WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN2305-2066

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ®

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

pharmtech & ingredients

АНАЛИТИКА ЭКСПО

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

GXP ГИАБ и НИП

BECKMAN COULTER

Life Sciences

BIOMEK® NXP

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ СТАНЦИЯ

Автоматизация рутинных процессов

Выполнение большинства молекулярно–биологических методик

стр. 273



В НОМЕРЕ:

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЭКСТЕМПОРАЛЬНОМ ИЗГОТОВЛЕНИИ ПОРОШКОВ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ПОЛИКОМПЛЕКСНЫХ МАТРИЦ В СТАНДАРТНЫХ И БИОРЕЛЕВАНТНЫХ СРЕДАХ МЕТОДАМИ USP III И USP IV

ОБЗОР ОСНОВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПРАВИЛАХ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ (ПРИКАЗ ОТ 01 АПРЕЛЯ 2016 Г. № 199Н)

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В МЕДИЦИНСКИХ ОРГАНИЗАЦИЯХ

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОДУКТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ 1,3-ОКСАЗИНОВ-6-ОНОВ С *N*-НУКЛЕОФИЛЬНЫМИ РЕАГЕНТАМИ

УЧАСТНИКИ «ХОЛОДОВОЙ ЦЕПИ»: АНАЛИЗ СООТВЕТСТВИЯ ТРЕБОВАНИЯМ ПРАВИЛ GDP

№ 1 (18) ФЕВРАЛЬ 2017

Summum bonum medicinae sanitas

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ



Pharmcontract
group of companies

СОЗДАНИЕ И МОДЕРНИЗАЦИЯ ПРЕДПРИЯТИЙ «ПОД КЛЮЧ» ОТ ИДЕИ ДО ВЫПУСКА ПЕРВОЙ СЕРИИ ПРЕПАРАТА

ПРОЕКТИРОВАНИЕ

- Концептуальное проектирование
- Проектирование на стадии Проект (П) и Рабочая документация (Р)
- Прохождение экспертизы
- Проведение квалификации DQ
- Автоматизированное проектирование
- Авторский надзор
- Управление проектами

СТРОИТЕЛЬСТВО

- Модульные здания из легковозводимых конструкций
- Реконструкция объектов
- Прокладка инженерных сетей
- Электромонтажные работы
- Внутренние отделочные работы
- Фасадные работы

ИНЖИНИРИНГ И КОМПЛЕКС ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

- Проектирование чистых помещений
- Производство ограждающих конструкций
- Проектирование и монтаж инженерных систем
- Проектирование систем водоподготовки
- IQ/OQ/PQ квалификация и валидация



ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОСНАЩЕНИЕ

- Подготовка и согласование технического задания, формирование ТКП
- Разработка детальных спецификаций оборудования и сопровождающей документации
- Подбор и поставка оборудования для биотехнологических производств, синтеза субстанций, ГЛФ и упаковки
- Сопровождение поставки, включая SAT и FAT
- Сопровождение валидационных работ IQ/OQ

ЛАБОРАТОРНОЕ ОСНАЩЕНИЕ

- Лаборатории доклинических исследований
- Оснащение клинических лабораторий
- Исследовательские лаборатории
- Испытательные лаборатории
- Микробиологические лаборатории
- Контроль качества радифармпрепаратов
- Масштабирование процессов: от лабораторного до промышленного

СЕРВИС, ВАЛИДАЦИЯ, ОБУЧЕНИЕ

- Сервисное обслуживание
- Квалификация оборудования
- Калибровка
- Валидация
- Инсталляция
- Ввод в эксплуатацию
- Постановка методики
- Клиентский сервис
- Обучение персонала

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

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

www.phct–group.com
info@phct–group.com

WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

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

Директор журнала
Дорина Е.А., к.п.н.

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.
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)

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
Dorina E.A., PhD

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
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)

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

Corrector:
Troitskaya E.N.

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

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

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**

Раздел «Фармацевтическая технология и нанотехнологии» **«Pharmaceutical Technology and Nanotechnology» part**

Секция «Современные технологии создания лекарственных форм» ***«Modern Technology of Creating Dosage Forms» section***

Попова Е.В., Бельтюков П.П., Кузнецов В.А., Петунов С.Г., Радилов А.С. 52 *Popova E.V., Beltiukov P.P., Kuznetsov V.A., Petunov S.G., Radilov A.S.*

ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИЗ БИОСОВМЕСТИМЫХ МИКРОКАПСУЛ СО ВСТРОЕННЫМ В ОБОЛОЧКУ ИНГИБИТОРОМ ПЕПТИДАЗЫ

FEATURES ENZYMATIC RELEASE BIOCOMPATIBLE MICROCAPSULES WITH BUILT-IN SHELL INHIBITOR PEPTIDASE

Филиппова Н.И., Вайнштейн В.А., Сон А.В., Минина С.А. 58 *Filippova N.I., Vainshtein V.A., Son A.V., Minina S.A.*

РЕГУЛИРОВАНИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИБУПРОФЕНА ИЗ МАТРИЧНЫХ ТАБЛЕТОК НА ОСНОВЕ КАРБОПОЛА

REGULATION OF IBUPROFEN RELEASE RATE FROM MATRIX TABLETS

Секция «Технология субстанций» ***«Substanses Technology» section***

Курегян А.Г., Степанова Э.Ф. 66 *Kuregyan A.G., Stepanova E.F.*

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ β-КАРОТИНА МЕТОДОМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

TECHNOLOGY OPTIMIZATION OF β-CAROTENE PRODUCTION BY MEANS OF MATHEMATICAL DESIGN OF EXPERIMENTS

Секция «Медицинские изделия как лекарственная форма» ***«Medical Products as the Dosage Form» section***

Загорулько Е.Ю., Теслев А.А., Флисюк Е.В. 70 *Zagorulko E.Y., Teslev A.A., Flisyuk E.V.*

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ НАНЕСЕНИЯ ПОКРЫТИЙ НА КОРОНАРНЫЕ СТЕНТЫ, ВЫСВОБОЖДАЮЩИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА (ОБЗОР)

MODERN COATING TECHNOLOGIES FOR DRUG ELUTING CORONARY STENTS (REVIEW)

Акентьева Т.Н., Лузгарев С.В., Лузгарев А.С., Резвова М.А., Кудрявцева Ю.А. 78 *Akentyeva T.N., Luzgarev S.V., Luzgarev A.S., Rezvova M.A., Kudryavtseva Y.A.*

МОДИФИКАЦИЯ И СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ГРУПП ГЕПАРИНА НА ПОВЕРХНОСТИ ШОВНОГО МАТЕРИАЛА

MODIFICATION AND METHOD OF DETERMINING OF ACTIVE GROUPS OF HEPARIN ON THE SURFACE OF SUTURE MATERIAL

Секция «Рецептурно-производственный отдел» ***«Prescription and Production Department» section***

Беляцкая А.В., Краснюк И.И., Краснюк (мл.) И.И., Степанова О.И., Король Л.А., Растопчина О.В. 82 *Belyatskaya A.V., Krasnyuk I.I., Krasnyuk (jr.) I.I., Stepanova O.I., Korol L.A., Rastopchina O.V.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЭКСТЕМПОРАЛЬНОМ ИЗГОТОВЛЕНИИ ПОРОШКОВ

USAGE OF FINISHED DOSAGE FORMS IN THE MANUFACTURE OF EXTEMPORANEOUS POWDERS

Раздел «Аналитические методики и методы контроля»

Секция «Контроль качества химико-фармацевтических препаратов»

Кодина Г.Е., Малышева А.О.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В МЕДИЦИНСКИХ ОРГАНИЗАЦИЯХ

88

Фролова А.М., Графов Д.А., Тюкова В.С., Ворфоломеева Е.В., Кирьянов Н.А., Филоненко Е.В., Панов А.В., Грин М.А., Кедик С.А.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ КАТИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО БАКТЕРИОПУРПУРИНИМИДА ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

94

Осипов А.С., Попова О.А., Сулименкова А.И., Нездольева М.В.

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ПАРАБЕНОВ

104

Секция «Поиск и разработка новых лекарственных средств»

Овсянникова Л.Н., Лалаев Б.Ю., Яковлев И.П., Ксенофонтова Г.В.

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОДУКТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ 1,3-ОКСАЗИНОВ-6-ОНОВ С *N*-НУКЛЕОФИЛЬНЫМИ РЕАГЕНТАМИ

108

Офицерова Е.С., Шкляренко А.А., Яковлев И.П., Федорова Е.В.

ФОРМИЛИРОВАНИЕ 2-(МЕТИЛТИО)ПИРИМИДИН-4,6-ДИОЛА В УСЛОВИЯХ РЕАКЦИИ ВИЛЬСМЕЙЕРА-ХААКА (КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ)

112

Спатлова Л.В., Юсупова Л.М., Бикмухаметова З.Н.

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АМИНОПРОИЗВОДНЫХ В РЯДУ 5,7-ДИХЛОРО-4,6-ДИНИТРОБЕНЗОФУРОКСАНА

116

Секция «Контроль качества лекарственного растительного сырья»

Тернинко И.И., Нгуен Т.Х.И.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ТРАВЕ КОТОВНИКА КОШАЧЬЕГО (*NEPETA CATARIA* L.)

120

Тушканова О.В., Бойко И.Е.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЮГЛОНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ОКОЛОПЛОДНИКА JUGLANS NIGRA L.

126

«Analytical and Quality Control Methods» part

«Quality Control of Chemical Drug Products» section

Kodina G.E., Malysheva A.O.

QUALITY CONTROL OF RADIOPHARMACEUTICALS IN MEDICAL INSTITUTIONS

88

Frolova A.M., Grafov D.A., Tukova V.S., Vorfolomeeva E.V., Keryanov N.A., Feelonenko E.V., Panov A.V., Green M.A., Kedeek S.A.

STANDARDIZATION OF CATIONIC DERIVATIVE OF BAKTERIOPURPURINIMID AS PHARMACEUTICAL SUBSTANCE FOR ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY

94

Osipov A.S., Popova O.A., Sulimenkova A.I., Nezdolieva M.V.

APPLICATION OF HYDROPHYILIC INTERACTIONS LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR PARABENS ANALYSIS

104

«New Drug Search and Development» section

Ovsyannikova L.N., Lalaev B.U., Yakovlev I.P., Ksenofontova G.V.

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE REACTION PRODUCTS OF 1,3-OXAZIN-6-ONES WITH *N*-NUCLEOPHILES

108

Ofitserova E.S., Shklyarenko A.A., Yakovlev I.P., Fedorova E.V.

FORMYLATION OF 2-(METHYLTHIO)PYRIMDINE-4,6-DIOL IN THE REACTIO CONDITIONS OF VILSMEIER-HAAK (SHORT MESSAGE)

112

Spatlova L.V., Yusupova L.M., Bikmuhametova Z.N.

SYNTHESIS AND ACARICIDAL, BACTERIOSTATIC ACTIVITY AMONG THE AMINO DERIVATIVES 5,7-DICHLORO-4,6-DINITROBENZOFUROXANA

116

«Quality Control of Herbal Drug Products» section

Terninko I.I., Nguyen T.H.Y.

IDENTIFICATION OF THE PHENOLIC COMPOUNDS OF CATNIP HERBS (*NEPETA CATARIA* L.)

120

Tushkanova O.V., Boyko I.E.

INVESTIGATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY JUGLONE ISOLATED FROM PERICARP JUGLANS NIGRA L.

126

Баева В.М., Молодожникова Н.М., Кузнецов Р.М. **130**

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛИСТЬЯХ И ПЛОДАХ ПЛЮЩА КАВКАЗСКОГО

Baeva V.M., Molodozhnikova N.M., Kuznetsov R.M.

COMPARATIVE STUDY OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS COMPOSITION IN THE LEAVES AND FRUITS OF *HEDERA CAUCASICA*

Кузнецова О.Ю., Горелова Е.Г., Фахрутдинова Д.И., Гильманов Р.З. **134**

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ БЕРЕЗОВЫХ ПОЧЕК, ПОЛУЧЕННЫХ ЭКСТРАКЦИЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

Kuznetsova O.Yu., Gorelova E.G., Fakhrutdinova D.I., Gilmanov R.Z.

THE TESTING EXTRACTIVES OF BIRCH BUDS, OBTAINED BY EXTRACTION USING ULTRASOUND

Тринеева О.В., Казьмина М.А., Сливкин А.И. **138**

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ ПРОСТЫХ САХАРОВ В ПЛОДАХ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

Trineeva O.V., Kazmina M.A., Slivkin A.I.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR DETERMINING THE AMOUNT OF FREE AND RELATED SIMPLE SUGARS IN THE FRUIT OF SEA BUCKTHORN

Буханова У.Н., Потанина О.Г. **144**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАКРО- И МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ СБОРА-ПОРОШКА «ЛОРПОЛИФИТ»

Bukhanova U.N., Potanina O.G.

MACRO- AND MICROSCOPIC FEATURES DETERMINATION OF THE COMBINATION PLANT MEDICINAL PRODUCT «LORPOLIPHYT» POWDER

Раздел «Эффективность и безопасность лекарственных средств»

«Drug Products Efficacy and Safety» part

Секция «Кинетика растворения»

«Dissolution Profile Test» section

Анфимова Е.В., Успенская Е.В., Плетенева Т.В., Сыроешкин А.В. **150**

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ РАСТВОРИМОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБТАНЦИЙ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ДИФРАКЦИИ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ С РАЗЛИЧНЫМ ИЗОТОПНЫМ СОСТАВОМ ПО ВОДОРОДУ

Anfimova E.V., Uspenskaya E.V., Pleteneva T.V., Syroeshkin A.V.

SOLUBILITY KINETICS OF DRUGS STUDIED BY LALLS METHOD IN WATER SOLUTIONS WITH VARIOUS HYDROGEN ISOTOPE CONTENT

Мустафин Р.И., Ситенкова (Буховец) А.В., Фотаки Н. **156**

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ПРЕДИКТИВНОГО ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» (ОБЗОР)

Moustafine R.I., Sitenkova (Bukhovets) A.V., Fotaki N.

THE FEATURES OF THE PREDICTIVE DISSOLUTION TESTING (REVIEW)

Ситенкова (Буховец) А.В., Фотаки Н., Мустафин Р.И. **164**

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ПОЛИКОМПЛЕКСНЫХ МАТРИЦ В СТАНДАРТНЫХ И БИОРЕЛЕВАНТНЫХ СРЕДАХ МЕТОДАМИ USP III И USP IV

Sitenkova (Bukhovets) A.V., Fotaki N., Moustafine R.I

A COMPARATIVE STUDY OF DRUG RELEASE FROM POLYCOMPLEX MATRICES IN STANDARD AND BIORELEVANT MEDIA USING USP III AND USP IV APPARATUS

Секция «Доклинические исследования»

«Preclinical Trials» section

Боярский М.Д., Тарасов Ю.В. , Филиппов Ю.И. , Сачивкина Н.П., Станишевкий Я.М. **168**

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОСОВМЕСТИМОСТИ ИМПЛАНТИРУЕМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ РАЗРАБОТОК

Boyarskiy M.D., Tarasov Y.V., Philippov Y.I., Sachivkina N.P., Stanishevkiy Ya.M.

PRECLINICAL HEMOCOMPATIBILITY STUDIES FOR IMPLANTABLE MEDICAL DEVICES: REVIEW AND EXPERIMENTAL RESEARCH RESULTS

Колотова Н.В., Старкова А.В. **178**

АНТИГЕЛЬМИНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕТЕРИЛАМИДОВ 1,4-ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Kolotova N.V., Starkova A.V.

ANTIHELMINTHIC ACTIVITY OF GETIRYAMIDES 1,4-DECARBOXYLIC ACIDS

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

Скачилова С.Я., Шилова Е.В., Павлов В.М., Молостова Т.Н. **182** *Skachilova S.Ya., Shilova E.V., Pavlov V.M., Molostova T.N.*

БРОНХОЛИТИЧЕСКИЕ И ТОКОЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ β_2-АГОНИСТОВ

BRONCHODILATOR AND TOCOLYTIC FEATURES OF β_2-ADRENOCEPTOR AGONISTS

Полосков В.В., Ершов Ф.И. **188** *Poloskov V.V., Ershov F.I.*

АКТИВАТОРЫ СИНТЕЗА ЭНДОГЕННЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ (ОБЗОР)

ACTIVATION OF SYNTHESIS OF ENDOGENOUS INTERFERON (REVIEW)

Секция «Биоаналитические методики» ***«Bioanalytical Methods» section***

Митюшова Е.В., Фаустова Н.М., Пожарицкая О.Н., Макаров В.Г., Шиков А.Н. **194** *Mityushova E.V., Faustova N.M., Pozharitskaya O.N., Makarov V.G., Shikov A.N.*

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ ПРЕПАРАТА ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2А

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF IMMUNOASSAY FOR IMMUNOGENICITY OF INTERFERON-ALPHA 2A DRUGS

Раздел «Регуляторные вопросы» ***«Regulatory Issues» part***

Наркевич И.А., Маркова В.А., Демидёнок Д.А. **202** *Narkevich I.A., Markova V.A., Demidyonok D.A.*

УЧАСТНИКИ «ХОЛОДОВОЙ ЦЕПИ»: АНАЛИЗ СООТВЕТСТВИЯ ТРЕБОВАНИЯМ ПРАВИЛ GDP

PARTICIPANTS OF THE «COLD CHAIN»: ANALYSIS OF COMPLIANCE WITH THE RULES OF THE GDP

Семин А.А., Наркевич И.А. **206** *Semin A.A., Narkevich I.A.*

РОЛЬ МАЛЫХ ИННОВАЦИОННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ В РАЗРАБОТКЕ ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ВЫВОДЕ ИХ НА РЫНОК

THE ROLE OF SMALL INNOVATIVE ENTERPRISES IN THE DEVELOPMENT AND MARKET LAUNCH OF INNOVATIVE DRUGS

Журавлева М.С., Лебедева М.В. **212** *Zhuravleva M.S., Lebedeva M.V.*

ОБЗОР ОСНОВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПРАВИЛАХ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ (ПРИКАЗ ОТ 01 АПРЕЛЯ 2016 г. № 199н, ВВЕДЕННЫЙ ВЗАМЕН ПРИКАЗА МИНЗДРАВА ОТ 23 АВГУСТА 2010 г. № 708н)

AN OVERVIEW OF THE MAIN CHANGES IN THE RULES OF GOOD LABORATORY PRACTICE (THE ORDER OF 01 APRIL 2016 № 199n ENTERED INSTEAD OF THE ORDER OF MINISTRY OF HEALTH OF 23 AUGUST 2010 № 708n)

Синченко С.А. **216** *S.A. Sinchenko*

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОКРИСТАЛЛЫ. ОСОБЕННОСТИ ОЦЕНКИ ПАТЕНТОСПОСОБНОСТИ

PHARMACEUTICAL CO-CRYSTALLS. FEATURES OF ASSESING THE PATENTABILITY

Раздел «История фармации» ***«History of Pharmacy» part***

Гузев К.С. **222** *Guzev K.S.*

О РОЛИ ГАЛЕНА В ФАРМАЦИИ

GALEN AND KNOWLEDGE OF PHARMACY

Публикации партнеров **230** ***Partner Publications***

ОТ РЕДАКЦИИ

Российский фармацевтический рынок с каждым годом все больше адаптируется к международной практике GxP-стандартов. В 2013 году Минпромторг России выпустил приказ № 916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств», согласно которому отечественная фармацевтическая отрасль перешла в течение нескольких лет на стандарты GMP. Летом прошлого года Минюст России зарегистрировал приказ Минздрава России № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», предусматривающий четкие требования к процессам организации, планирования, порядку проведения и контроля качества доклинических и клинических исследований лекарственных средств, оформлению их результатов и архивированию. Чуть позже, в августе 2016 года Министерство юстиции Российской Федерации зарегистрировало аналогичный приказ Минздрава России № 200н, регламентирующий проведение исследований с участием человека и де-факто устанавливающий стандарты GCP (Good Clinical Practice) – «Об утверждении Правил надлежащей клинической практики». Оба документа Министерства здравоохранения Российской Федерации подготовлены с учетом анализа международных правил и правоприменительной практики действующего законодательства и преследуют решение задачи гармонизации и взаимного признания результатов исследований российскими и зарубежными центрами.

В российских правилах GLP (Good Laboratory Practice) указано, что доклинические исследования осуществляются посредством химических, физических, биологических, микробиологических, фармакологических, токсикологических и других экспериментальных исследований или серий исследований по изучению исследуемого вещества, лекарственного средства или физического воздействия, средств, методов и технологий профилактики, диагностики и лечения заболеваний путем применения научных методов оценок в целях изучения специфического действия и доказательств безопасности для здоровья человека. А разные фазы (этапы) исследования могут проводиться на двух и более испытательных площадках, в том числе географически удаленных, организационно обособленных (многоцентровое доклиническое исследование). В новых правилах большое внимание уделено предъявляемым к испытательной лаборатории и ее персоналу требованиям. Предусмотрено утверждение руководителем испытательной лаборатории стандартных операционных процедур, в которых детально, подробно и последовательно регламентируется порядок проведения доклинического исследования или порядок осуществления процедур, не описанных подробно в протоколе исследования. Также описаны требования, которым должны соответствовать оборудование и компьютеризированные системы, используемые для сбора и хранения данных доклинического исследования, контроля факторов окружающей среды в помещениях, зонах, где проводится доклиническое исследование, его этапы, фазы. В частности, указанные приборы должны размещаться и устанавливаться с учетом особенностей, целей и назначения, соответствующих видам проводимых исследований. Помимо этого, оборудование, используемое при проведении доклинического исследования, подлежит периодическому техническому обслуживанию, включая регулярный профилактический осмотр, уход, калибровку в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации об обеспечении единства измерений. А оборудование, используемое для физическо-химических доклинических исследований, должно соответствовать видам проводимых исследований.

Аналогичные требования, но преимущественно в области документирования и оформления результатов клинического исследования, предъявляются и к CRO (Clinical Research Organization). Зарегистрированный Минюстом России 23.08.2016 года приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации «Об утверждении Правил надлежащей клинической практики» закрепил правила проведения клинических исследований лекарственных препаратов для медицинского применения, соблюдение которых позволит гарантировать безопасность и благополучие пациентов, что напрямую согласуется с принципами, заложенными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации.

Принятие двух приказов, регламентирующих этапы доклинических и клинических исследований, активный переход российских исследовательских центров и организаций на стандарты, максимально приближенные к международным, – все это обусловило поступление большого количества материалов в редакцию научно-производственного рецензируемого журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», посвященных анализу происходящих изменений. Более того, новые приказы Минздрава России стали одной из самых обсуждаемых тем на осенне-зимних семинарах и конференциях [см. С. 17–22, 24–29, 38–44]. В этой связи, учитывая опыт внедрения на российском фармацевтическом рынке стандартов GMP, редакцией журнала было принято решение о запуске профессионального информационного портала о вопросах надлежащей лабораторной практики в разработке и регистрации лекарственных средств – «Новости GLP». На площадке хорошо известного нашим читателям сайта pharmjournal.ru будет представлена актуальная информация о тенденциях внедрения GLP-стандартов на российском рынке, а раз в неделю все желающие, оформившие подписку, будут получать краткий дайджест, содержащий систематизированную выборку ключевых событий, произошедших в этой сфере не только в России, но и за рубежом. На страницах ежеквартальных номеров нашего издания мы продолжим публиковать обширные аналитические статьи о происходящих изменениях на фармацевтическом рынке, в том числе затрагивающие вопросы GLP и GCP, приводить опыт и точки зрения на проблемы, с которыми сопряжен процесс сертификации лабораторных комплексов в связи с произошедшими нововведениями. Надеемся, что наш новый проект и публикуемая на страницах журнала информация, касающаяся всех этапов жизненного цикла лекарственного средства, регламентированных стандартами GLP, GCP, GMP, GSP [с соответствующими материалами вы можете ознакомиться уже на страницах этого выпуска: 168–180, 182–192, 202–221, 230–233, 250–260, 288–291] и другими, окажется не просто интересной, но и полезной в вашей ежедневной работе.

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
ISSN: 2305-2066 Внесен в перечень ВАК

НОВОСТИ
ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОРТАЛ

С февраля 2017 года журнал "Разработка и регистрация лекарственных средств" запустил новый информационный ресурс по надлежащей лабораторной практике в разработке и регистрации лекарственных средств



ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОРТАЛ ПО НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКЕ

www.pharmjournal.ru

- Актуальные новости в еженедельной рассылке
- Обзор законодательства и систематизация происходящих изменений
- Аналитические материалы от ведущих экспертов отрасли
- Тенденции внедрения современных стандартов GLP
- Полноценные доклады и цитаты спикеров с крупнейших отраслевых событий

Подписаться на рассылку и всегда быть в курсе событий, не тратя время на изучение многостраничных нормативно-правовых актов, в один клик на pharmjournal.ru

КРУГЛЫЙ СТОЛ «ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА ИНОСТРАННЫХ КОМПАНИЙ В РОССИИ: ПРОБЛЕМЫ И ЛУЧШИЕ ПРАКТИКИ»

19 октября 2016 года на площадке Торгово-промышленной палаты Российской Федерации прошел круглый стол, где обсуждался опыт локализации промышленных производств иностранных компаний в России. Среди ключевых тем, по которым велась дискуссия, стали механизмы локализации иностранного производства в России; инструменты привлечения иностранных инвесторов, в том числе меры государственной поддержки промышленности; роль Торгово-промышленной палаты, Фонда развития промышленности, Агентства технологического развития и других институтов развития в создании условий для локализации; повышение экспортного потенциала российской продукции.



Представители фармацевтической отрасли России приняли активное участие в круглом столе, организованном на площадке ТПП РФ, по вопросам локализации иностранных компаний. Открывая заседание, вице-президент ТПП РФ **Дмитрий Курочкин** напомнил, что одной из приоритетных задач ТПП России является работа по реализации промышленной политики, направленной на инновационное развитие и технологическую модернизацию производства и в конечном счете повышение конкурентоспособности экономики России.

Важной составляющей промышленной политики является импортозамещение в производстве товаров, выполнении работ, оказании услуг. «Целевым ориентиром импортозамещения является снижение к 2020 году показателя импортозависимости по большинству отраслей на уровне ниже 50%», – напомнил спикер, представив в своей презентации достигнутые в 2013 году и планируемые к 2020 году показатели. Например, доля импортной продукции в фармацевтической отрасли в 2013 году составляла 50%. Целевой показатель на 2020 год – 73%.

При этом импортозамещение вовсе не означает вытеснение из страны иностранного производителя, желающего работать на территории Российской Федерации, отметил спикер: «Наоборот, мы заинтересованы в притоке иностранных инвестиций в российскую экономику, в создании на нашей территории самых современных производств, использующих наилучшие доступные технологии. При этом государство, – уточнил **Дмитрий Курочкин**, – ставит твердые условия по локализации производства продукции в России, юридически надежному трансферу технологий и закреплению их в российской юрисдикции». Например, при государственных, муниципальных закупках и закупках компаний с государственным участием приоритет отдается продукции отечественных предприятий и локализованных в России зарубежных компаний. Хорошим примером успешной работы по локализации производства, в которой самое активное участие принимает Комитет ТПП РФ по предпринимательству в здравоохранении и медицинской промышленности, профильные объединения предпринимателей – члены ТПП РФ, является фармацевтическая отрасль.



Дмитрий Курочкин

«Реализация Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации до 2020 года нацелена на возрождение отечественного фармацевтического производства, в том числе через локализацию производства иностранными компаниями. В результате за последние 6 лет объем иностранных инвестиций в отечественную фармацевтическую промышленность составил более 1 млрд евро», – привел статистику **Д. Курочкин**. Всего с 2013 г. введено 19 фармацевтических производственных площадок, в том числе 7 с участием иностранного капитала. Только в 2015 г. открыто 6 фармацевтических заводов. «В фармотрасли за последние 2–3 года наблюдается бум иностранных инвестиций и локализации», – подвел итог политике локализации вице-президент ТПП РФ. «Передовиками» локализации он назвал компании «Астра Зенека», «Такеда», КРКА, «Ново-Нордиск», «Гедеон Рихтер», «Штада», «Санофи», Novartis, Teva и Serdix.

Говоря о конкретной работе палаты и ее региональных подразделений по поддержке производителей, **Д. Курочкин** привел в пример сотрудничество с Фондом развития промышленности. В 2015–2016 годах системой ТПП РФ рекомендован и утвержден Экспертным советом ФРП 41 проект. Из них в области медицинской промышленности – 5. В их числе создание комплексного высокотехнологичного производства перевязочных материалов ООО «ХБК «НАВТЕКС» в г. Наволоки. Сумма займа 250 млн руб. Поддержку оказала ТПП Ивановской области. А Уральская ТПП рекомендовала оказать содействие созданию импортозамещающего производства генно-инженерного и аналогового инсулина из собственной субстанции на ООО «Завод Медсинтез» в г. Екатеринбурге. Сумма займа составляет 183 млн руб.

В то же время остаются проблемы, которые требуют решения как со стороны федеральных, так и местных властей, среди которых генеральный директор АРФП **Виктор Дмитриев** отметил нуждающуюся в совершенствовании нормативно-правовую базу и ее правоприменение, межведомственную несогласованность и отсутствие единого регулятора. «Недавно Росздравнадзор был принят в члены Международной коалиции регуляторных агентств по лекарственным средствам, что фактически дает ведомству статус официального представителя Российской Федерации в этой сфере. Стоит обратить на это внимание, ведь во многих странах существует один «основной регулятор» в сфере обращения лекарственных средств. Для России такая практика была бы полезной», – считает спикер.



Директор департамента региональной промышленной политики Минпромторга России Алексей Беспрозванных

Виктор Дмитриев также рассказал об опыте компаний, уже прошедших этап локализации. Прежде всего он обратил внимание на существенную разницу в поддержке инвесторов на региональном и федеральном уровне. По его словам, вход инвестора в регион всегда активно поддерживается региональными властями – это и создание инфраструктуры, и обеспечение «тепличных» условий на стадии строительства, но после запуска завода структура региональных закупок для инвестора изменяется в худшую сторону. То есть регион закупает производимой на новом заводе продукции меньше, чем это было ранее, когда компания завозила свою продукцию. Так было, например, в Калужской области. «Нам бы хотелось, чтобы регионы уделяли больше внимания производителям после того, как завод выходит на проектную мощность, чтобы в первую очередь закупалась продукция, производимая в регионе», – подчеркнул докладчик. Обратил внимание выступающий и на социально-профессиональную среду в регионах: не только на уровень образованности населения, но и на готовность его к миграции. «В Ярославле мы столкнулись с тем, что кандидаты часто не готовы мигрировать ради работы и лучшей зарплаты даже на несколько десятков километров», – рассказал **Виктор Дмитриев**.







Был поднят и вопрос стимулирования производства фармсубстанций в России. Эта тема стала особенно обсуждаемой среди «локализовавшихся» производителей после того, как Минпромторг России анонсировал проект трехступенчатой системы преференций при госзакупках в зависимости от глубины переработки. Генеральный директор АРФП подчеркнул, что нельзя забывать об экономической целесообразности углубления производства фармсубстанций. «Надо понимать, что локализовать некоторые субстанции будет не просто сложно технологически, но и экономически невыгодно. Необходимо оценивать общую потребность отрасли и перспективы выхода на новые рынки: существуют субстанции, потребность мирового рынка в которых составляет всего 1,5–2 кг в год. Экономического обоснования для организации производства 150 г субстанции для российского рынка не будет никакого. Эти граммы станут просто «золотыми». Надо, не лукавя, признать, что есть активные ингредиенты, которые значительно дешевле и выгоднее закупать за рубежом. Поэтому предложения Минпромторга России должны быть тщательно взвешены с учетом потребностей и финансовых возможностей системы здравоохранения, обсуждены с производителями и только после этого приняты», – заключил он.

