и содержанием TOC < 5 частей на миллиард.

Кроме того, смачиваемые части системы очистки воды изготовлены с использованием особо чистых материалов, включая чистый полипропилен и особо чистые фторполимерные компоненты с целью минимизации загрязнения со стороны самой системы.

Вода, полученная с использованием системы GenPure™ UV/UF-TOC, подверглась анализу с помощью утвержденных техник анализа на микроэлементы в условиях чистых помещений. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS) и ионная хроматография (IC) использовались для анализа воды на содержание микроэлементов и ионных примесей. Выполнены анализы воды на содержание 40 разных ионов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В систему GenPure™ UV/UF-TOC была подана деионизированная (DI) вода в условиях чистого помещения. Подача воды к системе GenPure™ осуществлялась из центральной системы водоснабжения лаборатории и превышала минимальные требования к исходной воде, описанные в инструкциях по эксплуатации [2] системы GenPure™. Перед отбором воды для анализа система промывалась деионизированной водой в течение двух дней. Содержание анионов и катионов было проанализировано с помощью ионного хроматографа Thermo Scientific™ Dionex™, модель IC 20. Микроэлементы металлов были проанализированы с помощью Agilent™, модель ICP-MS 7500cs. По причине взаимодействия при использовании ICP-MS анализ на двуокись кремния выполнен с помощью PerkinElmer™, модель GF-AAS 3030.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В таблицах 1 и 3 представлены данные о концентрациях ионов, обнаруженных в воде, очищенной с использованием системы водоподготовки GenPure™ UV/UF-TOC. Из 40 проанализированных микроэлементов содержание 37 находилось на уровне ниже предела обнаружения системы. Три элемента – кальций, натрий и цинк – продемонстрировали повышение количества при сравнении исходной и очищенной воды. Возможно, что ультрафильтр, который представляет один из последних этапов очистки в системе, мог внести эти примеси, поскольку расположен после ионообменного картриджа, но совокупность данных не дает ответа на этот вопрос. По этой причине для чувствительных приложений рекомендуется исполь-

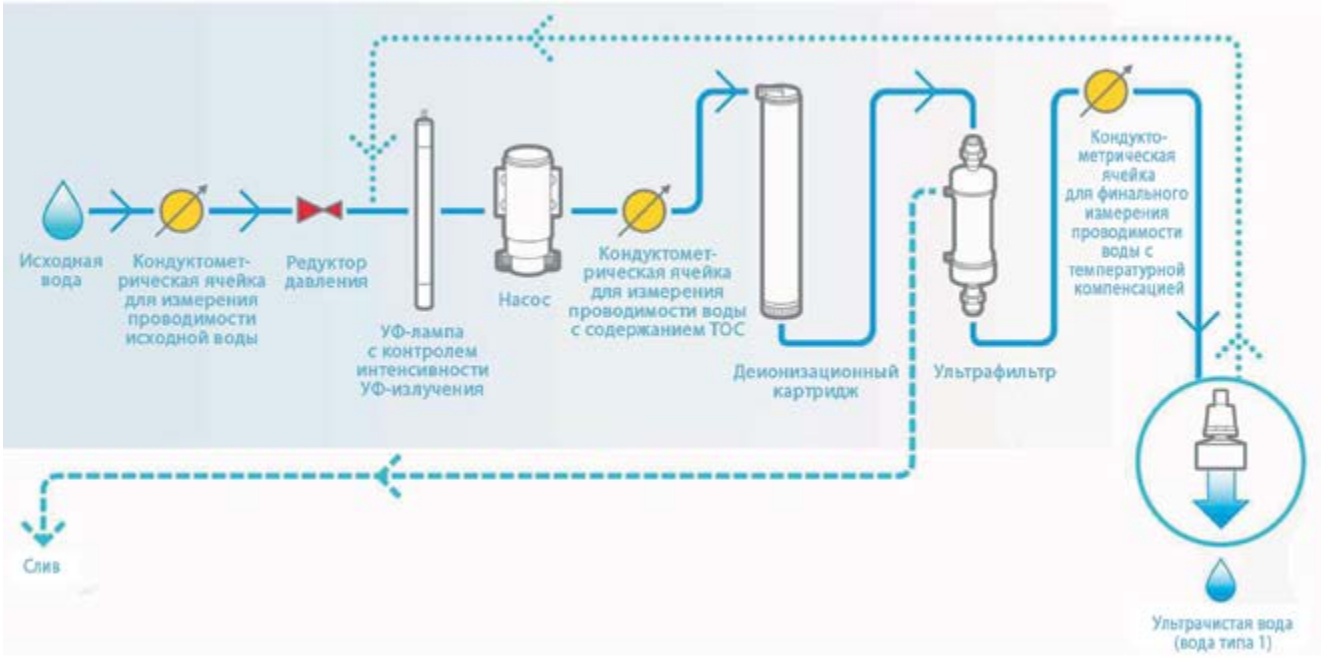


Рисунок 1. Схема технологического процесса системы водоподготовки GenPure™ UV/UF-TOC

зовать системы очистки воды, оснащенные только УФ-лампой, в то время как лабораториям, выполняющим молекулярные или клеточные биологические опыты, рекомендуется использовать системы, оборудованные УФ-лампой и ультрафильтром для удаления пирогенов и нуклеаз. Кроме того, некоторые из элементов не были представлены на обнаружимом уровне в исходной воде. Результаты определения концентраций веществ, представленных в количестве ниже определяемого уровня в исходной воде, очищенной с использованием системы водоподготовки, свидетельствуют, что система в соответствии с конфигурацией не вызывает загрязнения, но не демонстрируют, может ли система удалять эти примеси.

Таблица 1.

Анализ на содержание ионов в исходной и очищенной с помощью системы водоподготовки GenPure™ UV/UF-TOC воде с использованием ионной хроматографии

Параметр	Предел обнаружения, ч./трлн	Результат, ч./трлн.
Аммоний NH_4^+	10	< 10
Фториды F^-	5	< 5
Хлориды Cl^-	5	<5
Бромиды Br^-	5	<5
Нитриты NO_2^-	5	<5
Нитраты NO_3^-	5	<5
Фосфаты PO_4^{3-}	20	<20
Сульфаты SO_4^{2-}	10	<10

Таблица 2.

Определение уровня TOC в исходной и очищенной с помощью системы GenPure™ UV/UF-TOC воде с использованием ICP-MS

Параметр	Предел обнаружения, ч./трлн	Результат, ч./трлн	
		Исходная вода	Очищенная вода
TOC	0,1	6,5	2,0

В таблице 2 представлено содержание TOC в очищенной воде, которое находится в пределах технических характеристик системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стандартные технические требования к воде лабораторного назначения, ASTM D1193-06. Государственный стандарт для метода проведения анализа № 7916.
2. Инструкции по эксплуатации для системы очистки воды Thermo Scientific™ Barnstead™ GenPure™, Thermo Fisher Scientific, Niederelbert, Germany (Германия).

Таблица 3.

Результаты анализа исходной и очищенной с помощью системы Barnstead GenPure UV/UF-TOC воды

Микроэлемент	Предел обнаружения, ч./трлн	Результат, ч./трлн		Методы
		Исходная вода	Очищенная вода	
Алюминий, Al	0,3	< 0,3	< 0,3	ICP-MS
Сурьма, Sb	0,5	< 0,5	< 0,5	ICP-MS
Мышьяк, As	0,5	< 0,5	< 0,5	ICP-MS
Барий, Ba	0,1	< 0,1	< 0,1	ICP-MS/IC
Висмут, Bi	0,5	0,6	< 0,5	ICP-MS
Бор, B	20	560	< 20	ICP-MS
Кадмий, Cd	0,5	< 0,5	< 0,5	ICP-MS
Кальций, Ca	1	< 1	2,8	ICP-MS/IC
Хром, Cr	0,2	0,6	< 0,2	ICP-MS
Кобальт, Co	1	1,2	< 1	ICP-MS
Медь, Cu	0,5	< 0,5	< 0,5	ICP-MS
Железо, Fe	0,5	2,4	< 0,5	ICP-MS
Свинец, Pb	0,2	2,5	< 0,2	ICP-MS
Литий, Li	0,1	0,2	< 0,1	ICP-MS/IC
Магний, Mg	0,1	0,2	< 0,1	ICP-MS/IC
Марганец, Mn	0,5	2,8	< 0,5	ICP-MS
Молибден, Mo	0,2	0,6	< 0,2	ICP-MS
Никель, Ni	0,2	0,7	< 0,2	ICP-MS
Палладий, Pd	0,2	< 0,2	< 0,2	ICP-MS
Платина, Pt	1	< 1	< 1	ICP-MS
Калий, K	0,5	1,0	< 0,5	ICP-MS/IC
Кремний, Si	200	Не определен	< 200	GF-AAS
Серебро, Ag	0,2	< 0,2	< 0,2	ICP-MS
Натрий, Na	0,1	0,3	0,6	ICP-MS/IC
Стронций, Sr	0,2	< 0,2	< 0,2	ICP-MS/IC
Тантал, Ta	0,2	< 0,2	< 0,2	ICP-MS
Олово, Sn	1	< 1	< 1	ICP-MS
Титан, Ti	0,2	< 0,2	< 0,2	ICP-MS
Вольфрам, W	0,5	< 0,5	< 0,5	ICP-MS
Ванадий, V	0,2	< 0,2	< 0,2	ICP-MS
Цинк, Zn	0,5	1,7	17	ICP-MS
Цирконий, Zr	0,2	< 0,2	< 0,2	ICP-MS

ERWEKA®

АППАРАТ III «ПРОТОЧНАЯ ЯЧЕЙКА» (ПО ГФ XIII) В КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА И РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

АВТОР

А.С. Кузнецов,
продакт-менеджер
ГК «Фармконтракт»

ВВЕДЕНИЕ

В зависимости от физико-химических свойств твердых лекарственных форм используются различные аппараты и методы для проведения теста «Растворение». Государственная фармакопея РФ XIII издания описывает три типа аппаратов для проведения теста «Растворение»:

- Аппарат I «Вращающаяся корзинка».
- Аппарат II «Лопастная мешалка».
- Аппарат III «Проточная ячейка».

Erweka DFZ

Наиболее распространенными являются методы испытания растворимости с использованием Аппарата I «Вращающаяся корзинка» и Аппарата II «Лопастная мешалка». Однако в ряде случаев проведение теста «Растворение» с помощью первых двух Аппаратов невозможно. Так, объем среды растворения, циркулирующий в проточной ячейке, может варьироваться в широких пределах, что делает Аппарат 3 пригодным для исследования малорастворимых лекарственных средств, в то время как объем среды растворения в случае «Вращающейся корзинки» и «Лопастной мешалки» ограничен объемом сосуда для растворения – 1000 мл , максимум 2000 мл. Во-вторых, использование метода «Проточная ячейка» позволяет производить смену pH среды во время исследования, что дает возможность смоделировать продвижение по пищеварительному тракту лекарственной формы. «Проточная ячейка» особенно подходит для исследования растворения таких лекарственных форм, как таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, суппозитории, мягкие желатиновые капсулы, микрокапсулы, импланты, порошки и гранулы [1, 2]. Для лекарственных средств с отложенным высвобождением и контролируемым высвобождением «Проточная ячейка» может являться аппаратом первого выбора [2]. Кроме того, отбор проб и количественное определение для Аппарата 3 может быть автоматизировано, что особенно важно при исследовании пролонгированных лекарственных форм.

АППАРАТ 3 «ПРОТОЧНАЯ ЯЧЕЙКА»

Анализируя новое издание Российской государственной фармакопеи (ГФ XIII) и рынок тестеров Аппарат 3 «Проточная ячейка», можно прийти к выводу, что всего несколько производителей имеют в своей линейке приборы, полностью отвечающие требованиям ГФ XIII. Среди них – известный немецкий производитель высококачественных фармакопейных тестеров ERWEKA, на примере которого можно детально рассмотреть различные модификации оборудования и аспекты данного метода.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Принцип работы Аппарата 3 «Проточная ячейка» заключается в постоянной циркуляции среды растворения через проточную ячейку. Форма проточной ячейки выбирается в зависимости от тестируемой лекарственной формы.

Многообразие различных ячеек определяется широким спектром возможностей для исследования целого ряда лекарственных форм. ERWEKA предлагает ячейки различных конфигураций и размеров для следующих лекарственных форм:

1. Таблетки с замедленным высвобождением (ячейки с внутренним диаметром 12 и 22,6 мм)
2. Суппозитории.
3. Порошки и грануляты.
4. Имплантаты.
5. Крема.
6. Стенты.

Для обеспечения ламинарного потока среды в ячейке для тестирования таблеток используются стеклянные шарики небольшого диаметра, которые помещаются внутрь ячейки. Для предотвращения всплывания таблеток и других лекарственных форм применяются специальные держатели.

В проточной ячейке предусмотрено различное положение образцов в зависимости от их свойств. Так, возможно проведение тестирования без «подушки» из стеклянных шариков, а для всплывающих образцов предусмотрены специальные держатели или даже фиксация образца внутри «подушки» из стеклянных шариков.

В зависимости от способа подачи среды в проточную ячейку все системы можно разделить на две группы: работающие по принципу «Открытая петля» и «Закрытая петля». Наиболее простая система «Открытая петля» позволяет работать практически с неограниченным объемом среды и со специфичными лекарственными формами типа суппозиториев и свечей, содержащими большое количество парафиновой и жировой основы.

Рисунок 1. Система «Открытая петля»

Более сложная система «Закрытая петля» подразумевает замкнутый цикл подачи среды, что позволяет проводить тестирование с очень малым количеством среды или тестировать образцы с низкой концентрацией высвобождаемого активного вещества, например гормональные импланты.

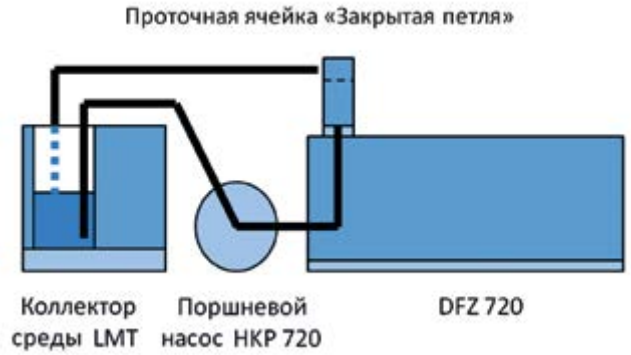


Рисунок 2. Система «Закрытая петля»

Вне зависимости от типа системы могут укомплектовываться коллектором фракций для автоматического отбора проб.

В линейке омпании ERWEKA простейшей системой, предлагаемой для проведения тестирования по методу «Проточная ячейка», является тестер **ERWEKA DFZ 720**. Система состоит из блока проточных ячеек, помещенных в водяную баню, блока управления, поршневого насоса и проточного нагревателя.

ТЕСТЕР РАСТВОРЕНИЯ ПО МЕТОДУ «ПРОТОЧНАЯ ЯЧЕЙКА» FLOW-THROUGH-CELL DFZ 720 USP4

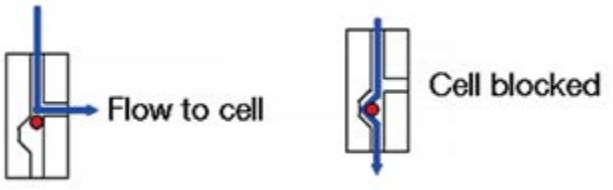
Блок проточных ячеек состоит из 7 индивидуальных ячеек, каждая из которых открывается и закрывается независимо от других.

Для термостатирования ячейки помещены в водяную баню, изготовленную из химически инертных материалов. Наличие у каждой ячейки «двойной рубашки» обеспечивает циркуляцию воды из водяной бани по контуру ячеек и тем самым необходимую точность температурного режима в каждой ячейке. Нагрев среды, которая перекачивается через ячейки, осуществляется внутренним спиральным змеевиком, что также обеспечивает точность температурного режима тестирования. Опционально возможно оснащение температурными сенсорами на входе в каждую ячейку (опция для более точного контроля). Перекачивание среды происходит благодаря 7-канальному поршневому насосу. Мощный и высокоточный насос поддерживает различные скорости потока – от 2 до 32 мл/мин с погрешностью менее 5% (одно из важнейших требований Eur.Ph и USP). В соответствии с требованиями USP рекомендуемые скорости потока составляют 4 мл/мин, 8 мл/мин и 16 мл/мин с пульсацией 120±10 тактов в минуту.

Система настолько проста в использовании, что практически не требует расходных материалов.

Проточная ячейка оборудована специальным отверстием для среды со встроенной клапанной системой, что обеспечивает защиту от повреждения ячейки высоким давлением.

Управление системой осуществляется с помощью ПК со специальным программным обеспечением Disso.net, которое полностью соответствует 21 CFR Part 11. С помощью данного ПО можно не только контролировать работу системы растворения и проведения тестирования, но и управлять процессом пробоотбора, работой насосов и т.д. По окончании тестирования либо формируется отчет в формате PDF, либо результаты экспортируется в формате XML для интеграции в LIMS-систему предприятия.



ОФЛАЙН-СИСТЕМА РАСТВОРЕНИЯ «ПРОТОЧНАЯ ЯЧЕЙКА» ERWEKA DFZ 720 «ОТКРЫТАЯ ПЕТЛЯ»

Данная система незаменима для плохо растворимых таблеток, образцы которых требуют большого объема среды для растворения. В случае стандартного тестера растворения объем среды ограничен размерами испытательных сосудов. При использовании системы растворения с открытой петлей объем среды практически неограничен, так как свежая среда постоянно прокачивается через ячейки.

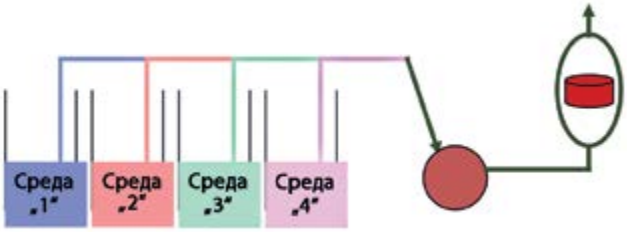
При использовании стандартного тестера растворения максимальное время тестирования ограничивается испарением среды. В USP регламентируется, что испарение среды во время теста не должно превышать 1% от номинального объема. Даже если использовать системы с низким испарением среды, это значение превышается за три дня тестирования. Использование системы с открытой петлей позволяет проводить тестирование в течение 7 дней, при этом испарение среды в проточной ячейке не превысит 1%.

Использование системы «Открытая петля» рекомендуется для анализа лекарственных средств, которые требуют смены профилей pH при проведении тестирования. Так как свежая среда постоянно прокачивается через проточную ячейку, смена сред во время теста не вызывает затруднений.

ERWEKA предлагает два типа устройств «переключения» для сред:

а) ручное: для двух типов среды;

б) автоматическое: с интерфейсом для внешнего контроля с помощью управляющего блока (SE) для переключения до 4 типов сред.



Офлайн-система «Проточная ячейка с открытой петлей» состоит из блока проточных ячеек, помещенных в водяную баню, блока управления, поршневого насоса, проточного нагревателя, устройства пробоотбора, коллектора фракций, а также ПК со специализированным программным обеспечением Disso.net.

В офлайн-системе «Открытая петля» свежая среда подается из отдельного сосуда и затем перекачивается через проточные ячейки. В зависимости от требуемого объема отбираемых образцов и интервала пробоотбора 3-ходовой клапан коллектора фракций автоматически перенаправляет поток среды из проточной ячейки в пробирку.

На рисунке 3 представлен график изменения концентрации активного вещества во времени. Как видно из графика, концентрация повышается до определенного значения, а затем уменьшается.

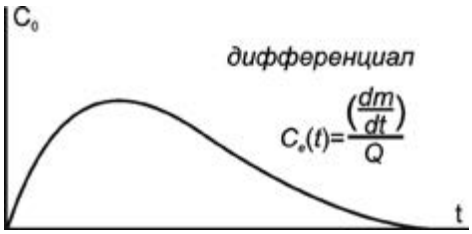


Рисунок 3. Изменение концентрации активного вещества

ОФЛАЙН-СИСТЕМА РАСТВОРЕНИЯ «ПРОТОЧНАЯ ЯЧЕЙКА» ERWEKA DFZ 720 «ЗАКРЫТАЯ ПЕТЛЯ»

Для проведения тестов растворения лекарственных средств, в которых требуется небольшой объем среды, используются стандартные тестеры растворения по методам 1 и 2 (ГФ XIII). Однако при использовании стандартных тестеров растворения по методам 1 и 2 минимальный объем среды определяется объемом сосуда для растворения и глубиной погружения лопастной мешалки/корзинки. Для системы «Закрытая петля» использование таких небольших объемов тестирования, как 27 мл, многократно циркулирующих через проточную ячейку, не является проблемой.

Офлайн-система растворения «Проточная ячейка» Erweka DFZ 720 «Открытая петля»

Насос HKP 720

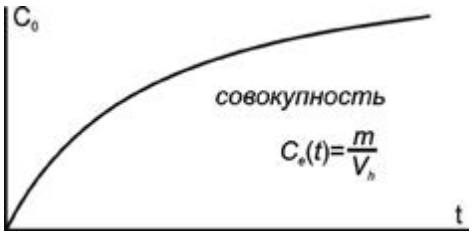
Блок проточных ячеек DFZ 720

Коллектор фракций FRL 704/804

Офлайн-система растворения «Проточная ячейка» Erweka DFZ 720 «Закрытая петля»

В системе «Закрытая петля» в отличие от системы «открытая петля» растворенные вещества не удаляются из потока, а проходят через приемник среды и вновь возвращаются в поток. На рисунке представлен график зависимости концентрации от времени. Как видно из графика, активное вещество постоянно концентрируется в системе. Эта особенность полезна для тестирования лекарственных средств с очень низкой концентрацией высвобождаемого вещества (например, для гормональных имплантов).

Система «Закрытая петля» требует дополнительную опцию – приемник среды LMT 720. LMT 720 включает 7 плоскодонных сосудов объемом 1000 мл, которые погружены в водяную баню. Среда внутри сосудов постоянно перемешивается магнитными мешалками. Отбор проб для дальнейшего анализа в данном случае осуществляется дополнительным перистальтическим или шприцевым насосом.



Учитывая все вышесказанное, можно выделить основные различия систем «Открытая петля» и «Закрытая петля», представленные в таблице 1.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Marques, W. Brown. Dissolution Technologies Questions and Answers // Dissolution Technologies. 2010.
2. R. Hanson, V. Gray. Handbook on Dissolution Testing. 3rd ed. // Dissolution Technologies. 2004.

Таблица 1.

Сравнение систем «Открытая петля» и «Закрытая петля»

Параметр	«Открытая петля»	«Закрытая петля»
Организация потоков среды	«Свежая» среда движется в одном направлении	Существуют два независимых потока: – поток среды для тестирования – поток для пробоотбора
Применение	Для лекарственных форм, требующих большой объем среды растворения	Для лекарственных форм с медленным высвобождением активного вещества
Характеристика проб	Каждая проба содержит растворенные вещества, которые высвободились из формы только в момент отбора пробы	Каждая проба содержит растворенные вещества с момента начала теста до момента отбора пробы
Научное применение	Изучение корреляции *in vivo / in vitro*	Продолжительное тестирование (более трех дней)

НОВАЯ ЛИНЕЙКА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ И ПРОИЗВОДСТВА ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ОТ КОРЕЙСКОГО ПРОИЗВОДИТЕЛЯ SEJONG PHARMATECH

АВТОР

А.М. Гринченко,
руководитель отдела оборудования ГЛФ ГК «Фармконтракт»

АННОТАЦИЯ

Sejong Pharmatech – корейская компания, имеющая 30-летний опыт производства высокотехнологичного оборудования для фармацевтической отрасли: для прессования таблеток, нанесения на них покрытий, смешивания с последующим гранулированием, а также наполнения твердых желатиновых капсул. Оборудование Sejong Pharmatech зарекомендовало себя более чем в 40 странах (входит в ТОП-3 производителей, высоким качеством продукции которых удовлетворены покупатели), имеет сертификаты соответствия ISO-9001, TUV/CE и соответствует европейским стандартам GMP.

ВВЕДЕНИЕ

В июле российский партнер Sejong Pharmatech ГК «Фармконтракт» представил новую линейку для разработки и производства твердых лекарственных форм, выпущенную корейской компанией под брендом *VANTIX*. В течение последних 30 лет компания Sejong Pharmatech проводила научно-исследовательские работы, а также накапливала опыт и знания, что позволило разработать линейку инновационного оборудования VANTIX, которое сможет удовлетворить потребности даже самых требовательных клиентов. Благодаря использованию передовых технологий, собранных по всему миру, оборудование под брендом *VANTIX* получило высокое признание на мировом рынке фармацевтического оборудования. Инженеры компании акцентируют свое внимание на потребностях клиентов, предлагая им наилучшие решения для их производственных задач.

В частности, для процесса влажной грануляции представлены установки псевдоожиженного слоя сушки-грануляции **D5L** и **D5LM**, с которыми интегрирован также смеситель-гранулятор. Для R&D-лабораторий и клинических исследований, а также для пилотного производства разработана в соответствии с требованиями GMP серия таблет-прессов **P130S** с системой автоматического регулирования веса таблеток.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

НОВИНКИ SEJONG PHARMATECH ПОД БРЕНДОМ VANTIX

Системы сушки-грануляции в псевдоожиженном слое VANTIX серии D и M

Машина VANTIX D5L (M) сконструирована для пилотного производства, разработки и оптимизации технологий гранулирования, смешения, сушки и нанесения покрытий. Установка псевдоожиженного слоя может укомплектовываться узлами верхнего и нижнего распыления. В данной модели блок подготовки воздуха (AHU) и вытяжной вентиляции, панель управления интегрированы в единый корпус машины. Узел нижнего распыления может выполнять функцию нанесения покрытий на пеллеты и порошки.

Благодаря интеграции миксера гранулятора VANTIX M с установкой возможно быстро и высокоэффективно производить полный цикл влажной грануляции в одном устройстве. Подача раствора, различные типы основной мешалки (импеллера) и турбомешалки (чоппера), а также сменные чаши с различным объемом (1, 3 и 5 л) позволяют производить разработку партии, проводить ее масштабирование максимально эффективно и точно с минимальными потерями.

VANTIX D5Lm

Таблеточные прессы серии P130S

Роторный таблеточный пресс VANTIX P130S – полностью автоматический таблеточный пресс для решения самых разнообразных исследовательских задач, отработки технологий и производства пилотных партий. Машина доступна с тремя типами роторов – для пресс-инструмента типа B, D и комбинированного типа B/D. Таблеточный пресс в базовой комплектации оснащен принудительным питателем, системой A.W.C. (Automatic weight system) автоматического контроля веса таблеток, датчиками контроля усилия прессова-

Краткие технические характеристики модели D5Lm

Объем емкости, л		1–5		
Потребление сжатого воздуха, л/мин		1400		
Общее энергопотребление, кВт		8,8		
Количество распылительных форсунок		1 (для верха и низа)		
Насос		Watson-Marlow 120 U\DV		
Приточный воздух	Мощность нагрева (кВт)	4,8		
	Тип нагрева	Электрический		
	Фильтр	Префильтр, антибактериальный, Нера-фильтр		
	Температурный диапазон (°C)	80		
Вытяжной воздух	Поток воздуха m^3/min	3		
	Давление воздуха(мм. в/с)	1000		
	Расход воздуха (л/мин)	2300		
	Фильтр	Картриджный (Полиэстер)		
Датчики	Температурные датчики (3 точки)	Контактный датчик, датчик выходящего воздуха, датчик подачи воздуха (для высоких температур)		
	Датчик разницы давлений	Цифровой D/P Передатчик		
Смеситель	Производительность (л/партия)	1	3	5
	Производительность (кг/партия)	0,7	2,1	3,5
	Мешалка (об/мин)	5–300		
	Чоппер (об/мин)	5–3400		
Габариты, мм	Внешний диаметр машины Ø (мм)	315		
	Ширина (мм)	1590		
	Высота (мм)	1705		
Программное обеспечение		21 CFR Part 11		
Вес (кг)		453		
Параметры энергопотребления		220/380V, 50/60Гц, 3 фазы		

ния, датчиками контроля хода верхних и нижних пуансонов (для предотвращения повреждения пресс-инструмента), а также усилия выталкивания.

Таблеточный пресс P130S позволяет контролировать следующие параметры: глубину наполнения, основное усилие прессования, скорость работы, скорость механического питателя, необходимое количество произведенных таблеток, время подачи порошка, а также осуществлять мониторинг производительности, общего количества таблеток, общее время работы. Все параметры работы выводятся в форме отчета, который можно формировать в конце работы.

Таким образом, таблеточный пресс P130S является полностью автоматической машиной, которая идеально подойдет не только для отработки технологии с последующим масштабированием, но и для пилотного производства. Пресс является мобильным, легким в управлении и обслуживании, что позволяет существенно упростить и облегчить работу с ним.

Краткие технические характеристики

Описание		Модель		
		4S/4S	8S	9S
Кол-во станций		4/4	8	9
Диаметр диска (мм)		130		
Производительность, кол-во/час	Одинарный	9 600	19 200	24 300
Кол-во оборотов диска (об/мин)	Одинарный	40	45	40
Максимальный диаметр таблетки, мм	Круглая	25	25	16
	Облонг	25/19	25	19
Максимальная толщина таблетки, мм		8,5		
Глубина наполнения (мм)		18	22	18
Размер кулачка (мм)		1–4		
Давление предварительного усилия прессования (kgf)		–		
Основное давление (kgf)		6000		
Тип матрицы		D/B	D	B
Тип пуансонов		EU-D/B	EU-D, TSM-D	EU-B, TSM-B
Требуемая площадь для установки (мм)		600x1200		
Вес (кг)		550		
Электропитание		220/380/400/415V, 50/60 ГЦ, 3-фазное		

VANTIX P130S

Автоматические машины нанесения покрытия VANTIX серии C

Автоматические машины нанесения покрытия VANTIX серии C – это высокотехнологичные машины с системой эффективной подготовки воздуха (AHU) и его вытяжки, которые обеспечивают оптимальный процесс сушки. Запатентованная технология передвижения распылительного пистолета позволяет осуществлять быстрый демонтаж/монтаж распылительного пистолета для легкого обслуживания. Коатер оснащен сменными барабанами под различные объемы загрузки от 0,4 до 9 кг. В модельном ряде представлено две установки C30FC и C30JC, которые отличаются наличием различных дополнитель-

VANTIX C30FC

ных опций, таких как система CIP, автоматическая выгрузка таблеток, наличие HEPA-фильтров на входе и прочее. Модель C30JC является более автоматизированной. Коатер оснащается полностью перфорированным барабаном.

Краткие технические характеристики:

Описание		Модель			
		C30FC			
Диаметр сменного дражир. котла, мм		240	330	420	480
Диаметр горловины котла, мм		135	160	200	200
Производительность	л/партия	1	2,5	5	9
	кг/партия	0,4–0,7	0,7–1,7	1,7–3,5	2–6,3
Скорость котла, об/мин		3-50			
Суммарная электрическая мощность, кВ		10			
Потребление воздуха	Объём воздуха ($м^3$/м)	14,5			
	Возд. давл. (мм в/с)	60			
Объём вытяжного воздуха	Объём воздуха ($м^3$/м)	11			
	Возд. давл. (мм в/с)	120			
Фильтрация	Префильтр, %	70			
	Антибактериальный фильтр, %	90			
	HEPA-фильтр, %	99			
Тип электронагревателя		Электрический (7 кВ)			
Фильтр	Тип	Префильтр, антибактериальный, HEPA			
	На выходе	картриджный			
Потребление сжатого воздуха (л/мин)		200			
Мощность двигателя, кВт		0,4			
Тип распылительного пистолета		Schlick gun 970			
Насос	плёнка	Watson-Marlow 323U			
	сахар				
Система очистки		вручную			
Датчик температуры		бесконтактный			
HEPA-фильтр, мм		300x300x150			
Программное обеспечение		21 CFR Part 11			
Вес, кг		450			
Размеры, мм		630x770x1750			

VANTIX C30JC

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новая линейка R&D-оборудования для производства твердых лекарственных форм от корейского производителя Sejong сочетает в себе передовые технологии, способные обеспечить максимальный уровень качества выпускаемой на фармацевтическом предприятии продукции. Высокотехнологичные и качественные таблеточные прессы, капсулонаполняющие машины, коатеры, автоматические машины для контроля веса капсул, различные типы оборудования для грануляции и прочее сопутствующее оборудование под торговой маркой VANTIX успешно зарекомендовало себя на мировом рынке.

PHARMATECH SEJONG

ПРОЦЕСС И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОВЕДЕНИЯ СУБЛИМАЦИОННОЙ СУШКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМ CHRIST

Материал предоставлен компанией MARTIN CHRIST

Рисунок 1. Давление и температура полок – два ключевых параметра системы. Вакуум, p=f (FD-step). Температура полки, T=f (продолжительность процесса)

ВВЕДЕНИЕ

В прошлом номере журнала был приведен обзор лиофильных сушилок компании MARTIN CHRIST (Обзор лиофилизационных систем MARTIN CHRIST // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 2(15). С. 279–282). Продолжая данную тему, в этой статье мы более подробно рассмотрим процесс и практические аспекты проведения лиофильной сушки.

МЕТОДИКИ ПРОВЕДЕНИЯ

Общий обзор процесса

Перед загрузкой нового продукта в лиофильную сушилку важно полностью удалить воду из камеры ледового конденсора, которая могла остаться после предыдущей партии. Выходной и вентиляционный клапаны в процессе сушки должны быть закрыты. Слой продукта не должен превышать 1–2 см, поскольку слишком большая толщина слоя оказывает негативное воздействие на продолжительность сушки.

Как показано на рисунке 1, процесс лиофлильной сушки может контролироваться путем выбора и изменения двух ключевых параметров системы.

На рисунке 2 приведена запись процесса лиофильной сушки суспензии. В связи с тем, что температура ее замерзания составляет около 0 °C и нет сложных физико-химических превращений, то лиофилизация возможна при давлении 1 мбар и температуре полок +40 °C. При завершении процесса сушки датчики температуры в слое суспензии толщиной 3 см (желтые, зеленые и синие линии) показывают значения, близкие к температуре полок.

До этого момента, исходя из температуры сублимации и температуры лиофилизата, измеряется «смешанная» температура. Температура ледового конденсатора (черная линия) повышается в начале процесса первичной сушки приблизительно от –83 °C до –70 °C, что связано с большим количеством конденсирующегося водяного пара. Спустя 20 ч этот эффект в некоторой степени уменьшается, следовательно ледовый конденсатор снова достигает температуры –85 °C.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

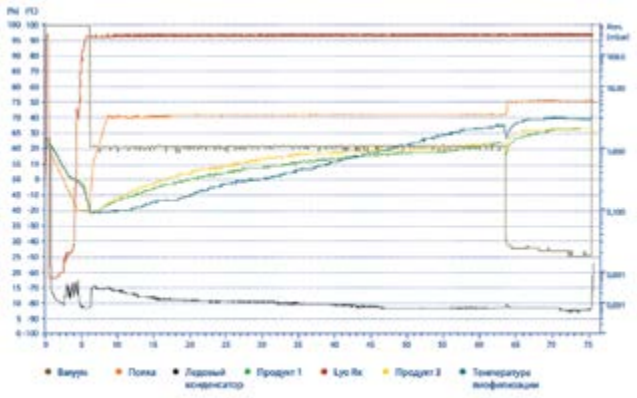


Рисунок 2. **График процесса лиофилизации суспензий**

Как правило, условия заморозки продукта не отличаются от заморозки в обычном морозильнике.

Как указывалось ранее, небольшие количества субстанции можно замораживать в камере ледового конденсатора (процесс внутри). Большие количества вещества лучше замораживать в отдельном лабораторном морозильнике (процесс снаружи). Сушить замороженный продукт предпочтительнее в круглодонных колбах или широкогорлых колбах для фильтрования, так как колбы можно прикреплять и удалять по отдельности, не влияя на процесс сушки других колб. Как будет более подробно объяснено в разделе «Поверхностная заморозка и вращательная заморозка», на продолжительность сушки влияет толщина слоя, которую в отличие от стационарной заморозки можно значительно уменьшить при вращательной заморозке, так как благодаря вращению внутри стеклянной емкости образуется равномерный слой льда.

При проведении заморозки в отдельном морозильнике, особенно при небольших количествах замораживаемого вещества, рекомендуется предварительно охлаждать полки для предупреждения частичного таяния во время процесса вакуумирования.

После заморозки система проходит этапы прогрева и предварительного охлаждения. Прогрев вакуумного насоса следует проводить с закрытым клапаном регулировки давления, улучшая тем самым производительность и уменьшая воздействие водяного пара на насос. В то же время предварительное охлаждение ледового конденсатора позволяет более эффективно конденсировать пары растворителя во время этапа первичной сушки. Этап подготовки занимает от 15 до 30 мин.

Для начала процесса сублимации клапан регулирования давления вакуумных насосов открывается, и происходит падение давления. Начинается процесс первичной сушки.

Опциональная вторичная сушка характеризуется максимально возможным снижением давления и небольшим повышением температуры полок (оба этих показателя улучшают десорбцию). В отличие от собственно сублимации фаза десорбции регулируется другими законами термодинамики.

После завершения процесса сушильная камера аэрируется через резиновый вентиль или вентиляционный клапан. Также через аэрационный клапан возможна подача азота или инертного газа. Теперь система может быть выключена, а продукт разгружен.

Ледовой конденсатор размораживается при комнатной температуре, однако если необходимо ускорить процесс, можно использовать теплую воду. Камера ледового конденсатора не должна быть заполнена водой больше, чем на половину. При использовании данного способа разморозки важно убедится, что вода не попала в соединительные трубки вакуумного насоса и датчик давления!