Проведение на территории ТПП РФ круглого стола *«Локализация промышленного производства иностранных компаний в России: проблемы и лучшие практики»* позволило ключевым участникам национального рынка (в т.ч. представителям региональных органов власти) обменяться опытом в сфере сотрудничества с иностранными инвесторами, изучить опыт иностранных компаний, успешно локализовавших свое производство в России. На примере фармацевтической и автомобильной промышленности были рассмотрены лучшие практики локализации, выявлены ключевые проблемы и перспективы дальнейшего развития.

«ФАРМА ФОРУМ. ИТОГИ 2016. ПРОГНОЗЫ 2017»

25 октября 2016 года РБК собрал инвесторов, представителей органов государственной власти и крупнейших производителей лекарственных средств, экспертов для подведения итогов 2016 года в фармацевтической промышленности и определения ключевых тенденций на следующий год. Участники конференции обсудили механизмы повышения привлекательности фармацевтического рынка в глазах инвесторов, инновации в помощь рынку, законодательные инициативы, работу государственной программы поддержки российского производителя и импортозамещения. Информационным партнером мероприятия выступил научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».





В конце октября 2016 года ключевые игроки фармацевтического рынка России собрались для обсуждения регуляторных вопросов, влияющих на развитие рынка, и оценки механизмов внедрения инноваций в отрасли. Одной из самых актуальных тем сессии *«Фармацевтический рынок сегодня: регулирование и развитие»* стало внедрение механизма специальных инвестиционных контрактов (СПИКов) в области фармацевтического производства. Открывая сессию, модератор, генеральный директор АРФП **Виктор Дмитриев** акцентировал внимание гостей на том, что во главе угла при реализации специнвестконтрактов должны стоять интересы пациентов и запросы системы здравоохранения. Именно поэтому, по мнению АРФП, при заключении СПИКов в сфере фармпроизводства необходимо ориентироваться на компетентное мнение Минздрава России, который и должен решать, какой инновационный лекарственный препарат необходимо привлечь на российский рынок, исходя из потребности в нем системы здравоохранения. При этом необходимо учитывать прогнозное влияние применения такого лекарственного препарата, исходя из его терапевтической ценности и влияния на индикаторы здоровья. По информации АРФП письмо с соответствующим предложением уже направлено в Минпромторг России. Также **Виктор Дмитриев** отметил необходимость гарантии реализации произведенной в рамках СПИКов продукции: «Мы настаиваем на том, чтобы монополия сохранялась в течение двух-трех лет. Если препараты не будут закупаться государством, инвестиции не окупятся долгие годы».

Для производителей специнвестконтракты интересны и гарантированной стабильностью налогового режима. Директор по развитию рынка компании «Биокад» **Дмитрий Мордвинцев** отметил, что компания видит главную цель заключения такого контракта в сохранении налогового режима особой экономической зоны для нее, как обладателя СПИК.

Участники форума также обсуждали возможности реализации инновационных моделей закупок: софинансирования и так называемый платеж за результат. По словам представителя компании «Пепеляев групп» **Сергея Клименко**, законодательство теоретически не запрещает применение данных механизмов, однако регулирующие органы запрещают организациям применять эти схемы. Более того, существует и ряд потенциальных рисков, среди которых спикер отметил любое вмешательство в сферу государственного заказа при размещении заказа на лекарственные препараты. «У нас существует четкая устойчивая практика, которая довольно негативно отсвечивает по любым нестандартным моделям. Поэтому основная идея заключается в том, что при софинансировании мы вопросы бесплатной передачи препаратов выделяем из № 44-ФЗ от 5 апреля 2013 года «О контрактной системе в сфере закупок товаров, работ, услуг для обеспечения государственных и муниципальных нужд» вооб-

ще в целом. То есть речь идет о прямых сделках между производителями и заказчиками», – пояснил представитель юридической фирмы. В качестве альтернативы он поддерживает внедрение модели риск-шеринга, к которой будет приковано самое пристальное внимание со стороны регуляторов, представителей бизнеса и госзаказчиков. Директор по развитию рынка BIOCAD **Дмитрий Мордвинцев** не согласился с коллегой – он убежден, что с точки зрения Минэкономразвития никаких дополнительных изменений в №44-ФЗ не требуется, поскольку исключение любой схемы риск-шеринга возможно двумя путями: гарантийное обязательство поставщика или организация юридического лица, которая осуществляет услугу по лекарственному обеспечению или оказанию медицинской помощи. «Единственный поставщик – это приятная вещь, но ничего как такового вам не гарантирует и действительно несет определенный объем рисков», – высказал неоптимистичную точку зрения спикер.

О механизмах сбыта произведенной продукции продолжил говорить руководитель по работе с индивидуальными клиентами (направление аптеки и фармпроизводители) портала «Яндекс. Маркет» **Антон Подолинский**, рассматривая ключевые аспекты продажи лекарственных средств в интернете путем легализации все больших позиций. «В онлайне фармацевтическая индустрия на текущий момент одна из самых быстрорастущих. Мы растем год от года на 30–35% и продолжаем расти. Это одна из немногих индустрий в онлайне, где спрос достаточно сильно превышает предложение: более 1 млн поисковых запросов в месяц связано с потенциальным заказом лекарственных средств», – оценил спрос основных потребителей фармрынка в internet представитель сервиса «Яндекс. Маркет» (рисунок 1). Основную причину ухода покупателей в онлайн-сферу спикер видит в привлекательности цен на препараты и их доступности (рисунок 2).

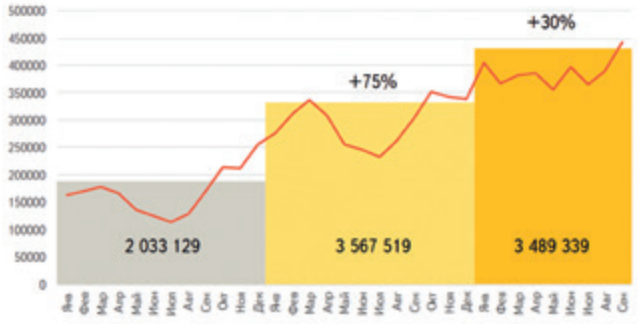


Рисунок 1. Динамика запроса «Интернет-аптека» в 2014–2016 гг.

Не обошли вниманием участники сессии и такой вопрос, как локализация. Генеральный директор АРФП **Виктор Дмитриев** отметил интерес к российскому рынку фармкомпаний из США: «Мы каждый день смотрим телевизор и интернет, и реально понимаем, что

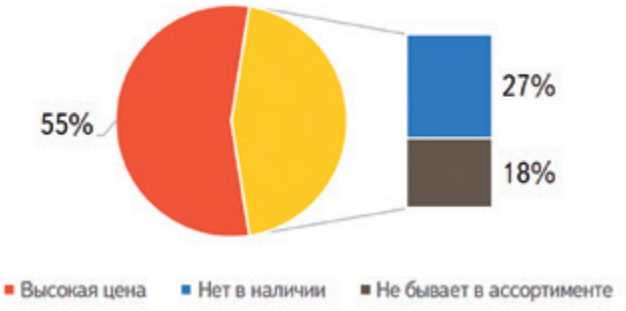


Рисунок 2. Почему не покупают в оффлайн аптеках

экономико-политическая ситуация для активных контактов с США не всегда благоприятна, но тем не менее у нас есть положительные примеры и нам отрадно, что фармацевтика наравне с космосом показывает как раз примеры достаточно удачного взаимодействия». Генеральный директор Abbott в России **Елена Карташева** привела пример успешной локализации продуктов своей компании на производственных мощностях компании «Верофарм».

В рамках первой сессии генеральный директор DSM Group **Сергей Шуляк** представил гостям форума традиционный аналитический отчет компании о состоянии рынка. Согласно проведенному исследованию, в последние годы можно было наблюдать огромные темпы прироста: «Были годы, когда в долларах он показывал 35%. Он входил в десятку ведущих фармацевтических рынков мира. Входил в пятерку самых динамично развивающихся фармацевтических рынков мира. Но за последние 2 года мы очень резко растеряли все свои потенциалы, преимущества, потому что курс рубля рухнул практически в два раза. И вот за 2015 год мы, наверное, видели самое большое падение рынка в мире. Минус 32%». В связи с изменением цен на препараты как из списка ЖНВЛП, так и нерецептурные рынок постепенно переходит на дженерики: «Они уже начинают править рынком, потому что происходит борьба не только за бюджетные средства, но и борьба в головах россиян. Спрос на качественные дженерики (более дешевые лекарственные препараты) значительно вырос. Мы отмечаем тенденцию, что действительно структура спроса меняется» (рисунок 3).

О тенденции развития фармацевтического рынка продолжилась дискуссия на сессии *«Инновации в фармацевтической отрасли: как поддержать новаторов?»* Директор по развитию RNC Pharma **Николай Беспалов** привел данные аналитического исследования о росте экспортного потенциала российских лекарственных препаратов, который по итогам восьми месяцев 2016 года вырос на 46%. Конечно, среди причин такого скачка спикер прежде всего отмечает колебания российской валюты, которые сделали российскую продукцию на международном рынке достаточно востребованной. Среди основных потребителей россий-

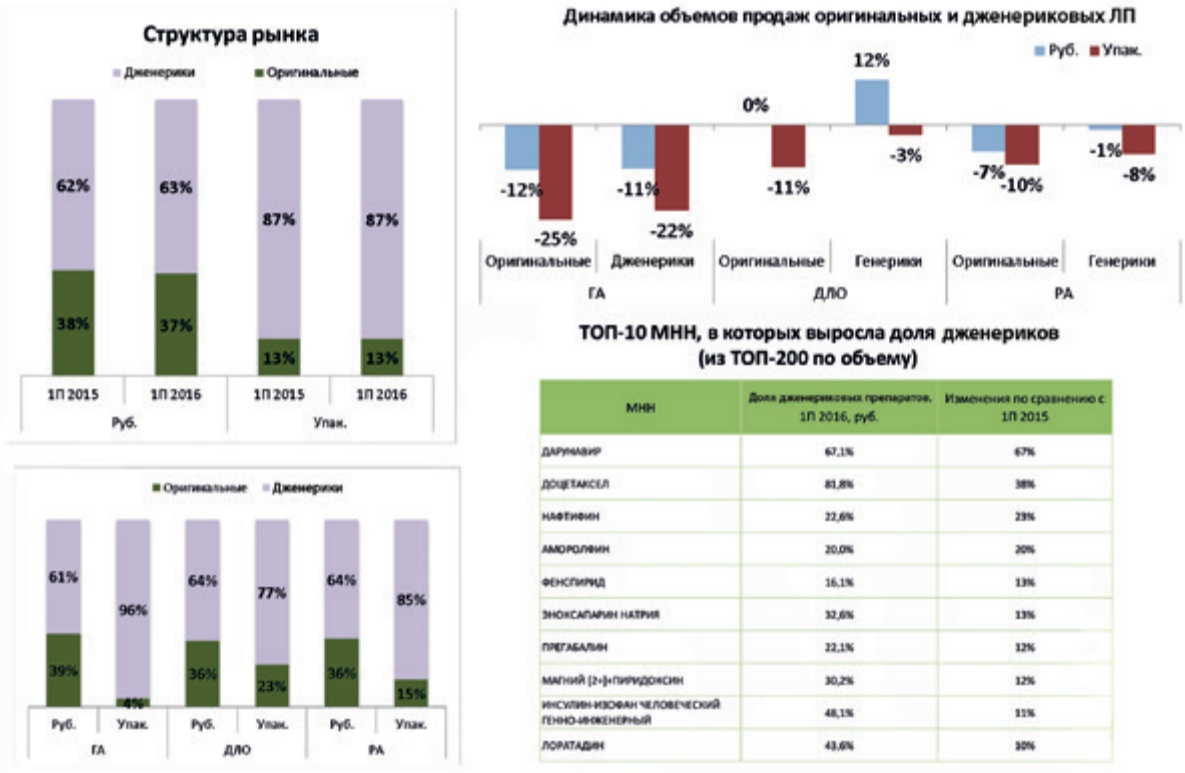


Рисунок 3. Рынок переходит на дженерики

ских лекарственных средств **Николай Беспалов** выделил Румынию: «По итогам восьми месяцев 2016 года небывалый спрос на российскую продукцию проявляют фармацевтические компании из Румынии» (рисунок 4).

Сессия продолжилась серией докладов представителей российских фармпроизводителей («Акрихин», «Нанолек» и «Р-Фарм»), которые рассказали об успешных разработках и контрактном потенциале своих компаний. Помимо обмена опытом производителей в ходе сессии состоялось выступление вице-президента, исполнительного директора кластера биомедицинских технологий «Сколково» **Кирилла Каема**, который обратил внимание, что сегодня компании, начинавшие свою деятельность по большей части с дистрибьюции, а потом перешедшие к производству дженериков, проявляют повышенный интерес к биосимилярам, где условно значительно больше объем разработки. «Биосимиляр повторить значительно сложнее, чем купить известную субстанцию индийского или китайского производителя и здесь ее штамповать», – пояснил спикер. Более того, по словам **Кирилла Каема**, компании сейчас впрямую заявляют, что нельзя сосредотачиваться только на дженериках и биосимилярах, а надо заниматься собственными разработками, иначе существует риск чрезмерного отставания.

Заместитель генерального директора STADA CIS **Иван Глушков** поделился опытом компании в обсуждении цены на новый продукт с ФАС: «Нашли группу



Рисунок 4. Объем, динамика и направления экспорта ЛП из России, млрд руб.

разработчиков с патентом стабильного аэрозоля. Начали с ними работать и достаточно быстро стало понятно, что терапевтический эффект достигается при существенно более низких концентрациях действующего вещества. И соответственно меньше побочных эффектов. Пришли в ФАС обсуждать цену, они говорят, что цена препарата должна зависеть от того, сколько там действующего вещества. У нас действующего вещества в 25 раз меньше, чем в таблетке, но сделать дешевле в 25 раз просто невозможно».

Конференция «Фарм форум» от РБК – одно из ключевых событий, где консолидированы интересы всех участников рынка. Это площадка, на которой обсуждаются актуальные вопросы, вырабатываются эффективные механизмы развития отрасли.

XVIII ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ГОСУДАРСТВЕННОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ В СФЕРЕ ОБРАЩЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ» («ФАРММЕДОБРАЩЕНИЕ-2016»)

2–3 ноября 2016 года в конгресс-центре ЦМТ 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 обсудили ключевые вопросы развития фармпромышленности. Обсуждение проходило в рамках ежегодной конференции из плана научно-практических мероприятий Министерства здравоохранения Российской Федерации на 2016 год (приказ № 275 от 28 апреля 2016 г.) «ФармМедОбращение-2016». На протяжении многих лет информационную поддержку мероприятию оказывает научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».





По традиции в конце осени представители здравоохранения, фармбизнеса, регуляторных органов власти обсуждали обширный перечень вопросов государственного регулирования в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий. В 2016 году основными вопросами стали законодательные новеллы в сфере обращения лекарственных средств, регламентирующие контроль качества лекарственных средств в Российской Федерации и на пространстве ЕАЭС, фармаконадзор и контроль проведения клинических исследований в Российской Федерации и ЕАЭС, экспертизу и регистрационный процесс лекарственных средств.

Деловая программа конференции началась пленарным заседанием, в котором приняли участие первый заместитель министра здравоохранения Российской Федерации **Игорь Каграманян**, руководитель Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения **Михаил Мурашко**, член коллегии (министр) по вопросам технического регулирования Евразийской экономической комиссии **Валерий Корешков**, директор департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **Ольга Колотилова**. Приветствуя участников конференции, **Михаил Мурашко** отметил, что деловая программа в этом году «включает в себя все те инновации в законодательстве, которые вступают в силу с 1 января 2017 года. Все преобразования, которые происходят в сфере регулирования лекарственных средств и медицинских изделий, грандиозны по масштабу... Реформа контрольно-надзорной деятельности, которая происходит сегодня в нашей стране, затрагивает очень многие сферы, и первое, что внедряется, это риск-ориентированный подход. Внедрение системы комплексной профи-



лактики нарушений, и в том числе использование методов предупреждения, устранение устаревших и дублирующих функций, неэффективных механизмов, создание и внедрение комплексной системы информационного сопровождения и повышение качества реализации контрольно-надзорной функции на всех уровнях».

Выступая с докладом *«Государственная промышленная политика в фармацевтической и медицинской отраслях»*, **Ольга Колотилова** представила ключевые показатели развития отрасли: «В первом полугодии 2016 года рост производства лекарственных средств к аналогичному периоду 2015 года составил 38%. Рост производства в прошлом году был 26% при росте рынка около 10%». По словам Ольги Колотиловой, «доля российских лекарственных препаратов в объеме рынка составляет 28,5%, в упаковках – 56%. По номенклатуре препаратов, входящих в перечень ЖНВЛП, доля российских лекарственных препаратов составляет 76%». Спикер также рассказала и о ближайших планах законотворческой деятельности Минпромторга России: «Министерство сейчас работает над введением трехступенчатой системы при проведении государственных закупок: если на госторги вышло предприятие с препаратом, произведённым из российской фармсубстанции, то такой препарат закупается в приоритетном порядке, если таких предложений на госторгах не поступило, то проводится закупка по правилу «третий лишний», если и таких предложений не поступает, то закупка проводится на общих основаниях».



Одним из самых значимых событий второго дня конференции стал организованный Минпромторгом России круглый стол *«Стандарты GMP как ключевой элемент обеспечения качества производства лекарственных средств»*, в рамках которого участники познакомились с актуальными требованиями постановления Правительства Российской Федерации от 06.07.2012 № 686 «Об утверждении Положения о лицензировании производства лекарственных средств» в контексте гармонизации надлежащей производственной практики с GMP EU. Особый интерес участников мероприятия вызвал вопрос инспектирования производителей фармацевтической продукции на соответствие стандартам GMP. Как отметила **Ольга Колотилова**, с 2016 года появилась норма о проверке зарубежных производителей на соответствие стандартам GMP, и Минпромторгом России выдаются соответствующие сертификаты, которые предъявляются при первичной регистрации лекарственных препаратов, со следующего года они будут предъявляться при внесении изменений в регистрационные документы и при подтверждении государственной регистрации. Спикер подчеркнула, что министерство ожидает введения аналогичной нормы по единому рынку для Евразийского союза. Также **Ольга Николаевна** поделилась планами по проведению инспекций российских предприятий: «На 2017-2019 годы будет сделан трёхлетний план проверок на соответствие стандартам GMP, в него будут включены все российские предприятия, в том числе те, которые ни разу не выходили ни на плановую, ни на внеплановую проверку».

Тему проверки зарубежных производителей продолжил директор ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» **Владислав Шестаков**: «С апреля по октябрь инспекторы провели проверки в 30 странах мира, среди которых Индия, США, Великобритания, Китай, Сингапур, и провели 121 инспекцию». **Владислав Николаевич** отметил, что если в начале работы инспекторов было довольно много отказов, то к октябрю 2016 г. количество предприятий, не прошедших инспекцию, свелось к нулю: «Ситуация меняется, и это не может нас не радовать. Это говорит о том, что коллеги действительно серьёзно подходят к инспекции».

Традиционно, кроме вопросов, связанных с нормативно-правовыми аспектами развития фармацевтического рынка, в ходе конференции состоялось обсуждение технологических аспектов фармацев-

тического производства, которые оказывают непосредственное влияние на качество производимых лекарственных средств. В рамках тематического круглого стола представители компаний «Санофи» и «Рош» поделились опытом переноса технологий на российские производственные площадки, подробно рассказав о ключевых этапах трансфера производства биотехнологических препаратов. Оказалось, компании сталкиваются с одной и той же проблемой: часто принимающая площадка в России оказывается недостаточно технологически оборудованной, а ее переоснащение влияет на сроки реализации всего проекта. Также представители «Санофи» обратили внимание на различный уровень опыта у сотрудников компаний, принимающих и осуществляющих трансфер, и на языковой барьер между специалистами обеих сторон. Эту проблему, по словам докладчиков, решают проводимые компанией специальные программы обучения и поддержки сотрудников, осуществляющих трансфер на всех его этапах. Генеральный директор АРФП **Виктор Дмитриев** обратил внимание представителей регуляторных органов, что им стоит подойти с особым вниманием к разработке системы преференций для фармкомпаний в зависимости от глубины локализации: «Предложения Минпромторга о трехступенчатой системе преференций больше актуальны для препаратов химического синтеза, в производстве биотехнологических же препаратов и этапов больше, и в основном нет экономической выгоды для производства субстанций на территории Российской Федерации. Часто достаточно одного завода по производству той или иной субстанции, чтобы обеспечить весь мировой рынок».

Поскольку вопрос обеспечения качества тесно связан с таким понятием, как «управление рисками», директор по качеству компании «Акрихин» **Ольга Маклакова** представила коллегам доклад о системе управления рисками в своей компании. Спикер акцентировала внимание на том, что «оценка рисков должна быть использована при исключительном соблюдении законодательства, основана на научных знаниях и направлена исключительно на защиту пациента».

Подводя итоги проведенного круглого стола, **Виктор Дмитриев** отметил чрезвычайную важность опыта зарубежных коллег, которым они охотно поделились: «Понимание этапности процессов не только производства, но и обеспечения качества, определение точек контроля и рисков важно при планировании трансфера технологий. Все это необходимо учитывать не только производителям, но и регуляторам, инициирующим нормативные новеллы, ставящие попадание в ограничительные списки и предоставление преференциальных возможностей в бюджетных закупках в зависимость от глубины переработки продукта. Такие





предложения должны обязательно обсуждаться с профессиональным сообществом с учетом интересов системы здравоохранения и пациентов и только после этого реализовываться».

Ежегодная конференция «ФармМедОбращение» – это дискуссионная площадка, на которой ключевые игроки фармацевтического рынка обсуждают актуальные вопросы обеспечения качества лекарственных средств и медицинских изделий, в том числе по основным тенденциям развития современной системы обеспечения качества фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ; методологии контроля качества лекарственных средств и неразрушающим методам контроля; обеспечению эффективности и безопасности воспроизведенных лекарственных средств; действующему порядку государственного контроля качества медицинских изделий на различных этапах их обращения. Благодаря такой обширной деловой программе конференция поддерживается профильными органами власти, представители которых каждый год организуют тематические сессии, круглые столы или мастер-классы, призванные разъяснить инициируемые ими нормативно-правовые изменения, получить обратную связь от компаний-производителей. Например, в 2016 году в рамках конференции был организован тренинг ВОЗ по тренд-анализу для сотрудников лабораторных комплексов Росздравнадзора.

VI ЕЖЕГОДНЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ПАРТНЕРИНГ-ФОРУМ «LIFE SCIENCES INVEST. PARTNERING RUSSIA»

9–10 ноября 2016 года в Санкт-Петербурге прошло важное событие в деловой жизни города, на площадке которого каждый год собираются для обсуждения актуальных вопросов и подготовки к подведению итогов года, обмена опытом и знакомства с достижениями иностранных коллег представители органов государственной власти федерального и регионального уровней, бизнес-сообщества, научно-исследовательских центров и институтов, образовательных учреждений, ведущие специалисты медицины, фармации, биофармации и радиологии, в том числе российские и зарубежные производители лекарственных средств, оборудования, а также разработчики и дистрибьюторы инновационной медицинской продукции и оборудования. Значимость события подтверждает поддержка со стороны Правительства Санкт-Петербурга, Министерства образования и науки Российской Федерации, Министерства промышленности и торговли Российской Федерации, Министерства здравоохранения Российской Федерации.





В приветственном письме губернатора Санкт-Петербурга **Георгия Полтавченко** к участникам форума отмечено, что место проведения **Life Sciences Invest** выбрано не случайно: «В Санкт-Петербурге за короткое время создан высокотехнологичный медико-фармацевтический кластер», предприятия которого выпускают востребованные и доступные препараты, качественную медицинскую технику, а сам фармкластер стал драйвером роста для многих других отраслей городской экономики, внося большой вклад в развитие инновационных технологий и выполнение программ импортозамещения. Более того, как отмечено губернатором региона, производимая в городе современная и конкурентоспособная продукция «завоевывает лидирующие позиции на российских рынках и пользуется устойчивым спросом за рубежом». Об этом же говорил и вице-губернатор Санкт-Петербурга **Сергей Мовчан** на торжественной церемонии открытия форума: «Санкт-Петербург – один из лидеров по производству фармацевтических препаратов и медицинского оборудования в России, что позволяет привлекать в страну иностранные компании. В Петербурге работает более 150 компаний, которые занимаются производством фармацевтических препаратов и медицинского оборудования. По этому показателю мы в первых рядах среди всех регионов России». Именно поэтому, по мнению вице-губернатора, множество зарубежных компаний заинтересованы в сотрудничестве с фармацевтическими предприятиями Петербурга. По той же причине в 2016 году «на форум привезен целый пакет предложений от немецких компаний, заинтересованных не только в выводе своих лекарств и оборудования на российский рынок, но и желающих организовывать производство на территории Петербурга и другой территории России». Директор союза «Медико-фармацевтические проекты. XXI век» **Дмитрий Чагин** видит причину выбора локации форума в историческом наследии города: «Де-факто еще сто лет назад в Петербурге был фармацевтический кластер с международным участием. В советское время Ленин-

град был центром фармацевтической науки. А Петроградская сторона и Аптекарский остров еще с дореволюционных времен были местом, где немецкие профессора в области фармации разводили свои фармацевтические огороды. Там же располагалась академия, где до революции 30% преподавателей были немцы».

Партнеринг-форум **«Life Sciences Invest»** – это не только насыщенная деловая программа и площадка для встречи ключевых игроков фармацевтического рынка; это событие с обширной культурной программой, в рамках которой гости северной столицы знакомятся с результатами нововведений и достижениями коллег. Так, накануне форума в СПХФА состоялось торжественное открытие Центра превосходства по разработке инновационных лекарственных средств и технологий. Данный центр включает в себя центр трансферта технологий и центр по GMP-тренингу, что позволяет академии реализовывать научно-исследовательский и образовательный потенциал:

- научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы по доклиническим исследованиям синтетических дженериков из списка стратегических лекарственных средств и списка жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств;
- научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы по доклиническим исследованиям биотехнологических аналогов из списка стратегических лекарственных средств и списка жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств;
- осуществлять подготовку специалистов с учетом современных требований к кадровому потенциалу фармацевтической отрасли.

Одной из ключевых тем VI партнеринг-форума стали вопросы модернизации и адаптации образовательной системы к потребностям рынка. Приветствуя гостей и участников форума, заместитель директора департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **Алексей Алехин** отметил, что министерство всегда уделяло большое внимание вопросам обеспечения качества производства лекарственных средств и подготовке необходимых кадров, потому что кадры для фармацевтической промышленности – это 80% успеха. В ходе пленарного заседания *«Приоритеты в развитии отечественной системы здравоохранения»* обсуждались перспективы развития фармацевтической науки и образования на современном этапе развития, актуальные вопросы межвузовской кооперации, научное и кадровое обеспечение процесса производства инновационных лекарственных препаратов, принципы построения и развития коммуникационных платформ и сетей образовательных учреждений и научно-исследовательских организаций. Об образовании и необходимости адаптации процесса подготовки кадров к потребностям фармацевтического рынка продолжили говорить на тематической сессии *«Инновационный подход в подготовке фармацевтических и медицинских кадров»*. Директор петербургской школы № 197 с углубленным изучением предметов естественнонаучного цикла **Татьяна Гембель** рассказала о первых итогах работы открытого с 1 сентября 2016 году на базе общеобразовательной школы первого фармацевтического класса: «Помимо углубленного изучения физики, химии и биологии, в этих классах проводятся экскурсионные работы по предприятиям фармацевтического кластера Петербурга». Исполнительный директор союза «Национальная фармацевтическая палата» (НФП) **Елена Неволина** подробно остановилась на требующих доработки элементах аккредитационной экзаменации специалистов-фармацевтов: «В 2017 году экзамен пройдет в прежнем формате. Но сейчас мы ставим перед министерством здравоохранения вопрос о том, чтобы он был изменен». В частности, по словам спикера, обсуждается вопрос о необходимости четкого закрепления ответственности членов аккредитационной комиссии.

Про образование много говорили в ходе заседания научно-технического совета *«Фармация будущего»* технологической платформы *«Медицина будущего»*. Говоря о развитии инновационных медицинских технологий в регионах, начальник отдела новых производственных технологий департамента науки и технологий Министерства образования и науки Российской Федерации **Алексей Семин** отметил, что наибольшего успеха удается достичь там, где работают именно фармацевтические кластеры, а не отдельные производства: в Москве и Санкт-Петербурге, Московской, Томской и Новосибирской областях. Проректор Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии **Владимир Лужанин** рассказал о фитофармацевтической платформе, которая создана в СПХФА. По его словам, использование лекарств, выделенных из растений, по-прежнему актуально. Так, широко используются алкалоидные препараты колхицин и дигоксин, а Нобелевская премия в 2015 году была присуждена за выделение артемизинина из одного из видов полыни. «Растения – реактор биологически активных веществ, а наша задача – их выделить и довести до конечного продукта», – убежден представитель СПХФА.

Директор института фармации и трансляционных исследований медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова **Вадим Тарасов** убежден в настоятельной необходимости модернизации профильного образования в России: «Мы должны трансформировать специалиста-провизора в специалиста трансляционных исследований. Для этого в МГМУ, где ранее существовали и фармацевтический факультет, и институт, в котором делали исследования, в сентябре этого года создан объединенный институт. Наша задача – трансляция, переход от фундаментальной науки к практической». Теме образования был посвящен круглый стол *«Химико-фармацевтический научно-образовательный медицинский кластер: первые итоги и перспективы раз-*

вития», в рамках которого во второй день форума обсуждались актуальные проблемы в области фармации как профессиональной сферы деятельности. Участники круглого стола были едины во мнении, что фармацию надо вывести за рамки такого понятия, как «здравоохранение», т.к. она затрагивает как минимум четыре направления: «здравоохранение», «сельское хозяйство», «пищевая промышленность», а также «химическое и химико-технологическое производство». Первый проректор по учебной работе СПХФА **Евгения Кириллова** предложила пересмотреть подходы для выпускников фармацевтических вузов, поскольку учебным заведениям необходимо точнее понимать запросы работодателя: «Наше предложение сводится к тому, чтобы не ограничивать подготовку провизоров только одной областью. Фармация достаточно широка на всём протяжении жизни лекарственных средств». Директор Пятигорского медико-фармацевтического института **Всеволод Аджиенко** рассказал о результатах деятельности химико-фармацевтического научно-образовательного кластера в Ставропольском крае: «В процессе взаимодействия проявляется интерес высших учебных заведений к тому, чтобы делиться нужной информацией, стараться перенимать лучшие практики взаимодействия и реализации образовательных программ».



Первый день форума после торжественной церемонии открытия и пленарного заседания начался тематической сессией *«Развитие системы оказания высокотехнологичной помощи в РФ. Поддержка инновационных компаний в сфере здравоохранения, в том числе мерами нефинансового характера»*, в рамках которой председатель комитета по промышленной политике и инновациям Санкт-Петербурга **Максим Мейксин** рассказал о том, как данное направление развивается в городе: работает фонд развития промышленности, предоставляющий целевые займы на модернизацию производств. Председатель комитета по инвестициям Санкт-Петербурга **Ирина Бабюк** отметила, что в последние годы город стал лидером в области реализации инвестиционных проектов в области здравоохранения.