Конденсат и талая вода спускаются в резервуар через дренажный клапан. Перед началом нового процесса необходимо полностью удалить всю оставшуюся влагу. После закрытия дренажного и аэрационного клапанов в систему можно загружать новую партию продукта.

Заморозка

Этап заморозки определяет микроструктуру, которая формируется при затвердевании раствора и тем самым также определяет микроструктуру сухого продукта. Различают две различных структуры замороженных материалов. Первая – кристаллическая форма – характеризуется присутствием кристаллов льда с четко выраженной границей между зернами. Это справедливо для большинства водных растворов с низким содержанием сахаров или белков. Если замораживание проводится достаточно медленно, то смесь затвердевает постепенно до момента кристаллизации последней капли жидкости при минимально возможной температуре, так называемой эвтектической точке. Во множестве случаев система не приходит в термодинамическое равновесие и жидкость становится переохлажденной зачастую на целых 10–20°C. Тогда кристаллизацию можно быстро инициировать путем встряхивания или внедрением центров кристаллизации, причем в этом случае твердая фаза не будет иметь эвтектический состав. Вторая структура – аморфные вещества без какой-либо границы между зернами, аналогичные переохлажденному расплаву, например оконное стекло. Нагрев такого замерзшего раствора не приведет к случайному таянию, скорее размягченный материал начнет течь. Это, соответственно, рассматривается как температура разрушения T_C. Температура стеклования T_G представляет собой точку затвердевания при переходе из жидкого в аморфное состояние и обычно на несколько градусов Кельвина ниже температуры разрушения.

- В фармацевтической отрасли аморфные матрицы предпочтительнее для внедрения чувствительных биомолекул из-за лучшей стабилизации ак-

тивных субстанций, поскольку аморфная матрица обеспечивает более длительные сроки хранения готового продукта.

- В то же время продукты с кристаллической структурой быстрее и легче сублимируются, поскольку перенос паров воды осуществляется быстрее через границы между зернами. Однако расплавление кристаллического продукта во время сушки может привести к разбрызгиванию и риску перекрестной контаминации, аморфные вещества по началу только теряют структуру.
- Ключевым аспектом при определении необходимой температуры полок и давления во время процесса первичной сушки является температура затвердевания (точка замерзания) высушиваемого материала. Она зависит не только от рассматриваемого продукта, но и от скорости заморозки. Например, в таблице 1 показан ряд эвтектических точек микробиологических культурных сред.

Таблица 1.

Эвтектические точки различных питательных сред [1]

Образец	Эвтектическая точка/°C
Водопроводная вода	-1,0
Сверхчистая вода	0,0
Ультрапастеризованное молоко	-11,7
Обезжиренное молоко	-11,0
Лактоза, 5 %	-1,0
Лактоза, 10 %	-2,0
mod. PC-med. (3 % NaCl)	-45,0
Лакмусовое молоко	-12,0
HGL	-12,0
BA бульон	-29,0
Глюкозный бульон	-6,5
Бульон с экстрактом солода	-6,5
Дрожжевая вода	-1,5
YGC	-15,0
MRS бульон	-20,0
M 17	-15,5
Основная среда для стрептококков	-15,0

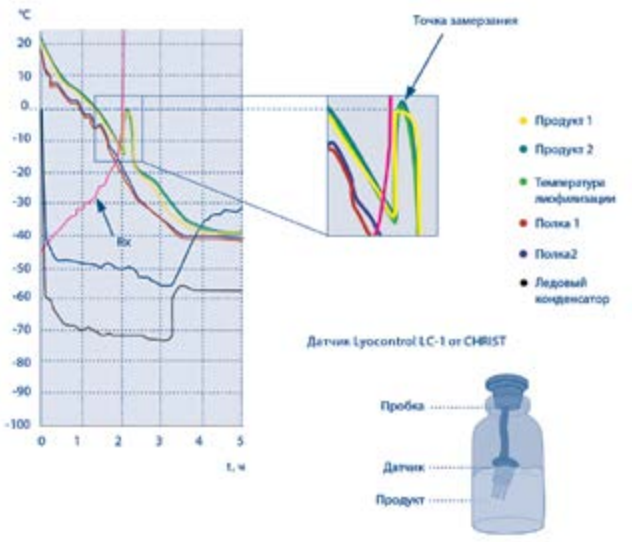


Рисунок 3. Определение точки замерзания с помощью системы Lyocontrol от CHRIST

Точку замерзания можно определить разными способами:

- Абсолютное термодинамическое значение [источник: руководства по эксплуатации, техническая литература (например, VDI Thermal Atlas), references].
- Криогенный микроскоп.
- DSC (дифференциальная сканирующая калориметрия).
- Измерение температуры и сопротивления во время этапа заморозки.

Электрическое сопротивление высушиваемого продукта почти всегда значительно возрастает при переходе из жидкого состояния в твердое, что обусловлено снижением подвижности ионов и электронов. Следовательно, измерение температуры и электрического сопротивления продукта в одной точке позволяет определить точку замерзания.

Из-за внезапного повышения сопротивления пересечение кривых Rx и T с очень высокой точностью можно принять в качестве точки замерзания, что подтверждено многочисленными измерениями с использованием различных растворов.

На рисунке 4 показано определение эвтектической точки или в более общем смысле точки замерзания. В случае менее интенсивного возрастания значений Rx во время кристаллизации за точку затвердевания принимается температура продукта, при которой сопротивление Lyocontrol больше не меняется.

Сопротивление выражается в процентном отношении, поскольку оно может изменяться на несколько порядков и фактическое значение в Ом не подходит для определения точки замерзания. Еще одним пре-

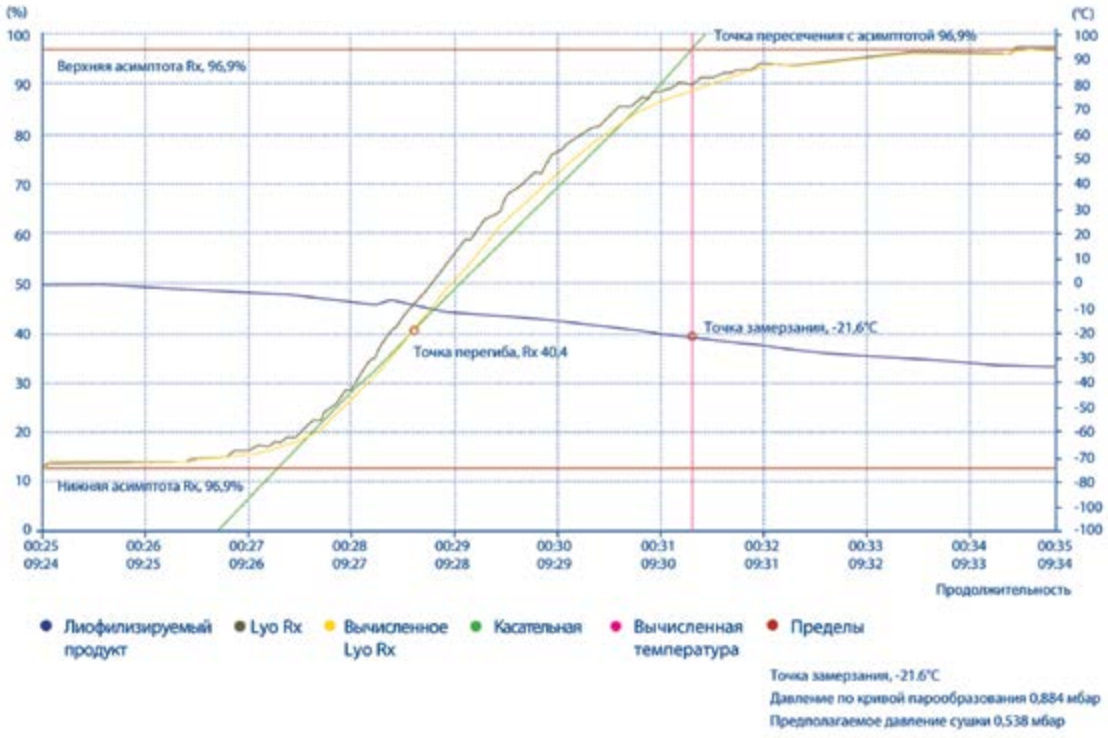


Рисунок 4. **При менее интенсивном возрастании значений Rx во время кристаллизации за точку затвердевания принимается температура продукта согласно этому графику**

имуществом системы LyoControl от MARTIN CHRIST является возможность контролировать процесс. Во время этапа первичной сушки может происходить таяние продукта, приводящее к разбрызгиванию, перекрестной контаминации и возможности потери партии, однако этого удается избежать, контролируя значение Lyo-Rx. Если продукт нагревается слишком быстро, то возможно падение сопротивления. На рисунках 5 и 6 показаны графики для нечувствительного продукта (величина сопротивления всегда около 100%) и для

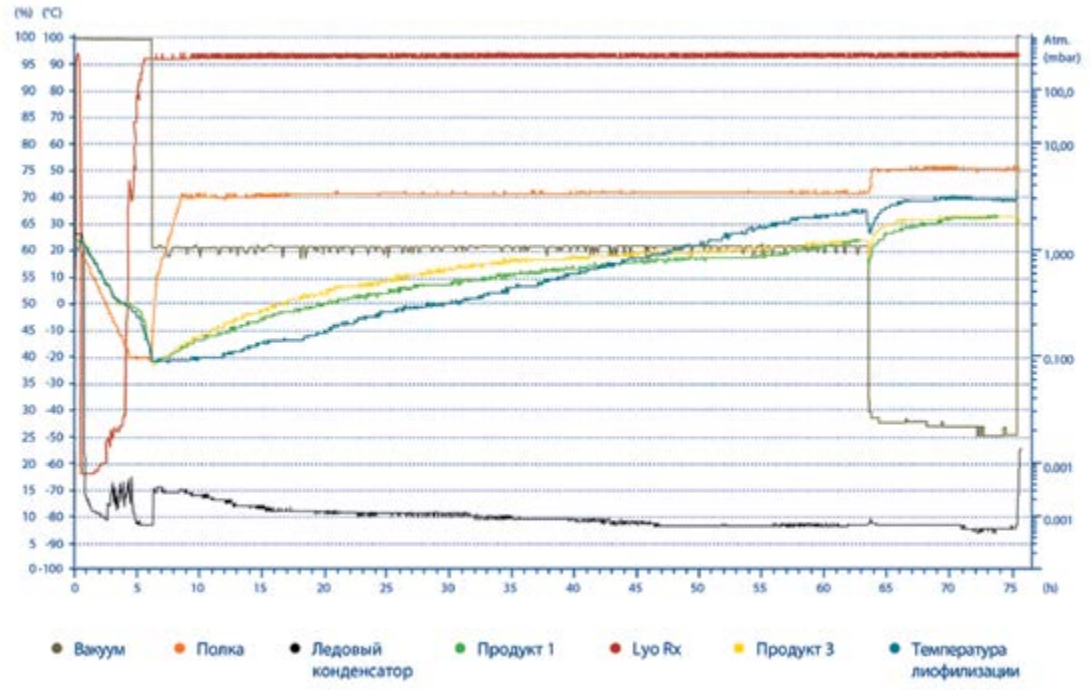


Рисунок 5. **График Rx для нечувствительного продукта**

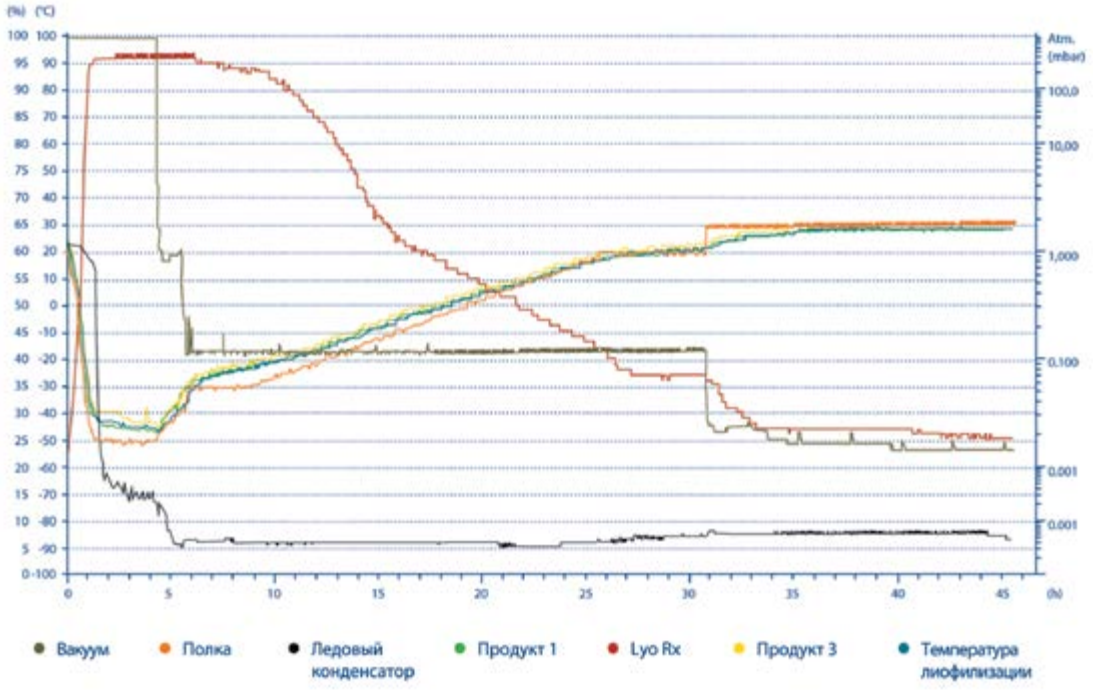


Рисунок 6. **График Rx для чувствительного продукта, оттаивающего в процессе первичной сушки**

очень чувствительного продукта, который оттаивает после нескольких часов основной сушки.

При использовании пилотных и промышленных систем CHRIST можно заранее установить минимальное значение Rx. В дальнейшем системы переходят в режим заморозки, при котором любой начавший оттаивать продукт замораживается снова. Система Lyo-Control точно определяет точку замерзания растворов, которые, затвердевая, образуют кристаллическую форму, но не так хорошо определяет температуру разрушения аморфных субстанций, используемых в фармацевтической отрасли. Скорость заморозки оказывает значительное влияние на морфологию кристаллических систем (рисунок 7).

На рисунке слева показан результат медленного охлаждения до температуры –2 °C, а затем кристаллизации 10%-го раствора маннитола, а справа – результат его быстрого охлаждения и кристаллизации при температуре –8 °C. Быстрое охлаждение приводит к более продолжительному этапу первичной сушки, что обусловлено меньшим диаметром пор и меньшим количеством микротрещин поверхностной структуры. Медленная заморозка (см. классификацию на рисунке 8) приводит к так называемому концентрированию заморозкой.

Например, в процессе заморозки раствора хлорида натрия образуются два различных типа кристаллов, а именно ледяная фаза низко- и высокообогащенная NaCl. Последняя капля раствора затвердевает при минимально возможной температуре, так называемой, эвтектической точке.

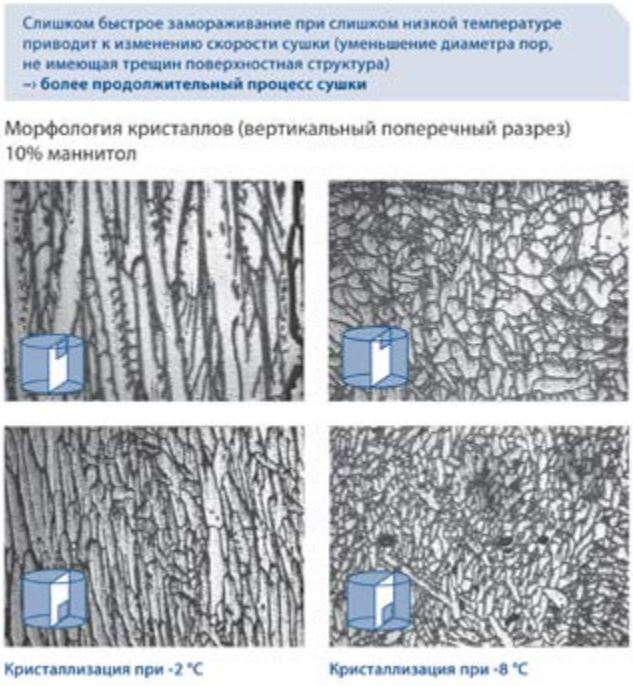


Рисунок 7. **Кристаллизация (вертикальный поперечный разрез) при заморозке 10%-го раствора маннитола [3]**

С практической точки зрения наилучшим является снижение температуры со скоростью 1–2 градуса в минуту (умеренная заморозка), что, с одной стороны, предотвращает концентрирование заморозкой, а с

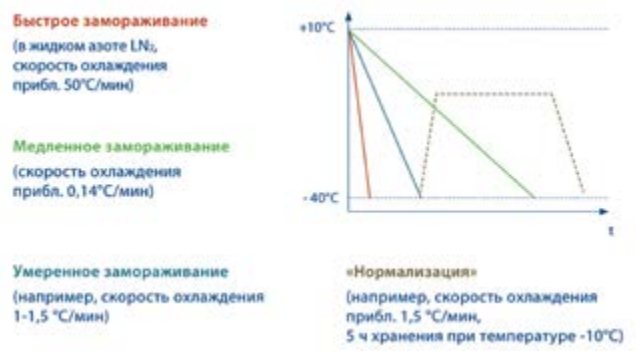


Рисунок 8. Классификация возможных скоростей охлаждения [4]

другой – позволяет получить подходящую кристаллическую структуру.

Исходный материал, содержащий растворитель, или материал с высокой концентрацией солей может оттаивать во время процесса сушки (это обычно четко видно из-за пенообразования). Следовательно, необходимо замораживать материал до минимально возможной температуры, например в жидком азоте.

Если исходный материал имеет высокую концентрацию растворителя или содержит кислоты, то его нельзя высушивать без обеспечения мер безопасности и использования специальных устройств, например дополнительных криогенных ловушек для защиты вакуумного насоса. Также возможно использование химически стойких гибридных вакуумных насосов (например, RC-6).

Первичная и вторичная сушка

После необходимых этапов (прогрев вакуумных насосов и предварительное охлаждение ледового конденсатора) давление в системе снижается до указанного рабочего вакуума, который поддерживается во время этапа первичной сушки. Как только начинается сублимация льда, происходит высвобождение тепла из замороженного материала и, как следствие, его дальнейшее охлаждение.

Небольшое повышение температуры полок при этом восполняет энергию, потерянную продуктом.

Процесс лиофилизации простых продуктов продолжается не менее 12 ч, а в случае более сложно высушиваемых продуктов, например вакцин с низкой температурой замерзания, – до нескольких дней. Высушивание объемных археологических находок может занимать недели.

Водяной пар, выделяемый при сушке под вакуумом, замерзает на поверхности очень холодного ледового конденсатора, таким образом, конденсатор эффективно действует в качестве «насоса для водяного пара». Вакуумный насос служит только для извлечения воздуха из сушильной камеры, но не для откачки водяных паров («газовый насос»).

Несомненную важность выбора подходящего давления можно объяснить с учетом уравнения состояния идеального газа:

Уравнение состояния идеального газа

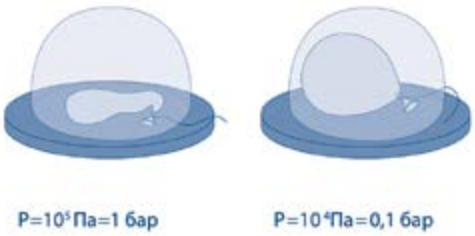
$$p \times V = m \times R_m \times T = \text{const.}$$

где p – давление газа [Па], 10^5 Па = 1 бар; V – объем [$м^3$]; m – масса [кг]; R_m = R / M, R = постоянная идеального газа = 8,314 Дж/моль x K; M – молярная масса [г/моль], $M(H_2O)$=18 г/моль; T – температура [K].

Однако при слишком низком давлении это малоэффективно:

1,0 г льда при давлении…

- 1,0 мбар производит 1 $м^3$ водяного пара;
- 0,1 мбар производит 10 $м^3$ водяного пара;
- 0,01 мбар производит 100 $м^3$ водяного пара.



Очень низкое давление приведет к образованию огромных объемов водяного пара, но при этом не обязательно произойдет быстрое снижение содержания влаги в образце!

Более продолжительный период сушки при очень низких давлениях, установленных из кривой парообразования и уравнения состояния идеального газа, был подтвержден множеством экспериментов. Например, на рисунке 9 показана скорость сублимации, которую можно достичь при различных значениях вакуума в камере и температурах полок (данные результаты были получены при использовании системы LyoBalance от MARTIN CHRIST).

Сравнение красной и синей кривых показывает, что даже незначительное увеличение давления от 0,05 мбар до 0,1 мбар при одинаковом энергопитании может привести к значительному увеличению скорости сублимации, и, как следствие, этап первичной сушки длится на 4,5 ч меньше. Это явление также используется в промышленной сублимационной сушке. Например, при лиофилизации суспензий, имеющих температуру замерзания около 0 °C, используется дав-

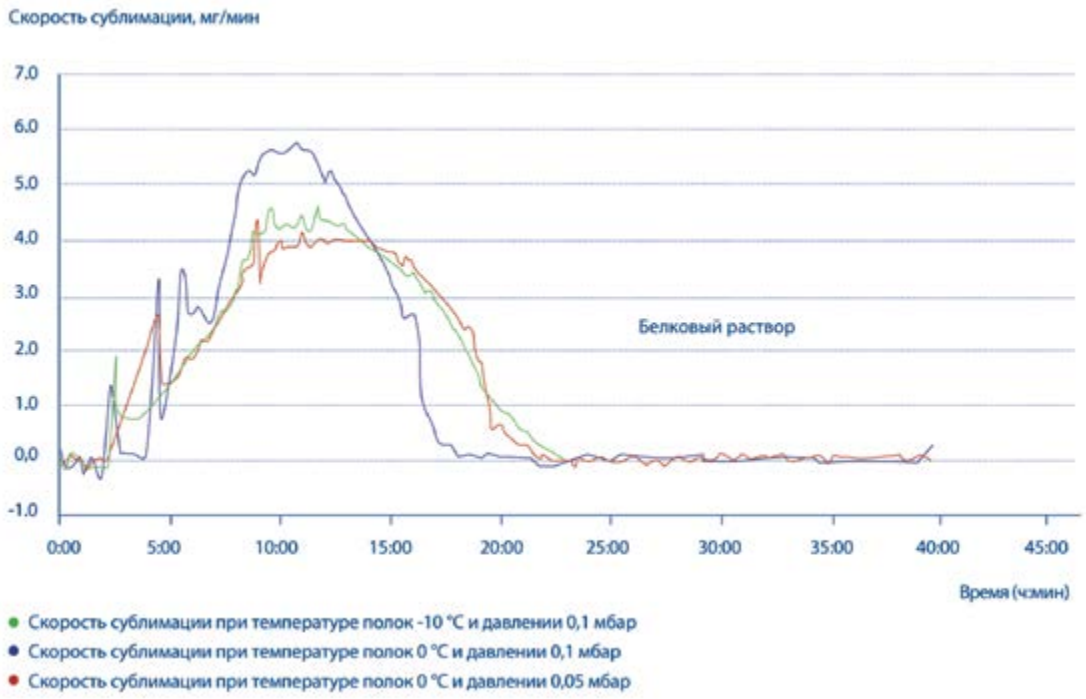


Рисунок 9. Влияние рабочего давления на скорость сублимации [5]

ление от 2 до 4 мбар, что близко к тройной точке воды. Однако производители вакцин применяют давление от 0,04 до 0,12 мбар в связи с тем, что точка замерзания данных растворов обычно очень низкая.

Другим сдерживающим фактором фармацевтической отрасли является аморфная структура материалов (отсутствие межзеренных границ для переноса пара).

Принимая во внимание преобладающее воздействие вакуумных устройств на температуру продукта, компания CHRIST внедрила так называемую функцию безопасного давления для защиты продукта. Если давление в сушильной камере превышает допустимые значения безопасного давления, то энергопитание полок прерывается и процесс сублимации начинает замедляться. Это предотвращает таяние продукта, возникновение риска перекрестной контаминации и изменение свойств продукта. Значения безопасной температуры находятся на 5 °C ниже температуры плавления, то есть между температурой сушки и температурой плавления.

Пример

Эвтектическая точка t_{eu} = –10 °C.

Температура сушки t_{dry} = –20 °C.

→ Вакуум сушки p_{dry} = 1,030 мбар.

Безопасная температура t_{safe} = –15 °C.

→ Безопасный вакуум p_{safe} = 1,650 мбар.

Рисунок 10. Лиофильная сушилка с функцией безопасного давления

В установках большей производительности с регулируемой температурой полок возможна работа с дополнительным сигнальным давлением. Если давление в сушильной камере повысится до заданных сигнальных значений, то независимо от прерывания энергопитания полки начинают максимально быстро охлаждаться до температуры замерзания. Сигнальная температура должна быть приблизительно на 3 °C ниже температуры плавления.

Пример

Эвтектическая точка t_{eu} = –10 °C.

Температура сушки t_{dry} = –20 °C.

→ Вакуум сушки p_{dry} = 1,030 мбар.

Безопасная температура t_{safe} = –15 °C.

→ Безопасный вакуум p_{safe} = 1,650 мбар.

Сигнальная температура t_{alarm} = –13 °C.

→ Сигнальный вакуум p_{alarm} = 1,980 мбар.

Рисунок 11. **Лиофильная сушилка с дополнительной функцией сигнального давления**

Вторичная сушка является опциональной возможностью, используемой при необходимости сохранить минимальное количество остаточной жидкости. В сущности, это подразумевает физический процесс десорбции, то есть удаление абсорбированного остаточного растворителя. При этом ледяная фаза больше не должна присутствовать. Вторичная сушка проводится при минимально возможном конечном давлении системы, как правило, при повышении температуры полок (например, от +20 °C до +30 °C), чтобы облегчить удаление газа из тонкого слоя молекул растворителя на поверхности пор.

Рисунок 12. **Промышленная установка с так называемым контролем температуры полок (с использованием силиконового масла) и функцией сигнального давления**

Рисунок 13. **Правильно высушенный продукт (слева) и растаявший разбрызганный продукт (справа)**

Минимально возможное конечное давление в сушильной камере для наиболее эффективной десорбции зависит от температуры ледового конденсатора в соответствии с кривой парообразования над льдом и характеристик вакуумного насоса.

Для уверенного предотвращения оттаивания продукта во время сушки рекомендуется работать при температуре приблизительно на 10 °C ниже температуры замерзания (эвтектическая точка или температура стеклования).

Там, где эффективность и скорость являются ключевыми производственными показателями, например для активных фармацевтических субстанций, целью в большинстве случаев является работа при температуре, как можно более близкой к температуре затвердевания (возможно только на 2 °C ниже ее). Эти процессы требуют хороших знаний продукта и обширных пилотных испытаний в качестве подготовительного этапа.

Для начала процесса сублимации необходима подача энергии к продукту. Источником энергии может служить более теплая окружающая среда (нагрев от прямого соприкосновения) при сушке в круглодонных колбах, широкогорлых колбах и т.д. или тепловое излучение внешней среды в случае необогреваемых полок или полок с регулируемой температурой.

На рисунке 14 показана температурная кривая для колбы с ободком в основании во время этапа первичной сушки.

Теплоизоляция материала и формы основания виал приводит к очень сильному перепаду температур, от +25 °C на полке до –15 °C в основании емкости, и заморозке продукта. Сравнительно хорошая теплопроводность замороженных твердых веществ приводит к низкотемпературному градиенту от основания до фронта сублимации. Теплопередача описывается уравнением:

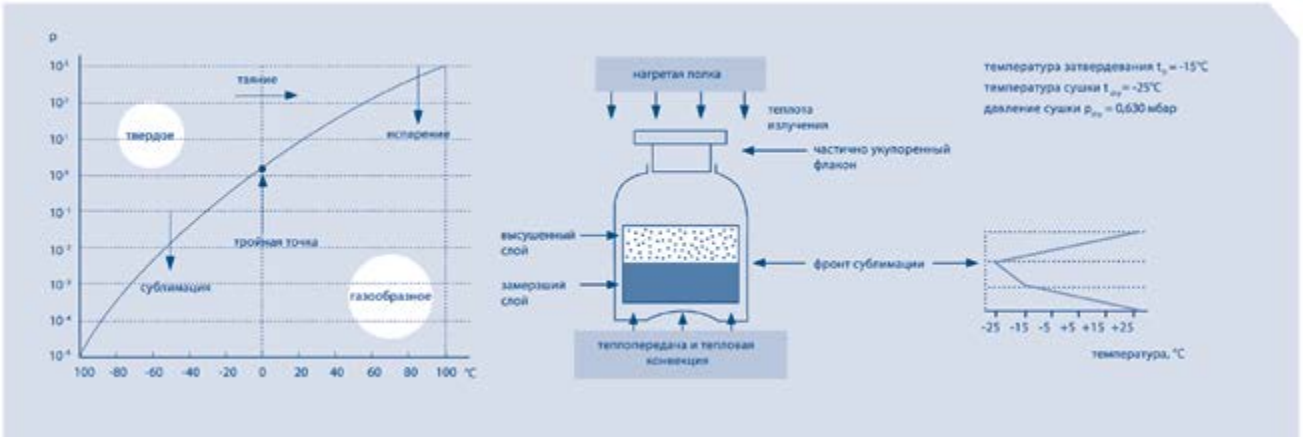


Рисунок 14. **Температурная кривая для колбы с ободком в основании во время этапа первичной сушки**

$$Q' = Q/t = k \cdot A \cdot \Delta T$$

где Q' – тепловой поток [Вт = Дж/с]; Q – количество тепла [Дж]; t – время [с]; k – сопротивление для теплопередачи [Вт/(м^2 · K)]; A – площадь поперечного сечения для теплопередачи [м^2]; ΔT – разность температур [K].

Она прямо пропорциональна количеству тепла, передаваемому на поверхность льда, где и происходит сублимация. Температура льда на фронте сублимации определяется кривой парообразования материала, которая идеально водная. Температурный градиент сухого остатка продукта возникает из-за воздействия на него теплового излучения и охлаждения за счет уноса энергии сублимированных водяным паром.

На рисунке 15 показан случай из практики.

Другим способом влияния на скорость является регулирование температуры полки. На рисунке 16 показаны результаты эксперимента по лабораторной сушке с использованием чистой воды с нагревом полок и без него. На практике температура полок имеет меньшее влияние, обусловленное тем, что давление обычно ниже, а матрица продукта затрудняет движение водяных паров и снижает скорость сушки.

Лиофильная сушка замороженных жидкостей, суспензий и т.д. в емкостях должна проводиться в системах с нагреваемыми полками. Но это не требуется при обработке материалов в виде отдельных кусков или материалов, имеющих неправильную форму, например растений, фруктов, археологических находок, в связи с тем, что поверхность контакта для теплообмена в любом случае будет слишком маленькой. Как и в случае с сушкой, в колбе необходимая энергия обеспечивается путем внешнего температурного излучения через прозрачную крышку сушильной камеры. Регулирование подачи энергии при этом практически невозможно. Если продукт начинает оттаивать

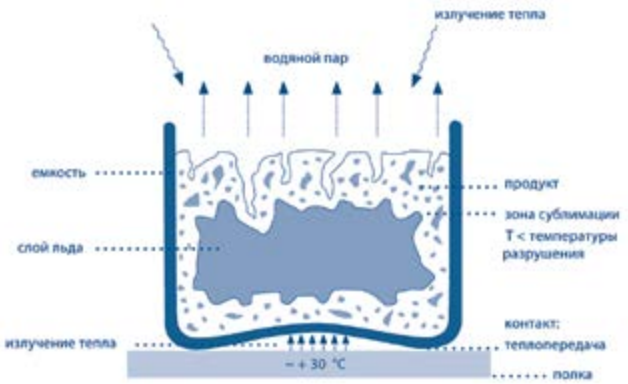


Рисунок 15. **Процесс лиофильной сушки в емкости продукта**

(слишком много излучения), то крышку или стеклянную колбу можно изолировать, например с помощью алюминиевой фольги.

Сушка субстанций приблизительно с 10%-ным содержанием твердых веществ показана на рисунке 17.

В первой четверти этапа первичной сушки содержание воды составляет 50%, в следующей четверти – 50% от содержания в предыдущей четверти и т.д. до момента асимптотического приближения кривой сушки к оси времени. Это происходит вследствие того, что физическая граница сублимации погружается в толщу продукта, а водяному пару приходится искать путь через сухие слои и сопротивление все больше возрастает. Процесс сушки определяется главным образом подводом энергии для сублимации и скоростью перемещения водяных паров. Для увеличения специального коэффициента теплопроводности высушиваемого материала и образования минимально возможного количества водяного пара сушка должна проводиться максимально близко к температуре затвердевания (эвтектическая точка или температура стеклования).

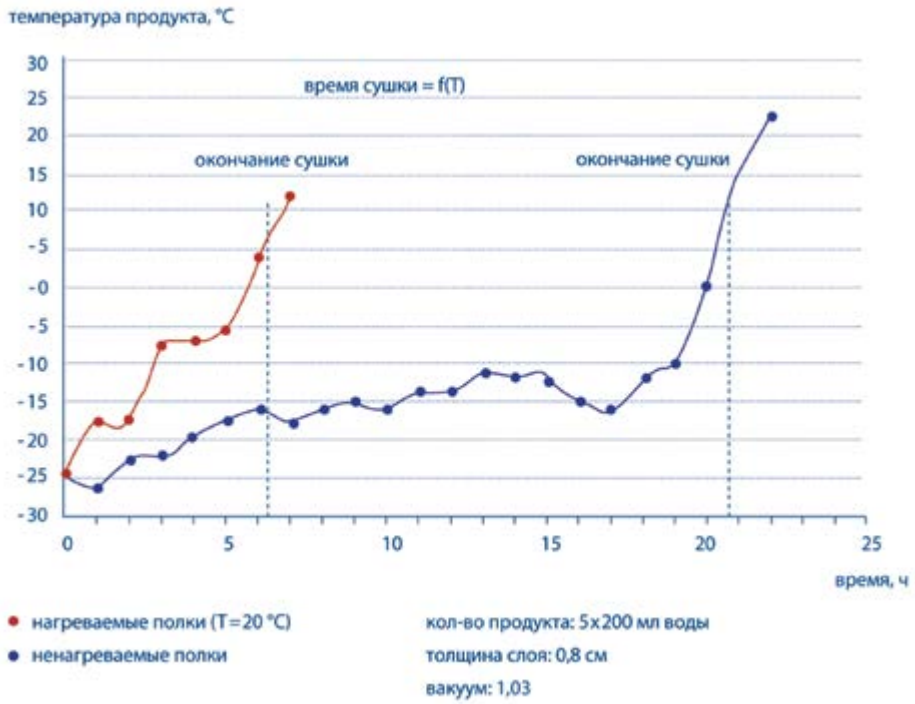


Рисунок 16. **Влияние нагрева полок на скорость сушки (чистая вода) [6]**

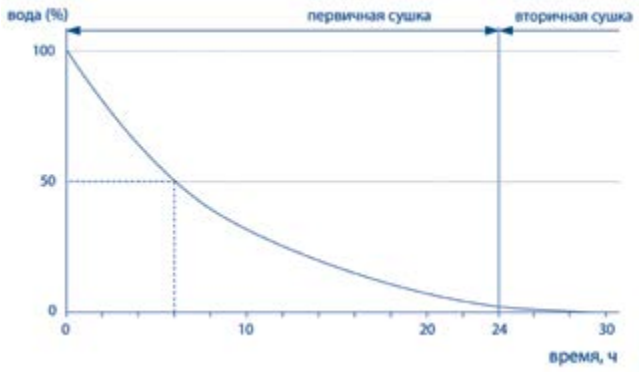


Рисунок 17. **Асимптотическая сушка**

Чем ближе давление к точке затвердевания в соответствии с кривой парообразования над льдом, тем быстрее проходит этап первичной сушки.

Подводя итог, можно сказать, что температура продукта во время сушки главным образом определяется уровнем выбранного вакуума и в меньшей степени температурой полок.

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Этап прогрева/предварительного охлаждения

В системах, оснащенных клапанами регулировки давления, возможно осуществлять прогрев вакуумного насоса. Если воздействие паров растворителя на насос начинается после установления рабочей температуры, это предотвращает конденсацию и положительно влияет на срок его эксплуатации.

Вакуумный насос можно включать, оставляя закрытым клапан регулировки давления. Перед началом этапа первичной сушки вакуумный насос предварительно включают и прогревают не менее 15 мин.

В некоторых случаях во время этапа первичной сушки, несмотря на закрытый клапан вакуумного насоса, возможно падение давления в камере ледового конденсатора или в сушильной камере (например, от 0,63 мбар до 0,47 мбар). Это обусловлено эффектом вакуумирования ледового конденсатора (эффект вакуумирования глубоким охлаждением).