Лейтмотивом круглого стола *«Инновации фармакологии и токсикологии»* стало обсуждение требований к доклиническим токсилогическим и фармакологическим исследованиям. Участники пришли к единому мнению, что без тщательного проведения доклинических исследований выпускать продукцию на рынок нельзя. Как отметил генеральный директор ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации» **Валерий Макаров**, заниматься выпуском таблеток можно, только предварительно проверив субстанцию в лаборатории. Руководитель группы фармакодинамики ЗАО «Институт экспериментальной фармакологии» **Мария Ковалева** обратила внимание коллег на термин «комбинированные лекарственные средства», которые зачастую ведут себя нестабильно: «Основная проблема производства лекарственных средств в том, что, составляя комбинацию, мы получаем уникальный продукт, который не всегда оказывается предсказуемым. Необходимы доклинические исследования, которые позволяют получать достоверную информацию». Не обошли вниманием участники круглого стола и такое направление, как биоаналоги и наноразмерные лекарственные средства. Коллега **Марии Ковалевой Гаджимагомед Ванатиев** отметил, что на изучение токсичности нанопрепаратов требуется больше времени, чем на изучение традиционных лекарств: 90 дней против 14. В то же время, по словам спикера, нанолекарства – направление перспективное, ведь данные лекарственные средства позволяют уменьшить дозу, вводимую в организм, что впоследствии позволит снизить токсичность лекарственного вещества.

Одним из самых популярных среди участников VI партнеринг-форума стал круглый стол *«Система инспектирования фармацевтического производства»*, где особое внимание было уделено системам норм GLP. Инспектор ВОЗ по GMP, вице-президент по науке ГК «Фармконтракт», д.х.н. **Иван Василенко** рассказал о подводных камнях и необходимости принятия подзаконных нормативно-правовых актов в связи с вступлением в силу приказа Минздрава России от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Свой доклад профессор начал с генезиса надлежащей лабораторной практики: «GLP – система норм и правил и указаний, направленных на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований. Правила GLP применяются для неклинических исследований безопасности разрабатываемых лекарственных средств, разработки пестицидов для сельского хозяйства, токсических веществ, безопасности пищевых добавок и красителей, испытаний веществ на взрывоопасность и испытаний изделий медицинского назначения. Таким образом, не регламентируются GLP фундаментальные исследования и разработка новых аналитических методов». Анализируя эволюцию законодательства, в т.ч. и российского, в области надлежащей лабораторной практики, **Иван Александрович** подробно рассказал, что и в каком объеме регулируется правилами GLP:

- Доклинические исследования веществ (включая лекарственные средства) включают в себя физические, биологические, микробиологические, фармакологические, токсикологические и другие исследования с целью изучения специфического действия и безопасности веществ, но требований обязательного применения правил GLP для целей разработки лекарственных препаратов в настоящее время нет.
- Надлежащая практика для лабораторий контроля качества лекарственных средств представлет собой совокупность организационных и правовых мер, направленных на соблюдение субъектами норм и правил обращения лекарственных средств независимо от форм собственности и ведомственной подчиненности. Деятельность лабораторий регулируется еще на основе ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики.
- Надлежащая лабораторная практика заводских лабораторий определяется правилами надлежащей производственной практики (GMP) и регулируется в рамках аттестации предприятия на соответствие правилам GMP.

«Таким образом, несмотря на закрепление в различных нормативно-правовых актах таких основных принципов GLP, как компетентность и ответственность персонала, оснащенность лаборатории, соблюдение условий хранения изучаемых веществ, внутренний контроль за проведением исследований, ведение протокола исследований, оформление итогового отчета и сохранность данных эксперимента, остается ряд противоречивых моментов и условий для возникновения рисковых ситуаций, – считает спикер. – Например, отсутствие единого координационно-консультативного центра и межведомственные разногласия, а также отсутствие ведомства, которое выполняло бы роль регулятора. Не стоит забывать и о проблеме оснащения лаборатории современным высокоэффективным оборудованием: сейчас есть новые образцы, которые появляются постоянно, без которых нельзя проводить полноценный анализ».

Помимо вопросов надлежащей лабораторной практики, участники круглого стола обсудили и вопросы самоинспекции. Директор по качеству ГК «Герофарм» **Ирина Никитина** считает, что проведение внутреннего аудита должно быть для фармацевтического предприятия обязательной документированной процедурой.

Рассказывая о долгосрочных задачах инспектирования фармацевтических производств, директор ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» **Владислав Шестаков** отметил, что Минпромторгом России поставлена задача проинспектировать все площадки, с которых поставляется продукция в Российскую Федерацию.



Второй день форума был посвящен вопросам международного сотрудничества, инноваций в медицине и проблемам действующего законодательства, регламентирующего фармацевтический рынок России.

В ходе сессии *«Гармонизация требований к обращению лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза»* председатель правления НП «Союз фармацевтических и биомедицинских кластеров» **Захар Голант** отметил позитивные тенденции в консолидации работы профильных органов власти, курирующих национальный фармрынок: «Если до 2010 года каждое из министерств вело свою собственную политику, то с 2010 мы видим более интенсивное общение между Министерством здравоохранения и другими министерствами и ведомствами, каждое из которых отвечает за свой блок вопросов. Мы также видим большое количество вносимых изменений в законодательство». В то же время не все проблемы оказываются решены. Например, директор «НПО Дом Фармации» **Марина Макарова** обратила внимание на отсутствие закона, который бы регламентировал содержание и уход за лабораторными животными. Сохраняются проблемы и в сфере защиты интеллектуальных прав, среди которых заместитель гендиректора «ГЕНЕРИУМ» **Снежана Манакова** особо отметила следующую ситуацию: «Сложившаяся судебная и правоприменительная практика не позволяют соблюдать в полной мере интеллектуальные права правообладателя. Судебное рассмотрение дел чаще всего происхо-



дит слишком поздно, когда контракты уже заключены. Да, есть практика возмещения ущерба. Но добиться этого бывает чрезвычайно сложно». По словам спикера, чаще всего заказчики не применяют норму, позволяющую им отстранить от участия в закупке тех ее участников, которые предоставляют недостоверную информацию.

Помимо оценки работы профильных органов государственной власти, участники сессии подвели промежуточные итоги развития отрасли в целом и оценили эффективность решения задач и степень достижения показателей, закрепленных в ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». По мнению проректора, по развитию СПХФА Минздрава России, председателя Правления НП «Союз фармацевтических и биомедицинских кластеров» **Захара Голанта**, практически все ключевые показатели эффективности, которые были заявлены в рамках федеральной целевой программы, сейчас выполняются: «За последние три года в России появилось 37 новых фармацевтических заводов. Фармацевтическая и медицинская промышленность – это одна из самых динамично развивающихся отраслей на сегодняшний момент».

Круглый стол *«Развитие фармацевтической отрасли на базе инновационных территориальных и промышленных кластеров. Международное взаимодействие»* прошел в формате обмена опытом между российскими и зарубежными участниками фармрынка и поиска эффективных механизмов взаимодействия в условиях санкций. Вице-губернатор Санкт-Петербурга **Сергей Мовчан** рассказал о готовности нескольких немецких компаний выйти на рынок Санкт-Петербурга и выразил надежду на продолжение сотрудничества с фармацевтическим кластером из Гамбурга. Директор по развитию и инновациям кластера «Medcity» **Фил Джексон** рассказал о том, как поставлена работа фармкластера Великобритании: структура работает в тесном взаимодействии с мэрией Лондона, учеными из Оксфорда и Кембриджа, кластер включает три профильных колледжа из мирового списка ТОП-5, шесть высших учебных заведений из ТОП-20 мировых университетов. «При этом регион также лидирует по благотворительности, на его территории развита IT-индустрия (Microsoft, Google, Cisco), что обеспечивает конвергенцию между отраслями. Взаимодействие с IT критически важно для современной медицины», – подчеркнул спикер.

Теме новых разработок был посвящен круглый стол *«Инновации в медицине»*. Президент Российского кардиологического общества **Евгений Шляхто** призвал тщательно анализировать итоги внедрения инноваций: «Привлечение новых партнеров, обратная связь, анализ успехов и неудач – именно то, что позволит нам сегодня объединить трансляционный и инновационный цикл и развиваться дальше». Руководитель лаборатории молекулярной вирусологии и онкологии Центра перспективных исследований СПбПУ **Андрей Козлов** рассказал об истории открытия вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), его развитии и системе противоэпидемических мероприятий, а также поделился информацией о работе над вакциной против ВИЧ. Говоря об онкологических заболеваниях, спикер отметил, что проблема будет решаться в ином направлении, чем до сих пор: «Специалисты предполагают, что в промежуток между 2020 и 2030 годами создадут вакцину, которая не сможет избавить пациента от опухоли, но будет приводить её в равновесное состояние».

Аналогичные вопросы инноваций обсуждались и на сессии *«Инновации в фармации»*, где особое внимание уделили лечению заболеваний печени. Заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии **Сергей Оковитый** считает, что одно из наиболее перспективных направлений для лечения заболеваний печени – это фитотерапия: «В настоящий момент есть большая доказательная база положительных эффектов от ее использования». Директор Центра фармацевтических технологий СПХФА **Андрей Теслев** представил итоги работы центра: в ЦФТ в рамках госконтрактов уже разработали несколько уникальных препаратов. «Нами создано лекарство, обладающее антиишемическим действием. Наш центр разработал несколько разновидностей данного препарата – растворы для инъекций и таблетки в твердой оболочке», – отметил спикер.

По традиции в рамках двухдневного партнеринг-форума **«Life Sciences Invest»** состоялось торжественное подписание ряда соглашений о стратегическом партнерстве между российскими и зарубежными компаниями. В 2016 году это были немецкий Bayer и отечественный «Полисан». Данное соглашение сроком на 10 лет подразумевает расширение сотрудничества в области производства на территории Санкт-Петербурга контрастных веществ и кардиологического препарата. Как отметил генеральный директор Bayer **Нильс Хессманн**, выпуск препаратов в России позволит обеспечить ими около 200 тысяч пациентов, что поможет избежать более пяти тысяч инсультов. Роль соглашения, которое позволит уже в те-



кущем году выпустить тестовые партии препаратов, а к 2018 году запустить коммерческое производство, высоко оценил губернатор Санкт-Петербурга **Георгий Полтавченко**: «Город делает еще один шаг вперед в развитии фармацевтического кластера. Компания «Полисан» – надежный, проверенный временем партнер города в развитии медицины и здравоохранения. Она входит в десятку крупнейших российских производителей жизненно важных препаратов. Полтора года назад «Полисан» и всемирно известная фармацевтическая компания «Байер» заключили соглашение о стратегическом партнерстве. Была поставлена задача создать в Петербурге производство контрастных препаратов для проведения компьютерной и магнитно-резонансной томографии. Сегодня эта задача успешно реализована. Новая линия позволит наладить выпуск контрастных веществ, которые до сих пор импортировались из-за рубежа».



Также в рамках форума было подписано трехстороннее соглашение о подготовке кадров между СПХФА, Pfizer и Витебским государственным медицинским университетом ордена Дружбы народов.

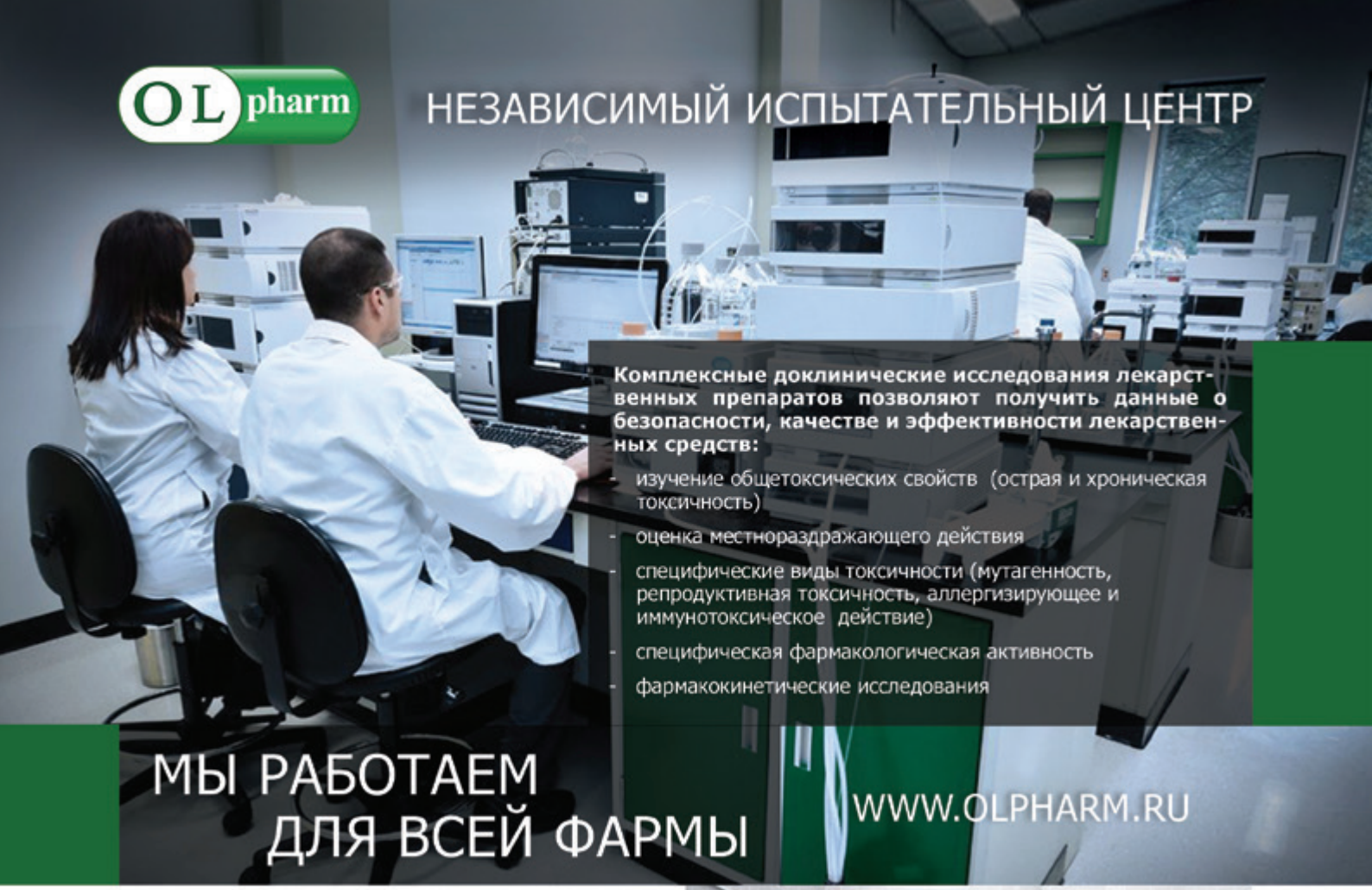


Подводя итоги VI Ежегодного партнеринг-форума «**Life Sciences Invest. Partnering Russia**», председатель комитета по промышленной политике и инновациям Санкт-Петербурга **Максим Мейксин** отметил, что фармацевтическая отрасль стала «визитной карточкой» Санкт-Петербурга, а форум – площадкой, на которой вырабатываются наиболее эффективные меры поддержки фармацевтической отрасли: «Мы видим, что фармацевтическая отрасль – один из драйверов развития промышленности, технологий и инноваций в городе. Форум – возможность встретиться, посмотреть, что нового появилось, поделиться мнениями, сформировать повестку дня». Директор союза «Медико-фармацевтические проекты. XXI век» **Дмитрий Чагин** отметил изменение вектора ключевых тем мероприятия: «Форум проходит шестой раз. Вопросы, которые мы обсуждаем на форуме, мы собираем весь год со стороны наших фармацевтических предприятий. Это и взаимодействие с пациентским сообществом, вопросы прорывных технологий, вопросы трансфера технологий, образовательные программы, события вокруг Санкт-петербургской государственной химико-фармацевтической академии, реализация нашей профильной программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» и все те прорывные направления и вопросы импортоопережения, которые сейчас наши компании фармацевтического кластера осуществляют в полном объеме». В центре внимания VI партнеринг-форума «**Life Sciences Invest. Partnering Russia**» находятся уже не вопросы импортозамещения в фармацевтической отрасли, а импортоопережения». Генеральный директор ГК «Герофарм» **Петр Родионов** отметил, что форум стал традиционной осенней встречей, где представляются достижения, обсуждаются механизмы борьбы с вызовами, стоящими перед фармацевтическим сообществом. При этом, по словам **Петра Родионова**, обсуждение проходит не только на городском уровне, но и с представителями федеральных ведомств, что позволяет сформировать определенное видение и стратегию развития отрасли в целом.

Высокую оценку форуму дали и зарубежные гости: госсекретарь Министерства экономики, строительства и туризма земли Мекленбург – Передняя Померания **Рудольф Штефан** заметил, что форум является важным событием в фармацевтической отрасли и производит колоссальное впечатление: «Вице-губернатор Петербурга **Сергей Мовчан** сегодня уже говорил, что каждый из участников форума на своем рабочем месте и в силу своих возможностей делает все, чтоб обеспечить здоровье нации, чтобы каждый гражданин чувствовал себя обеспеченным в плане здравоохранения. И я с этим согласен. С одной стороны, можно было бы считать, что то, что происходит в стенах форума это только обмен опытом, но на самом деле горизонты гораздо шире. Каждый из присутствующих имеет шанс сделать что-то хорошее для своих сограждан, и для представителей ФРГ огромная честь внести и свой вклад в это. Ведь речь идет об увеличении продолжительности жизни граждан России».

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

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В СООТВЕТСТВИИ С НАДЛЕЖАЩИМИ ПРАКТИКАМИ GXP»

18 ноября 2016 года GLP-сертифицированная лаборатория ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» и ведущий химико-фармацевтический холдинг России ГК «Фармконтракт» провели в АО «Технопарк Слава» научно-практическую конференцию по надлежащим практикам GxP. Мероприятие под известным и зарекомендовавшим себя брендом «Разработка и регистрация лекарственных средств» привлекло порядка 150 специалистов фармацевтической отрасли из Москвы, Московской области и других регионов Российской Федерации. Нормативно-правовые изменения, которые были внесены в 2016 году в GxP-стандарты, – крайне важная и актуальная тема, волнующая всех участников рынка. В частности, на конференции большое внимание было уделено вопросу сертификации лабораторий в соответствии с новым приказом Минздрава России № 199Н от 01.04.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».







Проведение научно-практической конференции по надлежащим практикам GxP накануне крупнейшей фармацевтической выставки России и СНГ «Pharmtech & Ingredients», на площадке которой анонсировалось проведение семинара со схожим названием, организаторы объяснили тем, что в 2016 году в рамках «Pharmtech & Ingredients» мероприятие носило узкую направленность – оно было посвящено вопросам внедрения биотехнологий в фармацевтическое производство. В то же время самой актуальной темой прошлого года для российского фармрынка стали нормативно-правовые изменения в GxP-стандартах. Именно поэтому научно-практическая конференция, раскрывающая специфику работы лабораторных комплексов в условиях ГОСТ по GLP (ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»), а также особенности обеспечения качества в деятельности фармацевтических предприятий в соответствии со стандартами ISO, GMP и GLP, механизмы обеспечения качества клинических исследований, привлекла внимание самых разных специалистов фармрынка России не только Центрального федерального округа, но и других регионов.

Первая секция мероприятия была открыта докладом генерального директора ООО «ЦФА», главного редактора научно-производственного журнала *«Разработка и регистрация лекарственных средств»*, к.фарм.н. **Игоря Шохина**. Свой доклад спикер начал с тезиса о том, что внедрение стандартов GxP в деятельность лабораторного центра преследует решение таких задач, как повышение качества выполнения исследований путем внедрения реальной, функционирующей системы менеджмента качества; повышение доверия партнеров и экспертов регуляторного органа к результатам исследований центра. Комплекс указанных задач и их решение – неотъемлемый элемент ряда стандартов, регламентирующих деятельность лаборатории:

- Правила надлежащей производственной практики (утверждены приказом Минпромторга России от 14 июня 2013 г. № 916).

- ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики.
- ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.
- ГОСТ Р ИСО 9001-2015. Системы менеджмента качества. Требования.
- Приказ Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Но какому стандарту отдать предпочтение при организации лабораторного комплекса? Утвержденные Минпромторгом России правила надлежащей производственной практики с точки зрения лабораторий регулируют деятельность лабораторий ОКК и R&D при фармацевтическом предприятии и должны быть внедрены на всем предприятии. ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий – основной документ для центров контроля качества лекарственных средств, центров сертификации, калибровочных лабораторий и т.д. Согласно этому стандарту аккредитация лабораторного комплекса на компетентность и независимость проводится сотрудниками Росаккредитации, а сертификация на компетентность проводится органом по сертификации. ГОСТ Р ИСО 9001-2015. Системы менеджмента качества. Требования – наиболее общий документ, который регулирует управление качеством любой организации в целом (не только лабораторий и не только фармацевтических). «Информация, приведенная в данном ГОСТе, в первую очередь нужна специалистам ООК для внедрения системы менеджмента качества в деятельность учреждения вне зависимости от вида его деятельности. Сертификация может быть проведена в дополнение ко всем вышеуказанным стандартам качества», – пояснил спикер. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики и приказ Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» – крайне близкие по своему содержанию документы. Например, ООО «ЦФА» успешно прошло сертификационный аудит на соответствие принципам надлежащей лабораторной практики GLP по ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Указанный ГОСТ предполагает несколько этапов сертификации:

- предварительная оценка системы менеджмента, включающая прежде всего анализ документации GLP;
- детальная сертификационная проверка соответствия деятельности испытательного центра требованиям заявленного стандарта.

«При этом диагностический аудит/консалтинг лаборатории на соответствие стандарту GLP может быть проведен любым независимым консалтинговым агентством и будет носить рекомендательный характер при разработке и внедрении системы менеджмента качества», – пояснил **И.Е. Шохин**. Далее спикер поделился успешным опытом по прохождению сертификационного аудита, раскрыв основные критерии соответствия лаборатории данному ГОСТу: «внедрение GLP в деятельность центра и получение соответствующего сертификата дало колоссальный опыт сотрудникам лаборатории, а также обеспечило принципиальное повышение качества и прослеживаемости результатов исследований».

Позицию органа по сертификации представила старший эксперт ассоциации по сертификации «Русский регистр», обладающей правом проводить добровольную сертификацию на соответствие надлежащим практикам GxP, **Е.П. Образцова**. Аудитор акцентировала внимание участников конференции на таком аспекте успешного поддержания статуса сертифицированного лабораторного центра, как ежегодное прохождение надзорных аудитов и ресертификация по истечении трехлетнего срока.

В рамках второй секции конференции участники и гости познакомились с прикладными аспектами реализации практик GxP в исследовательской деятельности. **И.Е. Шохин** представил доклад *«Разработка и валидация нестандартных методик анализа (анализ качества лекарственных средств и биоаналитика) в GxP-окружении»*, в котором было разобрано два исследования из деятельности ООО «ЦФА»: разработка и валидация методики определения эпоэтина в сыворотке крови для фармакокинетических исследований, а также разработка и валидация методики определения посторонних примесей в препаратах розувастатина. В продолжение темы докладчика генеральный директор ООО «ЦКИ» **Вера Березина** поделилась правилами выбора партнеров для проведения клинических исследований биоэквивалентности и организации взаимодействия между CRO, клиническим центром и лабораторией. Среди общих требований, предъявляемым к партнерам, спикер отметила следующие:

- Компетентность в области предполагаемого сотрудничества.
- Техническая оснащенность: партнер должен располагать необходимым набором требуемых для выполняемых им задач технических средств.
- Надежность как в финансовом плане, так и в отношении сроков и качества выполняемых работ.
- Опыт в решении аналогичных задач.
- Гибкость.

В то же время при поиске партнеров в сфере клинических исследований к указанному перечню стоит добавить и специфические требования:

- Соответствие условий выполнения проекта правилам надлежащих практик.
- Научная обоснованность плана исследования и сделанных по его итогам выводов.
- Соответствие содержания и оформления документации проекта требованиям регуляторных органов.
- Соблюдение этических норм и правил.

У клинического исследования биоэквивалентности есть дополнительные особенности, создающие повышенные требования к компаниям, вовлеченным в проект. «Во-первых, в отличие от сугубо терапевтических исследований, сосредоточенных на оценке медицинских показателей субъектов, клиническое исследование биоэквивалентности имеет дополнительную исследовательскую задачу – оценку фармакокинетических параметров исследуемого продукта. Включению подлежат, как правило, здоровые субъекты, а это означает отдельные процедурные формальности при подтверждении диагноза «здоров». Кроме того, за свое участие добровольцы чаще всего получают вознаграждение, что создает дополнительные процедуры и требования к ним. Исследования проходят в небольших выборках, и в том числе по этой причине для получения удовлетворительного результата необходимо унифицировать условия эксперимента; учитывая стационарный характер такого исследования, стандартизации подлежат длительные организационные периоды. Самое главное – наиболее ценными, но и наиболее уязвимыми в таком исследовании являются непосредственные объекты исследования – образцы крови субъектов. Их могут взять не в том количестве, в неверные временные периоды, не у того добровольца, ошибиться в условиях и длительности пробоподготовки, хранения и транспортировки, неверно промаркировать, проанализировать с ошибками, наконец – разбить, разлить, потерять, перепутать… И все это усугубляется тем обстоятельством, что в исследовании биоэквивалентности у фармкомпании всегда как минимум 2 бизнес-партнера – клинический центр и лаборатория, и также могут вовлекаться CRO, транспортные компании, контрактные производители и иные организации», – пояснила свою позицию **В.С. Березина**.

Завершилась вторая сессия конференции докладом заведующего лабораторией ФГБУ «ГНЦ «Институт Иммунологии» ФМБА России **В.В. Смирнова**, в котором был представлен современный взгляд на нормативно-правовые основы установления взаимозаменяемости лекарственных средств в свете нового законодательства (постановление Правительства «О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения» от 28.11.2015 г.).

По традиции третья сессия научно-практической конференции ***«Разработка и регистрация лекарственных средств»*** прошла в форме презентации новинок от компаний-производителей оборудования для фармацевтических предприятий и лабораторных комплексов. В частности, key account manager ГК «Фармконтракт» представил варианты оснащения и рекомендации по созданию лаборатории, специализирующейся на исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами I-IV групп патогенности: «Цикл реализации лабораторного комплекса от постановки задачи до запуска в эксплуатацию должен выглядеть следующим образом:

- Постановка задачи.
- Согласование и утверждение технического задания.
- Проектирование.
- Квалификация проекта.
- Строительство комплекса и монтаж инженерных систем.
- Запуск в эксплуатацию на этапе строительной готовности.
- Комплектация мебелью, оборудованием и инструментами.
- Квалификация оборудования и инженерных систем.
- Запуск лабораторного комплекса в эксплуатацию».

Другой key account manager ГК «Фармконтракт», **Александр Сапронов,** представил варианты оснащения лабораторий для проведения теста USP4. Со вступлением в силу Государственной фармакопеи XIII ОФС «Растворение для суппозиториев на липофильной основе» стала обязательной к исполнению для всех производителей суппозиториев. Для исполнения данной статьи производителю необходимо иметь тестер «Проточная ячейка» со специальными ячейками для растворения суппозиториев. Данный тип ячеек стандартизован и описан в ОФС. Суть метода «проточная ячейка» заключается в том, что лекарственную форму помещают в ячейки небольшого объема с точно определенными размерами (различные типы ячеек под различные продукты). На дно ячейки кладется рубиновый шарик, который выступает в качестве обратного клапана, а также предотвращает блокирование канала ячейки стеклянными шариками при их использовании (используются для создания внутри

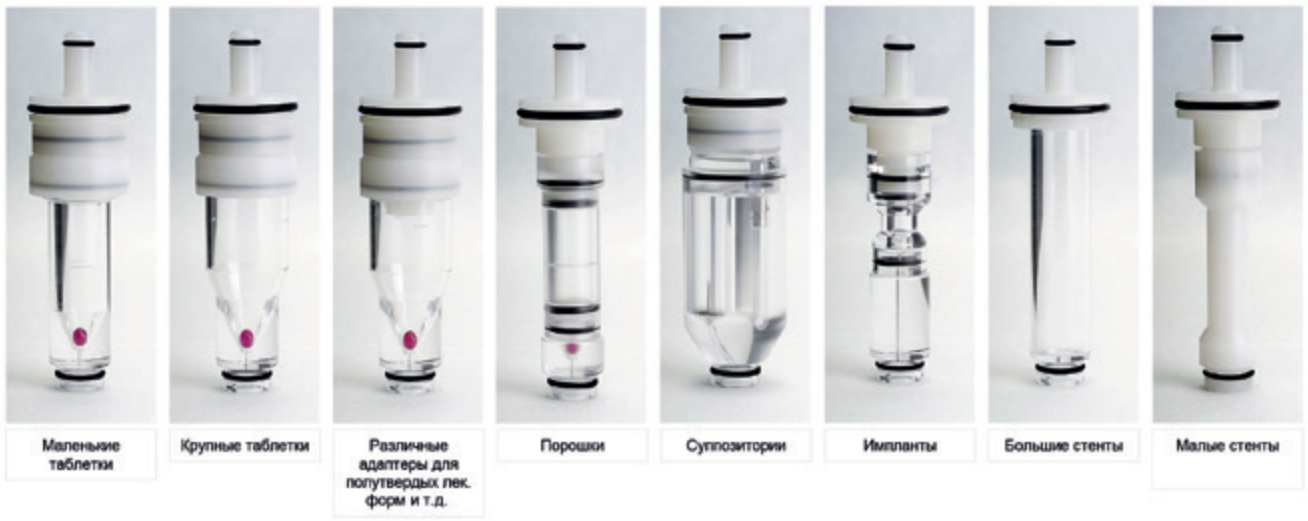


Рисунок 1. **Специальные ячейки для различных лекарственных форм**

ячейки ламинарного потока). Через ячейку с определенной скоростью прокачивается среда растворения. С определенной частотой осуществляется пробоотбор. Сами ячейки имеют водяную рубашку для поддержания постоянной температуры среды растворения. «Возможность использования различных типов ячеек в зависимости от тестируемого продукта позволяет с уверенностью сказать, что тестер «Проточная ячейка» является универсальным инструментом как для R&D- так и QC-лабораторий», – отметил спикер. Производители предлагают ячейки для исследования таблеток, капсул, порошков и гранулятов, имплантов, стентов, оптических линз, кремов и мазей и другие ячейки под конкретные задачи заказчика (рисунок 1).

«Тестер может работать по открытому и/или закрытому циклу (иметь открытую и/или закрытую



Рисунок 2. **Конфигурации системы в закрытом цикле**

конфигурацию). В закрытом цикле насос прокачивает определенный объем среды растворения (от 15 до 4000 мл) через испытуемый образец в ячейке. В открытом цикле мы прокачиваем растворитель через образец по незамкнутому циклу. Отработанная

процесс/система	риски/ошибки
Составление ТЗ	Ошибки проектирования Выбор неверного пути реализации проекта
Проектирование	Ошибки, приводящие к перепроектированию и переделкам в процессе реализации
Выбор технологического оборудования	Возможность выполнить производственную программу, провести квалификацию и валидацию
Строительно-монтажные работы	Прохождение квалификации
Чистые помещения	Прохождение квалификации
Инжиниринговые мероприятия	Прохождение квалификации
Пусконаладочные работы	Достоверность результатов, стабильная работа
Эксплуатация и сервисные работы	Своевременное устранение неполадок
Ввод и вывод из эксплуатации	Риски для последующих проектов

Рисунок 3. **Минимизация рисков посредством GEP**

среда сливается в емкость для отходов», – пояснил **А.А. Сапронов**. Первопроходцем в области создания тестеров для исследования лекарственных форм по методу USP 4 стала швейцарская компания SOTAX. Сегодня в линейке компании много различных конфигураций и аксессуаров для проведения анализов по данному методу. Все системы **Sotax** позволяют проводить их усовершенствование, от самого простого прибора до полуавтоматической рабочей станции. Различные конфигурации тестеров SOTAX как раз и представил спикер.

Завершилась конференция выступлением руководителя Центра надлежащих инженерных практик ФБУ «ГИЛС и НП» **Евгения Шмакова**, который рассказал о минимизации рисков путем экспертного сопровождения в процессе создания производственной площадки и лаборатории. Более того, по мнению спикера, для минимизации рисков процесс квалификации и валидации должен начинаться еще на этапе формирования бизнес-плана и заканчиваться только после завершения жизненного цикла самого проекта.