Поверхностная заморозка и вращательная заморозка

Если жидкости сушатся в колбах при толщине слоя больше 1 см, то рекомендуется использовать поверхностную или вращательную заморозку (рисунок 19) в охлаждающей бане. Во время вращения жидкость равномерно распределяется по внутренним стенам колбы и замерзает. При таком способе заморозки образуется тонкий слой продукта и увеличивается по-

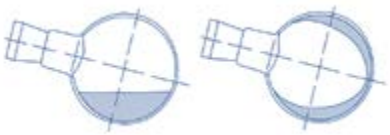


Рисунок 18. **Поверхностная заморозка в круглодонной колбе**

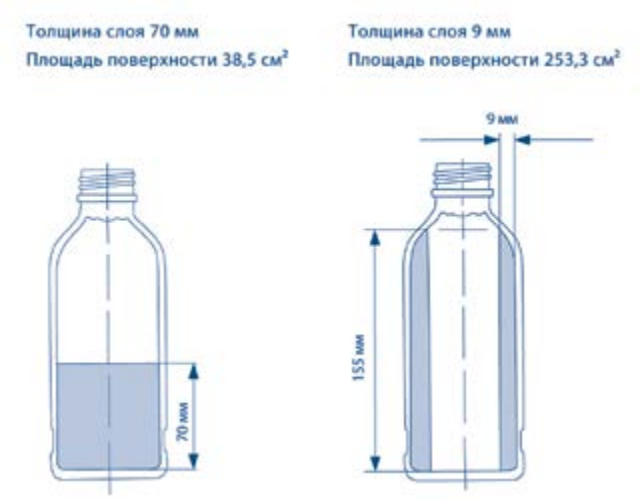


Рисунок 19. Вращательная заморозка в бутыли для инфузии

Рисунок 20. Охлаждающая баня для заморозки продукта во вращающихся круглодонных или широкогорлых колбах (слева) и сушка продукта в колбах в лабораторной сушилке (справа)

тенциальная поверхность сублимации, что значительно снижает общую продолжительность сушки.

Например, если 250 мл субстанции вводится в бутыль для плазмы объемом 500 мл, то слой будет толщиной приблизительно 70 мм. Путем вращения колбы в вертикальном положении со скоростью приблизительно 1000 об/мин замороженный жидкий продукт равномерно распределяется по стенкам бутыли с максимальной толщиной слоя 9 мм.

Колба вращается в охлаждающей бане. Вращательная заморозка позволяет получить ровный гомогенный слой. Концентрация возрастает, меняется объем и в значительной степени исключается образование различных кристаллов субстанции.

Достижимые значения давления

Кривая парообразования над льдом – зависимость давления пара от температуры льда – очень важна в ежедневной работе. При использовании систем одностадийного охлаждения (например, ALPHA 1-4, DELTA 1-24) минимально возможным давлением является только 0,021 мбар, потому что ледовый конденсатор имеет температуру –55 °C. При снижении давления, например до 0,01 мбар, начнется сублимация льда из ледового конденсатора («вторичное парообразование»).

Для сравнения: минимально возможное давление при использовании систем двухстадийного охлаждения (например, GAMMA 2-16, EPSILON 2-6D) ограничено предельным вакуумом пластинчато-роторного насоса – это приблизительно 0,005 мбар. Давление парообразования над ледовым конденсатором при –85 °C будет на порядок ниже – на уровне 0,0005 мбар.

Представленные здесь, теоретически рассчитанные величины можно получить только для полностью высушенной системы. Любая оставшаяся влага, например в выпускном отверстии, будет увеличивать достижимое итоговое давление, как результат вторичного парообразования («возможная утечка»).

Установление окончания сушки / PAT (процессно-аналитическая технология)

Остаточная влажность высушиваемой субстанции в основном зависит от температуры субстанции и уровня вакуума во время вторичной сушки.

Этап первичной сушки считается завершенным, если температуры продукта и полок становятся приблизительно одинаковыми (разность температур между полкой и продуктом приблизительно от 3 K до 5 K). После удаления из продукта абсорбированной влаги можно приступать к этапу вторичной сушки.

Предварительное заключение об окончании процесса сушки можно сделать на основании значений давления и температуры ледового конденсатора. Если ледовый конденсатор больше не нагружен, то итоговая температура составляет приблизительно –55 °C или –85 °C.

В зависимости от температуры ледового конденсатора падает давление в сушильной камере.

На рисунке 21 показан пример размещения датчиков температуры продукта. Об окончании сушки может также свидетельствовать положительная температура образцов и полок (15–20 °C), которая не отличается друг от друга более чем на 5 K. Этот показатель является более надежным, чем наблюдение за давлением и ледовым конденсатором.

На рисунке 23 показана степень влияния положения датчика в виале на регистрацию температуры продукта.

Рисунок 21. Датчик продукта в колбе с ободком, заполненной на 1 см активной субстанцией

Рисунок 22. Беспроводные и безбатарейные датчики температуры просты в использовании и не искажают температуру продукта, что часто случается при использовании проводных датчиков

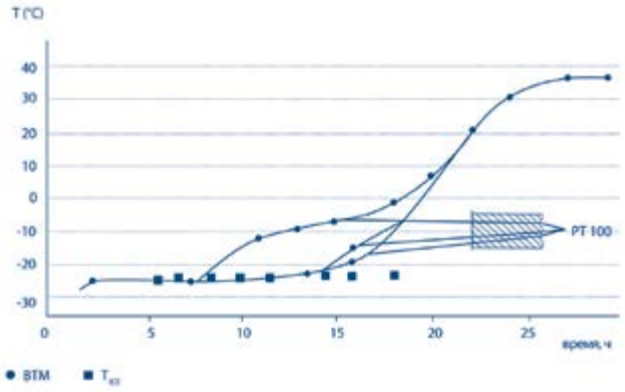


Рисунок 23. Влияние положения датчика температуры на продукт [4]

Образец может считаться полностью высушенным в первом приближении, если верхние из трех температурных датчиков показывают увеличение температуры продукта после приблизительно 7 ч. В связи с охлаждающим эффектом испарения на границе фронта сублимации повышение температуры продукта выше 0 °C занимает приблизительно 20 ч. Нижний из трех датчиков показывает наиболее правильные значения, так как он расположен непосредственно над основанием виалы или другой емкости, где материал высушивается дольше всего. Прямоугольная область на графике показывает температуру продукта на фронте сублимации, определяемую при использовании относительно нового так называемого процесса барометрического измерения температуры – специальной технологии, работающей с быстро открывающимися и закрывающимися промежуточными клапанами.

В отличие от этого практически применяемое испытание увеличением давления производится для клапанов с большим временем срабатывания (рисунок 24). Принцип основан на отделении сушильной камеры от ледового конденсатора, из-за чего не может произойти сброс сублимированного водяного пара. Это приводит к увеличению давления в камере продукта, которое может быть измерено. Однако как только происходит полное высушивание продукта, увеличение давления не происходит.

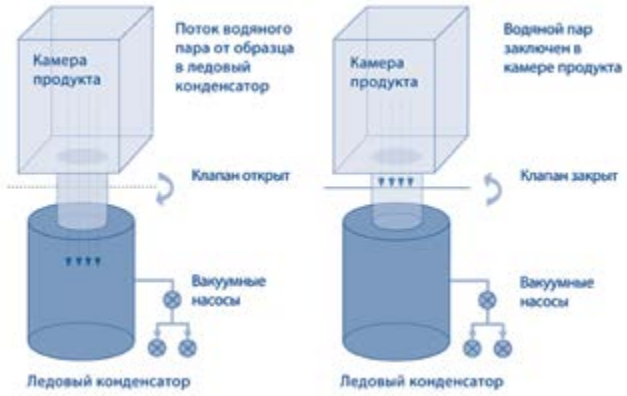


Рисунок 24. Принцип испытания повышением давления

Этот процесс нашел широкое практическое применение в областях, где лиофильные сушки регулярно используются с одинаковой загрузкой (количество и тип виал или емкостей). Испытание увеличением давления часто применяется как критерий для автоматического переключения между первичной и вторичной сушкой, а также для установления окончания процесса сушки.

При обработке чувствительных продуктов клапаны не должны быть закрыты очень долго, т.е. только на несколько секунд для предотвращения разрушения или оттаивания замороженного материала.

LyoBalance от компании CHRIST – это уникальный инструмент для разработки и оптимизации процессов в пилотном масштабе.

Система LyoBalance функционирует на основе принципа компенсации электромагнитной силы. Через определенные, предварительно установленные промежутки времени система LyoBalance взвешивает виалы и строит кривую зависимости потери массы от времени с точностью 0,001 г, что позволяет определить момент окончания процесса сушки.

При этом процесс сушки не прерывается, а весы можно разместить в любом месте камеры. Однако

Рисунок 25. Микровесы от компании CHRIST для измерения массы виал и небольших емкостей

полка, на которой расположены весы, не может быть изолирована. Более того, микровесы нельзя автоклавировать. Для контроля процесса сушки на поддонах поставляются специальные поддоны для весов.

Масс-спектрометрический датчик Lyotrack, разработанный компанией Alcatel/Adixen (Франция), не анализирует индивидуальные вещества, но позволяет контролировать процесс сушки. В определенной точке между камерой продукта и ледовым конденсатором отбирается проба пара и анализируется так называемым методом холодной плазмы. При этом измеряется отношение содержания паров воды к азоту. Чем дольше продолжается сушка, тем меньше становится доля водяного пара. Сравнение с LyoBalance показывает, что плазменный датчик Lyotrack настолько чувствителен, что не только определяет окончание первичной сушки, но и позволяет проследить выделение водяного пара во время вторичной сушки (десорбция).

Определение состава газового потока также используется в методиках, основанных на мониторинге процесса с одновременным измерением давления при использовании вакуумметра Пирани и с емкостным датчиком (измерение относительного давление). На рисунке 27 показаны оба принципа работы.

Принцип работы вакуумметра Пирани основан на измерении зависимости теплопереноса нагретой металлической проволоки от давления окружающего газа. При потере проволокой тепла изменяется её температура и соответственно электрическое сопротивление. Измеряя силу тока при пропускании через проволоку тока с постоянным напряжением, можно получить зависимость силы тока от давления. Коэффициент зависимости силы тока от давления I=f (давление) устанавливается при помощи калибровки датчика. Потеря тепла проволоки также зависит от типа газа. При большом содержании водяного пара она выше.

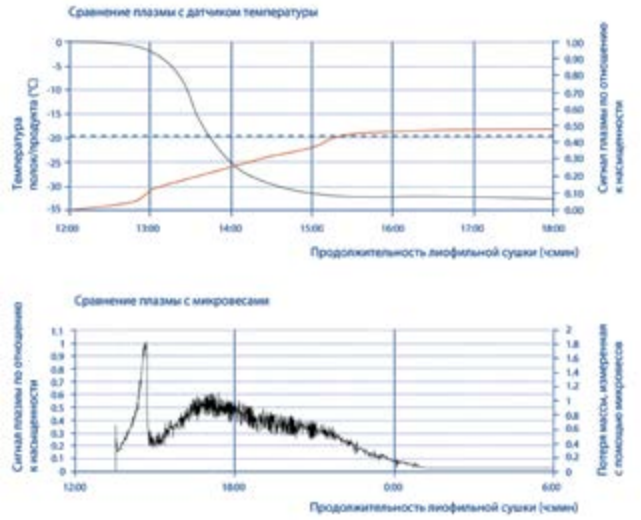


Рисунок 26. Спектрометрические измерения окончания сушки путем регистрации доли водяного пара в газовом потоке в ледовый конденсатор (создание «холодной плазмы») [7]

Рисунок 27. Принцип измерения давления при использовании вакуумметра Пирани (слева) и емкостного датчика (справа)

Действие емкостного датчика основано на отклоняющейся в зависимости от давления мембране электрического конденсатора, который не зависит от состава среды.

Поскольку показания вакуумметра Пирани зависят от типа газа, в частности в начале процесса сушки при высокой доле водяных паров измерения слишком высокие, а показания емкостного датчика не зависят от природы газа, точка пересечения двух кривых измерения свидетельствует об окончании этапа первичной сушки.

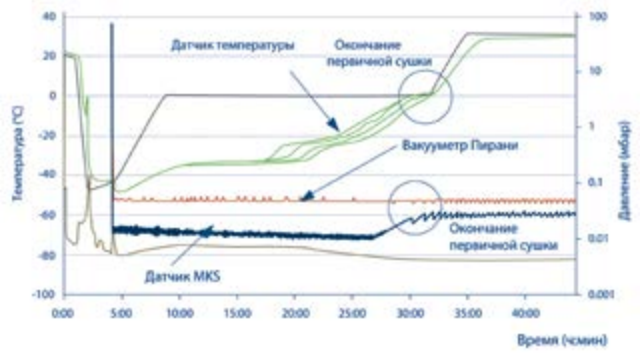


Рисунок 28. Измерение давления при использовании вакуумметра Пирани и ёмкостного датчика [5]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На рисунке 29 показан обзор основных параметров для разработки цикла сублимационной сушки.

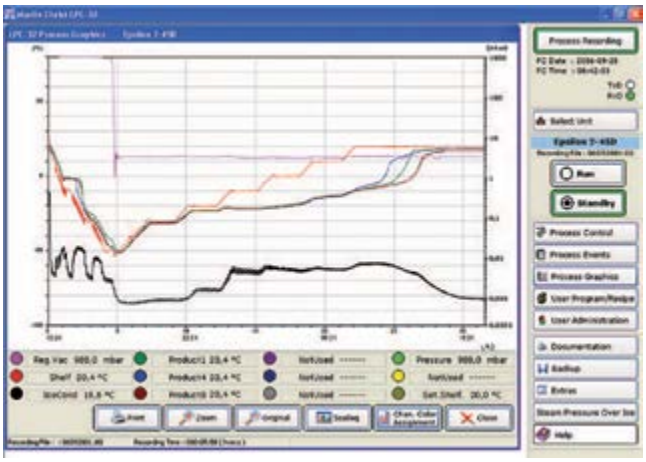


Рисунок 29. Основные параметры лиофильной сушки

Ключевым фактором является температура затвердевания рассматриваемого продукта. В качестве аппроксимации возможно регистрировать температуру охлаждения в лиофилизаторе. В точке замерзания кривая будет иметь пологую часть, то есть только после затвердевания последней капли жидкости продукт будет охлаждаться (правило фаз Гиббса). Также возможно надежное определение температуры затвердевания с помощью системы Lyocontrol. Однако этот процесс отличается меньшей точностью при использовании аморфных структур. В случае работы с такими субстанциями, например в фармацевтической промышленности, лучше использовать другие методы, например такие, как дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) или криомикроскопия.

Температура замороженного продукта перед началом сублимации должна быть приблизительно на 10 °C ниже температуры затвердевания. Величина давления при этом значении температуры должна быть выбрана с использованием кривой замерзания.

Во время первичной и вторичной сушки полки нагреваются для обеспечения необходимой энергии, однако температурный профиль полок определяется, как правило, только эмпирически.

На рисунке 30 показана зависимость скорости сублимации от давления и температуры полок.

Этот рисунок применим только для конкретного момента времени t, поскольку ряд кривых меняется в процессе образования сухого пористого слоя и давление паров постепенно падает. Подбор оптимального температурного профиля нагрева полок связан со сложными расчетами массо- и теплопереноса. В данном случае проведение нескольких опытов с температурными датчиками и системой Lyocontrol является более предпочтительным по сравнению с теоретическими расчетами.

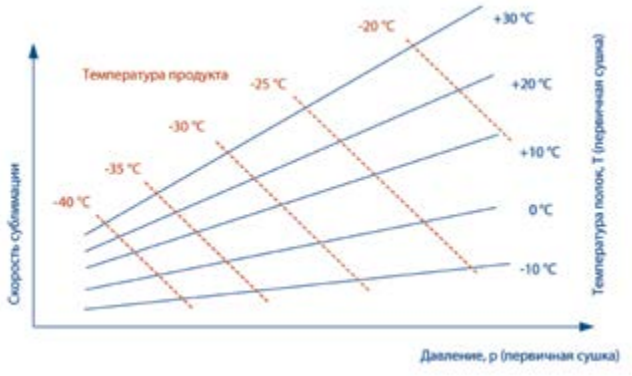


Рисунок 30. Зависимость скорости сублимации от давления p и температуры полок T с соответствующей изотермой температуры продукта [19]

Конец этапа первичной сушки может определяться при использовании датчиков температуры с помощью испытания давлением или микровесов. Для определения окончания этапа вторичной сушки испытание повышением давления – более чувствительный процесс, который является более подходящим потому, что температура продукта больше не меняется. Чувствительности весов не всегда достаточно для проведения измерений во время десорбции. Выявление остаточных водяных паров в камере также является подходящим методом (плазменный датчик Lyotrack от Adixen). Безусловно, также возможно использование манипуляторов или пробоотборных устройств для извлечения образцов во время процесса для проведения химического анализа на содержание остаточной влаги.

ЛИТЕРАТУРА

1. W. Bockelmann. Gefriertrocknung und Lagerung von Mikroorganismen. Christ-Gefriertrocknungsseminar, 3rd – 4th of march 2009, Osterode.
2. K. Hudel. Probetrocknung im Versuchslabor der Fa. Christ, 12 / 2006.
3. H. Gieseler, G. Lee. Influence of Different Cooling Rate on Cake Structure of Freeze Dried Samples Measured by Microbalance Technique. Poster presentation, Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, München 2003.
4. H. Gieseler. Gefriertrocknung von Pharmazeutika – Grundlagen der Formulierungs- und Prozessentwicklung. Christ-Gefriertrocknungsseminar, 25th of June 2003.