Среди наиболее типичных несоответствий/ошибок при квалификации проекта **Е.А. Шмаков** отметил следующие:

- В проектной документации нет четкой прослеживаемости движения персонала, сырья, материалов, полупродуктов, готовой продукции.
- При проекте совмещенного производства не производится оценка рисков кросконтаминации на этапе проектирования.
- Не учитываются при проектировании помещения для карантина и внутрипроизводственного контроля.
- Не учитываются все риски, связанные с движением воздушных потоков (особенно за зоной проектирования).
- Совмещенное хранение уборочного инвентаря для разных участков производств.
- Некорректная компоновка блоков системы вентиляции (несоответствие параметров микроклимата)….

Также спикер представил порядок действий предприятия/лаборатории после выявления несоответствий:

- Первичная оценка и классификация (критическое/некритическое).
- Принятие решения о дальнейших действиях.
- Поиск причин отклонения, разработка корректирующих или предупреждающих действий (CAPA).
- Одобрение и реализация CAPA.
- Документальное закрытие отклонений.
- Отслеживание и распространение информации.

Подводя итоги, **Евгений Шмаков** порекомендовал представителям компаний для минимизации рисков привлекать стороннюю организацию для независимой оценки результатов, а качество конечного продукта закладывать уже на этапе формирования технического задания по проекту. Помимо этого, необходимо формирование цивилизованного рынка квалификации, нормативной базы, требований к качеству выполняемых работ: квалификация, как и государственная экспертиза, должна стать обязательным этапом создания фармацевтического производства,



Рисунок 4. Обобщенная схема последовательности основных стадий создания производственного участка или лабораторий

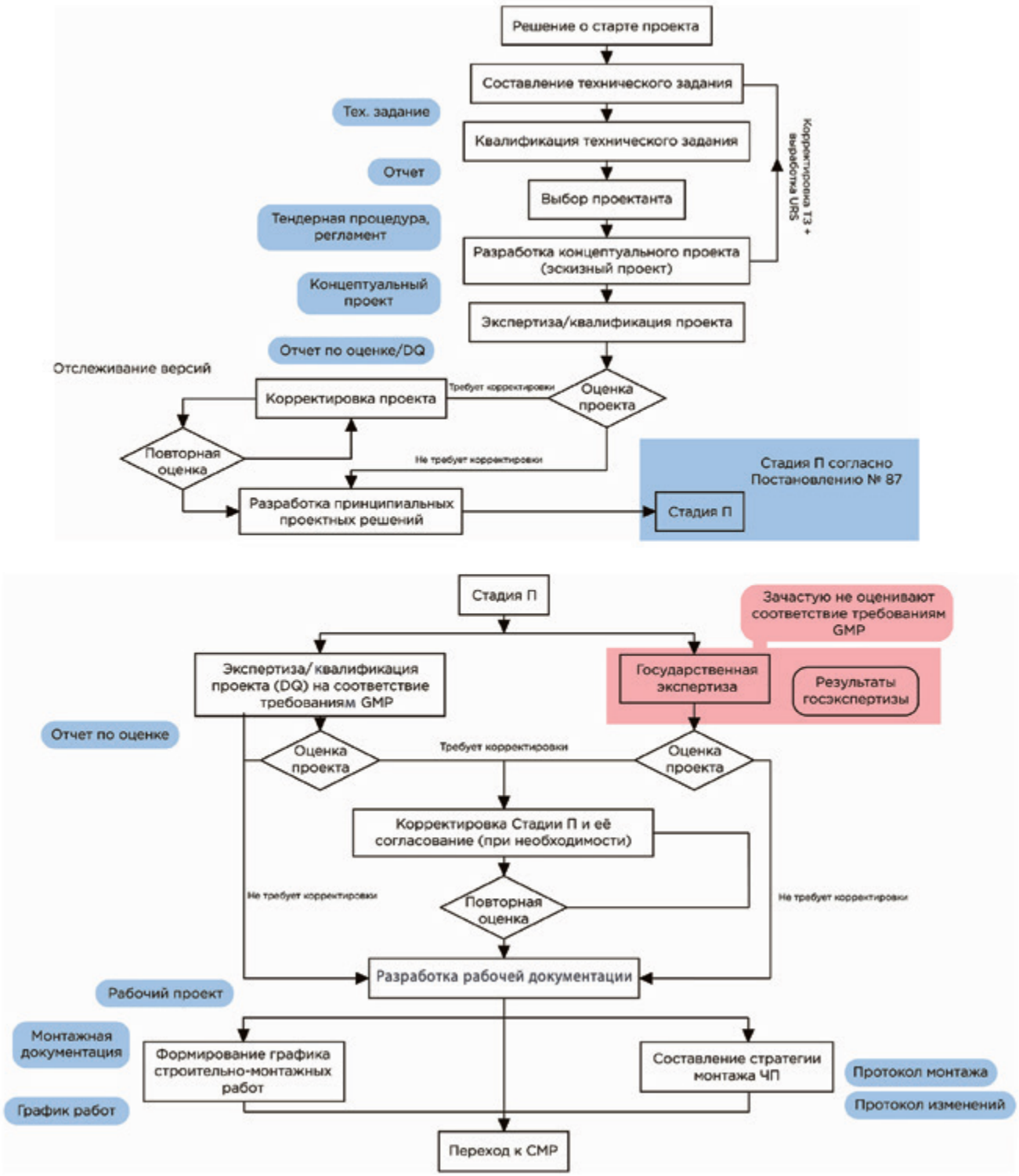


Рисунок 5. Этапы минимизации рисков путем привлечения экспертной оценки

поскольку вместе эти процедуры позволяют снизить риски, связанные с бюджетом и сроками проекта.

Высокий уровень организации научно-практической конференции, профессиональный состав компетентных докладчиков, интересные и актуальные темы – все это привлекло колоссальное количество участников, отзывы и пожелания которых касались необходимости регулярного проведения аналогичных мероприятий. Именно поэтому весной 2017 года в АО «Технопарк Слава» снова пройдет конференция по актуальным темам GxP-стандартов, с материалами которой наши читатели смогут познакомиться более детально уже в следующем выпуске.

18-Я МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА ОБОРУДОВАНИЯ, СЫРЬЯ И ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА «PHARMTECH & INGREDIENTS»

22–25 ноября 2016 года в МВЦ «Крокус Экспо» прошла крупнейшая для рынка России и СНГ фармацевтическая выставка, способствующая развитию отечественного производства и расширению сотрудничества мировых инновационных компаний с отечественными фармпроизводителями. По традиции мероприятие проходило при поддержке Минпромторга России, правительства Московской области, отраслевых ассоциаций и постоянных спонсоров и партнеров – ГК «Фармконтракт» и GE Healthcare. Информационным партнером мероприятия на протяжении многих лет выступают научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» и портал gmpnews.



Высокое значение выставки «Pharmtech & Ingredients» для фармацевтической промышленности России ежегодно отмечают как представители Минпромторга России, так и руководители профильных ассоциаций. В частности, в приветственном письме к участникам и гостям мероприятия директор департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Министерства промышленности и торговли Российской Федерации **Ольга Колотилова** оценила выставку как «уникальный проект и значимое для отрасли событие, которое позволяет объединить работающие на фармацевтическом рынке организации из 25 стран мира». Генеральный директор АРФП **Виктор Дмитриев** считает выставку «ведущим мероприятием, способствующим укреплению деловых связей между российскими и зарубежными предприятиями, обмену опытом»; это своего рода диалоговая площадка для специалистов фармацевтической индустрии, ученых, представителей профильных органов власти со всей России, стран СНГ и Европы. Солидарна с коллегой в высокой оценке роли выставки для России и ближнего зарубежья и исполнительный

директор СПФО **Лилия Титова**: на протяжении 18 лет мероприятие остается крупнейшей выставкой, где ежегодно и весьма успешно демонстрируется широкий спектр производственного и упаковочного оборудования, клинических испытаний, новейшие инновационные технологии фарминдустрии. Статус выставки подтверждается и уровнем гостей, принимающих участие в торжественной церемонии открытия. В этом году гостей МВЦ «Крокус Экспо» приветствовали заместитель председателя правительства Московской области, министр инвестиций и инноваций Московской области **Денис Буцаев**, директор ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации **Владислав Шестаков**, председатель Комитета Торгово-промышленной палаты Российской Федерации по развитию потребительского рынка **Александр Борисов**, заместитель генерального директора АРФП **Елена Масловская**, исполнительный директор СПФО **Лилия Титова**.

Как отметил в своём выступлении заместитель председателя правительства Московской области **Денис Буцаев**, фармпроизводство – «это единственная отрасль экономики, которая не упала в 2014–2015 годах и показала устойчивую тенденцию к росту, что в 2016 году привело практически к 20% увеличению объема производства в Московской области». Положительные тенденции развития российского фармпрома отмечены и в приветственном письме **Ольги Колотиловой**: «в отечественной фармацевтической промышленности наблюдаются положительные перемены – строительство новых заводов, обновление оборудования, расширение ассортимента выпускаемой продукции. Среди российских производителей немало предприятий, чей уровень оснащения, система организации управления производством и обеспечение качества продукции соответствует мировым стандартам. Все это дает возможность оптимистичного прогноза, что потенциал отечественной фарминдустрии позволит в будущем обеспечить здравоохранение страны практически полностью за счет современных российских лекарственных средств». **Виктор Дмитриев** среди позитивных тенденций отмечает повышение инвестиционной привлекательности отечественной фармотрасли за счет происходящих изменений регуляторной системы обращения лекарственных средств. Заявления представителей органов власти и отраслевых объединений подтверждаются обилием участников и колоссальным интересом посетителей выставки к предлагаемым как экспонентами, так и организаторами мероприятий: в 2016 году в выставке «Pharmtech & Ingredients», площадь которой достигла 14 000 м^2, приняли участие 359 компаний из 26 стран, из них 45 компаний-экспонентов – новые участники; за 4 дня работы выставку посетили 6511 специалистов фармацевтической отрасли из 58 российских регионов и 41 страны мира, т.е. по сравнению с прошлым годом прирост посетителей составил 9%.

С чем связан такой ажиотаж?

Во-первых, с активностью компаний-экспонентов, которые не просто представили эксклюзивные и инновационные стенды, но и приготовили ряд интерактивных мероприятий. Например, еще до начала выставки ведущий химико-фармацевтический холдинг России ГК «Фармконтракт» анонсировал массу интересных мероприятий, которые начались с первого дня. Традиционно специально для выставки было подготовлено новое научно-практическое руководство для биотехнологов: **«Красная» биотехнология: от науки к промышленности»**. Презентация крайне актуального издания состоялась в рамках хоро-





шо известного и любимого посетителями «Pharmtech & Ingredients» семинара «*Разработка и регистрация лекарственных средств*». Как отметила коммерческий директор ГК «Фармконтракт» **Оксана Якименко**, открывая семинар, книга была подготовлена в кооперации с GE Healthcare и лучшими отечественными и зарубежными учеными как ответ на запросы потребностей российских заводов в высокоэффективном оборудовании для организации производства биопродуктов и квалифицированных кадрах. На ее страницах сочетаются как научные достижения развития биопроцессов, так и практические навыки внедрения биотехнологий для производства биологических лекарственных средств. Издание содержит наглядные примеры организации этапов разработки, масштабирования и серийного выпуска биотехнологической продукции на примере производства моноклональных антител, биоаналога инсулина гларгина, вакцин, фракционирования плазмы, генно-инженерных препаратов из растений и других задач, стоящих перед отраслью.

Сам семинар «*Разработка и регистрация лекарственных средств: биотехнологические аспекты*» также был посвящен вопросам развития биотехнологий. Тема семинара, по словам модератора, вице-президента по маркетингу ГК «Фармконтракт» **Евгении Дориной**, выбрана не случайно: «На сегодняшний день на долю биотехнологических препаратов в России приходится только 8,5% всех лекарственных средств. Такая ситуация во многом обусловлена тем, что полный цикл организации производства биофармацевтической продукции до ее вывода на рынок – процесс достаточно длительный и в среднем занимает 5–7 лет. В результате отечественный рынок биопрепаратов остается преимущественно зависимым от импорта. Хотя есть и исключения». Например, директор по экономике здравоохранения группы компаний «Р-Фарм» **Александр Быков** в рамках семинара рассказал о том, как происходило создание биофармпроизводства на заводе в Ярославле. Уникальная линия по производству терапевтических белков была создана на платформе **FlexFactory** GE Healthcare Life Sciences и стала своеобразной иллюстрацией внедрения передовых технологий зарубежных коллег на отечественный рынок. Платформа основана на так называемых «одноразовых технологиях» и позволяет в короткое время нарабатывать значительные объемы высокотехнологичной продукции, в частности моноклональных антител. В отличие от стандартных решений «одноразовые технологии» позволяют значительно экономить ресурсы и время. На всех этапах производства (культивирование, хроматография, фильтрация) применяются одноразовые элементы, которые после использования утилизируются и заменяются новыми. Все это дает возможность оперативно адаптировать линию для производства новых продуктов в соответствии с актуальными потребностями системы здравоохранения. Более подробно о **FlexFactory** и других продуктах рассказал менеджер по развитию бизнеса GE Healthcare Life Sciences в регионах Европы, Ближнего Востока и Африки **Фрэнсис Манон**: «Интегрированная биотехнологическая система **FlexFactory** дает возможность организовать сертифицированное по стандартам GMP



производство многих жизненно важных препаратов и субстанций для их изготовления в максимально короткие сроки – от 9 до 12 месяцев. При этом по мере диверсификации производства можно изменять отдельные процессы либо разрабатывать абсолютно новую линию». Спикер также обратил внимание участников семинара, что комплексный подход при внедрении биотехнологий позволяет сократить время вывода продуктов на рынок и масштабировать производство в соответствии с текущими потребностями системы здравоохранения. Для решения этих задач GE Healthcare предлагает ряд инновационных решений, среди которых «полностью функциональный, готовый к запуску в течение 14-18 месяцев биотехнологический комплекс KUBio, предназначенный для производства инсулина, препаратов для лечения рака, гемофилии и других заболеваний». Кстати, совершить виртуальное турне по биофармацевтическому предприятию **KUBio** для создания технологических линий по производству моноклональных антител и ознакомиться со всеми этапами производства биофармацевтических препаратов на платформе GE Healthcare **FlexFactory** можно было все дни работы выставки на стенде компании.

Еще одним из самых популярных событий деловой программы «Pharmtech & Ingredients» стал круглый стол *«Маркировка идентификационными знаками лекарственных препаратов. Варианты технического и информационного обеспечения»*. Ключевые игроки фармацевтического рынка обсудили предстоящие изменения 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», обусловленные проектом федерального закона «О маркировке товаров контрольными (идентификационными) знаками в Российской Федерации» (разработан Министерством финансов Российской Федерации), согласно которому устанавливаются правовые основы государственного контроля за оборотом товаров от производства до конечного потребителя с целью усиления эффективной борьбы с контрафактными лекарственными средствами и пресечения нарушений правил обращения лекарственных средств. Согласно разработанному Минфином России проекту с начала 2017 года должен стартовать пилотный проект по внедрению новой системы маркировки, а к концу 2018 года все лекарственные препараты должны обладать контрольными идентификационными знаками. Для реализации этих амбициозных задач создана специальная рабочая группа, представитель которой, исполнительный директор СПФО **Лилия Титова** рассказала о задачах группы: «Основная цель рабочей группы – унифицировать требования и минимизировать расходы на внедрение системы сериализации, которые лягут бременем на бюджеты производителей и карманы пациентов… Группой разрабатываются рекомендации по маркировке с техническими требованиями к знаку, который будет наноситься на упаковки».

Необходимость внедрения унифицированной для всех участников фармацевтического рынка маркировки продукта не вызывает сомнения – вопросы, вызывающие нарекание и порождающие массу дискуссий, связаны с механизмом реализации данной задачи. Директор по экономике «Р-Фарм» **Александр Быков** убежден, что потери от вторичного вброса и оборота контрафактной продукции в первую очередь представляют проблему для потребителя. В качестве примера унифицированной маркировки спикер предлагает перенять опыт, реализованный при чипировании шуб: «Конечно, хотелось бы, чтобы и с лекарствами было так же, чтобы на каждом этапе можно было проследить его движение, – это наша мечта». При этом процесс перехода к единой системе маркировки представитель «Р-Фарм» предлагает осуществлять в несколько этапов и начать с дорогостоящих лекарственных средств, включенных в программу «Семь нозологий». В продолжение идеи поэтапной реализации унифицированной маркировки президент компании «Акрихин» **Денис Четвериков** предлагает на «втором этапе, после пилотного, введение обязательной маркировки для продукции, закупаемой государством на тендерной основе. Таким образом, могут быть перекрыты существующие каналы поступления в розничную торговлю лекарственных средств, приобретенных через систему госзакупок. Повсеместный же переход к маркировке готовых лекарственных средств – это уже последний этап, когда доказана целесообразность и отработаны все нюансы ее внедрения». Конечно, не все удастся реализовать сразу. Среди препятствий **Александр Быков** отметил отсутствие официальных требований к участию в федеральной системе сериализации, необходимость унификации, созвучной с зарубежными стандартами. Солидарен с коллегой и руководитель отдела технологических проектов «Байер» **Евгений Белов**, который считает предлагаемые сейчас механизмы «логичными и понятными», но опасается появления менее современных и комфортабельных для всех игроков фармрынка решений.

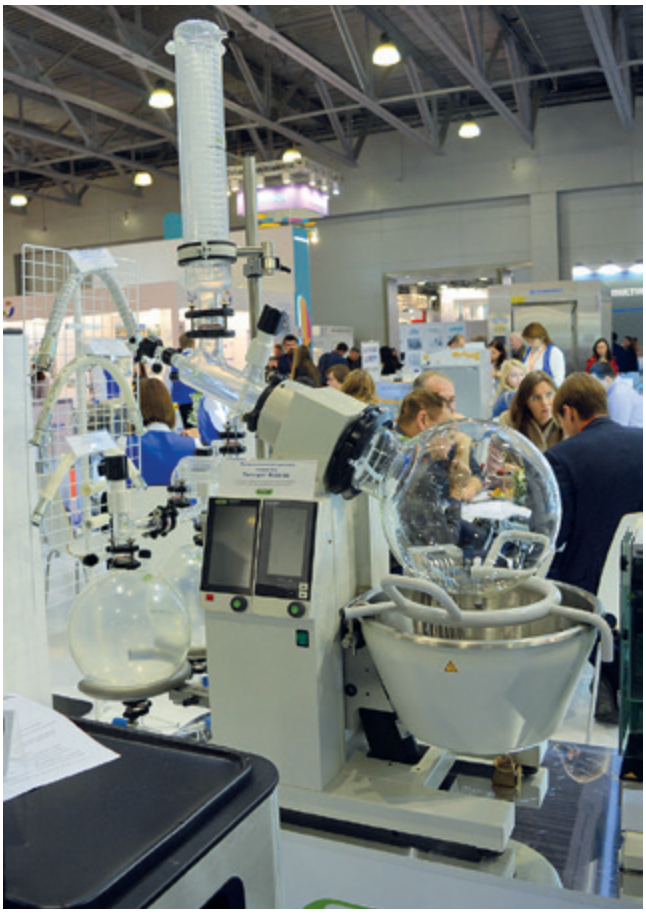
Второй день выставки «Pharmtech & Ingredients» оказался не менее богатым на события деловой программы. Так, итальянский производитель изоляторов и мельниц представил доклад по новейшим технологиям в микронизации и смешивании на базе уникальной системы помола внутри изолятора от **FPS**. В своей презентации коммерческий директор **FPS Stefano Butti** уделил большое внимание аспектам безопасности, подчеркнув, что в отношении микронизации в фармацевтической промышленности необходимо учитывать такие нежелательные факторы, как технологический газ, получение мелко измельченного порошка, мгновенное воспламенение пыли, элементы конструкции, находящиеся под давлением и шум: «Всегда, когда в качестве технологического газа используется газ, отличный от воздуха, в зависимости от размера оборудования необходимо помнить, что насыщение газом окружающей среды может привести к удушью. Уровень кислорода внутри рабочего помещения должен быть всегда выше 20%». Данные аспекты всегда лежат в основе разработок **FPS**.

Помимо презентаций компаний, 23 ноября начал работу *11-й Международный форум «Фармтехпром»*, где обсуждались вопросы производства готовых лекарственных средств и технологии производства различных фармацевтических продуктов. Руководитель направления ГЛФ ГК «Фармконтракт» **Александр Гринченко** представил доклад о современных технологиях получения твердых лекарственных форм, в котором привел обзор технологического оборудования для лабораторной разработки и получения пилотных партий твердых лекарственных форм, а также производственных единиц представленного на самом инновационном стенде для данных целей оборудования **Sejong Pharmatech**. Как отметил спикер, при рассмотрении и оценке качества, безопасности и эффективности лекарственных средств крайне важно максимально конкретизировать требования к оборудованию, задействованному на каждом этапе их производства. Такой подход лежит в основе всех решений «под ключ» для организации производства твердых лекарственных форм, которые предлагает ведущий химико-фармацевтический холдинг России ГК «Фармконтракт» при создании производственных линий на базе **Sejong Pharmatech,** от этапа подготовки исходного сырья до фасовки порошков, гранул и упаковки таблеток. С действующей линией докладчик пригласил всех ознакомиться на стенде холдинга, где были представлены автоматизированный таблеточный пресс **VANTIX P420S** производительностью 186 тыс. однослойных таблеток в час и узлом таблетирования диаметром 420 мм, а также лабораторный таблеточный пресс **P130S** с комбинированным ротором B/D и функцией автоматического контроля веса. В максимально приближенных к реальному производству условиях – в чистой зоне – был расположен полностью автоматический коатер для нанесения пленочного покрытия **VANTIX C30JC**. Созданная линия позволяет организовать производство таблеток по стандартам GMP.

Выставочная экспозиция: чем участники удивляли гостей?

Традиционно выставочная экспозиция – это место, где можно познакомиться с новым производственным и упаковочным оборудованием, оборудованием для лабораторий, клинических испытаний, «чистых помещений», найти российских и зарубежных партнёров – производителей высококачественных АФИ и функциональных ингредиентов, а также получить подробную информацию о проектно-технологических решениях для создания фармацевтического производства «под ключ». В этом году на «Pharmtech & Ingredients» впервые была организована **Зона контрактных услуг** – специальное выделенное пространство для компаний и заводов, оказывающих контрактные услуги производителям фармацевтических препаратов, БАДов и косметики. Более того, накануне выставки организаторы мероприятия и учредители первого российского журнала о GMP *«Новости GMP»* объявили о старте проекта по информационному освещению компетенций отечественных производственных компаний в рамках поддержки локализации и трансфера технологий в Россию. Первостепенная задача проекта – формирование информационной среды для успешного продвижения производственных возможностей отечественных предприятий в рамках развития мероприятий по локализации высокотехнологичных препаратов, описанных в стратегии «ФАРМА-2020» и повышения инвестиционной привлекательности отечественных фармацевтических производств. Идея проекта возникла как продолжение поднятой и крайне востребованной участниками российского и зарубежного фармацевтического рынка темы по контрактному производству. В результате организаторы выставки «Pharmtech & Ingredients» предложили российским компаниям проанонсировать возможнос-





ти своих производств в специально созданной Зоне контрактных услуг – специализированном разделе для компаний и заводов, оказывающих контрактные услуги производителям фармацевтических препаратов, БАДов и косметики. Существование подобного раздела на крупнейшей выставке сырья, оборудования и технологий для фармацевтического производства в России и странах ближнего зарубежья – это уникальная возможность практического решения вопросов распределения загруженности российских заводов. Со своей стороны, журнал «Новости GMP» запустил интерактивную площадку по контрактному производству, где консолидирована информация о российских предприятиях, находящихся в поиске партнеров по контрактному производству, и интересах лицензиаров и контракторов, находящихся в поиске надлежащих партнеров по контрактному производству. Более подробная информация о проекте была представлена в выпуске журнала «Новости GMP», который каждый участник выставки получал на входе.

Самым инновационным стендом, по признанию организаторов выставки «Pharmtech & Ingredients», стал стенд ведущего химико-фармацевтического холдинга России ГК «Фармконтракт», который снова оказался самым большим. На отчетном мероприятии об итогах года для фармацевтической промышленности ярчайший стенд представлял отдельные участки реального производства. Здесь можно было посетить участок синтеза фармацевтических субстанций, для оснащения которого демонстрировались предложения **ICS Cool Energy** в области термостатирования, **BUCHI Labortechnik** для осушки порошков и удаления растворителей из жидких субстанций, **BuchiGlasUster** для процессов кристаллизации и выгрузки осадка. Существенный интерес гостей вызвал новый промышленный испаритель **R-220 Pro**, который позволяет осуществлять удаленный контроль дистилляции пенящихся образцов, перекристаллизации с обратным холодильником через смартфон при помощи push-уведомлений. И конечно же, внимание посетителей выставки «Pharmtech & Ingredients» привлекла ректификационная система **BuchiGlasUster** для разделения смеси жидких веществ с близкими температурами кипения, регенерации растворителей и выделения отдельных продуктов реакции. Среди обширного перечня оборудования для участка синтеза фармацевтических субстанций была представлена и флеш-система **Reveleris® X2**, позволяющая обнаружить вещества и примеси.

В условиях чистой зоны происходил процесс таблетирования на технологической линии **Sejong Pharmatech**. В рамках коллективной экспозиции демонстрировались готовые R&D-решения для этапов разработки, которые включали в себя фильтрационные системы **GE Healthcare**, а также элементы решений для серийного выпуска продукции – системы транспортировки и хранения сред **GE Healthcare ReadyToProcess Bin**. Рядом с участком биофармацевтического производства расположилась микробиологическая лаборатория, новинкой которой стала климатическая камера **KBF115** с программируемым контроллером **MB2**. Безусловным элементом любо-



го фармпредприятия является ОКК, для которого демонстрировались различные конфигурации системы растворения **SOTAX** и тестеры твердости **Pharmatron**. Также для соответствия лабораторий контроля качества выпускаемой фармпредприятием продукции стандартам GLP было предложено не только хорошо известное и успешно зарекомендовавшее себя аналитическое оборудование от **Agilent, BINDER, Mielie, Vibra,** но и лабораторные газовые горелки **Integra**, устройство для вакуумной аспирации жидкостей **Integra VACUSAFE**, центрифуга **Thermo Fisher SL 16** для образцов объемом по 100 мл и проб по 400 мл, спектрофотометр для микропланшет **Multiskan Go**, лабораторный ручной диспергатор **Kinematica Polytron PT 1200 E** для быстрой обработки образцов в небольших количествах и объемах. Впервые на самом инновационном стенде 2016 года был представлен британский гомогенизатор высокого давления **Stansted Fluid Power SPCH** (до 4000 бар) для пилотного фармацевтического производства, которое может быть масштабировано до промышленного уровня. Прибор позволяет работать с противоточной напорной ячейкой. Еще одной новинкой, но уже для ДНК-технологий в условиях диагностических лабораторий, требующих высокой пропускной способности при выполнении рутинных анализов, и научных учреждений, где важна возможность оптимизации и тонкой регулировки, стал амплификатор **ДТ-прайм**. С помощью представленного амплификатора возможно проводить ПЦР в режиме реального времени. Для гидролиза воды на мембранах из полимерного электролита с получением и обязательной осушкой и очисткой водорода демонстрировался генератор высокочистого водорода **LC-H2**. Поток водорода при этом достигает до 100 мл/мин, а чистота составляет 99,9995%.

Помимо новинок в области решения исследовательских задач, ГК «Фармконтракт» привезла и системы для микроволновой пробоподготовки в присутствии кислот с максимальной температурой нагрева до +250 °С **Multiwave GO**, а также реакторы для синтеза высокой производительности **Monowave 50**, оснащенные автоматической системой подачи 24 пробирок для загрузки реакционной смеси. Для сухого и мокрого измельчения, смешивания и гомогенизации твердых, мягких, хрупких волокнистых и абразивных материалов была запущена мельница-ступка **PULVERISETTE 2**, а для чувствительных к температуре проб – быстроходная роторная мельница **PULVERISETTE 14**.

Самый инновационный стенд оказался и самым репрезентативным не только в плане демонстрировавшегося оборудования, но и представительства компаний-партнеров: на стенде холдинга работали как давние партнеры (BuchiGlasUster, FPS, Infors, Integra, Sotax), так и представители компаний, продукцию которых специалисты ГК «Фармконтракт» вывели на российский рынок только в 2016 году – Sejong Pharmatech, O.M.A.R., SkySoftgel, StanstedFluidPower и других. По отзывам гостей, на стенде были представлены не просто готовые решения «под ключ», благодаря которым холдинг приобрел репутацию единственной компании на рынке, способной взять на себя ответственность за выполнение в срок и в рамках утвержденного бюджета всего комплекса работ, от идеи до выпуска первой партии готового продукта: «Экспозиция подтверждает амбициозное заявление: ГК «Фармконтракт» – крупнейший национальный дистрибьютор».

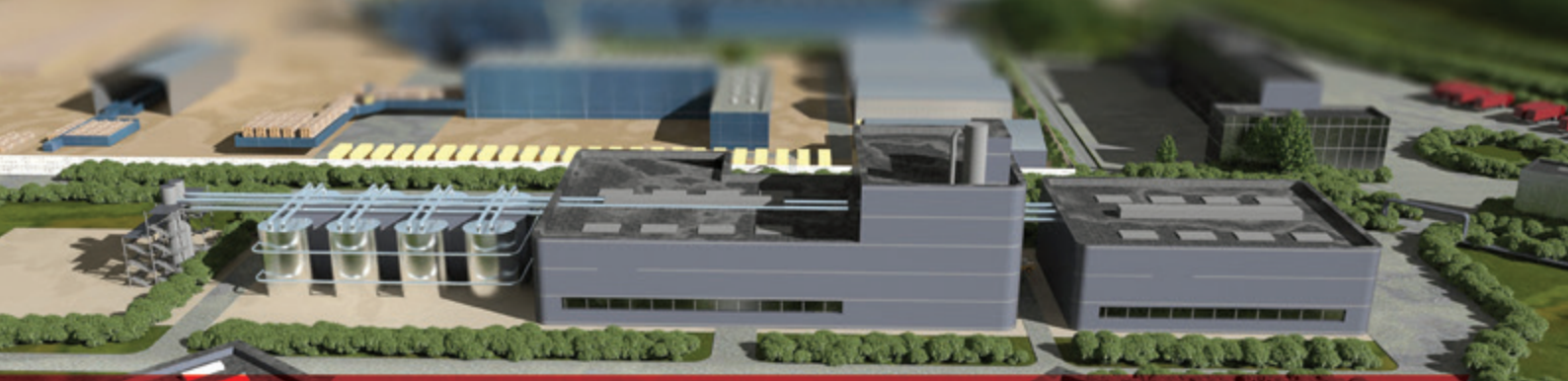
Стоит отметить, что в этом году существенно изменился состав гостей «Pharmtech & Ingredients» – по данным компаний-экспонентов, это не просто заглядывающие на самые привлекательные стенды для интересных фото гости, но реальные заказчики, пришедшие с целью решить конкретную производственную задачу: спроектировать участок синтеза конкретной фармацевтической субстанции, создать линию по производству определенной лекарственной формы с максимально точно заданной производительностью фармацевтического продукта, определить критические параметры оборудования, необходимого для организации биофармпроизводства, и получить референсные рекомендации по имеющимся на рынке предложениям. Более того, как отметили сотрудники национального дистрибьютора технологического и лабораторного оборудования ГК «Фармконтракт», на этой выставке в гости заглядывают не просто специалисты фармацевтических заводов из одного департамента, но сразу группа лиц, занимающихся разными этапами процесса производства и вывода на рынок лекарственных средств. Очевидно, что внедренный на российском фармрынке комплексный подход реализации проектов «под ключ» силами одного исполнителя оказался как никогда востребованным и актуальным.