5. I. Presser. Gefriertrocknung von Pharmazeutika – Stabilisierungsverfahren für empfindliche Arzneistoffe. Christ Seminar – Gefriertrocknung mit System, 23rd of November 2005.
6. P. Knerr. Probetrocknung im Versuchslabor der Fa. Christ, 3 / 2008.
7. Diverse Lyotrack presentation for freeze drying, given at company Martin Christ, Alcatel / Adixen 8 / 2006.
8. F. Franks. Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 1998. № 45. P. 221–229.
9. J. Mi. Protection Mechanisms of Excipients on Lactat Dehydrogenase during Freeze-Thawing and Lyohilisation: Doctoral Dissertation. 2002.
10. S. Allison, B. Chang, T. Randolph, J. Carpenter. Hydrogen bonding between sugar and proteins is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding // Arch. Biochem. Biophys. 1999. № 365. P. 289–298.
11. Cleland & Langer Formulation and Delivery of Proteins and Peptides, Chapter 8, Freeze Drying of Proteins by Pikal M // American Chemical Society. 1994. P. 120–133.
12. G.W. Oetjen. Lyophilisation. Wiley-VCH. 1999.
13. M. Kramer. Innovatives Einfrierverfahren zur Minimierung der Prozeßzeit von Gefriertrocknungszyklen: Dissertation Universität Erlangen. 1999.
14. R. Ramott, S. Rambhatla, M. Pikal. The Effect of Nukleation Temperature on the Process of Lyophilisation. Oral Presentation at the University of Connecticut School of Pharmacy. 2002.
15. J. Searls, J. Carpenter, T. Randolph. Annealing to Optimize the Primary Drying Rate, Reduce Freeze-Induced Drying Rate Heterogeneity, and Determine Tg‘ in Pharmaceutical Lyophilisation // J. Pharm. Sci. 2001. V. 90. № 7. P. 872–887.
16. N. Milton. Evaluation of Manometric Temperature Measurement as a Method of Monitoring Produkt Temperature During Lyophilization // J. Pharm. Sci. and Techn. 1997. № 57. P. 7–16.
17. C. Roth, G. Winter, G. Lee. Continuous Measurement of Drying Rate of Crystalline and Amorphous Systems during Freeze-Drying Using an In Situ Microbalance Technique // J. Pharm. Sci. 2001. V. 90. № 9. P. 1345–1355.
18. Bedienungsanleitung Wägesystem CWS 40, Fa. Christ Gefriertrocknungsanlagen, 10 / 1997, 03 / 2000.
19. M. Pikal, S. Nail and X. Tang. Automated Process Design Through Manometric Temperature Measurement – Design of a «Smart Freeze Dryer». Conference Presentation, Freeze Drying of Pharmaceuticals and Biologicals, Breckenridge, CO. 2001.
20. M. Pikal. Lyophilisation / Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 2001. P. 1299–1326.
21. F. Fonseca, S. Passot, C. Trelea, M. Marin. Impact of physical properties of bioproducts on formulation and on freeze-drying cycle development. Vienna Congess ISPE, Sept 2006.
22. G. Jiang, M. Akers et al. Mechanist Studies of Glass Vial Breakage for Frozen Formulations I. Vial Breakage Caused by Crystallizable Excipient Mannitol // PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2007. V. 61. № 6. P. 241–272.
23. G. Jiang, M. Akers et al. Mechanist Studies of Glass Vial Breakage for Frozen Formulations I. Vial Breakage Caused by Amorphous Protein Formulations // PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2007. V. 61. № 6. P. 292–306.
24. X. Tang, M. Pical. Design of freeze drying for pharmaceuticals: practical advice // Pharm. Res. 2004. № 21(2). P. 191–200.
25. J.F. Carpenter, M.J. Pikal, B.S. Chang, T.W. Randolph. Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice // Pharm. Res. 1997. № 14. P. 969–975.
26. X.C. Tang, S.L. Nail, M.J. Pikal. Evaluation of Manometric Temperature Maesurement, a Process Analytical Technology Tool for Freeze-drying: Part II Measurement of Dry-layer Resistance // PharmaSciTech. 2006. № 7(4). Article 93.
27. B.S. Chang, N.L. Fischer. Development of an Efficient Single-step Freeze-Drying Cycle For Protein Formulations // Pharmaceutical Research. 1995. V. 12, №. 6. P. 48-64.
28. I. Presser, N. Denkinger, H. Hoermann, G. Winter. New methods in the monitoring of freeze drying processes: Validation of the microbalance. Central European Symposium Pharmaceutical Technology Conference, Vienna 2001.
29. I. Presser, N. Denkinger, H. Hoermann, G. Winter. New methods in the monitoring of freeze drying processes: near infrared spectroscopy determination of residue moisture during freeze drying. Protein Stability Conference, Breckenridge, Colorado 2002.

CHRIST

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ АНАЛИЗА ВЛАЖНОСТИ ПРОДУКЦИИ ОТ ЯПОНСКОГО ПРОИЗВОДИТЕЛЯ SHINKO DENSHI БРЕНДА VIBRA

Материал предоставлен компанией ООО «ВИБРА РУС»

ВВЕДЕНИЕ

Влагомеры, или анализаторы влажности, – электронные приборы, предназначенные для быстрого и точного определения влажности готового продукта и содержания влаги в разных материалах. Влажность определяется процентным соотношением массы воды к массе материала. Существует три типа измерительных стандартов: измерения, связанные с изменением содержания влаги, измерения, связанные с изменением содержания сухого вещества, и измерения, связанные с содержанием твердого вещества.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Тип	Формула	Описание
Влажный	$\frac{W-D}{W}\times 100\%$	Процент массы выпаренной влаги к массе образца перед высушиванием
Сухой	$\frac{W-D}{D}\times 100\%$	Процент массы выпаренной влаги к массе образца после высушивания
Твердый	$\frac{D}{W}\times 100\%$	Процент остаточной массы образца после высушивания относительно массы образца перед высушиванием

Примечание: Обозначения используемые в формуле: W – вес содержания влаги до измерения; D – сухой вес после измерения

Пока измерения выполняются, вес в каждый момент времени используется в качестве сухого остатка. В анализаторах влажности VIBRA серии MD используются все три типа измерительных стандартов.

АНАЛИЗАТОРЫ ВЛАЖНОСТИ VIBRA СЕРИИ MD

Анализаторы влажности используются в науке, промышленности и сельском хозяйстве, где также известны под названием «измерители влажности зерна» или «влагомеры зерна». Такое обозначение может создать ощущение, что сфера применения этих приборов очень узка и специфична, но это не так.

Лабораторные электронные влагомеры могут проводить анализ любых образцов в самых различных областях производства:

- фармацевтических изделий – суспензий, таблеток, компонентов;
- сельскохозяйственной продукции – семян, злаков, удобрений;
- продуктов питания – муки, выпечки, чая;
- строительных и промышленных материалов – древесины, полимеров, красок;

- тканей и текстильных изделий – хлопчатобумажных, шерстяных, синтетических.

Современные измерители влажности имеют несколько режимов работы, позволяя пользователю, в зависимости от типа исследуемого материала, выбирать и контролировать параметры сушки. Во влагомерах реализованы встроенные критерии установки сушки: автоматический, полуавтоматический, по времени. Работать с анализаторами влажности чрезвычайно просто, интуитивно понятная панель управления позволяет оператору с легкостью выполнять поставленные задачи.

VIBRA серии MD имеет автоматический режим измерения, при котором прибор контролирует процесс сушки и автоматически останавливает анализ в нужное время. Анализатор влажности легко содержать в чистоте и порядке, благодаря простому устройству оборудования.

Работа современных анализаторов основана на точном методе измерения влажности – сушильно-весовом. Он заключается в равномерном подогреве и взвешивании образца. В японских анализаторах марки ViBRA используется нагреватель из углеродного волокна высокой мощности и современные методы обработки данных. Это гарантирует достоверность данных и долгий срок службы устройства. Кроме того, для удобства использования эти влагомеры оснащены функцией автоматического определения веса тары – тарирования.

Сушильно-весовой метод называют прямым методом измерения влажности: он наиболее точен, но трудоемок, так как для этого требуется совместное использование сушилки, высокоточных весов и эксикаторов, что делает процесс дорогостоящим и трудоемким. Анализаторы влажности, работающие по косвенным методам, к которым относятся кондуктометрический, емкостный, сверхвысокочастотный и инфракрасный, действуют путем обезвоживания объекта. Влагомеры, работающие по этим методам, измеряют не саму влажность, а связанный с ней физический параметр и переводят измеренную величину в значение влажности. Косвенные методы требуют предва-

рительной градуировки с целью установления зависимости между влажностью материала и измеряемой величиной.

Анализатор влажности **VIBRA серии MD** позволяет определить содержание влаги в исследуемых образцах. Устройство является экологически безопасным источником высоких температур благодаря уникальному нагревателю из органического углеродного волокна с большой мощностью.

Принцип действия анализатора основан на термогравиметрическом анализе, при котором происходит измерение массы образца, его сушка в заданном оператором режиме, измерение массы остатка и вычисление относительного изменения массы. На дисплее отображается результат измерений массовой доли влаги и массовая доля сухого остатка (в процентах).

Анализаторы снабжены следующими устройствами и функциями:

- юстировка весоизмерительного устройства с помощью внешней гири;
- установка различных режимов сушки образца (автоматический, по времени, ускоренный, пошаговый);
- устройство для установки показаний анализатора на ноль по команде оператора в режиме отображения массы образца;
- установка различных температур сушки;
- самодиагностика;
- отображение влажности и массы образца.

Анализаторы оснащены цифровым интерфейсом связи для передачи данных на периферийные устройства (например, персональный компьютер, принтер).

ПРЕИМУЩЕСТВА АНАЛИЗАТОРА ВЛАЖНОСТИ VIBRA

При всей сложности прибора, его эксплуатация максимально упрощена. **Влагомер VIBRA** самостоятельно контролирует степень и интенсивность нагрева, прекращая его в нужный момент. Подключение прибора к компьютеру и периферии расширяет его возможности, позволяя интегрировать данные в общую информационную систему лаборатории и выводить их на печать.

Надежность измерительных сведений анализатора влажности VIBRA серии MD – один из самых важных факторов устройства. Комбинация системы автоматического определения веса тары и недавно разработанного инновационного нагревателя из органического углеродного волокна дает превосходную воспроизводимость результатов измерения.

Источником нагрева служит карбоновый конвектор. Этот нагреватель выделяет инфракрасное излучение более чем в 2 раза интенсивнее, чем галогеновый нагреватель в диапазоне длины волн от 2,5 до 3 мкм. Конвектор работает в средневолновом инфракрасном диапазоне и не создает магнитных полей, воздействующих на сенсор определения. Срок службы конвектора составляет 7000 ч. Столько же по времени работают 4 обычные инфракрасные лампы.

Современный инфракрасный термогравиметрический анализатор влажности позволяет определять содержание влаги с точностью от **0,1 до 0,01%**. Память на 50 результатов, **2 режима сушки** и 5 настроек сохранения параметров позволяют использовать прибор для широкого спектра образцов в различных областях науки, сельского хозяйства и промышленности. **Температура сушки от 30 до 180 °С.**

Запатентованная **автоматическая система тарирования** позволяет компенсировать дрейф показаний даже во время длительного процесса сушки и значительно повысить точность измерений.

Отличительной особенностью анализатора влажности VIBRA серии MD является то, что в нем есть встроенный микролифт, который поднимает образец для сушки, разгружая весовую ячейку через заданные оператором промежутки времени, улучшая воспроизводимость показаний массы.

Влагомер прост в управлении, оснащен защищенной мембранной клавиатурой и ярким жидкокристаллическим дисплеем с индикацией выбранного режима и версии встроенной программы, температуры, массы пробы, содержания влаги и сухого остатка (%).

Для удобства пользователей в комплект поставки анализатора влажности входят две платформы для взвешивания с держателями, набор ложек, запасной сетевой предохранитель и 10 одноразовых чашек для сушки проб.

Инфракрасный термогравиметрический влагомер MD-83 производится в Японии компанией Shinko Denshi, гарантия изготовителя на прибор – 1 год.

СОВРЕМЕННЫЕ РЕШЕНИЯ В ОБЛАСТИ УПАКОВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Материал предоставлен компанией CUBE

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время всё больше ужесточаются требования GMP к упаковке лекарственных средств (ЛС). Вследствие этого увеличиваются требования к оборудованию, используемому упаковки ЛС в блистеры.

В данной статье мы рассмотрим линейную блистерную машину B300P производства CUBE (Корея), которая позволяет решить проблему в области упаковки таблеток и мягких желатиновых капсул. CUBE – один из лидеров рынка в области линий производства мягких желатиновых капсул и блистерной упаковки для фармацевтической и пищевой промышленности. С желанием постоянного технологического развития и поиска инноваций, конкурентоспособности на рынке группа компаний CUBE производит высококачественное оборудование.

Рисунок 1. Общий вид линейной блистерной машины B300P

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Линейная блистерная машина разработана и сконструирована в соответствии с требованиями фармацевтической и пищевой промышленности, отвечает GMP-стандартам. Компактная линейная машина обеспечивает гибкий график и широкий ассортимент выпускаемой продукции. Кроме того, машина обладает довольно высокой производительностью для удовлетворения потребностей клиента. Программное обеспечение предоставляет возможность управления и контроля производственных партий с разделением уровней доступа. Управление осуществляется при помощи ПЛК и сенсорной панели управления с доступным и легким интерфейсом. При помощи ПО оператор может управлять всеми автоматизированными узлами машины, такими как узлы на сервоприводах, для увеличения производительности, точности и прочих параметров.

ПРЕИМУЩЕСТВА ЛИНЕЙНОЙ БЛИСТЕРНОЙ МАШИНЫ

Одним из основных преимуществ данной машины является её «балконная конструкция», что позволяет совместить компактный и эргономичный дизайн с удобством обслуживания. Данный вид конструкции применяется для разделения рабочей и механической зоны машины. Электропроводка и пневматические шланги разделены для улучшения показателей стабильности работы, проведения сервисного обслуживания и безопасности.

Также имеется понятная и дружественная система управления при помощи ПЛК.

- Запись данных и параметров каждого продукта при помощи сенсорного экрана.
- Защита паролем режима внесения изменений конфигурации системы.
- Отображение рабочей скорости, количества произведенного продукта, сообщений об ошибках и т.д. на сенсорном экране.

Машина имеет быструю и простую замену сменных форматных частей с использованием минимального набора инструментов.

КОНСТРУКТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ

1 секция: так называемые медленные механизмы:

- Система разматывания формовочной пленки с механизмом фиксации бобины.
- Максимальный диаметр бобины 500 мм, внутренний диаметр 76 мм.
- Монтажный стол для легкой замены и подачи пленки. Подача формовочной пленки происходит при помощи направляющей после подачи пленки в зажимное устройство через катушку бобины и направляющего ролика после поднятия прижимного ролика вверх. Формовочная пленка, которая проходит через ролик, контролируется при помощи лазерного датчика.
- Моторизированная система разматывания пленки с контролем уровня при помощи датчика положения. Благодаря наличию соединительного устройства происходит соединение концов старой и новой бобин, что позволяет минимизировать время прерывания работы. В случае отсутствия пленки машина автоматически останавливается.
- Узел предварительного нагрева позволяет проводить предварительное нагревание пленки ПВХ до необходимой температуры, за счет чего обеспечивается однородность формовки. ПВХ-пленка настраивается по ширине (влево / вправо) при помощи устройства позиционирования, после чего нагревается при помощи пластины нагревателя со встроенным патроном, которая передвигается вверх / вниз. Воздушный цилиндр под давлением, который установлен на верхнем нагревателе, обеспечивает предварительное нагревание во время запуска и любого этапа работы машины.
- Многослойная термоформовка (линейная).
- Верхняя нагревающая пластина поднимается вверх после остановки машины.
- Четырехпозиционный узел формовки для управления верхними и нижними пластинами обеспечивает формовку предварительно нагретой пленки ПВХ, которая проходит через верхнюю и нижнюю пресс-формы со сжатым воздухом. ПВХ-пленка нагревается на узле предварительного нагревания. Станция формовки передвигается вверх и вниз при помощи кулачка и коленно-рычажного механизма, который подключен к коленвалу. Основная формовка пленки ПВХ выполняется при помощи фиксированной нижней формы для выдувания и верхней пластины с механическим приводом. Формовка завершается после введения формовочного пуансона в нижнюю пресс-форму. Замена верхней и нижней пластины для проведения настроек происходит быстро благодаря особенностям конструкции: в нижней части узла установлена дисковая коническая пружина, которая позволяет уменьшить нагрузку во время контакта верхней и нижней пластин; охлаждающая пластина, которая установлена на верхней и нижней пластинах, предотвращает перегревание формующей пластины.

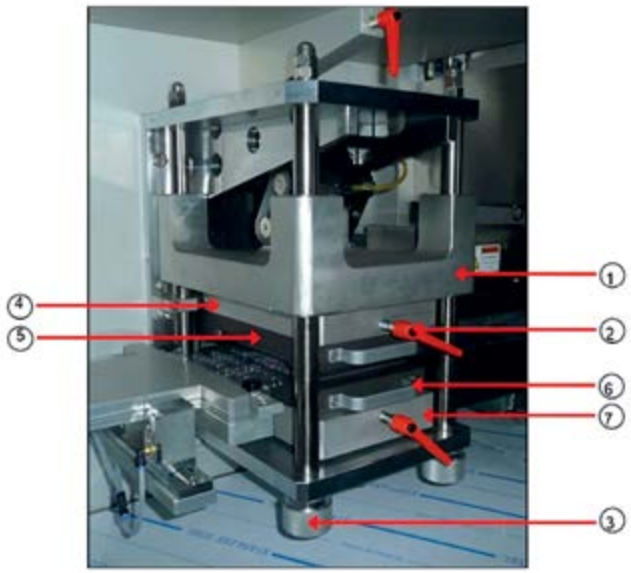


Рисунок 2. Узел формовки.

Обозначения на рисунке: 1 – формующее устройство со сдвигом; 2 – пресс-форма; 3 – зажимная рукоятка; 4 – выдувная форма; 5 – контргайка; 6 – нижняя охлаждающая пластина; 7 – верхняя охлаждающая пластина

- Секция охлаждения. Поток охлаждающей воды поступает при помощи автоматического чиллера, который находится на внешней части машины. Тем самым осуществляется защита верхней пресс-формы от высоких температур (форма может нагреваться за счет предварительно нагретой пленки ПВХ во время процесса формовки).
- Использование серводвигателя для достижения оптимальных условий формовки и максимальной скорости.
- Система захвата и передвижения с функцией самонастройки обеспечивает точное перемещение сформированных блистеров. Блистер перемещается при помощи ремня ГРМ, который подключен к серводвигателю комплекта захватов (с цилиндром) пленки ПВХ.
- Универсальная система подачи продукта для установки различных питателей. Метод подачи продукта при помощи рельсовой цепи используется для наполнения материала, в то время как щеточный питатель используется для капсул. Таблетки и капсулы подаются из бункера при помощи виброустройства. Тип питателя подбирается, исходя из характеристик продукта (форма и параметры таблетки, капсулы). Ручейковый питатель используется для таблеток, покрытых оболочкой, а щеточный питатель – для наполнения капсул. Он может быть использован вне зависимости от их размера. Продукт из линейного виброустройства попадает в щеточный питатель и наполняется при помощи двух горизонтальных щеточных роликов и одного комплекта вертикальных лопастей. Узел подачи продукта может работать двумя различными способами. Первый – подача таблеток с покрытием и капсул при помощи щеточного питателя, второй – подача таблеток без покрытия. Оба способа используют бункер, расположенный на линейном питателе. В случае с таблетками без покрытия они попадают в круглый питатель из линейного питателя и по порядку направляются в ячейки сформированного блистера. В случае с таблетками с покрытием и капсулами щеточный питатель используется для прямого наполнения, так таблетки и капсулы не создают пыли. Количество таблеток (уровень), которые подаются из линейного питателя в щеточный через шланг, контролируется при помощи датчика. Они попадают в ячейки блистера при помощи поворота двух горизонтальных щеточных роликов и одного комплекта вертикальных резиновых лопастей. Бункер и ручейковый питатель поворачиваются для быстрого демонтажа и очистки. Пыль удаляется через лицевую часть ручейкового питателя. Узел удаления пыли очищает поверхность пленки ПВХ и ячейки блистера после наполнения.
- Система управления уровнем для остановки машины в случае, когда продукт выступает над пленкой.
- Подача фольги при помощи системы контроля натяжения. Максимальный диаметр бобины 260 мм, внутренний диаметр 76 мм. Машина автоматически останавливается в случае отсутствия фольги. Натяжной ролик обеспечива-

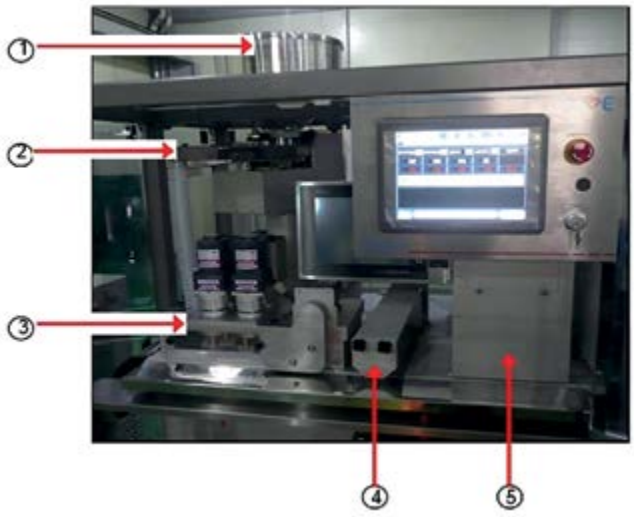


Рисунок 3. Узел подачи продукта.