Образовательный проект «Pharmtech Tutor»

Традиционно в рамках выставки «Pharmtech & Ingredients» состоялся образовательный проект «Pharmtech Tutor», который проводится с целью получения студентами профильных специальностей фармацевтических образовательных учреждений практических навыков. При содействии ведущих фармкомпаний студенты 12 вузов России прошли мини-стажировку на стендах участников выставки, пообщались с экспертами отрасли и смогли «из первых рук» получить информацию о востребованных в отрасли профессиях и даже договориться о последующем трудоустройстве.

В целом 18-я Международная выставка оборудования, сырья и технологий для фармацевтического производства «Pharmtech & Ingredients» подтвердила характеристику, которую ей дала директор департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **Ольга Колотилова**: для отрасли – это «популярный и востребованный проект», для экспонентов – «эффективный инструмент собственного продвижения», а для специалистов – «ежегодное ожидаемое событие для профессиональных встреч».

Следующая выставка «Pharmtech & Ingredients» пройдет 21–24 ноября 2017 года.



«ФАРМКОНТРАКТ ИНЖИНИРИНГ»

Проектирование и строительство производственных предприятий для фармацевтической промышленности любой сложности по стандартам cGMP

ПОЛНЫЙ ЦИКЛ РАБОТ «ПОД КЛЮЧ» ОТ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПЕЦИАЛИСТОВ



ПРОЕКТИРОВАНИЕ ОТ РАЗРАБОТКИ КОНЦЕПТУАЛЬНОГО РЕШЕНИЯ ДО ФОРМИРОВАНИЯ ПРОЕКТНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ РД



ВАЛИДАЦИЯ ОТ ПРОЕКТНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ DQ ДО ВАЛИДАЦИИ ПРОЦЕССА



СТРОИТЕЛЬСТВО, ВКЛЮЧАЯ УПРАВЛЕНЧЕСКИЙ КОНСАЛТИНГ И ПЛАНИРОВАНИЕ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОЕКТОВ



ИНЖЕНЕРНЫЕ СИСТЕМЫ: АВТОМАТИЗАЦИЯ, ВЕНТИЛЯЦИЯ, ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ КОММУНИКАЦИИ



ЧИСТЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ НА ОСНОВЕ СОБСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА ОГРАЖДАЮЩИХ КОНСТРУКЦИЙ



ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СКЛАДЫ

Накопленные знания и подтвержденные навыки по организации высокотехнологичных фармацевтических производств нашей команды – Ваша гарантия получения лицензии на готовый объект и успешного прохождения аудита:



Пергаев Михаил Анатольевич

Руководитель направления проектирование и строительство, инжиниринг



Старкова Галина Петровна

Заместитель руководителя направления проектирование и строительство, инжиниринг



Фроленков Константин Александрович

Руководитель направления синтез субстанций

ФАРМКОНТРАКТ ИНЖИНИРИНГ: ВМЕСТЕ МЫ СОЗДАЕМ БУДУЩЕЕ РОССИЙСКОЙ ФАРМАЦЕВТИКИ!

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

+7 (495) 134-50-87
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)

8 800 333-91-29
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)

www.phct-engineering.ru

info@phct-engineering.ru

23-Я МЕЖДУНАРОДНАЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ВЫСТАВКА «АПТЕКА»

5–9 декабря 2016 года в ЦВК «Экспоцентр» при поддержке АРФП, РАФМ, РААС и СПФО прошла ежегодная международная выставка для специалистов фармацевтической отрасли «Аптека-2016», которая является одним из крупнейших отраслевых выставочных брендов в России, отмечена знаком Всемирной ассоциации выставочной индустрии (UFI) и проходит под патронажем Торгово-промышленной палаты Российской Федерации. Постоянным информационным партнером мероприятия выступает научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».





Деловая площадка для подведения итогов года и обсуждения перспектив развития фармацевтической отрасли, по словам исполнительного секретаря РАФМ **Г.В. Петрухиной**, с каждым годом приобретает все большую важность для российской фарминдустрии за счет своей практической ориентации: «Именно здесь представлены новейшие научно-технические разработки в производстве лекарственных препаратов, внедрение которых способствует развитию отрасли и, как следствие, повышению уровня здравоохранения в России. В рамках Международного делового медико-фармацевтического форума специалисты могут обменяться опытом, обсудить актуальные вопросы развития отрасли». Более того, как отмечено в приветствии исполнительного директора РААС **Н.В. Игнатьевой**, мероприятие ежегодно вносит серьезный вклад в развитие фармацевтической отрасли, позволяя представить расширенный ассортимент фармацевтической продукции; «способствует развитию конструктивного диалога и рождению новых идей сотрудничества между представителями фармацевтической промышленности и российскими аптечными организациями». Вице-президент ТПП РФ **Д.Н. Курочкин** солидарен с представителем РАСС в оценке выставки: она «способствует повышению качества и ассортимента отечественной фармацевтической продукции, позволяет всем заинтересованным участникам ознакомиться с современными подходами к ведению аптечного бизнеса, а также укрепить существующие контакты и найти новые».

В 2016 году выставка собрала более 180 компаний из 17 стран мира – Великобритании, Германии, Египта, Индии, Иордании, Ирана, Испании, Италии, Казахстана, Китая, Польши, Республики Белоруссия, Российской Федерации, Узбекистана, Украины, Хорватии и Чехии. Среди постоянных участников выставки «Аптека», представляющих уже на протяжении двух десятилетий свои экспозиции, стоит отметить Борисовский завод медпрепаратов, «Виолент», «Татхимфармпрепараты», «Вилар», «Бельфарма», «Зелдис-Фарма», «Фитосила», «Эвалар». Компании, входящие в Алтайский биофармацевтический кластер («Алтай-Селигор, «Благодать+», «Эвалар», «Юником», «ВестЛи»), выступили в этом году с коллективной экспозицией, представив возможности региона в области производства лекарственных средств, БАДов и субстанций. Впервые свои экспозиции на «Аптека-2016» представили «Фармасинтез-Ритейл», «Реал Косметик», «Adwia» (Египет), «БелЭмса» (Беларусь), «Пептек», «MP DISTRIBUZIONE s.r.l.» (Италия).

По словам организаторов, цель выставки – быть эффективной площадкой для делового общения, будь то первое знакомство с рынком или ежегодная встреча с партнерами со всей России. В то же время, как отмечали гости и участники «Аптека-2016», данное мero-

приятие является той площадкой, где можно оценить потенциал российских фармпроизводителей, увидеть результаты реализации программы по импортозамещению. «В настоящее время особую значимость приобретает реализация программы по усилению роли локальных производителей на внутреннем рынке, обеспечению разработки высококонкурентной продукции, переходу на инновационную модель развития, ориентированную на создание новейшей инфраструктуры», – отмечено в приветственном письме вице-президента ТПП РФ. Участие крупнейших российских производителей лекарственных средств позволяет наглядно представить их возможности и оценить готовность к покрытию большего объема фармацевтических препаратов за счет собственных производственных мощностей.

Выставка «Аптека» – это не только многообразная экспозиция достижений российского фармпрома, но и не менее интересная, насыщенная деловая программа. Специалистам фармацевтического рынка «Аптека» знакома благодаря *Международному медико-фармацевтическому форуму*. В 2016 году в рамках 17 секций проходило бурное обсуждение приоритетов развития индустрии: возможностей российской фармы в области импортозамещения, влияния общеэкономической ситуации на покупательское поведение в аптечной рознице, особенностей поддержания продаж в условиях кризиса и многих других важных вопросов. Так, в ходе сессии **«Ситуация в фармацевтической отрасли: процессы и ожидания»** директор Института развития общественного здравоохранения **Юрий Крестинский** привел данные о текущем положении системы лекарственного обеспечения в России: около 90% населения оплачивают лекарственные средства за свой счет, что соответствует 69% фармацевтического рынка. Спикер также отметил существующие на сегодняшний день проблемы, связанные с лекарственным обеспечением:

- Несбалансированная система лекарственного обеспечения. По оценке ВОЗ, в 2015 г. Россия сильно отставала от ряда стран по ключевым показателям эффективности здравоохранения (110 место из 189 стран по ожидаемой продолжительности жизни) и лидировала по смертности среди 172 стран (3 место – по инсультам, 15 – по онкологическим заболеваниям, 4 место – по причине алкоголизма, 9 место – по коронарной болезни сердца).





- Неэффективная система госзакупок лекарственных средств и госзаказов. Около 40% лекарственных препаратов, находящихся в обращении в Российской Федерации, в том числе включенных в ограничительные списки и формуляры, не имеют доказательной базы клинической эффективности и безопасности.
- Ограниченность и нерациональность использования финансирования лекарственного обеспечения. Финансирование лекарственного обеспечения в России ограничено (государственное финансирование амбулаторного сегмента составляет 0,2% от ВВП по сравнению с 0,8% в странах ОЭСР), выделяемые средства используются нерационально.
- Слабая и неэффективная координация действий заинтересованных сторон: отсутствуют устойчивые и эффективные коммуникационные каналы для взаимодействия регуляторных органов, участников фармацевтической отрасли и экспертного сообщества; координация между долгосрочными стратегиями развития здравоохранения, фармацевтической отрасли, системы лекарственного обеспечения и медицинской науки недостаточна.

Особое внимание **Юрий Крестинский** уделил регуляторным проблемам, среди которых выделил долгий, сложный и высокозатратный процесс регистрации и вывода новых лекарственных препаратов на отечественный рынок из-за требования проведения клинических исследований в России. По мнению спикера, это приводит к ограничению доступа пациентов к инновационным лекарственным средствам, которые выводятся на рынок России на 5–7 лет позднее по сравнению с международными рынками. Еще одной проблемой в сфере нормативно-правового регулирования является отсутствие единых требований и нормативов перехода на стандарты GMP к производителям лекарственных средств. Их качество должным

образом не контролируется на стадии производства, отсутствует жесткий контроль качества лекарственных средств при обращении как в розничной сети, так и при приемке госзаказов. Завершая свое выступление, **Юрий Крестинский** предложил следующие пути решения обозначенных проблем:

1. Переход от системы госзакупок к системе возмещения затрат на лекарственные средства, за исключением ограниченного перечня дорогостоящих лекарственных средств для госпитальных нужд. Пересмотр регулирования.
2. Разработка национальной лекарственной политики.
3. Гармонизация российских стандартов оказания медицинской помощи и протоколов с международными клиническими рекомендациями.
4. Актуализация и синхронизация отраслевых стратегий.
5. Ревизия находящихся в обращении лекарственных средств с точки зрения их эффективности и безопасности.
6. Пересмотр принципов ценообразования.
7. Оптимизация основных процессов в отрасли:

- отмена обязательных локальных клинических исследований при наличии международно признанной доказательной базы эффективности и безопасности лекарственных средств;
- определение критериев взаимозаменяемости лекарственных средств как для дженериков, так и для биоаналогов.

В рамках первой сессии состоялся доклад о государственных образовательных стандартах. Заведующая кафедрой РУДН, член Совета по профессиональным квалификациям в области фармации **Ирина Косова** рассказала об особенностях практико-ориентированного обучения, современных требованиях, которым должны соответствовать образовательные программы, и таком критерии результатов обучения абитуриентов, как аккредитация выпускников.

Следующую сессию, посвященную вопросам отечественного фармпроизводства, проводила АРФП в формате круглого стола. Учитывая, что самым актуальным вопросом для всех участников рынка является внедрение и применение системы маркировки лекарственных средств, пилотные проекты по которой стартуют уже в 2017 году, наибольший интерес участников сессии вызвал доклад начальника управления организации государственного контроля качества медицинской продукции Росздравнадзора **Валентины Косенко**. Спикер отметила, что для бизнеса данная система – путь к снижению издержек за счет невозможности «повторного вброса», для государства же – профилактика попадания в оборот фальсифицированных лекарств, контроль за эффективностью расходования бюджетных средств и адресностью движения препарата и оперативное управление запасами. «Росздравнадзор надеется на включенность и оперативную реакцию всех участников процесса, но все же на первом месте должен стоять общественный контроль», – отметила **Валентина Косенко**. По прогнозам ведомства, к 2019–2020 годам все препараты, находящиеся в обращении на территории Российской Федерации, будут промаркированы. Позицию ведомства разделяют и профильные ассоциации. Например, заместитель генерального директора АРФП **Елена Масловская** считает, что преимущества маркировки очевидны как для государства, так и для производителей. Однако крайне важно, чтобы процесс не был запущен преждевременно: нужно оценить итоги пилотного проекта и только после этого вводить обязательную для всех систему. Также, по словам спикера, производители опасаются повышения стоимости лекарственных средств с введением маркировки, особенно на низкий ценовой сегмент, который уже сейчас находится под угрозой. В ходе круглого стола участники также получили ответ на волнующий всех вопрос о стоимости и сроках внедрения системы маркировки на заводах. В среднем этот процесс может занять 12–15 мес. и обойдется компании, в зависимости от типа упаковочной линии и имеющегося оборудования, в 70–250 тыс. евро.

Не обошли вниманием участники мероприятия и вопрос о «третьем лишнем». По мнению заместителя генерального директора STADA CIS **Ивана Глушкова**, ожидать отпуска цен на препараты низкого ценового сегмента, субсидирования производителей и роста цен в ближайшее время не стоит: «Не стоит забывать, что ценовая доступность лекарств влияет на поведение электората, поэтому в преддверии выборов 2018 года вопрос сохранения текущих цен для государства останется критичным».

О предлагаемых Минпромторгом России поправках в постановление Правительства Российской Федерации № 1289, предусматривающих систему трехступенчатых преференций в зависимости от глубины локализации, рассказал директор по фармэкономике ГК «Р-Фарм» **Александр Быков**. Эксперт подчеркнул,



что повышение доступности лекарств за счет снижения производителями цен происходит только в условиях реальной конкуренции на рынке. Если же к госзакупкам будут допускаться только лекарственные средства, имеющие на территории России все стадии производства, включая синтез субстанции, необходимо создать комплекс мероприятий по сохранению конкурентных условий: «Меры поддержки, предлагаемые ПП № 1289, должны носить сбалансированный характер и способствовать стимулирующему развитию отрасли, а не блокирующему», – подвел итоги спикер.

Генеральный директор DSM Group **Сергей Шуляк** представил данные о развитии рынка в области импортозамещения. Например, данные агентства наглядно демонстрируют тенденцию роста отечественных препаратов в госзакупках. Более того, половина врачей по всей России отметили улучшение уровня качества отечественных лекарственных препаратов, хотя в регионах в отличие от Москвы врачи отмечали ухудшение качества отечественных лекарственных препаратов за последние 3 года. В Москве уровень врачей, перешедших на отечественные лекарственные препараты, выше по сравнению с регионами. То есть можно предположить, что в столице процесс импортозамещения проходит легче для врачей, т.к. для них имеет меньшее значение происхождение лекарственных препаратов. В регионах политику импортозамещения проводить сложнее, т.к. врачи больше внимания уделяют происхождению лекарственных препаратов (рисунок 1).

Живой интерес гостей деловой программы выставки «Аптека» вызвала сессия *«Новые нормативно-правовые акты. Контроль и надзор в сфере фармобращения»*, проводимая Росздравнадзором.

Начальник управления лицензирования и контроля соблюдения обязательных требований Росздравнадзора **Ирина Крупнова** представила доклад о современной архитектуре контрольной и надзорной деятельности. Стратегия развития здравоохранения Российской Федерации на долгосрочный период предусматривает выстраивание вертикальной системы контроля и надзора в сфере здравоохранения:

- систематизацию и актуализацию обязательных требований, обусловленную отсутствием связи с безопасностью товаров, работ, услуг, а также свободного доступа проверяемых лиц к информации;
- централизацию контрольно-разрешительных функций, внедрение системы аккредитации медицинских организаций всех видов собственности, а также иных организаций, осуществляющих медицинскую деятельность, для оценки эффективности их деятельности по единым национальным критериям;
- обеспечение комплексного подхода к организации государственного контроля качества лекарственных средств, включающего контроль их производства и обращения;
- создание и внедрение системы менеджмента качества медицинских услуг, устанавливающую критерии оценки качества медицинской помощи как основу формирования системы внутреннего контроля качества и безопасности медицинской деятельности, имеющей целью постепенное снижение государственного контроля в пользу обеспечения качества со стороны медицинской организации как основание для формирования системы аккредитации медицинских организаций;
- разработку системы оценки потенциальных рисков при осуществлении медицинской и фармацевтической деятельности и порядок ее использования при планировании контрольных мероприятий.

Производитель	Объем, млн руб. 9М 2016	Прирост	Доля среди отечественных	Доля в целом на рынке	Место в общем рейтинге
ОТИСИФАРМ	17 176,8	15%	8%	2,2%	10
ФАРМСТАНДАРТ	12 149,6	1%	5%	1,6%	20
БИОКАД	10 722,7	34%	5%	1,4%	22
ВАЛЕНТА	9 839,4	17%	4%	1,3%	24
Ф-СИНТЕЗ	7 878,7	-13%	3%	1,0%	27
ВЕРОФАРМ	6 647,8	11%	3%	0,9%	31
МАТЕРИА МЕДИКА	5 924,6	23%	3%	0,8%	32
СОТЕКС	5 615,0	23%	2%	0,7%	33
ПХ "Фарм-центр"	5 493,0	3%	2%	0,7%	34
ГЕНЕРИУМ	5 276,2	33%	2%	0,7%	35

Рисунок 1. Отечественные производители в основном расположились за чертой ТОП-20. При этом указанные компании растут к 2015 году выше рынка

Особое внимание спикер уделила архитектуре совершенствования контроля. Для этого **Ирина Крупнова** предлагает повышать уровень защищенности охраняемых законом ценностей в сферах производства или оказания услуг за счет обеспечения соблюдения обязательных требований. Также необходимо проводить снижение избыточных и устаревших обязательных требований при осуществлении государственного контроля (надзора) и муниципального контроля административных и финансовых издержек граждан и организаций, осуществляющих предпринимательскую и иные виды деятельности, в том числе путем исключения существующих и предотвращения установления новых избыточных контрольно-надзорных функций, обеспечения соответствия обязательных требований достижениям науки, техники и уровню развития экономики. Среди иных мер, ориентированных на усовершенствование контрольной системы, можно отметить и оптимизацию использования трудовых, материальных и финансовых ресурсов, используемых при осуществлении государственного контроля (надзора) и муниципального контроля. В целом реформу контрольной и надзорной деятельности можно представить следующим образом:



При этом, предпосылками для внедрения риск-ориентированного подхода служат как недостаточное количество финансовых, материальных и кадровых ресурсов для соблюдения желаемой интенсивности контрольно-надзорных мероприятий и охвата проверками всех подконтрольных субъектов, так и недопустимо высокие административные барьеры и издержки бизнеса от проведения контрольно-надзорной деятельности (рисунок 2).

Какие же преимущества сулит предлагаемая модель?

1. Переориентация контрольно-надзорной деятельности на объекты повышенного риска.
2. Отсутствие плановых проверок для объектов низкого риска и сокращение частоты проверок для добросовестных подконтрольных субъектов.
3. Общее сокращение избыточных административных издержек (издержки перераспределяются пропорционально опасности деятельности и добросовестности субъектов).
4. Повышение результативности контрольно-надзорной деятельности, выражающееся в улучшении общественно значимых показателей (снижение смертности, числа пожаров, количества катастроф и т.д.).
5. Повышение эффективности использования материальных, финансовых и человеческих ресурсов.
6. Общее снижение числа проверок и объема задействованных для их проведения ресурсов при одновременном снижении причиняемого ущерба жизни и здоровью граждан.

Чтобы добиться перечисленных **Ириной Крупновой** преимуществ, необходимо пройти несколько этапов совершенствования контроля:

- категорирование (классифицирование) подконтрольных объектов по классам потенциальной опасности возможности причинения вреда здоровью и жизни граждан от осуществляемой ими деятельности;
- установление периодичности проведения проверок с учетом уровня возможных рисков причинения вреда здоровью и жизни граждан от осуществляемой ими деятельности как в статистике, так и в динамике;

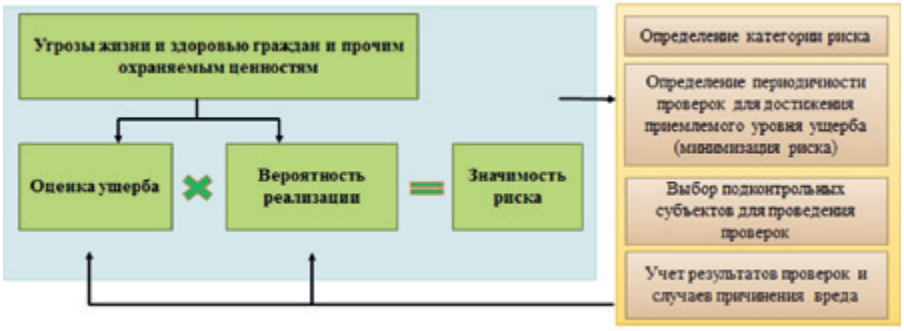


Рисунок 2. Базовые предпосылки внедрения рисковой модели

- формирование единого реестра нормативных правовых актов, регламентирующих обязательные требования в сфере здравоохранения, в том числе разработка проверочных листов;
- обеспечение доступа граждан и организаций к информации о порядке проведения проверок;
- проведение стандартизации государственных услуг;
- внедрение единых подходов при осуществлении одного вида контроля на всей территории Российской Федерации;
- разработка профилактических мероприятий, направленных на предупреждение совершения правонарушений в сфере здравоохранения;
- формирование в подконтрольной сфере мировоззрения, направленного на исполнение законодательства и проведения внутреннего самоконтроля в целях предупреждения правонарушений;
- разработка и совершенствование методики по оценке результативности и эффективности деятельности территориальных органов, в том числе разработки инструментов, направленных на формирование мотивации деятельности как руководителей, так и государственных гражданских служащих;
- организация и проведение обучения должностных лиц, осуществляющих государственный контроль по организации функционирования системы управления рисками причинения вреда с проведением в установленном порядке соответствующей аттестации.

На сегодняшний же день Росздравнадзор довольно часто сталкивается с типовыми нарушениями, допускаемыми при обращении лекарственных средств:

медицинскими организациями	аптечными организациями	оптовыми организациями	иными организациями
• не соблюдаются условия хранения лекарственных препаратов, в том числе требующих защиты от повышенной температуры, от действия света и других факторов окружающей среды;			
• не организовано получение информации о недоброкачественных и фальсифицированных лекарственных препаратов			
• помещения для хранения лекарственных препаратов требуют текущего ремонта			
• не соблюдаются правила уничтожения недоброкачественных лекарственных препаратов			
• перефасовка лекарственных препаратов из заводской упаковки	• отсутствие минимального ассортимента лекарственных препаратов		
	• отсутствие объекта по адресу, указанному в лицензии		
• вне карантинной зоны размещены лекарственные препараты с истекшим сроком годности			

Среди причин, служащих нарушению законодательства в части обращения лекарственных препаратов, спикер отметила объективные и субъективные. К первым относятся отсутствие сформированной системы управления качеством [не проводятся регулярно внутренние проверки организации на соответствие требованиям действующего законодательства в сфере фармацевтической деятельности (периодичность устанавливается руководителем)] и недоведение результатов оценки качества деятельности до всех сотрудников организации в целях совершенствования рабочих процессов и недопущения нарушения действующего законодательства. Ко вторым – отсутствие ведущей роли руководства организации и регулярной основы поддержания компетенции специалистов организации на должном уровне (обязанность провизора, фармацевта – систематически поддерживать, развивать и расширять свои знания, навыки и умения, чтобы гарантировать свою постоянную компетентность в процессе работы).

Начальник отдела нормативно-правового регулирования фармацевтической деятельности, оборота наркотических средств и психотропных веществ Министерства здравоохранения Российской Федерации **Наталья Николаева** привела обзор законодательства в сфере оборота наркотических средств и психотропных веществ в целях обеспечения их доступности для нуждающихся пациентов. Спикер также рассказала о ключевых пунктах дорожной карты «Повышение доступности наркотических средств и психотропных веществ для использования в медицинских целях» (распоряжение Правительства РФ от 01.07.2016 № 1403-р), реализация которой рассчитана до 2018 годы:

1. Расширение номенклатуры НЛП.

На сегодняшний день внесены изменения в инструкцию по медицинскому применению лекарственного препарата «Морфин, раствор для инъекций» в части расширения перечня показаний к применению, уточнения способа применения и режима дозирования, в том числе у детей, с учетом рекомендаций ВОЗ. Зарегистрирован лекарственный препарат «Бупраксон, таблетки» (МНН бупренорфин + налоксон). На завершающем этапе находится регистрация лекарственного препарата «Фентанил, ТТС». Решается вопрос о ввозе лекарственных препаратов, содержащих оксикодон + налоксон (таблетки), дигидрокодеин (таблетки пролонгированного действия). Помимо этого, продолжается разработка и регистрация отечественных опиоидных анальгетиков в неинвазивных лекарственных формах:

- морфина гидрохлорида (таблетки пролонгированного действия, таблетки короткого действия, раствор для приема внутрь);
- бупренорфина (ТТС);
- оксикодона (таблетки, капсулы);
- гидроморфона (таблетки, капсулы).

Проводятся работы по разработке неинвазивных лекарственных форм налбуфина, по организации промышленного выпуска отечественных фармацевтических субстанций обезболивающих препаратов морфина гидрохлорида, фентанила, бупренорфи-



на, буторфанола. Прорабатывается вопрос об организации производства новых готовых лекарственных средств в форме матричных ТТС и безыгольных инъекторов.

2. Оптимизация расчетов потребности в НЛП и ПЛП.

Уже разработан и направлен на регистрацию в Минюст России приказ об утверждении нормативов для расчета потребности в НЛС и ПЛС, предназначенных для медицинского применения (бупренорфин, бупренорфин+налоксон, дигидрокодеин, омнопон, морфин, оксикодон, оксикодон+налоксон, просидол, тримепиридин, фентанил), для ПВ – из расчета фактического использования (по отчетам) за 3 года; для МО, оказывающих первичную медико-санитарную и паллиативную медицинскую помощь в амбулаторных условиях (в г на 1000 человек); для МО, оказывающих специализированную медицинскую помощь, скорую медицинскую помощь, паллиативную медицинскую помощь в стационарных условиях (в г на 1 койку); для МО, оказывающих скорую медицинскую помощь вне МО (2 позиции – морфин и фентанил – в г на 1000 вызовов). Активно разрабатываются методические рекомендации по определению нормативов потребности в НС и ПВ для субъектов РФ, проводится годовой и полугодовой анализ полноты выборки НЛП, в том числе в неинвазивных формах.

Спикер отметила, что в настоящее время наблюдается рост объема заявленных потребностей на НЛП (в 2016 г. рост составил 31% по сравнению с 2015 г.), фактической выборки НЛП (за первое полугодие 2016 г. рост составил 52% по сравнению с аналогичным периодом 2015 г.) и показателя обеспеченности больных злокачественными новообразованиями неинвазивными НЛП (в 2014 году – 11% от количества больных, нуждавшихся в обезболивании на месячный курс лечения по рекомендациям ВОЗ, в 2015 году – 20%, за первое полугодие 2016 г. – уже 12%).

3. Повышение доступности обезболивания НЛП, в том числе упрощение процедуры их назначения и выписывания. С этой целью разрабатываются методические рекомендации по обезболиванию пациентов при оказании всех видов медицинской помощи и механизм взаиморасчетов между регионами по обеспечению НЛП и ПЛП по месту фактического проживания пациентов. На сегодняшний день уже разработано несколько проектов нормативно-правовых актов, необходимых для перехода на электронную систему назначения и выписывания НС и ПВ.

4. Гармонизация НПА Российской Федерации и субъектов РФ в сфере оборота НС и ПВ.

5. Декриминализация деяний медицинских и фармацевтических работников, связанных с нарушениями правил оборота НС и ПВ.

6. Развитие паллиативной медицинской помощи и обучение медицинских работников.

В рамках *Международного медико-фармацевтического форума* прошел также и ряд сессий, на которых рассматривались актуальные вопросы развития аптечных сетей, эффективные механизмы увеличения продаж и повышения компетенции провизоров в контексте внедрения современных технологий в процесс непрерывного фармацевтического образования.

Важным событием 2016 года стал *Второй Международный форум «Традиционные медицинские системы мира» (ТМСМ)*, организованный компанией «Евроэкспо» совместно с некоммерческим партнерством «Аюрведическая российско-индийская ассоциация». Официальную поддержку форуму оказали Государственная Дума, Министерство здравоохранения, Министерство иностранных дел Российской Федерации, посольства Китая, Индии, Республики Корея в России, Министерство здравоохранения Китая и Министерство AYUSH Индии, а также университеты РУДН и МГМУ имени И.М. Сеченова. Деловая программа форума включала круглый стол «Роль и значение мировых традиционных медицинских систем в глобальном здравоохранении», день традиционной китайской медицины и день традиционной индийской медицины с выступлением экспертов, демонстрацией различных видов лечебного китайского массажа, дегустацией индийской кухни, мастер-классами по аюрведе и йоге.

Обширная выставочная экспозиция, два разнонаправленных форума, сессии и круглые столы которых охватили ключевые аспекты развития фармацевтической и медицинской промышленности, поддержка мероприятия со стороны профильных государственных структур и отраслевых ассоциаций – все это подтверждает статус выставки «Аптека» как одной из самых авторитетных в отрасли. Как отметил генеральный директор АРФП **Виктор Дмитриев**, выставка и форум зарекомендовали себя как площадки, на которых встречаются специалисты всех рангов и где происходит активное деловое общение, обмен опытом, обсуждается широкий круг проблем отрасли.

Следующая, **24-я Международная специализированная выставка «Аптека»** пройдет 4–7 декабря 2017 года.

«ФАРММЕДПРОМ-2016»

С 5 по 9 декабря 2016 года в Москве проводился Международный научно-практический форум «РОССИЙСКАЯ НЕДЕЛЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ» и 26-я международная выставка «Здравоохранение-2016», ключевым событием которых стали выставка и конференция достижений и новинок фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации «ФармМедПром-2016», организованная Минпромторгом России. Информационным партнером мероприятий на протяжении многих лет выступает научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».





Форум – это ежегодно проводимое мероприятие, которое позволяет производителям в области фармацевтической и медицинской промышленности продемонстрировать свои разработки и достижения специалистам в области здравоохранения, врачам, государственным и частным структурам, занимающимся закупкой лекарственных средств и медицинских изделий, увидеть достижения российской фармацевтической и медицинской промышленности. В мероприятии приняли участие представители Министерства здравоохранения, Министерства промышленности и торговли, Министерства труда и социальной защиты Российской Федерации, Госдумы России, Торгово-промышленной палаты Российской Федерации.

В рамках форума при поддержке Минпромторга была организована экспозиция «ФармМедПром». Данная экспозиция призвана продемонстрировать основные достижения отечественной медицинской и фармацевтической промышленности в рамках следования государственной программе Российской Федерации по «Развитию фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013–2020 гг. Данная программа ориентирована на создание инновационной российской фармацевтической и медицинской промышленности мирового уровня и развитие импортозамещения в данных сферах.

На стенде Минпромторга России свои новинки и достижения продемонстрировали более 60 ведущих российских производителей медицинских изделий и лекарственных средств.

В рамках выставки прошла премьера универсального полипозиционного рентгенодиагностического комплекса с многофункциональным поворотным столом-штативом – разработки НИПК «Электрон», не имеющей аналогов.



Установка объединяет функционал нескольких диагностических аппаратов и позволяет выполнять любые виды рентгенодиагностических исследований:



рентгенографию органов грудной клетки и костно-суставной системы от конечностей до черепа, контрастные исследования органов желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы, интервенционные процедуры под рентгеновским контролем в любом режиме (рентгенография, рентгеноскопия, линейная томография) и при любой укладке пациента (лежа на столе или на каталке, в том числе в латеропозиции, сидя, стоя). Главный и уникальный принцип новой разработки – отсутствие необходимости дополнительных перемещений пациента, что особенно важно при неотложных исследованиях и исследованиях травмированных пациентов.