Обозначения: 1 – бункер (опционально); 2 – ручейковый (линейный) питатель; 3 – система визуальной инспекции; 4 – устройство подачи продукта; 5 – роликовая щетка + клапанный затвор с контролем уровня

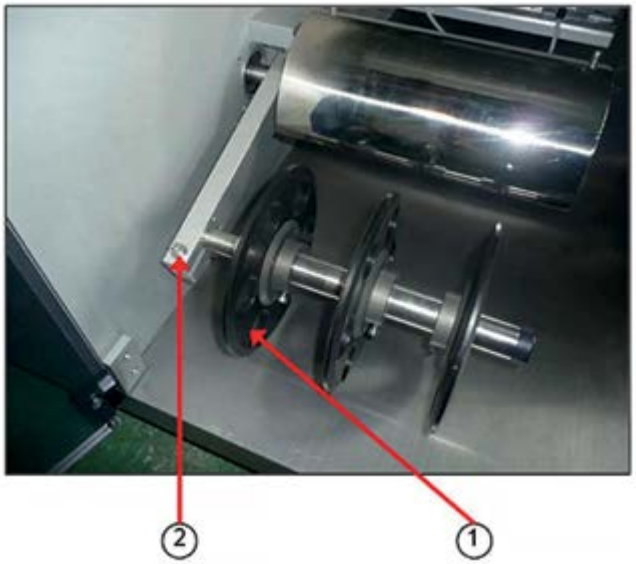


Рисунок 4. **Натяжной ролик: 1 – натяжной ролик; 2 – болты**

ет перемещение сформированной пленки для блистера из пластины узла перемещения в узел подачи продукта с соответствующим усилием. Данная система состоит из натяжного ролика и зафиксированной радиальной направляющей. Натяжной ролик создает соответствующее натяжение, которое необходимо для перемещения материала из пластины узла перемещения при помощи поднятия и опускания. Необходимо менять натяжной ролик в случае использования различных видов продуктов.

- Четырехпозиционная секция запаивания для управления верхними и нижними пластинами. Сформированный блистер после наполнения ячеек термически скрепляется с алюминиевой фольгой в узле запайки. Нагрев обеспечивается при помощи верхней запаечной пластины, которая передвигается вверх и вниз. Охлаждающая пластина, которая установлена на верхней и нижней пластинах, предотвращает перегрев машины. Верхняя запаечная пластина передвигается вверх при помощи пневматического цилиндра, что обеспечивает защиту блистера от повреждений после остановки машины. Дисковая коническая пружина, которая установлена на верхней пластине, позволяет уменьшать нагрузку во время контакта верхней и нижней пластин. Давление, которое оказывается на верхнюю пластину, способствует процессу запайки блистера. На верхней пластине установлен датчик, который обеспечивает остановку машину в случае появления чрезмерных нагрузок или излома дисковой конической пружины, что позволяет защитить машину от повреждений.

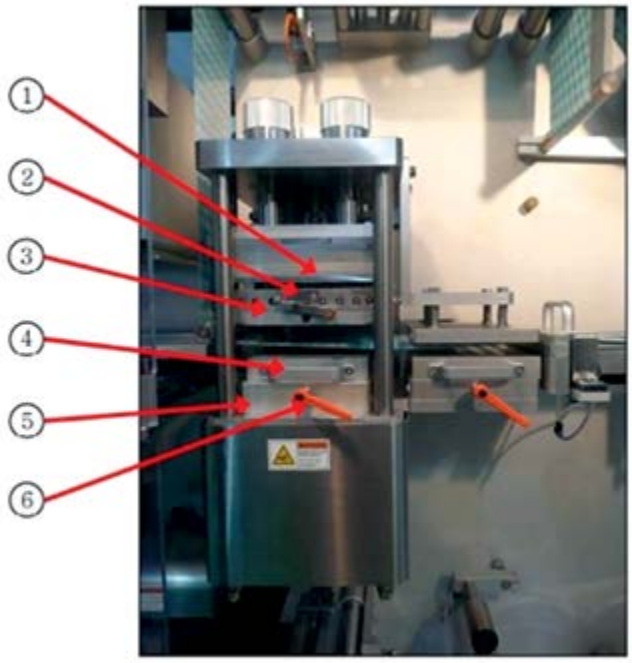


Рисунок 5. **Нижняя и верхняя часть узла запайки.**

1 – устройство для защиты от перегрева запаивающего узела; 2 – оснащен охлаждающей пластиной; 3 – нижняя часть узла запайки без нагревателей; 4 – устройство для разблокировки нижней части узла запайки; 5 – запайки установлены на охлаждающей пластине, которая подключена к чиллеру; 6 – при помощи ручки необходимо ослабить запайку и вытянуть

2 секция: быстрые механизмы:

- Самонастраивающаяся система позиционирования ролика с серводвигателем и датчиком. Серводвигатель управляет обрезкой / перфорацией и пробивкой.

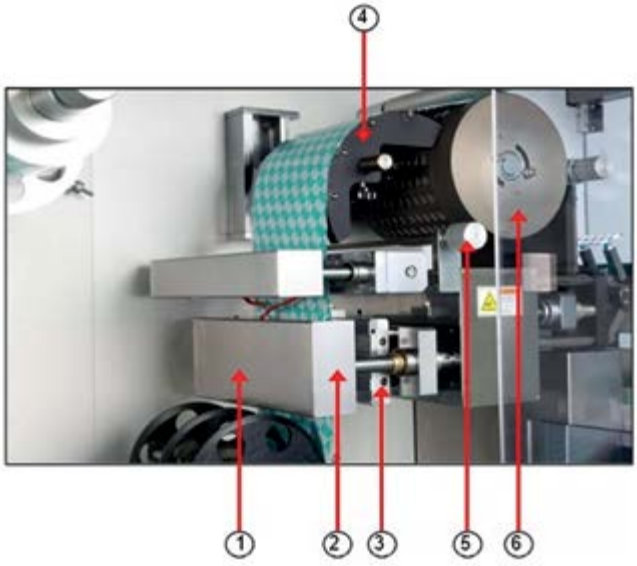


Рисунок 6. **Узел обрезки и перфорации.**

1 – защитная крышка; 2 – матрица и основание узла обрезки; 3 – форма перфорации и обрезки; 4 – направляющая (3); 5 – рычаг управления уровня направляющей; 6 – система перемещения (3)

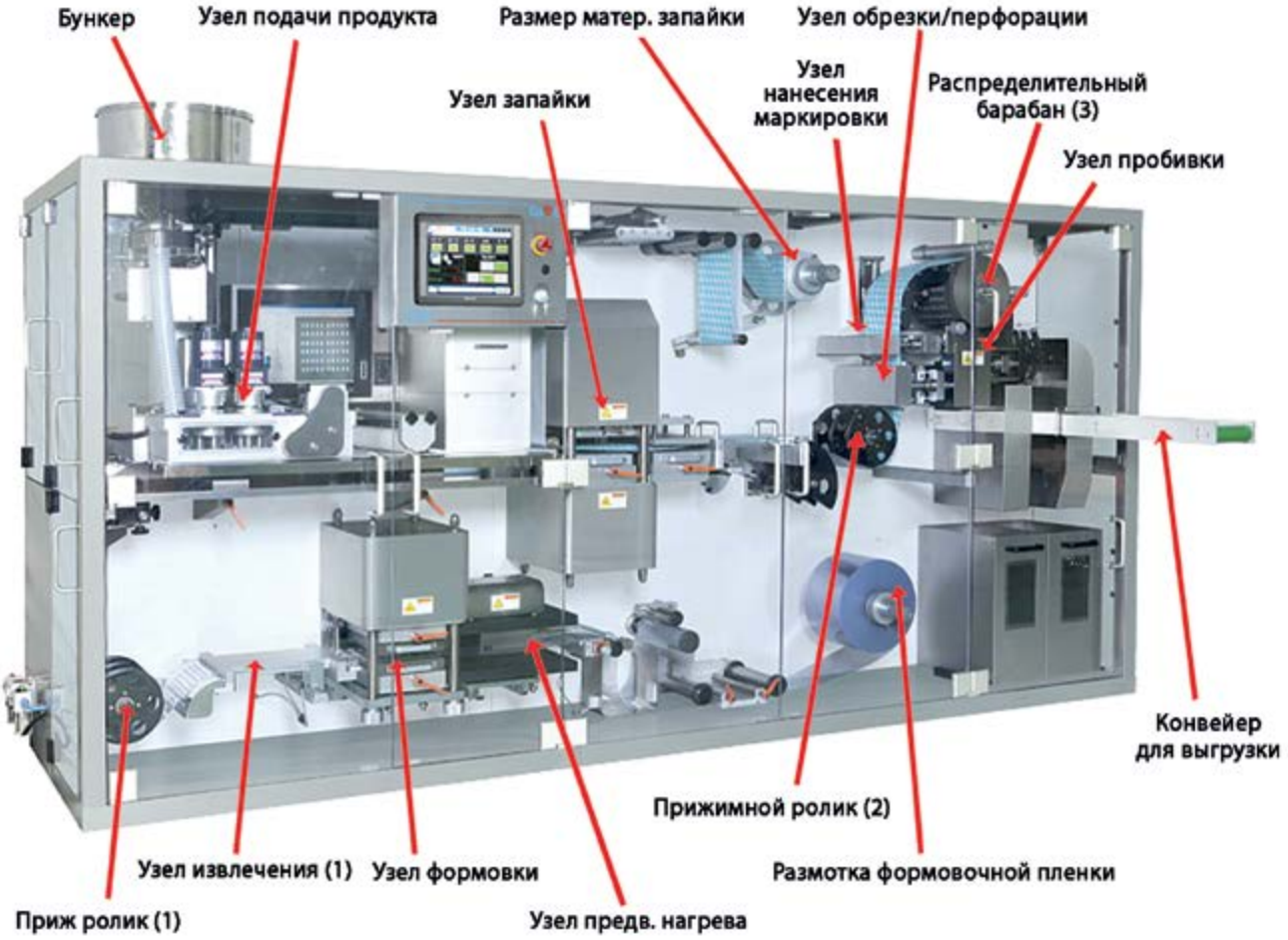


Рисунок 7. Общий вид блистерной машины

- Узел обрезки / перфорации приводится в действие при помощи вала с ремнем, выполняя перфорацию или обрезку сформированного блистера. Линия обрезки наносится на пленку ПВХ на определенную глубину при помощи ножа с подогревом. Узел перфорации находится левой стороны, а узел пробивки – с правой. Оба узла функционируют одновременно при помощи вала и рычага коленно-рычажного механизма.
- Легкая и простая маркировка может быть выполнена после установки узла тиснения, с помощью которого и происходит нанесение маркировки: даты производства, серийного номера и иной цифровой информации.
- Позиционирование согласующего вала при помощи системы серводвигателя для точного передвижения пленки в зону пробивки.
- Узел пробивки.
- Перекладчик блистеров с присосками для выгрузки. Вакуумная присоска удерживает блистер и размещает его на ленте конвейера при помощи специального механизма, который передвигается вверх и вниз. Остатки пленки выгружаются в коллекторный контейнер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье мы постарались представить основные конструкционные особенности блистерной машины B300P с производительной мощностью 300 бл/мин. Машина разработана и сконструирована в соответствии с требованиями фармацевтической и пищевой промышленности и отвечает GMP- и CE-стандартам. Её основные преимущества по сравнению с устройствами других производителей – высокая производительность при компактных размерах, быстрая смена форматных частей и их доступность, высокий уровень автоматизации и др.

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

Конгрессно-выставочные мероприятия при поддержке Минпромторга России

II полугодие 2016 года

13-15 сентября	II-я международная специализированная выставка «Импортозамещение»
14-17 сентября	VI Международная выставка «Реабилитация. Доступная среда 2016»
20-22 сентября	Первая всероссийская GMP конференция
20-23 сентября	Российский национальный конгресс кардиологов
26-27 сентября	Конференция по биотехнологиям «Биотехмед»
27-30 сентября	XVII Всероссийский научно-образовательный форум «Мать и дитя 2016»
28 сентября - 1 октября	Rehacare International
29-30 сентября	XVIII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Давиденковские чтения» (неврология)
3-5 октября	XXII Объединённая российская гастроэнтерологическая неделя
4-6 октября	CPhI Worldwide
6-7 октября	IV Национальная конференция «Общество для всех возрастов 2016»
12-14 октября	Российский конгресс лабораторной медицины
18-21 октября	XXVI Национальный конгресс по болезням органов дыхания
20-22 октября	XVI Конгресс Российского Общества Урологов
дата уточняется	Актуальные клинико-технологические решения в хирургии позвоночника. Формирование идеологии по разработке отечественных конструкций и технологий производства
дата уточняется	Иммунобиологический щит России
3-4 ноября	Международная конференция травматологов-ортопедов «ТРАВМА 2016»
7-9 ноября	Конгресс Российского общества рентгенологов и радиологов
9-10 ноября	VII Всероссийский конгресс пациентов
9-10 ноября	VI Международный партнеринг-форум «Life Sciences Invest. Partnering Russia»
17-19 ноября	V Конгресс Национальной ассоциации фтизиатров
21-24 ноября	III-й Международный конгресс «Раны и раневые инфекции» с конференцией «Проблемы анестезии и интенсивной терапии раневых инфекций»
22-25 ноября	18-я Международная выставка оборудования, сырья и технологий для фармацевтического производства «Pharmtech & Ingredients 2016»
27-30 ноября	XXII Всероссийский съезд сердечно-сосудистых хирургов
1 декабря	Первый национальный форум реабилитационных технологий «Надежда на технологии»
5-9 декабря	Демонстрация результатов государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013-2020 годы

По вопросам участия обращайтесь
в Центр корпоративных
коммуникаций S-GROUP
+7 499 340 25 11
info@sgr.com.ru

S·GROUP

Актуальная информация:
pharmmedexpo.ru
фарммедпром.рф

Федеральная сеть сервисных центров «Фармконтракт»

В рамках клиентского сервиса Вы получаете следующий комплекс услуг по техническому обслуживанию оборудования ведущих мировых производителей:

Инсталляция, IQ/OQ/PQ квалификационные работы и калибровка оборудования в соответствии с требованиями нормативов USP, FIP и GMP

Составление досье на оборудование

Сервисное обслуживание: настройка, поверка и калибровка, валидация, аттестация и идентификация оборудования

Обучение персонала работе на новых моделях оборудования, правилам текущего ремонта и обслуживания

Разработка методик анализа и их установка на конкретную модель прибора заказчика

Метрологическое обслуживание средств измерений

Гарантийное и пост гарантийное обслуживание оборудования от сертифицированных сервисных инженеров

Валидация чистых помещений

«Фармконтракт Сервис» - авторизованный сервисный центр

büchi glas uster · SKALAR · BUCHI · SYSTAG · ESCO · METTLER TOLEDO · OL pharm PRO

SCHMIZO · INTEGRA · ERWEKA · Agilent Technologies · CHRIST · Julabo · BINDER

Miele PROFESSIONAL · Nabertherm · cisa · Nabertherm · M · IKA · sigma

РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКОГО И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ

скидка 5%
до конца июня 2016 г.*

Всегда в наличии всегда расходные материалы и запчасти для оборудования, задействованного в процессах:

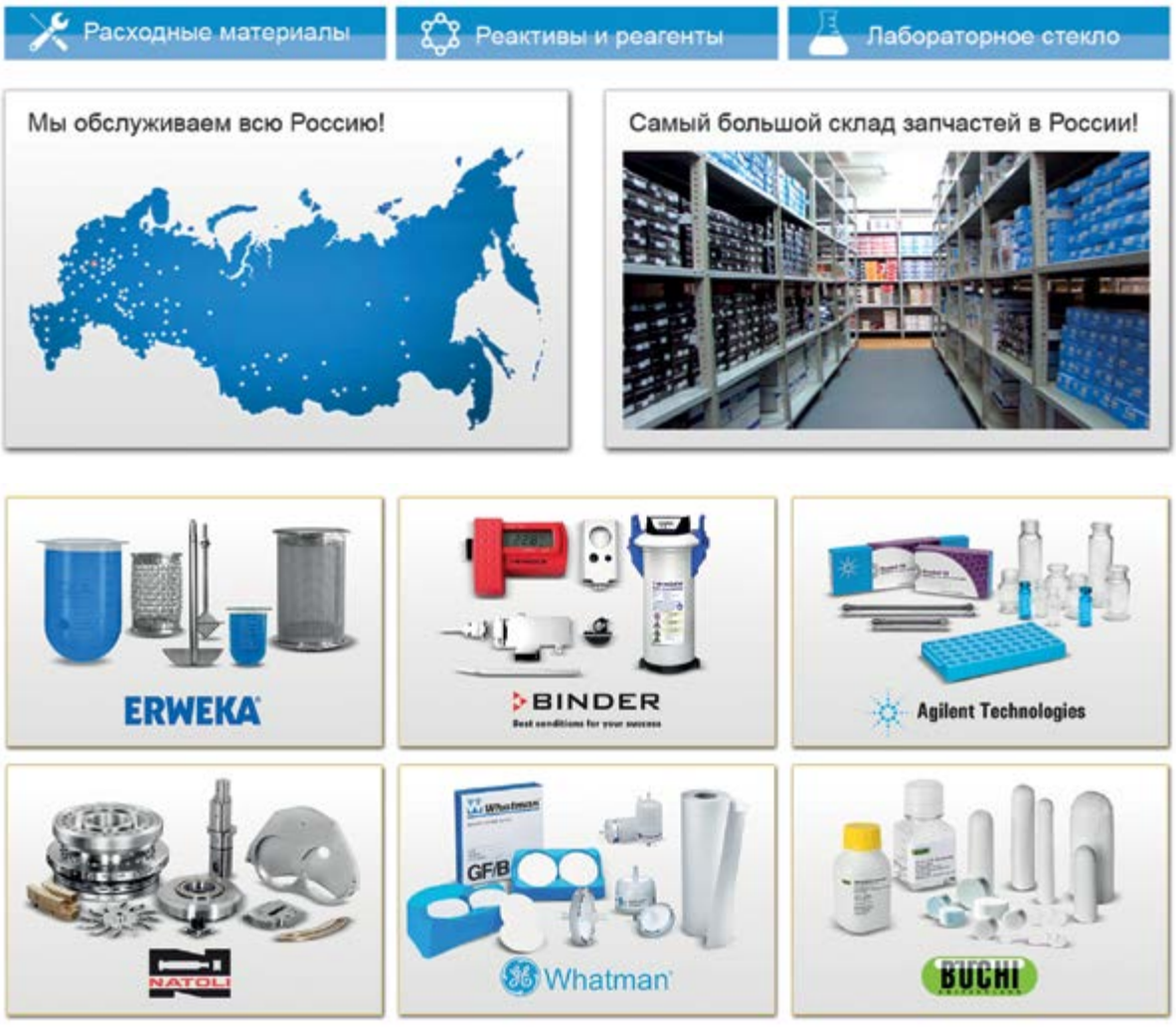
- **анализа и испытаний при создании, производстве и контроле качества фармацевтических и ветеринарных препаратов;**
- **диагностических и экспертных исследований в области клинической и судебной медицины, токсикологического и экологического анализа**

**О наличии товара на складе уточняйте у менеджеров*

+7 (499) 674-09-45 (центральный офис в Москве) 8 (800) 333-93-92 (бесплатный звонок) info@phct-service.ru wwwphct-service.ru

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОГО ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Научно-производственный рецензируемый журнал из перечня ВАК «Разработка и регистрация лекарственных средств» регулярно публикует статьи о новинках в области производства современного оборудования, задействованного на всех этапах производства лекарственных средств и различных химических продуктов. Более того, 90% научных статей нашего издания – это результаты реальных исследований, которые проводятся как специалистами компаний-производителей лекарственных препаратов и химических продуктов, так и учеными-исследователями. Практически в каждой из таких статей довольно подробно описан процесс его проведения на конкретных единицах оборудования. Но правила работы, особенности технического обслуживания описываемых приборов остаются за рамками статей. Этот немаловажный момент довольно часто упускается из виду не только при проведении исследований или в ходе R&D, но даже на этапе закупки. Именно поэтому представленный Вашему вниманию номер мы хотим завершить материалом в форме блиц-интервью сервисной службы ГК «Фармконтракт», которая не просто оказывает профессиональные услуги по вводу в эксплуатацию, квалификации и калибровке, гарантийному и постгарантийному обслуживанию широкого парка европейского оборудования, а также по подбору необходимых комплектующих, оригинальных расходных материалов, но, по сути, обеспечивает бесперебойный выпуск российских лекарственных средств.