Разработчики особенно отметили, что одна из ключевых комплектующих данного комплекса – многофункциональный поворотный стол-штатив – была разработана по заказу Министерства промышленности и торговли Российской Федерации в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации» на период до 2020 года и дальнейшую перспективу.

«Подобного рода презентации свидетельствуют о высокой эффективности госпрограммы по развитию фармацевтической и медицинской промышленности, которую мы активно реализуем совместно с большим числом участников рынка при активной поддержке Министерства здравоохранения России. Создание подобного рода комплексов также свидетельствует о высочайших компетенциях наших разработчиков в различных областях», – рассказал заместитель министра промышленности и торговли Российской Федерации **Сергей Анатольевич Цыб**. Высоко оценили отечественный продукт и представители Минздрава России, отметив высокий потенциал отечественного фарм- и медпрома.



Свои достижения в области производства высокотехнологичных имплантируемых медицинских изделий (коронарных стентов и катетеров) продемонстрировала компания Stentex. Эффективность и безопасность продукции, локализуемой совместным предприятием ГК «Ренова» и корпорации Medtronic,

доказана многолетними клиническими исследованиями, в которых принимали участие десятки тысяч пациентов, и опытом применения у миллионов пациентов по всему миру. При выходе на проектную мощность Stentex обеспечит имплантируемыми изделиями и расходными материалами выполнение более 160 тысяч операций по стентированию и ангиопластике в год, способствуя тем самым спасению жизней пациентов с острым коронарным синдромом и снижению смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в России.

Компания «Герофарм» представила первый в России генно-инженерный инсулин человека, производимый из отечественной субстанции, препараты для терапии нервных расстройств, эпилепсии, глаукомы и других заболеваний. Представители Московского эндокринного завода рассказали о своих планах по организации собственного производства субстанций для производства лекарственных средств, используемых в лечении социально значимых заболеваний. Новинку представила и компания «Фармасинтез»: инновационный препарат для снижения спайкообразования при операциях на серозных полостях. «Фармасинтез» в 2017 году планирует запуск завода по производству высокотехнологичных фармацевтических субстанций для противотуберкулезных, противоопухолевых и других препаратов в Братске. В апреле 2016 года произведен запуск первой очереди предприятия и получена лицензия на производство.



АО «Равенство» (входит в концерн «Гранит-Электрон») продемонстрировало разработки в области лучевой терапии в онкологии «Рокус-Р». Знакомясь с этими продуктами, **Сергей Цыб** отметил, что данное предприятие произвело трансфер технологий из оборонного комплекса в медицинскую промышленность, что соответствует поручению президента страны **Владимира Путина** о диверсификации оборонно-промышленного комплекса. Осмотрев продукцию, которую привезло НПО «Петровакс Фарм», **Сергей Цыб** заявил о необходимости расширять спектр бизнес-интересов: «Не надо останавливаться на гриппе, у вас сейчас большие перспективы в освоении рынка иммунобиологических препаратов».

В рамках «ФармМедПрома» также состоялась дискуссионная сессия *«Развитие экспорта отечественной фармацевтической и медицинской продукции»*. Представители Минпромторга, Минздрава и Минэкономразвития России, российские фарм- и медпроизводители обсудили вопросы продвижения экспортного потенциала, меры господдержки компаний-экспортеров, новые инициативы по созданию условий для выхода российской продукции на международные рынки. Особое внимание в своем докладе **Сергей Цыб** уделил и кадровым вопросам, непрерывному образованию врачей, ознакомлению их с продукцией российского фарммедпрома и перспективам совместного сотрудничества медицинского сообщества с производителями фармацевтической и медицинской продукции.

В недавнем послании Федеральному собранию президент России **Владимир Путин** анонсировал новый план развития экономики до 2025 года, основной целью которого является наращивание позиции России на глобальных рынках и выход в ближайшие пять лет на темпы экономического роста выше мировых. Следуя данному направлению, Минпромторг России большое значение придает развитию экспортного потенциала российской промышленности и готов к разработке новых мер поддержки экспортеров



и развитию имеющихся как регуляторных, так и финансовых инструментов: «Посыл руководства нашей страны с точки зрения развития несырьевого экспорта очень сильно повлиял на встраиваемость высокотехнологичных секторов в развитие экспортной составляющей. И теперь перед ведомством стоит задача провести анализ необходимых мер господдержки для дополнительного стимулирования потенциальных экспортеров».

Подводя итоги 2016 года для отрасли, замминистра промышленности и торговли Российской Федерации отметил такие позитивные тенденции, как

- экспорт лекарственных средств за 9 месяцев 2016 года показал 20%-й рост в рублях по сравнению с аналогичным периодом прошлого года. По медицинским изделиям динамика экспортных позиций примерно такая же – рост 17–18% в денежном выражении;
- основные страны, куда экспортируются лекарства, – это развивающиеся рынки и постсоветское пространство. Однако активно идет и завоевание европейского и латиноамериканского рынков. В то же время медизделия уже сейчас преимущественно поставляются в развитые страны: «Пусть экспорт еще невелик, но мы видим его рост и в натуральном, и в денежном выражении. Очень важно, что в основном это страны Европы. Причем компании–экспортеры очень эффективно работают над продвижением своей продукции на данных рынках. Это говорит о качестве выпускаемой продукции, – подчеркнул **Сергей Цыб**. – И это самое важное: мы начинаем соответствовать всем международным стандартам качества в части производства как лекарственных средств, так и медицинских изделий».

Причину неоспоримого успеха признания отечественной продукции западными коллегами **Сергей Цыб** видит в действии государственной программы, заложившей ключевые факторы модернизации отрасли, технологическому перевооружению производственных площадок и формированию соответствующих компетенций. «Теперь отечественные производители уже имеют возможность заявлять на международных рынках как о собственных продуктах, так и о готовности к возможному партнерству с крупными иностранными компаниями и игроками. В результате у драйверов внутреннего рынка теперь появилась возможность развития экспортной составляющей и организации поставок продукции в другие страны», – выразил уверенность **Сергей Цыб**.

Целью Минпромторга является «поддержка испытаний и исследований различного рода, т.е. всех процедур, которые касаются регистрации за рубежом; максимальное вовлечение административных, финансовых и регуляторных механизмов, – рассказал **Сергей Цыб**. – Например, сейчас мы поддерживаем проведение клинических исследований через Фонд развития промышленности».

Также замминистра обратил особое внимание на новые возможности локализованных в России зарубежных производителей и призвал их наращивать свой экспортный потенциал. По его мнению, большая роль здесь отводится профильным ассоциациям. Более того, по развитию экспортных направлений Минпромторг России работает в тесном сотрудничестве со всеми крупнейшими объединениями, организациями, институтами развития. Огромную помощь оказывает Министерство здравоохранения в плане подключения к работе своих подведомственных учреждений. Активно участвуют ассоциации, сами производители и другие участники рынка. И конечно же, немалый вклад вносят отраслевые СМИ, объективно освещая достижения национальных производителей и создавая площадки для организации диалога между российскими и зарубежными фармкомпаниями.



«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ РЕЙТИНГ»

20 декабря 2016 года в Москве подвели итоги и наградили лучшие компании российской фармацевтической отрасли. Первое мероприятие такого рода собрало более 250 участников и гостей, ведущих артистов шоу-бизнеса, СМИ, а также топ-менеджеров лидирующих фармацевтических компаний и отраслевых ассоциаций. Основу рейтинга составили синдикативные исследования ведущего российского маркетингового агентства DSM Group: впервые рейтинговое исследование строилось на базе объективных показателей – объёме продаж фармацевтической продукции в ценах конечного потребления. То есть лидеров среди компаний и продуктов выявлял сам рынок, отражая потребности и выбор пациентов и врачей – тех, для кого и работает вся фармацевтическая отрасль.







«Национальный фармацевтический рейтинг – 2016» от DSM Group десятью номинациями охватил весь российский фармацевтический рынок: более 1300 отечественных и иностранных производителей, более 5830 брендов. Как отметили организаторы, целью такого амбициозного проекта было отметить лучших в отрасли и рассказать профессиональному фармацевтическому и врачебному сообществу, а также широкой аудитории о тех, кто добивается выдающихся результатов в работе по обеспечению страны качественными лекарственными препаратами. «Национальный фармацевтический рейтинг» – совершенно новый формат отраслевого мероприятия, которое не только отметило лучших на фармацевтическом рынке, но и позволило выйти за устоявшиеся границы и провести вечер с настоящим драйвом. В рамках мероприятия были консолидированы масштабное музыкальное шоу, выступления экспертов, а также живой диалог представителей отраслевых и центральных СМИ с участниками церемонии и артистами во время совместного фуршета. В числе гостей присутствовали генеральные директора ведущих российских и зарубежных фармацевтических компаний, топ-менеджеры Big Pharma, представители регуляторных органов, депутаты, а также приглашённые артисты и деятели шоу-бизнеса.

Согласно полученным данным лучшими среди лучших в 2016 году стали:

В номинации «Бренд косметики»:

1. Vichy (Vichy laboratories),
2. La Roche Posay (La Roche Posay),
3. Librederm («Зелдис-Фарма»).

В номинации «Производитель косметики»:

1. Vichy laboratories,
2. La Roche Posay,
3. Компания «Зелдис-Фарма».

В номинации «OTC-препарат»:

1. «Нурофен» (Reckitt Benckiser),
2. «Кагоцел» («НИАРМЕДИК ПЛЮС»),
3. «Ингавирин» («Валента Фарм»).









В номинации «OTC-производитель»:

1. «Отисифарм»,
2. Bayer,
3. Sanofi.

В номинации «Rx-препарат (на рынке в целом)»:

1. Бренд «Ревлимид» («Селджен Интернешнл Сарл.»),
2. «Калетра» (Abbott),
3. «Превенар» (Phizer).

В номинации «Rx-препарат (на аптечном рынке)»:

1. «Конкор» (Takeda),
2. «Актовегин» (Takeda),
3. «Лозап» (Sanofi).

В номинации «Rx-производитель»:

1. Sanofi,
2. Novartis,
3. Abbott.

В номинации «Бренд БАД»:

1. Solgar (Solgar Vitamin and Herb),
2. Бренд «Витамишки» (Pharma-Med),
3. «Доппельгерц» (Queisser Pharma).

В номинации «Производитель БАД»:

1. «Эвалар»,
2. «РИА «ПАНДА»,
3. Pharma-Med.

В номинации «Бренд зубной пасты»:

1. Rocs (DRC Group),
2. «Лакалют» (Dr. Theiss Naturwaren),
3. Splat («Сплат-Косметика»).

Подводя итоги необычного мероприятия, эксперт фармацевтического рынка, генеральный директор компании-организатора DSM Group **Сергей Шуляк** отметил, что «церемония награждения номинантов «Национального фармацевтического рейтинга» прошла в этом году впервые, но тот ошеломительный успех, которого мы сами до конца не ожидали, позволяет нам говорить о том, что событие станет ежегодным! Нам важно отметить лучших в нашей сфере, основываясь на достигнутых результатах, нам важно рассказать об успехах фармацевтической отрасли тем, для кого она работает, кому она помогает сохранять здоровье и красоту, – для нас с вами. Отдельное спасибо нашим партнёрам и друзьям – артистам, которые по-настоящему оживили церемонию, наполнили её неповторимой энергетикой и драйвом! Это достойное завершение 2016 года и огромный стимул для развития и покорения новых вершин в 2017 году».

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

SEJONG PHARMATECH



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



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 66.099.2

ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИЗ БИОСОВМЕСТИМЫХ МИКРОКАПСУЛ СО ВСТРОЕННЫМ В ОБОЛОЧКУ ИНГИБИТОРОМ ПЕПТИДАЗЫ

Е.В. Попова[1]*, П.П. Бельтюков[1], В.А. Кузнецов[1], С.Г. Петунов[1], А.С. Радилов[1]

Резюме. Микрокапсулы, содержащие поли(аллил)амина гидрохлорид (РАН), были получены послойной адсорбцией бычьего сывороточного альбумина и дубильной кислоты на $CaCO_3$-микрочастицах (ядрах) с их последующим растворением при помощи этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Включение РАН проводили методом соосаждения. Изучена кинетика высвобождения РАН из микрокапсул в среде с щелочными значениями pH и трипсином. Продемонстрирована возможность регулирования высвобождения РАН из микрокапсул путем варьирования состава их оболочки (введение в оболочку овомукоида).

Ключевые слова: система доставки белков, ингибитор пептидаз, микрокапсулы, релиз.

FEATURES ENZYMATIC RELEASE BIOCOMPATIBLE MICROCAPSULES WITH BUILT-IN SHELL INHIBITOR PEPTIDASE

E.V. Popova[1]*, P.P. Beltiukov[1], V.A. Kuznetsov[1], S.G. Petunov[1], A.S. Radilov[1]

Abstract. Microcapsules consisted of biocompatible components – bovine serum albumin and tannic acid were made using Layer-by-Layer encapsulation method. Process of microcapsule formation was studied. Poly(allyl)amine hydrochloride (PAH) was included into the microcapsules and process of its release into medium with alkaline pH and trypsin was studied. The ability to control release of model substance PAH from these capsules with the help of trypsin was shown.

Keywords: protein delivery system, peptidase inhibitor, microcapsules, release.

1 – ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» России, 188663, Россия, Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, корп. 93

1 – Federal State Unitary Enterprise Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology FMBA, 93, Kapitolovo st., |Kuzmolovsky g.p. , Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: arabka2008@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

При разработке пероральных форм терапевтических белков и пептидов главной проблемой является их низкая стабильность, обусловленная как гидролизом белков и пептидов при низких значениях pH среды желудка, так и их расщеплением ферментами (трипсин, химотрипсин) кишечника.

Несмотря на разнообразие методов создания систем доставки для терапевтических белков и пептидов, одним из наиболее перспективных является включение целевых объектов в микрокапсулы, полученные послойной адсорбцией противоположно заряженных природных полиэлектролитов. Варьируя технологическими условиями формирования микрокапсул и составом их оболочки, можно повысить их стабильность при прохождении кислой среды желудка, увеличить биодоступность включенного в них белка или пептида, обеспечить его контролируемое высвобождение, пролонгировать его действие, минимизировать побочные эффекты препарата [1, 2].

Существуют различные модификации метода послойной адсорбции. В некоторых модификациях в качестве носителей (ядра) белков используются различные вещества: силикагели [3], композиты из кремния, кальция фосфата [4, 5], гидроксиапатит [6], полигидроксикарбоновые кислоты [7], меламинформальдегидные микрочастицы [8], микрочастицы из карбоната кальция [9, 10], частицы из хлоргексидина [11] и т.д., которые растворяются после формирования оболочек микрокапсул.

Наиболее распространенным механизмом высвобождения веществ из полимерных микрокапсул является растворение защитной оболочки за счет изменения pH среды. Для этого подбираются пары полиэлектролитов, способные защитить содержимое капсулы от кислой среды желудка и обеспечить его контролируемое вы-

свобождение в среде кишечника за счет разрушения микрокапсулы. В ряде работ для дополнительной защиты белка в микрокапсулах от воздействия ферментов широко используются ингибирующие агенты (например, аминобензамидин-п) и различные модифицированные аминокислоты [12, 13].

В настоящей работе для формирования оболочки микрокапсулы выбраны биосовместимые природные органические соединения – бычий сывороточный альбумин (БСА) и полифенол дубильная кислота (рисунок 1). Благодаря большому количеству гидроксильных групп дубильная кислота (ДК) может формировать стабильные связи со сложными углеводородами и различными белками. При этом формируемые комплексы могут быть как растворимыми, так и нерастворимыми. Данные комплексы обычно формируются гидрофильными взаимодействиями.

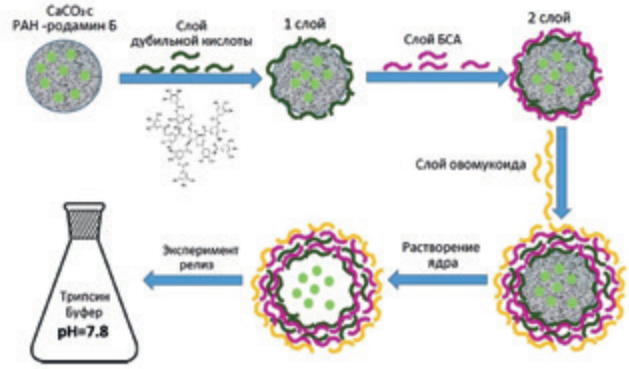


Рисунок 1. Схема формирования микрокапсул

Фенольные группы дубильной кислоты способны к диссоциации (как все слабые кислоты), что ведет к возможности приобретения заряда (образование водородной связи) при изменении pH.

Так, в сильно щелочной среде pH (pH~10) связывания белка и дубильной кислоты не происходит. При кислых значениях pH (pH<6) водородные связи усиливаются гидрофобными взаимодействиями между неполярной частью белка и дубильной кислотой. Благодаря природной устойчивости дубильной кислоты к воздействию ферментов ожидается, что полученные микрокапсулы будут способны эффективно защищать включаемые в них вещества при прохождении желудочно-кишечного тракта.

Однако известно [14], что трипсин способен разрушить комплекс дубильной кислоты и БСА. Поэтому для защиты микрокапсул от воздействия трипсина и замедления процесса их разрушения (а соответственно, и замедления высвобождения содержимого) впервые были нанесены дополнительные слои ингибитора трипсина – овомукоида (ОМ) (рисунок 1) – гликопротеина с молекулярной массой около 30 кДа. Аминогруппы трипсина взаимодействуют с кислотными функциональными группами овомукоида, образуя с ним комплекс и ингибируя активность трипсина.

Целью настоящей работы было определение возможности управления высвобождением модельного вещества поли(аллил)амина гидрохлорида (полимера, являющегося безопасным, нетоксичным, хорошо растворимым в воде, устойчивым к гидролизу и нечувствительным к изменениям pH) из микрокапсул, состоящих из бычьего сывороточного альбумина и дубильной кислоты, путем введения в их оболочку овомукоида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовались следующие реактивы: карбонат натрия (Sigma-Aldrich, каталожный номер 451614), хлорид кальция (Sigma-Aldrich, каталожный номер C5080), хлорид натрия (Sigma-Aldrich, каталожный номер 746398), дубильная кислота (Sigma-Aldrich, каталожный номер 16201), овомукоид (Sigma-Aldrich, каталожный номер T9253), бычий сывороточный альбумин, меченный флуоресцеина изотиоцианатом (Sigma-Aldrich, каталожный номер A9771), родамин Б (Sigma-Aldrich, каталожный номер 1001925575), полиаллиламина гидрохлорид (Sigma-Aldrich, каталожный номер 283223). Все растворы солей готовили в деионизованной воде (проводимость 0,05 mS/cm, «Реахим», Санкт-Петербург, Россия).

Приготовление капсул

Ядро из карбоната кальция готовили соосаждением растворов хлорида кальция и карбоната натрия. Соосаждение проводилось следующим образом: поли(аллил)амина гидрохлорид (исходная концентрация в эксперименте 2,0 мг/мл) добавляли к 3 мл раствора 0,33 моль/л $CaCl_2$, затем полученную смесь прикапывали к 3 мл раствора 0,33 моль/л Na_2CO_3 при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при 600 об/мин. Полученную суспензию перемешивали в течение 30 с и оставляли на 15 мин при комнатной температуре. Суспензию центрифугировали на приборе Centrifuge 5418 (Eppendorf, Германия) при 3000 об/мин и отбирали супернатант. Полученные ядра промывали этиловым спиртом и сушили в сушильном конвекционном шкафу FD 115 (Binder, Германия) при температуре 50 °C. После того как ядра высохли, их взвешивали и затем на них формировали полимерную оболочку.

Для формирования первого слоя на ядро наносили раствор дубильной кислоты (исходная концентрация 2 мг/мл). Для этого к полученным по вышеуказанной методике ядрам добавляли 2 мл раствора дубильной кислоты. Полученную суспензию перемешивали при помощи вортекс-шейкера MixMate (Eppendorf, Германия) в течение 15 мин, осаждали



Сушильный конвекционный шкаф FD 115, Binder

центрифугированием при 3000 об/мин в течение 3 мин и троекратно промывали водой для удаления свободной дубильной кислоты. Второй слой, состоящий из БСА (исходная концентрация 2 мг/мл), и все последующие пары слоев наносили аналогично. На последней стадии формирования микрокапсулы ядро растворяли в течение 1 ч при перемешивании при помощи вортекс-шейкера MixMate (Eppendorf, Германия) при комнатной температуре в 2 мл 0,2 М этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

Исследование капсул

Количество включенного в ядро РАН рассчитывали по формуле:

$$I(\%) = \frac{(C \times V)_s - \left(\sum_i (C_i \times V_i)\right)}{(C \times V)_s} \times 100\%, \quad (1)$$

где I – процент включения РАН; V – объем исходного раствора; C– исходная концентрация раствора; V_i – суммарный объем фильтратов и смывов и C_i – концентрация фильтратов и смывов.

Эффективность включения белка в ядро из карбоната кальция характеризуется загрузкой РАН (L):

$$L = I \cdot (P_{pr} / P_{templ}), \quad (2)$$

где L – величина, характеризующая количество включенного вещества на единицу веса ядер; P_{pr} – исходный вес включенного в ядра вещества; P_{templ} – вес ядер из карбоната кальция, полученных в ходе реакции соосаждения, описанной выше. Данные потери включаемого в ядра вещества были получены спектрофотометрически и коррелировали с величиной его загрузки.

Приготовление раствора трипсина

Раствор трипсина готовили следующим образом: навеску трипсина 10 мг растворяли в 10 мл 0,1 мМ HCl. Затем полученный раствор разбавляли 0,2 М трис(гидроксиметил)аминометаном (ТРИС) до получения pH, равного 7,5–8,5.

Изучение высвобождения РАН из микрокапсул

Суспензии микрокапсул инкубировали в 2 мл раствора 0,2 М ТРИС, содержащего трипсин (приготовлен по методике, указанной выше), при постоянном перемешивании при помощи вортекс-шейкера MixMate (Eppendorf, Германия) при 100 об/мин при постоянной температуре 37 °С. Через определенные промежутки времени (1 ч) отбирали автоматической пипеткой (Eppendorf, Германия) аликвоты (по 0,1 мл) суспензии. В систему добавляли эквивалентный объем буфера с трипсином. Аликвоты центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин, отделяли супернатант и спектрофотометрически определяли концентрацию РАН, меченного родамином Б (на 560 нм), в супернатанте. Эффективность высвобождения РАН оценивали отношением его содержания в супернатанте и в исходной суспензии.

Методы:

Сканирующая электронная микроскоопия

Фотографии капсул были получены на микроскопе Supra 40 VP (Carl Zeiss, Германия). Образцы наносились на кремниевую пластинку и покрывались золотом.

Конфокальная микроскопия

Конфокальные фотографии были получены на конфокальном микроскопе Zeiss «LSM 710» (CarlZeiss, Германия) с аргоновым лазером λ=488 нм.

Для визуализации микрокапсул и их содержимого к бычьему сывороточному альбумину (БСА) и включенному в микрокапсулы поли(аллил)амина гидрохлориду (РАН) присоединяли флуоресцентные метки (рисунок 2).

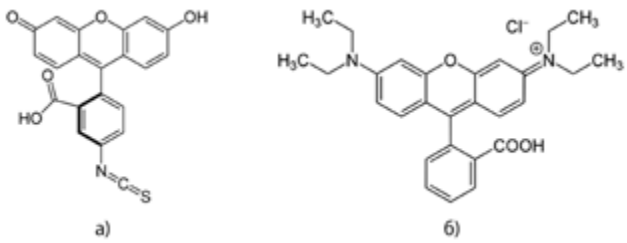


Рисунок 2. Структурные формулы флуоресцентных меток:

а – флуоресцеина изотиоцианат (ФИТЦ); б – родамин Б

Спектрофотометрия

Оптические исследования проводили на спектрофотометре SF-2000 (ЛОМО, Россия). Концентрации меченного РАН рассчитывалась по калибровочной кривой при λ_{max}=560 нм (максимум поглощения в УФ-области родамина Б).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве ядра для формирования микрокапсул использовали микрочастицы $CaCO_3$, содержащие модельный объект поли(аллил)амина гидрохлорид (РАН), меченный родамином Б. Известны три модификации $CaCO_3$: ватерит (сферическая форма, гексагональная кристаллическая решетка), кальцит (кубическая форма, ромбоэдрическая кристаллическая решетка) и арагонит (иглообразная форма, орторомбическая кристаллическая решетка). Из трех модификаций были выбраны ватериты, поскольку они имеют более высокую растворимость по сравнению с кальцитом и арагонитом, высокодисперсную пористую структуру, высокую удельную плотность поверхности, а также широкий диапазон получаемых размеров (0,6–10 мкм). $CaCO_3$-микрочастицы с РАН, меченным родамином Б, были покрыты: 8 слоями БСА и дубильной кислоты (1); 4 слоями БСА и дубильной кислоты и 4 слоями овомукоида и дубильной кислоты (2). Белок, входящий в оболочку микрокапсул, был ранее помечен флуоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ). Полученные микрокапсулы имели среднее включение в них РАН, меченного родамином Б, 54,7%, и загрузку 24,6 мкг/мг. При этом потери модельного вещества при формировании микрокапсулы составили 1,3% на один слой.

В первой серии экспериментов микрокапсулы, состоящие из 8 слоев БСА и дубильной кислоты, были помещены в среду со значением pH=7,8 (0,2 М ТРИС-HCl) и трипсином для исследования процесса разрушения микрокапсул и кинетики высвобождения из них модельного вещества РАН (рисунок 3). Трипсин не формирует комплекса с дубильной кислотой и остается активным ферментом, способным разрушить микрокапсулы.

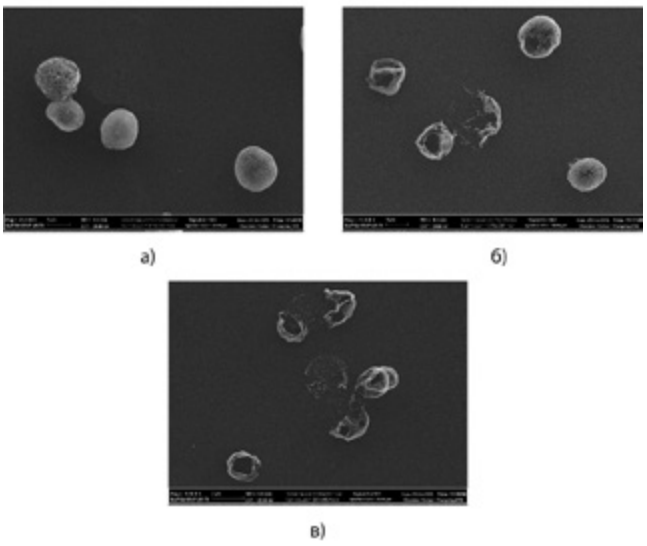


Рисунок 3. Микрокапсулы, состящие из бычьего сывороточного альбумина (БСА) и дубильной кислоты:

а – исходные микрокапсулы; б – микрокапсулы после 6 ч в среде 0,2 М ТРИС-HCl с трипсином; в – микрокапсулы после 24 ч в среде 0,2 М ТРИС-HCl. Температура инкубации 37 °С. Увеличение ×20000. Размеры капсул 1,5–2,5 мкм

Анализ полученных фотографий показал, что разрушение микрокапсул заметно уже после 6 ч контакта со средой и ферментом (рисунок 3б). Результат является вполне естественным, поскольку одна из компонент микрокапсул – бычий сывороточный альбумин разрушается под действием трипсина. После 24 ч пребывания в среде с ферментом микрокапсулы полностью разрушены (рисунок 3в). Данные подтверждаются экспериментами по высвобождению поли(аллил)амина гидрохлорида из микрокапсул в 0,2 М ТРИС-HCl с трипсином (рисунок 7).

В качестве еще одного доказательства разрушения микрокапсул приведены фотографии (рисунок 3), полученные методом конфокальной микроскопии. Для этого одна из компонент оболочки (БСА) и содержимое микрокапсулы (РАН) были помечены флуоресцентными метками. Микрокапсулы исследовали под конфокальным микроскопом в режиме timelaps на протяжении 4 ч (рисунок 4).

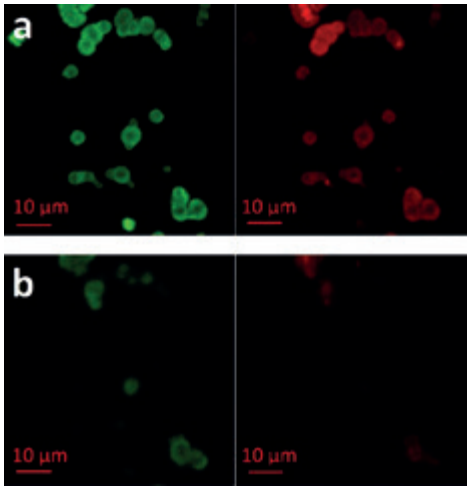


Рисунок 4. Конфокальные фотографии микрокапсул (БСА*ФИТЦ – ДК)$_4$ с (РАН*родамин Б) в ходе контакта со средой, содержащей трипсин (timelaps):

а – исходные микрокапсулы; б – микрокапсулы после 4 ч в среде

Следует отметить, что уже через 2 ч контакта со средой и ферментом наблюдалось заметное падение свечения флуоресцеина изотиоцианата (ФИТЦ) – метки, присоединенной к оболочке миерокапсулы. Представленные фотографии подтверждают результаты, полученные выше методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), и позволяют сделать вывод о том, что микрокапсулы (БСА*ФИТЦ – ДК)$_4$ неустойчивы к воздействию ферментов.

Поэтому во второй серии экспериментов в целях замедления разрушения микрокапсул под действием протеолитического фермента трипсина (и, соответст-

венно, замедления высвобождения из них РАН) в их оболочку встраивали овомукоид (ОМ). Овомукоид, как и другие белки, связываясь с дубильной кислотой посредством водородных связей, формирует плотную оболочку (рисунок 5).

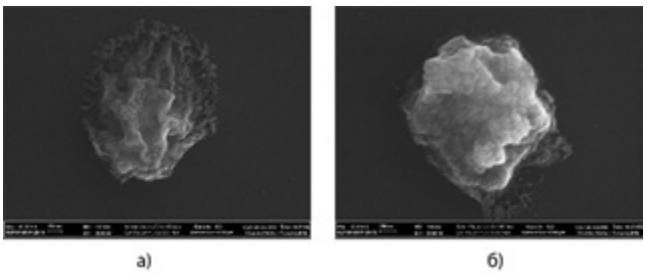


Рисунок 5. Микрокапсулы (БСА*ФИТЦ + ДК)$_2$ со включенными в оболочку 1 слоем (а) и 2 слоями (б) овомукоида. Увеличение ×60000. Размер микрокапсул 1,8–2 мкм

При сравнении микрокапсул, полученных без защитных слоев овомукоида (рисунок 3а), и микрокапсул с одним слоем овомукоида (рисунок 5а) установлены существенные различия в их морфологии. Проходя через поры оболочки (БСА*ФИТЦ + ДК)$_2$, овомукоид взаимодействует не только с дубильной кислотой на поверхности микрокапсулы, но и со свободными группами дубильной кислоты и БСА более ранних слоев. Таким образом, нанесение последующих слоев овомукоида существенно увеличивает толщину микрокапсулы (рисунок 5б).

Во второй серии экспериментов микрокапсулы, состоящие из 4 слоев БСА и дубильной кислоты, а также из 4 слоев овомукоида и дубильной кислоты, помещали в среду со значением pH=7,8 (0,2 М ТРИС-HCl) и трипсином для исследования процесса разрушения микрокапсул и кинетики высвобождения из них модельного вещества РАН (рисунок 6). Через 6 ч контакта со средой с трипсином микрокапсулы с овомукоидом (рисунок 6б) оказались менее разрушенными, чем микрокапсулы из первой серии экспериментов в аналогичных условиях (рисунок 3б).

Исследование динамики разрушения микрокапсул в течение 2 ч при помощи конфокального микроскопа также показало, что модифицированные микрокапсулы (рисунок 6а) сохраняют как внешнюю структуру оболочки, так и внутреннее содержимое. В то же время немодифицированные микрокапсулы (рисунок 4б) через 4 ч уже заметно разрушаются, в то время как в случае модифицированных микрокапсул падения флуоресценции практически не наблюдалось (рисунок 7б).

Полученные результаты для обеих систем подтверждаются экспериментами по высвобождению модельного вещества из капсул в среду со значением pH=7,8 (0,2 М ТРИС-HCl), содержащую и не содержащую трипсин (рисунок 8).

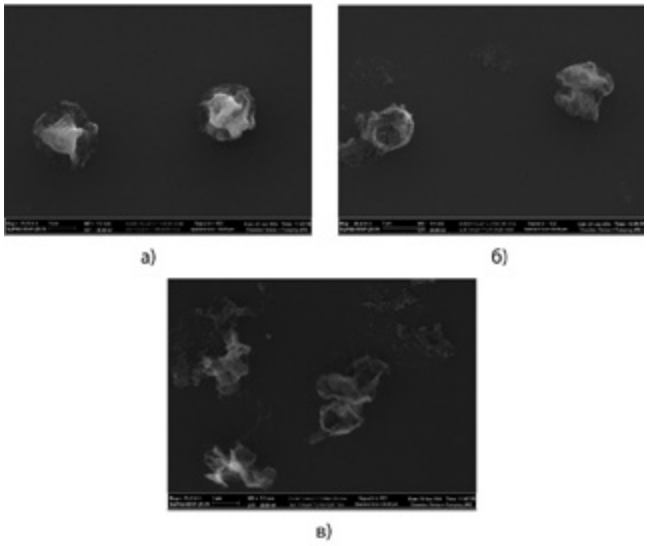


Рисунок 6. Фотографии микрокапсул, состоящих из (БСА*ФИТЦ – ДК)$_2$ и (ОМ – ДК)$_2$, содержащих (РАН*родамин Б):

а – исходные микрокапсулы; б – микрокапсулы после 6 ч в среде 0,2 М ТРИС-HCl с трипсином; в – микрокапсулы после 24 ч в среде 0,2 М ТРИС-HCl. Температуры инкубации 37 °С. Увеличение ×25000. Размеры капсул 1,5–2,5 мкм

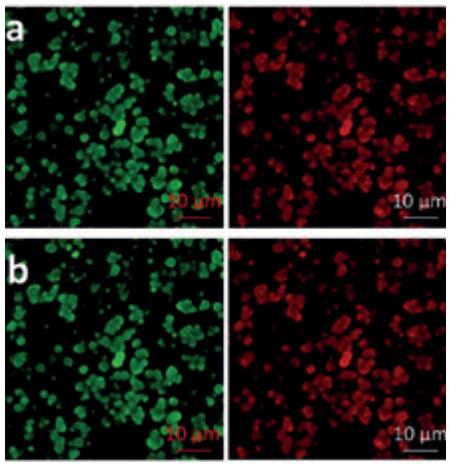


Рисунок 7. Конфокальные фотографии микрокапсул с 2 защитными слоями овомукоида в ходе контакта со средой, содержащей трипсин (timelaps):

а – исходные микрокапсулы; b – микрокапсулы после 4 ч в среде

Полученные профили высвобождения поли(аллил)амина гидрохлорида, меченного родамином Б, из системы первой серии экспериментов (то есть система без защитных слоев овомукоида) показали, что введение трипсина увеличивает скорость высвобождения РАН, меченного родамином Б, из микрокапсул с немодифицированной оболочкой (рисунок 8с) через 2 ч контакта со средой (около 30%). В случае с микрокапсулами без модифицированной оболочки, помещенными в среду с pH=7,8 без трипсина, высвобождение через 2 ч составляло порядка 22% (рисунок 8а). Аналогичные различия в скорости высвобождения РАН, меченного родамином Б, из микрокапсул в среду

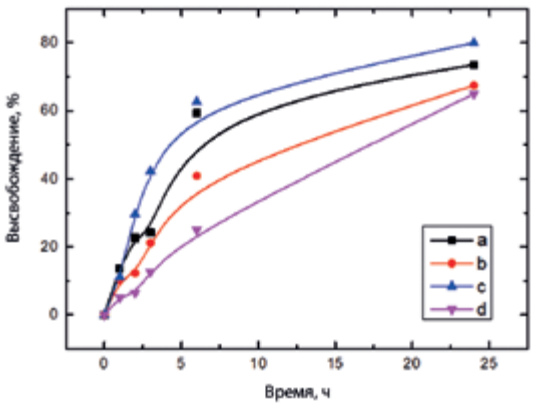


Рисунок 8. Высвобождение (PAH*родамин Б) из микрокапсул:

a – в среде 0,2 М ТРИС-HCl без трипсина, без овомукоида в оболочке; b – в среде 0,2 М ТРИС-HCl с трипсином, с овомукоидом в оболочке; c – в среде 0,2 М ТРИС-HCl с трипсином, без овомукоида в оболочке; d – в среде 0,2 М ТРИС-HCl без трипсина, с овомукоидом в оболочке. Температура инкубации 37 °C

с трипсином (порядка 20%) и без него (порядка 15%) наблюдали для систем из второй серии экспериментов (рисунки 8b и 8d).

Введение в оболочку исследуемых микрокапсул овомукоида позволило существенно снизить (почти в 2,5 раза) скорость высвобождения модельного вещества в щелочную среду без трипсина (рисунки 8a и 8d). Аналогичные результаты были получены в случае микрокапсул с овомукоидом в оболочке после их контакта с щелочной средой с трипсином (рисунки 8b и 8c), что коррелирует с результатами сканирующей электронной микроскопии и конфокальной микроскопии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе методом послойной адсорбции бычьего сывороточного альбумина и дубильной кислоты были получены микрокапсулы, содержащие модельное вещество поли(аллил)амина гидрохлорид (PAH). В качестве ядер для формирования микрокапсул были использованы сферические пористые микрочастицы (ватериты) $CaCO_3$ с включенным в них методом соосаждения модельным веществом.

Анализ фотографий, полученных методами конфокальной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии, подтвердил предположение о том, что микрокапсулы без защитных слоев овомукоида являются неустойчивыми к воздействию трипсина.

Результаты сканирующей электронной микроскопии показали существенные различия структур микрокапсул первой (оболочки без овомукоида) и второй (в оболочку введен овомукоид) серий экспериментов.

Изучение кинетики высвобождения модельного вещества PAH в среду с трипсином показало, что введение в оболочку микрокапсул 2 слоев овомукоида позволило снизить скорость их разрушения практически вдвое.

Таким образом, можно предположить, что, поскольку все вещества, входящие в состав микрокапсул, являются разрешенными к фармацевтическому применению, исследованные в настоящей работе микрокапсулы могут быть использованы при создании новых пероральных систем доставки терапевтических белков и пептидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Murtaza, M. Ahmad. Layer-by-layer microcapsules for the delivery of lipophilic drugs // Journal of Pharmacy and Alternative Medicine. 2012. V. 1. P. 20–31.
2. M.V. Lomova, A.I. Brichkina, M.V. Kiryukhin, E.N. Vasina, A.M. Pavlov, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, M.N. Antipina. Multilayer capsules of bovine serum albumin and tannic acid for controlled release by enzymatic degradation // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2015. V. 7. P. 11732–11740.
3. K. Kenta, M. Matsusaki, T. Kida, M. Akashi. Controlled Release Using a Polymer Stereocomplex Capsule through the Selective Extraction and Incorporation of One Capsule Shell Component // Langmuir. 2012. V. 28. P. 15378–15384.
4. K.A. Fisher, K.D. Huddersman, M.J. Taylor. Comparison of micro- and mesoporous inorganic materials in the uptake and release of the drug model fluorescein and its analogues // Chemistry-A European Journal. 2003. V. 9. P. 5873–58788.
5. J.A. Juhasz, S.M. Best, W. Bonfield. Preparation of novel bioactive nano-calcium phosphate–hydrogel composites // Science and Technology of Advanced Materials. 2010. V. 11. P. 1–8.
6. H. Kim, J.C. Knowles, H. Kim. Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic Vancomycin release // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2005. V. 16. P. 189–195.
7. D.B. Shenoy, A.A. Antipov, G.B. Sukhorukov, H. Mohwald. Layer-by-Layer Engineering of Biocompatible, Decomposable Core–Shell Structures // Biomacromolecules. 2003. V. 4. P. 265–272.
8. T. Pavlitschek, M. Gretz, J. Planh. Microcapsules prepared from a polycondensate-based cement dispersant via layer-by-layer self-assembly on melamine-formaldehyde core templates // Journal of applied polymer science. 2013. V. 127. P. 3705–3711.
9. N. Sudareva, H. Popova, N. Saprykina, S. Bronnikov. Structural optimization of calcium carbonate cores as templates for protein encapsulation // J. Microencapsul. 2014. V. 31. P. 333-343.
10. T. Wang, S. Wang, R. Luo, C. Zhu, T. Akiyama, Z. Zhang. Microencapsulation of phase change materials with binary cores and calcium carbonate shell for thermal energy storage // Applied Energy. 2016. V. 171. P. 113–119.
11. D. Luo, S. Shahid, R. Wilson, M. Cattell, G. Sukhorukov. Novel Formulation of Chlorhexidine Spheres and Sustained Release with Multilayered Encapsulation // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2016. V. 8. P.12652–12660.
12. X. Ruckenstein, E. Ruckenstein. Trypsin Purification by *p*-Aminobenzamidine Immobilized on Macroporous Chitosan Membranes // Ind. Eng. Chem. Res. 1998. V.37. P. 159–165.
13. G. Bayramoglu, V.C. Ozalp, M.Y. Arica. Magnetic Polymeric Beads Functionalized with Different Mixed-Mode Ligands for Reversible Immobilization of Trypsin // Ind. Eng. Chem. Res. 2014. V. 53. P. 132–140.
14. P. Makkar, R. Dawra, R. Singh. Tannic acid and proteolytic enzymes: Enzyme inhibition or substrate deprivation? Tannic acid and proteolytic enzymes: Enzyme inhibition or substrate deprivation? Tannic acid and proteolytic enzymes: Enzyme inhibition or substrate deprivation?Determination of both tannin and protein in a tannin-protein complex // Journal of Agricultural and Food. 1988. V. 36. P. 523–525.

УДК 615.014

РЕГУЛИРОВАНИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИБУПРОФЕНА ИЗ МАТРИЧНЫХ ТАБЛЕТОК НА ОСНОВЕ КАРБОПОЛА

Н.И. Филиппова[1]*, В.А. Вайнштейн[1], А.В. Сон[1], С.А. Минина[1]

Резюме. Исследованы профили высвобождения ибупрофена из таблеток в средах, имитирующих изменение pH в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). В качестве полимера-пролонгатора использовали карбопол Ультрез-21. Составы с тремя различными нейтрализующими агентами (L-лизин, N-метилглюкозамин, гидрокарбонат натрия) в различных соотношениях карбопол : нейтрализующий агент прессовали в таблетки с использованием метода влажной грануляции. В составах с гидрокарбонатом натрия наблюдалось наиболее быстрое высвобождение ибупрофена по сравнению с составами, в которых в качестве нейтрализующего агента использовались аминосодержащие L-лизин и N-метилглюкозамин. На скорость и степень высвобождения ибупрофена из таблеток существенно влияют количество и скорость нейтрализации карбопола. Скорость набухания карбопола возрастает с увеличением содержания нейтрализующего агента в составе таблеток.

Ключевые слова: матричные таблетки, замедленное высвобождение, ибупрофен, карбопол, L-лизин, N-метилглюкозамин.

REGULATION OF IBUPROFEN RELEASE RATE FROM MATRIX TABLETS

N.I. Filippova[1]*, V.A. Vainshtein[1], A.V. Son[1], S.A. Minina[1]

Abstract. Release profiles were investigated from tablets of ibuprofen in media simulating the conditions of the gastrointestinal tract. Carbopol Ultrez 21 was used as prolongator polymer. The formulations with three different neutralizing agents [L-lysine, N-methylglucosamine (MGA), sodium hydrocarbonate] in several carbopol : neutralizer ratios were tabletted with using the wet granulation method. Faster release of ibuprofen has been observed in formulations with sodium hydrocarbonate, than in formulations with amine containing L-lysine and MGA. Both the amount and neutralization rate of carbopol influence significantly on rate and extent of ibuprofen release from tablets. Carbopol swelling rate grows up with increasing of neutralizer content in tablet.

Keywords: matrix tablets, sustained-release, ibuprofen, carbopol, L-lysine, MGA.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, 14-A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: natalia.philippova@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) представляют собой группу лекарственных средств, широко применяемых в клинической практике, причем многие из них отпускаются без рецепта.

Ибупрофен относится к группе нестероидных противовоспалительных препаратов. Механизм действия и профиль безопасности ибупрофена хорошо изучены, его эффективность клинически доказана. Обезболивающий механизм действия ибупрофена заключается в замедлении синтеза простагландинов – индукторов воспаления. После приема препарата изменяется восприимчивость болевых рецепторов. Ибупрофен является достаточно сильным безрецептурным анальгетиком. Главное его преимущество состоит в способности ослаблять боли воспалительного характера дозами в 200–400 мг [1].

Клинические достоинства НПВП во многом уменьшает серьезный риск развития специфических осложнений. Известной проблемой является так называемая НПВП-гастропатия, специфическая патология верхних отделов ЖКТ, возникающая вследствие локального влияния НПВП на слизистую оболочку, что сопровождается развитием гастрита, эрозий и язв.

Повреждение чаще локализуется в желудке. Клинические симптомы некоторых побочных эффектов при применении НПВП почти у 60% больных, особенно пожилых, отсутствуют, поэтому для установления диагноза во многих случаях требуется проведение специальных обследований. Отсутствие клинической симптоматики в таких случаях связывают с анальгезирующим действием препаратов. Поэтому пациенты при длительном приеме НПВП не отмечают нежелательных явлений со стороны желудочно-кишечного тракта и являются группой повышенного риска развития серьезных осложнений, например НПВП-гастродуоденопатии (кровотечение, тяжелая анемия) [2].

Для улучшения переносимости НПВП может быть использован метод снижения местораздражающего действия на оболочку желудка за счёт регулирования высвобождения действующих веществ в начальный период времени [3, 4].

Снижение и регулирование скорости высвобождения НПВП в начальный период времени уменьшает концентрацию действующего вещества на слизистой оболочке желудка, что позволяет снизить раздражающее действие [5, 6].

Одним из наиболее эффективных способов регулирования кинетики высвобождения является создание матричных таблеток, в которых скоростью и степенью высвобождения можно управлять, вводя в состав различные полимеры: производные целлюлозы, крахмала, аминометакриловые полимеры, композиционные полимерные носители и другие [7].

Целесообразным является достижение равномерного высвобождения в течение первых 2–4 ч. В таком случае можно сочетать сравнительно быстрое наступление обезболивающего эффекта и устранение высоких локальных концентраций на слизистой. Замедление высвобождения обычно достигается путем применения матричных таблеток на основе набухающих полимеров [8, 9]. При этом карбомеры в таком аспекте применения изучены недостаточно, поэтому целью работы было выбрано изучение влияния карбомерных матриц, полученных различными способами, на равномерность высвобождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы, использованные при изготовлении опытных образцов таблеток

Ибупрофен (CAS № 15687-27-1, Sinoway Industrial Co., Ltd., Китай); микрокристаллическая целлюлоза (MICROCEL® MC-101) (CAS № 9004-34-6, Blanver Farmoquimica Ltda, Бразилия); лактозы моногидрат (CAS № 10039-26-6, Meelunie B.V., Нидерланды); Carbopol® Ultrez 21, полимер (CAS № 110-82-7, Lubrizol Advanced Materials, США); стеарат кальция (х.ч., ООО «Реактив», Россия); L-лизин (CAS № 56-87-1, Xiamen Fine Chemical Import Co., Ltd, Китай); N-метилглюкозамин (CAS № 42852-95-9, Xiamen Fine Chemical Import Co., Ltd, Китай); гидрокарбонат натрия (х.ч., ЗАО «Вектон», Россия); натрий фосфорнокислый 2-замещенный 12-водный (ч., ЗАО «Вектон», Россия); калий фосфорнокислый 1-замещенный (х.ч., ЗАО «Вектон», Россия); гидроксид натрия (х.ч., Chemapol, Lachema n.p. Brno, Чехия).

Составы и методы, использованные при изготовлении опытных образцов таблеток

Разработаны составы матричных таблеток ибупрофена с использованием карбопола Ультрез-21 в качестве полимера-пролонгатора и L-лизина, N-метилглюкозамина (МГА) и гидрокарбоната натрия в качестве нейтрализующих агентов. Составы таких вариантов приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Опытные составы таблеток ибупрофена 200 мг; масса 1 таблетки 400 мг

№ варианта	Ибупрофен, мг	Карбопол Ультрез-21, мг	L-лизин, мг	N-метилглюкозамин, мг	Натрия гидрокарбонат, мг	МКЦ, мг	Лактозы моногидрат, мг	Стеарат кальция, мг
IB-0	200,00	–	–	–	–	39,20	156,80	4,00
Нейтрализующий агент – N-метилглюкозамин								
MGA-1	200,00	2,00	–	20,00	–	58,00	116,00	4,00
MGA-1	200,00	5,00	–	28,00	–	54,32	108,68	4,00
Нейтрализующий агент – L-лизин								
Lys-3	200,00	2,00	6,00	–	–	60,00	128,00	4,00
Lys-4	200,00	5,00	10,00	–	–	60,00	121,00	4,00
Lys-5	200,00	2,00	20,00	–	–	58,00	116,00	4,00
Lys-6	200,00	2,00	28,00	–	–	33,20	132,80	4,00
Lys-7	200,00	2,00	40,00	–	–	30,80	123,20	4,00
Lys-8	200,00	4,00	20,00	–	–	34,40	137,60	4,00
Lys-9	200,00	8,00	20,00	–	–	33,60	134,40	4,00
Lys-10	200,00	20,00	20,00	–	–	31,20	124,80	4,00
Lys-11	200,00	40,00	20,00	–	–	27,20	108,80	4,00
Нейтрализующий агент – гидрокарбонат натрия								
HCNa-12	200,00	4,00	–	–	20,00	57,20	114,80	4,00
HCNa-13	200,00	10,00	–	–	28,00	52,80	105,20	4,00
HCNa-14	200,00	20,00	–	–	40,00	45,20	90,80	4,00

Получение таблеток методом влажного гранулирования

Все ингредиенты просеивали через сито с размером отверстий 0,5 мм. Компоненты взвешивали в соответствии с таблицей 1, помещали в ступку и перемешивали. К каждой композиции добавляли воду и тщательно перемешивали до получения однородной влажной массы. Затем массу протирали через сито с диаметром отверстий 1,5 мм и сушили (60 °С, 10 мин), снова протирали (диаметр отверстий сита – 1,5 мм). Полученные гранулы сушили в сушильном шкафу ШС-80-01-СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при 60 °С до постоянной массы. Потеря в массе при высушивании составляла не более 3,0%. Сухие гранулы протирали через сито с диаметром отверстий 1 мм. Полученные гранулы опудривали стеаратом кальция. Таблетки прессовали на однопуансонной таблеточной машине (Single punch tablet press, KORSCH XP 1, Германия), диаметр таблетки – 11 мм, средняя масса – 400 мг.

Оценка параметров таблеток

Определяли показатели качества таблеток: среднюю массу, прочность на излом, истираемость, растворение.

Отклонение от средней массы

Определение проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII (Т. 2, ОФС 1.4.2.0009.15, С. 209–211).

$$\Delta m_i = \frac{m_{ср} - m_i}{m_{ср}} \cdot 100, \ \%.$$

Прочность на излом

Прочность на излом определяли с помощью тестера твердости таблеток Erweka TBH 125 (Frankfurt, Германия). Прочность на излом определяли с использованием шести таблеток для каждого варианта. Все таблетки имеют одинаковые геометрические параметры, поэтому прочность определяли на основе 6 измерений (ГФ XIII, Т. 2, ОФС 1.4.2.0011.15, С. 215–216).

Истираемость

Определение проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII (Т. 2, ОФС 1.4.2.0004.15, С. 175-176).

$$П = 100 - \frac{m_н - m_к}{m_н} \cdot 100, \ \%.$$

Тест «Растворение»

Определение оптической плотности стандартного раствора ибупрофена

Приготовление фосфатного буфера (pH=7,2)

13,61 г калия дигидрата ортофосфата и 2,78 г натрия гидроксида точно взвешивали, растворяли в 2 л воды при перемешивании. При необходимости доводили pH до 7,2±0,05 с помощью 85%-й фосфорной кислоты или натрия гидроксида.

Приготовление растворов ибупрофена в фосфатном буфере, воде и 0,01 М HCl

Около 100 мг (точная навеска) стандартного образца субстанции ибупрофена помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в фосфатном буфере (pH 7,2), получали раствор с концентрацией ибупрофена 0,1%.

Для определения длины волны и оптической плотности в воде, 0,01 М HCl и фосфатном буфере (pH=7,2) по 1 мл 0,1% раствора ибупрофена в фосфатном буфере вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки соответствующим растворителем. Получали растворы ибупрофена в воде, 0,01 М HCl и фосфатном буфере (pH=7,2) с концентрацией 0,001% (0,01 мг/мл).

Определение оптической плотности растворов ибупрофена

Снимали УФ-спектры растворов ибупрофена в кварцевых кюветах (10 мм) на УФ-спектрофотометре СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр», Россия) (рисунок 2). Наблюдается выраженный максимум поглощения в фосфатном буфере с pH 7,2 при 222±2 нм; эта длина волны и выбрана в качестве аналитической. В воде и в растворе соляной кислоты наблюдается незначительное поглощение, так как отсутствует ионизация молекулы ибупрофена.

Тест «Растворение» выполняли на тестере растворения Erweka DT 728 (Frankfurt, Германия) по методу USP II при 60 оборотах в минуту в течение 4 ч.

Растворение в фосфатном буфере (pH=7,2)

Каждую таблетку, содержащую 200 мг ибупрофена, помещали в стакан, содержащий 500 мл фосфатного буфера (pH=7,2) при температуре 37,0±0,1 °С.

Пробы объемом 0,25 мл фильтровали через фильтр (Millex, США) с диаметром пор 0,45 мкм через определенные временные интервалы (15; 30; 45; 60; 90; 120; 150; 180; 240 минут). 0,25 мл пробы доводили до 10 мл фосфатным буфером с pH 7,2. Оптическую плотность каждого образца измеряли при длине волны 222 нм. Процент высвобождения ибупрофена в каждой пробе рассчитывали по формуле:

$$\%_{высвобождения} = \frac{D_{иссл}}{D_0} \cdot 100, \ \%,$$

где $D_{иссл}$ – оптическая плотность испытуемой пробы; D_0 – оптическая плотность 0,001% раствора ибупрофена в фосфатном буфере (pH 7,2).

Тест «Растворение» в среде, моделирующей условия ЖКТ

Тест заключается в том, что таблетки растворяют на приборе в течение 1 часа в среде с pH 1,7 (0,01 М HCl), затем, не извлекая таблетки, доводят pH среды до 7,2 прибавлением двузамещенного фосфата натрия и продолжают испытание. При измерениях концентраций учитывают увеличение объема среды растворения, внося соответствующую поправку в объем пробы. Концентрация HCl 0,01 М выбрана для того, чтобы можно было довести pH от 1,7 до 7,2 без существенного увеличения объема среды растворения. pH 1,7 достаточно адекватно отражает кислотность среды желудка.

Определение количества и формы Na_2HPO_4, необходимого для достижения pH 7,2.

Приготовление 10% раствора Na_2HPO_4.

10,00 г Na_2HPO_4 помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 70–80 мл горячей воды (t=80–90 °С); затем доводили объем водой очищенной до метки.

Определение pH проводили потенциометрически в соответствии с требованиями ГФ XIII (Т. 1, ОФС 1.2.1.19.0002.15, С. 611–612) с использованием pH-метра-милливольтметра «Аквилон» pH-410 (Россия).

20 мл 0,01 М HCl помещали в стакан вместимостью 50 мл. При постоянном перемешивании на магнитной мешалке порциями вносили соответственно порошок или раствор Na_2HPO_4, отмечая величину pH. После установления постоянного значения pH (7,2) фиксировали объём или навеску фосфата, израсходованного для его достижения (рисунок 1).

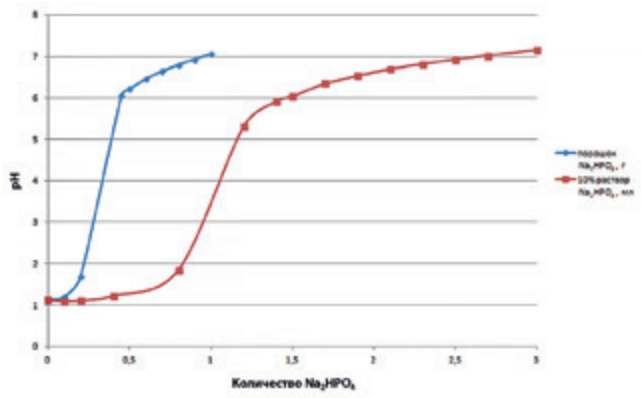


Рисунок 1. Кривые титрования 0,01 М раствора HCl раствором и порошком Na_2HPO_4

Растворение порошка Na_2HPO_4 при добавлении к 0,01 М HCl происходит в течение некоторого времени, тогда как при внесении 10% раствора Na_2HPO_4 установление равновесия происходит практически мгновенно. Поэтому, несмотря на необходимость внесения большего объема, в качестве титранта целесообразно использовать раствор, а не порошок Na_2HPO_4. Таким образом, было установлено, что для доведения pH до 7,2 необходимо внести 75 мл 10% раствора Na_2HPO_4 на 500 мл 0,01 М HCl.

Проведение теста «Растворение» в среде с изменением pH (моделирующей условия ЖКТ)

Каждую таблетку, содержащую 200 мг ибупрофена, помещали в 500 мл 0,01 М HCl (pH=1,7).

Каждую таблетку, содержащую 200 мг ибупрофена, помещали в стакан, содержащий 500 мл 0,01 М HCl (pH=1,7) при температуре 37,0±0,1 °С. Отбор проб объемом 0,25 мл с фильтрацией через фильтр (Millex, США) с диаметром пор 0,45 мкм проводили через временные интервалы 15; 30; 45; 60 мин. 0,25 мл пробы доводили до 10 мл фосфатным буфером с pH 7,2. оптическую плотность каждого образца измеряли при длине волны 222 нм.

Затем в среду растворения прибавляли по 75 мл 10% раствора Na_2HPO_4, доводя pH до 7,2. Объем среды в стакане увеличивался до 575 мл. Далее продолжали отбор проб объемом 0,287 мл с фильтрацией через временные интервалы 90; 120; 150; 180; 240 минут. Каждую пробу доводили до 10 мл фосфатным буфером с pH 7,2 и измеряли оптическую плотность каждого образца при длине волны 222 нм.

Процент высвобождения ибупрофена в каждой пробе рассчитывали по формуле:

$$\%_{\text{высвобождения}} = \frac{D_{\text{иссл}}}{D_0} \cdot 100,\ \%,$$

где $D_{\text{иссл}}$ – оптическая плотность испытуемой пробы; D_0 – оптическая плотность 0,001% раствора ибупрофена в фосфатом буфере с pH 7,2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

УФ-спектры растворов ибупрофена в воде, 0,01 М HCl и в фосфатном буфере с pH 7,2 показывают, что выраженный максимум поглощения наблюдается при pH 7,2 (рисунок 2). Это связано с формированием хромофора за счет частичной ионизации молекулы ибупрофена в слабощелочной среде. В слабокислой среде ионизация не происходит и, соответственно, отсутствует специфическое поглощение в УФ-области. Поэтому в качестве растворителя для количественного определения ибупрофена спектрофотометрическим методом выбран буферный раствор с pH 7,2.

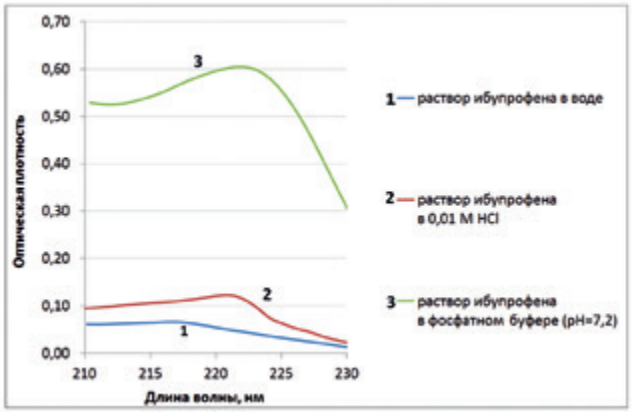


Рисунок 2. УФ-спектры раствора ибупрофена (0,01 мг/мл) в воде, 0,01 М HCl и фосфатном буфере (pH=7,2)

Таблетка при попадании в организм человека сначала поступает в желудок (pH=1÷2) и затем, спустя примерно час, в кишечник с pH=7÷8. В связи с этим представляло интерес изучение характера высвобождения ибупрофена в условиях, имитирующих изменение pH в процессе продвижения таблетки в организме. Были проведены предварительные эксперименты по выбору щелочного агента для доведения pH до слабощелочной реакции. Из сравнения гидрокарбоната натрия, карбоната натрия, порошка фосфата натрия двузамещенного и 10% водного раствора фосфата натрия был выбран последний, так как в этом случае реакция нейтрализации происходит практически мгновенно и не наблюдается выделения углекислого газа.

Изучение характера растворения субстанции ибупрофена в разных средах на приборе «Растворение»

Представляло интерес изучиние характера растворения субстанции ибупрофена в выбранных средах для получения информации о влиянии ингредиентов на скорость и степень высвобождения ибупрофена из лекарственной композиции.

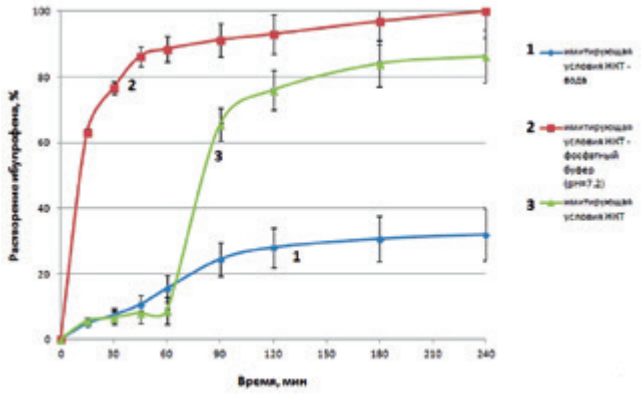


Рисунок 3. Профили растворения субстанции ибупрофена в различных средах

На графике (рисунок 3) представлены кривые растворения субстанции ибупрофена в различных средах. Заметно, что растворение ибупрофена в воде не достигает даже 40% за 4 ч (рисунок 3). В фосфатном буфере (pH=7,2) ибупрофен растворяется в течение 15–30 мин и уже через 1 ч степень растворения достигает 90%. При использовании среды, моделирующей условия ЖКТ, наблюдается S-образный профиль растворения, причём в среде 0,01 М HCl субстанция практически не растворяется, а при изменении pH среды до 7,2 степень растворения резко возрастает до 70–80% и достигает 85–90% через 4 ч.