Эти люди, сертифицированные заводами-изготовителями высокотехнологичного оборудования сервисные инженеры рассказали нам, почему так важно уделять внимание сервису и поделились своим видением клиент-партнерских отношений.

Исхакова Юлия – руководитель сервисной службы:

Сервисная поддержка клиентов Группы компаний «Фармконтатркт» является одним из основных направлений деятельности компании.

Основная задача, поставленная перед нами, – грамотный и лояльный подход к решению задач наших заказчиков и партнеров.

Сотрудники сервисной службы всегда готовы оказать всестороннюю поддержку как нашим постоянным (работающим по долгосрочным сервисным договорам), так и новым клиентам. Мы стараемся оказать помощь в решении практически любых проблем в максимально короткие сроки и с гарантированными обязательствами.

Расширенный спектр услуг по обеспечению бесперебойного функционирования включает в себя ввод оборудования в эксплуатацию, проведение пуско-наладочных работ и квалификации оборудования, обучение сотрудников лабораторий, гарантийную и постгарантийную поддержку.

Группа компаний «Фармконтракт» имеет государственную лицензию на осуществление дополнительного профессионального образования, в связи с чем наши специалисты всегда готовы оказать научно-практические консультации и обучение персонала лабораторий по работе и обслуживанию оборудования с выдачей аттестата государственного образца о повышении квалификации и профессиональной переподготовке специалистов.

Наши специалисты проводят разработку и постановку методик, помогают в проведении аттестации оборудования и метрологической поддержке.

Вы всегда можете рассчитывать на бесплатную техническую поддержку сервисных инженеров в режиме 24/7.

Шкутов Дмитрий – технический директор:

Сервисный отдел, имея в своём составе сертифицированных специалистов, в состоянии решать задачи, связанные как с переоснащением производств и лабораторий, так и с обучением персонала для работы на оборудовании.

Мы готовы подготовить для заказчиков технические решения, связанные с ремонтом нестандартного оборудования, и подготовить рекомендации для проведение планового технического обслуживания оборудования, установленного нашей компанией.

Каждый раз, инсталлируя новое оборудование, мы постоянно пополняем наши технические знания и возможности в различных направлениях, начиная от простейших установок и до методической поддержки сложных химических процессов и методик.

Инженерный состав, проходя ежегодные специализированные сервисные тренинги, имеет все возможности для технической поддержки полной линейки оборудования, которое поставляет Группа компаний «Фармконтракт».

Головин Дмитрий – продажа сервисных услуг, служба внутреннего контроля:

В мои задачи входит проработка совместно с заказчиком индивидуальных условий оказания сервисных услуг и контроль работы сервисных инженеров на территории заказчика.

Большое количество сертифицированных сервисных инженеров в штате нашей сервисной службы, собственный склад наиболее востребованных запасных частей и расходных материалов и налаженные партнерские связи с сервисными службами прочих производителей позволяют нам заключать комплексные сервисные контракты с лабораториями контроля качества лекарственных средств, фармацевтическими производствами, а также научно-исследовательскими центрами, осуществляющими изыскания в области химических и фармацевтических разработок.

Мы строго следим за оперативным реагированием на запрос заказчиков. Установленный срок выезда специалиста по Москве и Московской области – 2 рабочих дня, в другие регионы – от 5 до 10 рабочих дней. В рамках клиентского сервиса мы проводим бесплатные консультации по телефону и электронной почте 24 часа в сутки и 7 дней в неделю.

Оперативное реагирование на все жалобы и претензии, которые возникают у заказчиков при работе с ГК «Фармконтракт», будь то сервисное обслуживание,

поставка оборудования или расходных материалов, или поиск решения на обоюдовыгодных условиях позволяют нам решать все возникающие у заказчиков вопросы.

Кухнина Наталья – продажа расходных материалов:

Мы предлагаем широкий ассортимент расходных материалов, комплектующих и запасных частей более 60 брендов ведущих компаний мира и российских производителей, поскольку обладаем собственным складом самых ходовых расходных материалов, площадью более 2500 кв.м. Это обеспечивает возможность оперативной и своевременной доставки заказчику требуемого груза.

По запросам клиентов у нас существует широкая возможность поиска и подбора новых поставщиков с учетом пожеланий конкретного заказчика. При этом запрос выполняется максимально быстро. Наш принцип – доброжелательное общение с клиентами для выяснения всех деталей заказа.

Васильев Вадим – сервисный инженер:

Хорошая компания – это живой организм, слаженная работа каждого органа, направленная на процветание и рост. Сервис – «лицо и руки». Зачастую, через работу сервисного отдела и профессионализма сервис-инженера у клиента складывается общее мнение о компании в целом.

Пятовский Павел – сервисный инженер:

Несомненно, важнейшим этапом работы любого наукоемкого объекта является запуск оборудования и ввод его в эксплуатацию. Большое значение имеют также и действия, следующие за запуском.

После установки оборудование проверяется согласно рекомендациям производителя. Затем, если оно является средством измерения, оборудование обязательно подвергается первичной метрологической поверке, согласно внутрироссийским правилам.

В случаях, когда этого недостаточно, например когда предприятие работает согласно требованиям GMP и GLP, оборудование подвергается дополнительному тестированию и сбору информации о нем (аттестация, квалификация). Проверке подвергается больший набор параметров в объеме и с допусками, рекомендованными производителем оборудования, с учетом опыта проведения подобных работ в других, в том числе международных, организациях. Такая проверка помогает выявить проблемы с оборудованием, если они есть, и позволяет подтвердить качество и его работоспособность и пригодность к использованию.

Следующим важным процессом является формирование и введение в лаборатории или на производстве стандартных операционных процедур, связанных с использованием оборудования. Эти процедуры представляют собой специально созданный и оформленный набор простых инструкций или пошаговых действий, которые надо выполнять, чтобы успешно использовать оборудование. Как показывает практика, введение таких процедур существенно улучшает качество работы с оборудованием, а предприятиям, работающим в рамках требований GMP и GLP, без таких процедур вообще не обойтись.

Создание и использование правильных, четких и грамотных процедур, а также следование им – залог и гарантия качественной работы, отвечающей всем нормативным требованиям, исправного функционирования оборудования, получения достоверных результатов.

Пузырев Станислав – сервисный инженер:

Компетентность и научный подход к решению задач клиента – наше основное конкурентное преимущество на рынке сервисных услуг. Мы осуществляем калибровку оборудования и постановку конкретных методик под нужды заказчика, а также оказываем помощь в валидации методик. Индивидуальный подход к решению задач заказчика любой технической сложности – это основной принцип работы сервисных инженеров ГК «Фармконтракт» с широчайшей линейкой обслуживаемого оборудования. Среди моих основных задач: запуск приборов и консультация сотрудников заказчика по работе и оптимизации эксплуатационных характеристик поставленного оборудования; удаленная помощь клиенту, а также обратная связь с заказчиком в любое время суток. Среди моих задач также помощь в проведении поверки оборудования и консультации по работе с программным обеспечением сторонних производителей.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

К публикации принимаются законченные оригинальные работы (до 25 машинописных страниц, включая иллюстративный материал и список литературы), рассматривающие экспериментальные исследования в области фармацевтической технологии и разработки, вопросы оценки качества, эффективности, безопасности воспроизведенных и оригинальных лекарственных средств и регистрации лекарственных средств.

Журнал также публикует предлагаемые авторами и одобренные редакционной коллегией обзорные статьи по актуальным проблемам фармацевтической технологии, разработки и регистрации лекарственных средств (до 40 машинописных страниц, включая иллюстративный материал и список литературы).

Работы приоритетного характера (1-3 машинописные страницы), содержащие не более 3 иллюстраций, публикуются в виде коротких сообщений.

Текст статьи должен быть представлен в редакцию на адрес электронной почты: info@pharmjournal.ru, набранным в текстовом редакторе MS Word версии не ниже 2003. Название файла – фамилия первого автора. Редакция не несет ответственности за содержание и достоверность представленного материала.

Первая страница статьи начинается с УДК и названия статьи на русском языке, напечатанного заглавными буквами по центру. Далее следует список авторов на русском языке. Для каждого автора указываются инициалы и фамилия, сначала пишутся инициалы, потом фамилия автора. Инициалы отделяются от фамилии автора одинарным пробелом. Затем следуют точные названия и адреса (с обязательным указанием почтового индекса) всех учреждений (с цифровой пометкой, где работает каждый из авторов), звездочкой в верхнем регистре помечен автор, ответственный за переписку (* – ссылка на телефон и адрес электронной почты). Редакция не несет ответственности за искаженное воспроизведение имен собственных, допущенное по вине автора.

Затем приводится краткое резюме статьи (**Резюме**.) на русском языке (не более 100 слов). Далее следуют ключевые слова (**Ключевые слова**:) (не более 6) на русском языке.

Далее в том же порядке: название статьи заглавными буквами по центру, список авторов с указанием точных названий и адресов с почтовым индексом всех учреждений/организаций (также с цифровой пометкой в верхнем регистре, указывающей, где работает каждый из авторов), краткое резюме (**Abstract**.) и ключевые слова статьи (**Keywords**:) в переводе на английский язык.

Текст экспериментальной статьи и коротких сообщений должен быть разбит на разделы: 1) ВВЕДЕНИЕ; 2) МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ; 3) РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ; 4) ЗАКЛЮЧЕНИЕ; 5) ЛИТЕРАТУРА (все буквы в названиях разделов - заглавные).

Все сокращения и аббревиатуры, использованные в тексте статьи, должны быть расшифрованы (либо при первом употреблении в скобках, либо в конце статьи в списке сокращений). Расшифровка сокращений и аббревиатур иноязычных терминов должна быть представлена на языке оригинала.

Правила набора. Интервал между словами должен быть один пробел, перенос слов не делать, текст набирается шрифтом Times New Roman, 14 кеглем через полтора интервала. Название статьи набирается заглавными буквами полужирным шрифтом, инициалы и фамилии авторов – полужирным шрифтом. При обозначении единиц измерения должна использоваться система единиц СИ. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств. При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов. При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производитель и страну происхождения. При описании специфических импортных реактивов необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива. При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности. При описании используемых стандартных образов приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности. Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия. Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

К статье необходимо приложить список всей цитируемой литературы, оформленный в соответствии с действующим ГОСТ Р 7.0.5-2008. В тексте статьи следует указывать номер ссылки в квадратных скобках цифрами в соответствии с пристатейным списком литературы. Ссылки нумеруются в порядке цитирования. Перед списком указывается ЛИТЕРАТУРА прописными буквами. Список литературы должен представлять собой полную затекстовую ссылку. Для книг и сборников указываются точные названия по титульному листу, место и год издания, страницы; для нормативных документов – тип документа и принявший его орган (постановление Правительства Российской Федерации, приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации и т. п.), дата утверждения, номер и точное название. Для журнальных статей указываются фамилия и инициалы авторов, полное название статьи, название журнала, год, номер выпуска, номера страниц.

Решение о публикации принимает редакция. Редакция журнала оставляет за собой право вносить стилистические изменения, не искажающие смысл. Корректура не высылается.

Образец оформления статей, примеры сокращения единиц измерения и оформления ссылок представлены на сайте журнала: www.pharmjournal.ru.

Подписка на научно-производственный журнал*

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Журнал выходит 1 раз в квартал

АНКЕТА ПОДПИСЧИКА

Фамилия: _____

Имя: _____

Отчество: _____

Предприятие: _____

Должность: _____

Отдел: _____

Необходимое количество экземпляров журнала: _____

Телефон: _____

Факс: _____

E-mail: _____

Почтовый индекс: _____

Город, район, область: _____

Адрес: _____

Пожалуйста, отметьте один или несколько вариантов

Наиболее интересные для Вас разделы: ☐ Новые методики анализа ☐ Регистрационные вопросы	*Какие материалы вы хотели бы видеть в следующих номерах:* ☐ Практические пособия выполнения анализов ☐ Новости фармацевтической отрасли ☐ Пути решения трудностей при регистрации ☐ Аналитические статьи и обзоры ☐ Оборудование для разработки и анализа
Нужно ли размещать тематические рекламные блоки в журнале: ☐ *Да* ☐ *Нет*	*Ваши предложения и пожелания:* _____ _____ _____ _____

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

ВНИМАНИЕ! Почтовая доставка за пределы России, в т.ч. страны ЕАЭС, ЕС, а также Украину, Узбекистан, Туркменистан **платная**.

* Отсканированную копию заполненной анкеты необходимо выслать на электронный адрес редакции: **info@pharmjournal.ru** или на почтовый адрес:
115516, Москва, ул. Промышленная, д.11, стр. 3, оф. 419.
Также Вы можете оформить подписку на нашем сайте в разделе «Подписка»: **www.pharmjournal.ru**

Благодарим Вас за неоценимый вклад в развитие Журнала!

- Компания МФарм на сегодня входит в пятёрку лучших инжиниринговых компаний на рынке чистых помещений.

- Наличие собственных специалистов и специализированных подразделений по выполнению каждого этапа проекта определяет многопрофильность деятельности в рамках одного подрядчика.

- Налаженные процессы управления проектами и планирования бюджета позволяют реализовывать комплексные проекты и отдельные работы одинаково качественно с соблюдением сроков вне зависимости от масштаба проекта.

ПРОЕКТИРОВАНИЕ

ЧИСТЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ПОДРЯД

УПРАВЛЕНИЕ ПРОЕКТАМИ

ИНЖЕНЕРНЫЕ СИСТЕМЫ

КВАЛИФИКАЦИЯ И ВАЛИДАЦИЯ

СЕРВИСНОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Москва
ул. Дубининская, 57, стр. 2, офис 2 . 307

+7 (495) 646-02-10

Санкт-Петербург
ул. 8-я Красноармейская, 22, офис 307/2

+7 (812) 578-50-46

ООО **“МФарм”** в составе ГК **“Фармконтракт”**

MTEX

ПРОИЗВОДСТВО КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

ОГРАЖДАЮЩИЕ КОНСТРУКЦИИ

Стеновые

Облицовочные

Пустотелые панели

Остекление

Растровый подвесной потолок стандартный

Подвесной потолок «walk-on»

Скругляющий плинтус

ГЕРМЕТИЧНЫЕ ДВЕРИ

Общего назначения

Противопожарные

НАПОЛЬНОЕ ПОКРЫТИЕ

Фальшпол

Гомогенный плиточный линолеум

Наливной антистатический пол

ШЛЮЗЫ И ПЕРЕДАТОЧНЫЕ ОКНА

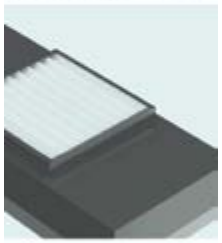
Активные

Пассивные

МОБИЛЬНЫЕ И СТАЦИОНАРНЫЕ ЧИСТЫЕ ЗОНЫ

С остеклением

С ламелями

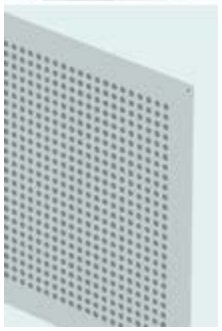


ПРИТОЧНАЯ СИСТЕМА

Модули приточные

С HEPA-фильтром

Фильтро-вентиляционные модули (FFU)



ВЫТЯЖНАЯ СИСТЕМА

Вытяжные короба

Вытяжные панели с HEPA-фильтром

Активные

Пассивные

Исполнение по типовым и индивидуальным размерам

Использование в чистых помещениях ISO 3-9

Устойчивость к УФ-обработке и обработке дезинфицирующими средствами, содержащими этиловый спирт, перекись водорода, хлор

Отечественное сырье

Монтаж и шеф-монтаж конструкций

Процесс производства 5-6 недель

Поставка по всей России и СНГ

Оснащаем медицинские учреждения, научно-исследовательские институты, фармацевтические заводы, предприятия микроэлектроники и другие высокотехнологичные производства.

MTEX

+7 (495) 646 13 82 info@mtxclean.ru mtxclean.ru

Julabo
THE TEMPERATURE CONTROL COMPANY

Новейшие водяные бани для широкого спектра применений

PURA™

- Объем от 4 до 30 л
- Размещение от 1 до 7 штативов с пробирками
- Брызгозащищенная клавиатура для управления
- Максимальное удобство опорожнения и очистки
- USB–порт для передачи данных на ПК
- Удобная откидная крышка

Pharmcontract® group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 252-00-98
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)
www.phct-group.com

8 800 333-69-11
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)
info@phct-group.com