Изучение растворения в зависимости от соотношения карбопола и нейтрализующего агента

Для проведения экспериментов был выбран полиакрилатный гелеобразователь карбопол Ультрез-21. Карбополы являются слабыми кислотами и при добавлении веществ основного характера загустевают и превращаются в гель. В качестве нейтрализующих агентов исследовали: L-лизин, МГА и гидрокарбонат натрия.

Соотношение карбопол : нейтрализущий агент выбрано 1:2 и 1:3 (таблица 1, вар. Lys-3, Lys-4, Lys-5, Lys-6, MGA-1, MGA-2).

Установлены экспериментальные зависимости скорости и степени высвобождения ибупрофена в зависимости от соотношения карбопола и нейтрализущего агента. Результаты эксперимента представлены на рисунке 4.

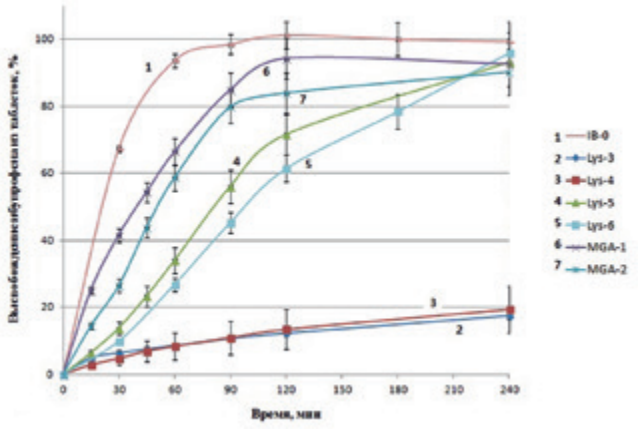


Рисунок 4. Кинетика высвобождения ибупрофена из таблеток с карбополом, полученных в соответствии с составами Lys-3, Lys-4, Lys-5, Lys-6, MGA-1, MGA-2 (таблица 1). Варианты Lys-3, Lys-4: среда растворения – вода, остальные варианты: среда растворения – фосфатный буфер (pH=7.2)

Низкая степень высвобождения в вариантах Lys-3 и Lys-4 связана с отсутствием ионизации ибупрофена в воде. Профили высвобождения в фосфатном буфере (pH=7,2) (рисунок 4, вар. Lys-5, Lys-6, MGA-1, MGA-2) отражают зависимость степени высвобождения от типа нейтрализующего агента и количества карбопола. В составах с лизином (рисунок 4, вар. Lys-5, Lys-6) скорость высвобождения ниже, чем в составах с МГА (рисунок 4, вар. MGA-1, MGA-2), что связано, по-видимому, с большей щёлочностью L-лизина и, соответственно, большей скоростью набухания карбопола в вариантах Lys-5 и Lys-6 (с лизином). Введение в состав карбопола и L-лизина в качестве нейтрализующего агента обеспечивает пролонгацию высвобождения в течение 4 ч.

Таким образом, содержание нейтрализующего агента в пределах 5–7% не оказывает существенного влияния на профиль растворения. Содержание 5,0% L-лизина в составе матрицы является достаточным для обеспечения равномерного высвобождения ибупрофена из матриц с содержанием карбопола 0,5%, в течение 4 часов.

Влияние относительного содержания карбопола на кинетику высвобождения ибупрофена

Было исследовано влияние относительного содержания карбопола на кинетику высвобождения ибупрофена. Для этого был получен ряд вариантов Lys-5, Lys-7, Lys-8, Lys-9, Lys-10 (табл. 1), в которых варьировалось содержание карбопола от 0,5 % до 10,0 %, при неизменном содержании L-лизина 5% (п. 2.4). На гистограмме (рисунок 5) приведена степень высвобождения исследованных вариантов таблеток ибупрофена 200 мг через 3 часа после начала растворения.

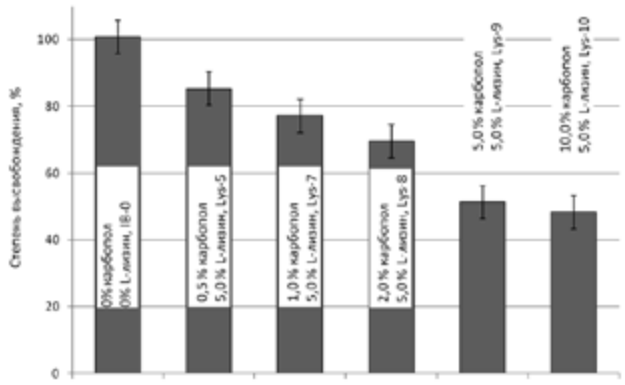


Рисунок 5. Степень высвобождения ибупрофена из таблеток ибупрофена 200 мг через 3 часа. Влияние относительного содержания карбопола на кинетику высвобождения ибупрофена. Содержание L-лизина 5,0 %

При увеличении содержания карбопола в таблетке до 10% (рисунок 5) увеличиваются степень набухания и пролонгирующие свойства матрицы: вариант Lys-5, содержащий 0,5% карбопола, через 3 часа высвобождает более 80%, в то время как вариант Lys-10, содержащий 10% карбопола, через 3 часа высвобождает около 50%.

Влияние гидрокарбоната натрия в составе таблетки на профиль высвобождения ибупрофена

Гидрокарбонат натрия способствует как ионизации ибупрофена, так и набуханию карбопола. Были изготовлены составы с введением $NaHCO_3$ в различных соотношениях с карбополом (вар. HCNa-11, HCNa-12, HCNa-13, таблица 1).

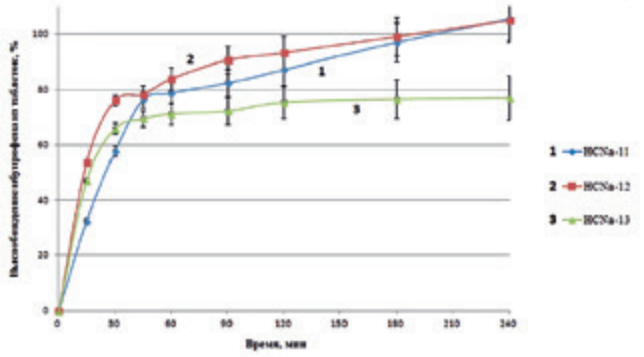


Рисунок 6. Профили высвобождения ибупрофена из таблеток, полученных методом влажного гранулирования, в соответствии с составами HCNa-11, HCNa-12, HCNa-13 в фосфатном буфере (pH=7,2)

В составах с гидрокарбонатом натрия наблюдается более быстрое высвобождение ибупрофена (до 80% за 60 мин), чем в составах с аминосодержащими лизином и МГА (рисунок 6). По-видимому, ионизация и растворение ибупрофена под действием гидрокарбоната натрия происходит значительно быстрее, чем нейтрализация и набухание карбопола. При этом соотношение соды и карбопола практически не влияет на высвобождение ибупрофена. Таким образом, составы карбопола с гидрокарбонатом натрия не обеспечивают задержания высвобождения ибупрофена.

Влияние среды растворения на высвобождение ибупрофена из таблеток

Для определения влияния характера среды растворения на высвобождение ибупрофена из таблеток были выбраны варианты Lys-5, MGA-1, MGA-2 и HCNa-11, HCNa-12, HCNa-13. Составы таких вариантов приведены в таблице 1.

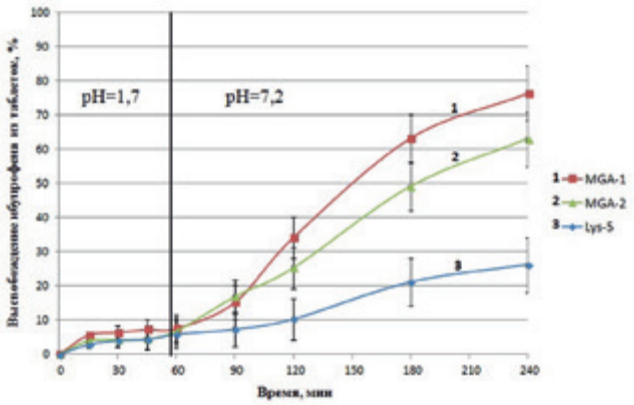


Рисунок 7. Профиль высвобождения ибупрофена из таблеток в среде растворения, моделирующей условия ЖКТ. Таблетки содержат L-лизин (вар. Lys-5) и МГА (вар. MGA-1, MGA-2)

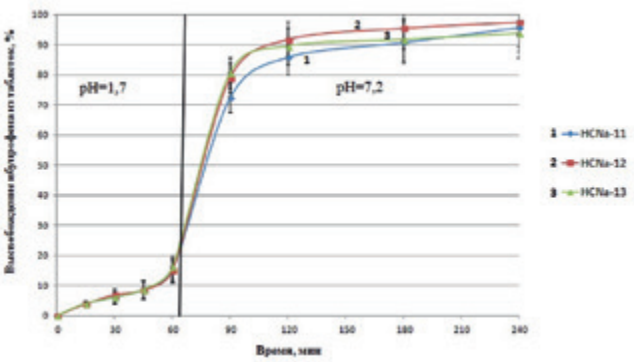


Рисунок 8. Профиль высвобождения ибупрофена из таблеток в среде растворения, моделирующей условия ЖКТ. Все варианты содержат гидрокарбонат натрия

В среде растворения, моделирующей условия ЖКТ (рисунки 7, 8), высвобождение ибупрофена из таблеток отличается от высвобождения в буферном растворе (рисунок 6). При низком pH=1,5 высвобождение не превышает 5–10%, это обусловлено плохой растворимостью ибупрофена в кислой среде. При pH=7,2 высвобождение возрастает, причём наблюдается зависимость степени высвобождения от вида и количества нейтрализующего агента.

Составы с карбополом и МГА показывают достаточно равномерное высвобождение в период до 4 часов (см. рисунок 7, кривые MGA-1, MGA-2).

При использовании в качестве нейтрализующего агента гидрокарбоната натрия высвобождение при изменении pH резко увеличивается и практически не зависит от количества введённого в состав гидрокарбоната натрия. Таким образом, использование гидрокарбоната натрия в отличие от аминосодержащих нейтрализующих агентов не позволяет достичь равномерного высвобождения ибупрофена в течение 4 ч.

Оценка качества таблеток ибупрофена

Показатели, характеризующие качество полученных таблеток, представлены в таблице 2. Истираемость (прочность на истирание) всех вариантов находится в пределах нормы и не превышает 3% (ГФ XIII, Т. 2, ОФС 1.4.2.0004.15, С. 175–176). Прочность на излом находится в пределах 42-93 Н. Отклонение от средней массы также не превышает нормы (ГФ XIII, Т. 2, ОФС 1.4.2.0009.15, С. 209–211).

Таблица 2.

Показатели качества таблеток ибупрофена

№ варианта	Прочность на излом (H±σ), n=6	Средняя масса и отклонение от средней массы (мг±σ), n=10	Истираемость (прочность на истирание), (%±σ)
IB-0	58,8±5,2	395,0±12,0	1,25±0,03
MGA-1	85,2±8,2	398,0±10,0	1,80±0,04
MGA-2	84,3±9,5	403,0±9,5	1,70±0,02
Lys-3	93,1±8,9	389,0±8,2	2,10±0,04
Lys-4	64,7±6,3	398,0±6,0	1,12±0,04
Lys-5	75,2±5,8	393,0±8,0	1,40±0,03
Lys-6	89,2±3,7	401,0±3,0	1,80±0,03
Lys-7	82,9±4,6	392,0±8,7	2,05±0,04
Lys-8	74,5±7,1	397,0±10,0	1,90±0,03
Lys-9	93,1±6,3	395,0±5,0	1,30±0,04
Lys-10	69,6±5,8	397,0±8,0	1,60±0,03
HCNa-11	51,9±3,7	400,0±5,0	1,85±0,03
HCNa-12	46,1±3,2	389,0±7,3	2,10±0,03
HCNa-13	42,1±2,8	396,0±5,0	1,50±0,03

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследовано влияние нейтрализующего агента на высвобождение ибупрофена из полиакрилатных матриц. Увеличение относительного содержания карбопола и нейтрализующего агента приводит к усилению задерживающих свойств матрицы. Установлено, что матрицы на основе карбопола с аминосодержащими нейтрализующими агентами позволяют регулировать равномерное высвобождение в период до 4 ч.

Ибупрофен проявляет кислотные свойства, поэтому, чтобы обеспечить его растворение, в состав матриц необходимо ввести такое количество нейтрализующего агента (например, L-лизина, МГА), которого будет достаточно для нейтрализации ибупрофена и карбопола. Таким образом, нейтрализующий агент выполняет две функции: с одной стороны, он тормозит высвобождение, нейтрализуя карбопол и способствуя набуханию матрицы, а с другой – способствует ионизации ибупрофена, что повышает скорость его перехода в водный раствор.

Если процесс набухания матрицы опережает скорость распада таблетки, то наблюдается более выраженный эффект задержки высвобождения активного вещества.

Тип среды растворения оказывает существенное влияние на профиль высвобождения ибупрофена из таблеток. Так, при растворении образцов в среде с изменением pH от 1,7 до 7,2 наблюдается задержка высвобождения в кислой среде и ускорение высвобождения после повышения pH среды. Наиболее равномерное высвобождение наблюдается в случае введения в состав таблетки МГА.

Разработанные составы обеспечивают замедление высвобождения ибупрофена в начальный в период (1–2 ч) и полное высвобождение до 4 ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т.Е. Морозова, Т.Б. Андрущишина, Е.К. Антипова. Ибупрофен: безопасность и эффективность применения в широкой клинической практике // Терапевтический архив. 2013. № 3. С. 118–124.
2. М.В. Журавлева, А.Ю. Обжерина. Актуальные вопросы повышения безопасности применения нестероидных противовоспалительных препаратов: значение фармакогенетических исследований // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2011. № 2. С. 31–34.
3. D. Bhowmik, H. Gopinath, B. Pragati Kumar, S. Duraival, K.P. Sampath Kumar. Controlled Release drug delivery system // The Pharma innovation. 2012. V. 1. P. 322–324.
4. I. Chugh, N. Seth, A.C. Rana, S. Gupta. Oral sustained release drug delivery system: anoverview // International research journal of pharmacy. 2012. V. 3(5). P. 57–62.
5. E. Jantratid et al. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update // Pharm. Res. 2008. V 25(7). P. 1663–1676.
6. И.Е. Смехова, Ю.М. Перова, И.А. Кондратьева, А.Н. Родыгина, Н.Н. Турецкова. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 26–30.
7. Н.Б. Демина. Современные тенденции развития технологии матричных лекарственных форм с модифицированным высвобождением (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2016. Т. 50. № 7. С. 74–80.
8. J. Jinno, D.M. Oh, J.R. Crison, G.L. Amidon. Dissolution of ionizable water-insoluble drugs: the combined effect of pH and surfactant // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2000. V. 89(2). P. 268–274.
9. K.A. Watkins, R. Chen. pH-responsive, lysine-based hydrogels for the oral delivery of a wide 2 size range of molecules // Int. J. Pharm. 2014. V. 464. P. 10–18

ИНТЕГРИРОВАННОЕ РЕШЕНИЕ ПО ПОЛУЧЕНИЮ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ОТ ГК "ФАРМКОНТРАКТ"

1 Термостат ICS i-Temp ci 90e

Контроль температуры в реакторе в диапазоне +20…+90°С. В качестве теплоносителя используется вода под давлением. Малый внутренний объем и высокая мощность нагрева/охлаждения позволяют поддерживать температуру с высокой точностью и быстро компенсировать температурные эффекты процесса.

2 Моноблочный кулачковый насос Inoxpa TLS

Позволяет перекачивать в реактор реагенты и растворители, в том числе жидкости с высокой вязкостью и суспензии. Конструкция насоса обеспечивает возможность безразборной очистки, регулировка расхода осуществляется при помощи частотного преобразователя.

3 Реакторная система Patent объемом 100 л

Проведение химической реакции при повышенной температуре, в том числе в режиме кипячения растворителя, контролируемая загрузка при помощи мерных емкостей и насоса. Излишки растворителя удаляются после окончания процесса методом прямой дистилляции.

4 Чиллер Julabo FLW7006

Эффективное охлаждение раствора в кристаллизаторе до температуры -10°С. Чиллер имеет водяное охлаждения и позволяет устанавливать заданное значение температуры в циркуляционном контуре. Мощный насос позволяет осуществить расположение чиллера в удалённом помещении.

5 Кристаллизатор BuchiGlasUster Mixing vessel 100

В прозрачном аппарате при интенсивном перемешивании происходит охлаждение реакционной массы до выпадения кристаллов продукта. Сосуд имеет вентиль донного слива без «мертвого объема» с большим проходным диаметром для удобства выгрузки образовавшейся суспензии.



6 Горизонтальная фильтрующая центрифуга Heinkel H 1000 P

Центрифуга периодического действия для эффективного разделения суспензий объемом до 170 л. Встроенная система промывки, управление с ПЛК в полностью автоматическом режиме.
Режим предварительного и финального отжима. Выгрузка осадка осуществляется автоматически через боковой порт при помощи специального ножа.

7 Вакуумно-сушильный шкаф Binder vdl 115

Эффективная осушка порошкообразных АФИ. В комплекте вакуумный мембранный насос, система улавливания паров. Полностью гладкая внутренняя поверхность из нержавеющей стали AISI316L позволяет легко проводить очистку после окончания работы.

8 Реакторная система Patent объемом 100 л

Размол полученного порошка АФИ до размеров порядка 50-100 мкм.
Конструкция обеспечивает наилучшие значения тонины помола.
Управление процессом осуществляется при помощи PLC-системы управления.

9 CIP/SIP-станция Inoxpa

Эффективная очистка всех аппаратов технологической цепочки.
Независимые контуры для промывки несколькими моющими растворами и стерилизации. Управление процессами мойки и стерилизации осуществляет в полностью автоматическом режиме при помощи ПЛК с сенсорным дисплеем.



Получение продукта в ходе химической реакции с последующей очисткой, удалением следов растворителя и измельчением полученного твердого продукта до размеров 50 - 100 мкм.

Все оборудование имеет фармацевтическое исполнение и обеспечено полным комплектом документов, необходимых при валидации процесса.

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 615.322.57.087

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ β-КАРОТИНА МЕТОДОМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

А.Г. Курегян[1]*, Э.Ф.Степанова[1]*

Резюме. В настоящей статье представлены результаты моделирования и оптимизации процесса получения каротиноидов на примере β-каротина. Проведена комплексная количественная оценка влияния пяти технологических параметров на выход индивидуального каротиноида методом математического планирования эксперимента. Цель достигнута путем построения математической модели на основе уравнения регрессии первого порядка. Доказана адекватность работы полученной математической модели и проведена оптимизация процесса получения β-каротина методом крутого восхождения.

Ключевые слова: каротиноиды, β-каротин, экстракция, математическое планирование эксперимента, крутое восхождение.

TECHNOLOGY OPTIMIZATION OF β-CAROTENE PRODUCTION BY MEANS OF MATHEMATICAL DESIGN OF EXPERIMENTS

A.G. Kuregyan[1]*, E.F. Stepanova[1]*

Abstract. This article presents the results of modeling and optimization of the process of producing carotenoids by the example of β-carotene. The complex quantitative estimation of five technological parameters influence on the exit of individual carotenoid is conducted by the method of the mathematical planning of experiment. The complex quantitative estimation of influence of five technological parameters is conducted on the exit of individual carotenoids the method of the mathematical planning of experiment. The goal is achieved by constructing a mathematical model based on regression equations of the first order. We prove the adequacy of the work produced mathematical models and optimization carried out the process of obtaining β-carotene by a steep ascent.

Keywords: carotenoids, β-carotene, extraction, mathematical design experiment, steep ascent.

1 – Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, 357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

1 – Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of SEI HPE Volgograd state medical university MH RF, 11, Kalinina prospekt., Pyatigorsk? 357532, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: Kooreguan@mail.ru, efstepanova@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды – один из классов природных биологических активных веществ (БАВ), который может способствовать решению задач по профилактике и терапии достаточно широкого круга патологических состояний [1–3].

Получение любых индивидуальных БАВ из растительного сырья с достаточно высокой степенью чистоты является трудоемким процессом. Одним из наиболее эффективных способов получения фармацевтических субстанций природного происхождения является комбинация методов экстракции и хроматографии. Такой сочетанный подход требует целенаправленного выбора и оптимизации технологического процесса.

Наиболее эффективно для этих целей используются математико-статистические методы планирования. Именно эти методы прикладной математики позволяют выявить влияние нескольких факторов на изучаемый технологический процесс [4–6].

Цель исследования – моделирование и оптимизация процесса получения каротиноидов на примере β-каротина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичную экстракцию сырья (мякоть плодов тыквы, влажность не более 15%, гидромодуль 1:10) проводили смесью ацетона и метилового спирта; полученный экстракт сушили до полного удаления растворителя; сухой остаток растворяли в гексане; шрот повторно обрабатывали гексаном; экстракты объединяли; для омыления эфиров каротиноидов использовали раствор гидрокарбоната натрия с концентрацией от 5 до 10%; отделяли органический слой, промывая диэтиловым эфиром до полного удаления гидро-

карбоната натрия; разделение суммы каротиноидов на индивидуальные соединения осуществляли на колонке с алюминия оксидом (подвижная фаза – гексан, ацетон, диэтиловый эфир).

Количественное определение β-каротина проводили спектрофотометрически, расчет по стандартному образцу β-каротина (7235-40-7, Sigma-Aldrich).

Использованные в эксперименте реактивы: метанол (ч.д.а., ГОСТ 6995-77), ацетон (ч.д.а., ГОСТ 2603-79), *н*-гексан (ч.д.а., ТУ 2631-003-05807999-98), спирт этиловый (ФС 42-3071-00), натрия гидрокарбонат (ФС.2.2.0011.15), вода очищенная (ФС.2.2.0020.15), диэтиловый эфир (ч.д.а., ТУ 2600-001-43852015-10 с изм. №1), алюминия оксид для хроматографии (ТУ 6-68-164-99) и оборудование: весы лабораторные ВЛ-210, класс точности 1 (специальный); блендер лабораторный Waring 8010S; лабораторные сита С30/50 (ГОСТ 3826-82); роторный испаритель (испаритель ротационный R-213b); эксикатор (ГОСТ 25336-82); спектрофотометр СФ-2000 (ОКБ «Спектр», спектральный диапазон от 200 до 750 нм); воронки делительные вместимостью 25, 100 и 500 мл; колбы конические вместимостью 25, 50, 100, 250 мл; колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 250 мл; цилиндры мерные градуированные объемом 10, 50 и 100 мл, пипетки градуированные объемом 1, 2, 5, 10 мл (класс точности 1, ГОСТ 29227-91).

Комплексную оценку влияния технологических параметров на выход индивидуального каротиноида осуществляли методом математического планирования эксперимента, используя построение математической модели на основе уравнения регрессии первого порядка. Расчеты проводили на базе программного пакета Microsoft Office, включающего лицензионную программу Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для построения математической модели в качестве переменных величин были выбраны следующие: количество алюминия оксида, помещаемого в хроматографическую колонку; время контакта фаз на одной ступени экстракции; концентрация раствора гидрокарбоната натрия; число ступеней экстракции; температурный режим экстрагирования.

Для проверки значимости влияния этих факторов на процесс экстракции был построен эксперимент по типу дробной реплики, условия которого представлены в таблице 1.

Далее в соответствии с дробной репликой 2^3 был поставлен эксперимент в восьми повторностях в соответствии с матрицей планирования, представленной в таблице 2.

Критерием оптимизации было выбрано содержание каротиноида, которое определяли методом спектрофотометрии как количество экстрагированного β-каротина в процентах.

Таблица 1.

Условия планирования эксперимента

	Количество алюминия оксида X_1, г	Время экстракции X_2, мин	Концентрация раствора гидрокарбоната натрия X_3, %	Число ступеней экстракций X_4, раз	Температура X_5, °С
Основной уровень	5	20	10	3	20
Интервал варьирования	2	10	5	1	5
Верхний уровень (+1)	7	30	15	4	25
Нижний уровень (–1)	3	10	5	2	15

Таблица 2.

План и результат эксперимента получения β-каротина

№ опыта	Уровни факторов					Экспериментальное значение У, %
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	
1	+	–	–	–	–	0,137
2	+	+	+	+	–	0,134
3	–	–	–	+	+	0,149
4	–	+	–	–	–	0,144
5	+	–	+	–	+	0,136
6	+	+	–	+	+	0,140
7	–	–	+	+	–	0,139
8	–	+	+	–	+	0,142
9	0	0	0	0	0	0,141
10	0	0	0	0	0	0,139
11	0	0	0	0	0	0,142
12	0	0	0	0	0	0,143
13	0	0	0	0	0	0,140
14	0	0	0	0	0	0,138

На основании полученных результатов рассчитывали значения коэффициентов уравнения регрессии. Пример расчета и значения коэффициентов уравнения регрессии представлены в таблице 3.

Как показали расчеты, коэффициенты в уравнении регрессии для первого, второго и третьего фактора имели отрицательные значения, для четвертого и пятого – положительные.

На основании полученных результатов было составлено опорное уравнение регрессии, имеющее следующий вид:

$$y=0{,}1401-0{,}0034x_1-0{,}00013x_2-0{,}00238x_3+$$
$$+0{,}000375x_4+0{,}00163x_5. \quad (1)$$

Таблица 3.

Расчет значений коэффициентов уравнения регрессии

Пример расчета	Коэффициент в уравнении регрессии	Значение коэффициента
$b_0=\frac{\sum y}{n}=\frac{1{,}121}{8}=0{,}1401$ $b_1=\frac{\sum y\cdot x_1}{n}=\frac{-0{,}027}{8}=-0{,}0034$	b_0	0,140100
	b_1	–0,003400
	b_2	–0,000130
	b_3	–0,002380
	b_4	+0,000375
	b_5	+0,001630

Далее согласно матрице эксперимента по результатам опытов в нулевых условиях, отраженных в таблице 2, проводили оценку дисперсии коэффициентов уравнения:

$$y_0=\frac{\sum y}{n}=\frac{0{,}843}{6}=0{,}141 \quad (2)$$

$$S_y=\frac{\sum(y-\overline{y})^2}{n-1}=8{,}4\cdot10^{-4} \quad (3)$$

$$S_y^2=7{,}1\cdot10^{-7} \quad (4)$$

$$S_{bi}^2=\frac{S_y^2}{n}=\frac{7{,}1\cdot10^{-7}}{8}=0{,}89\cdot10^{-7} \quad (5)$$

$$S_{bi}=2{,}98\cdot10^{-4}. \quad (6)$$

Для определения значимости коэффициентов уравнения регрессии рассчитывали величину критерия Стьюдента и сравнивали расчетное значение с табличным – 2,57 [7]:

$$t_0=\frac{b_0}{S_{bi}}=\frac{0{,}1401}{2{,}98\cdot10^{-4}}=470 \quad (7)$$

t_1=11,40; t_2=0,44; t_3=7,99; t_4=1,25; t_5=5,50.

Коэффициенты Стьюдента для второго (t_2) и четвертого (t_4) факторов меньше табличных, это свидетельствует о минимальном влияния на процесс получения каротиноидов времени контакта фаз и числа ступеней экстракций больше минимальных значений – 10 мин и более 2 раз.

Наибольшее положительное влияние на процесс оказывает температура (t_5). Максимальное отрицательное влияние оказывает количество алюминия оксида (t_1), если происходит увеличение его количества до значений больше 5 г.

После учета влияния факторов на процесс получения β-каротина уравнение регрессии приняло окончательный вид:

$$y=0{,}1401-0{,}0034x_1-0{,}00238x_3+0{,}00163x_5. \quad (8)$$

Любая построенная математическая модель нуждается в проверке адекватности.

С этой целью, используя окончательное уравнение регрессии (8) и матрицу эксперимента, представленную в таблице 2, рассчитывали теоретические значения измеряемого показателя – содержание β-каротина в конечном экстракте. Пример расчета содержания каротиноида в конечном экстракте и результаты представлены в таблице 4.

По полученным данным рассчитывали сумму квадратов отклонений экспериментальных данных от теоретических и дисперсию адекватности:

$$S_R=\sum(y_э-y_p)^2=0{,}000144^2=2{,}1\cdot10^{-8} \quad (9)$$

$$S_R^2=\frac{S_R}{N-f}=\frac{2{,}1\cdot10^{-8}}{14-6}=4{,}15\cdot10^{-9}. \quad (10)$$

Таблица 4.

Значения экспериментального и рассчитанного содержания β-каротина в конечном экстракте

№ опыта	Пример определения расчетного содержания ($y_{расчетное}$) каротиноида: y_1=0,1401–0,0034(+1)–0,00238(–1)+0,00163(–1)=0,138		
	$y_{экспериментальное}$	$y_{расчетное}$	$y_э-y_р$
1.	0,137	0,138	–0,001
2.	0,134	0,133	0,001
3.	0,149	0,148	0,001
4.	0,144	0,144	0
5.	0,136	0,136	0
6.	0,140	0,141	–0,001
7.	0,139	0,139	0
8.	0,142	0,143	0,001
9.	0,141	0,136	0,005
10.	0,139	0,136	0,003
11.	0,142	0,136	0,006
12.	0,143	0,136	0,007
13.	0,140	0,136	0,004
14.	0,138	0,136	0,002

Таблица 5.

Крутое восхождение по содержанию β-каротина в конечном экстракте

Характеристика	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	y
Начальная точка движения	3 г	10 мин	5%	2 ступени	25,0 °С	0,149
Единица варьирования	0,25	–	0,5	–	2,5	–
Коэффициент в уравнении регрессии	–0,00340	–	–0,00238	–	+0,00163	–
Опыт 1	2,75	10	4,5	2	27,5	0,155
Опыт 2	2,5	10	4	2	30,0	0,158
Опыт 3	2,25	10	3,5	2	32,5	0,151

Далее было рассчитано значение критерия Фишера:

$$F = \frac{S_R^2}{S_y^2} = \frac{4{,}15 \cdot 10^{-9}}{3{,}50 \cdot 10^{-6}} = 0{,}0012. \quad (11)$$

Расчетное значение критерия Фишера составило 0,0012, что не превышает табличное значение этого показателя – $F_{0,95}(8,13)=2,77$ [7] и позволяет утверждать, что разработанная модель адекватна.

На следующем этапе проводили оптимизацию процесса экстракции, параметр оптимизации – содержание β-каротина, %. Для этого использовали метод крутого восхождения, который представлен в таблице 5. Начальной точкой движения был выбран эксперимент с наилучшими результатами по содержанию каротиноида, полученными в предыдущем исследовании.

Изменение факторов проводили в соответствии с их влиянием на процесс и значением коэффициентов в окончательном уравнении регрессии. Наибольшее значение коэффициента наблюдается у первого фактора – количества алюминия оксида, его шаг варьирования был максимальным.

Для факторов третьего и пятого – концентрации раствора натрия гидрокарбоната и температуры – шаг изменяли пропорционально значению их коэффициентов в уравнении регрессии, для незначимых факторов – времени контакта фаз и числа ступеней экстракций – значения принимали равными минимальным, то есть 10 мин и 2 ступени.

Таким образом, было установлено, что увеличение температуры выше 30 °С и уменьшение количества алюминия оксида до значений меньше 2,5 г и концентрации раствора гидрокарбоната натрия до значений меньше 4% не приводит к увеличению выхода β-каротина, а следовательно, в опыте 2 достигнуты оптимальные условия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышесказанное, необходимо отметить, что предлагаемый способ оптимизации позволил увеличить выход продукта на 6% от максимального и на 12% от среднего до оптимизации. Кроме того, выявленное количественное влияние пяти факторов на процесс экстракции каротиноидов на примере получения β-каротина позволит в дальнейшем упростить масштабирование методики.

Наработка экспериментального и теоретического материала по экстракции соединений различной полярности позволит в дальнейшем при систематизации и математико-статистической обработке этих данных получить теоретические модели, позволяющие проводить оптимизацию экстракции соединений природного происхождения, учитывая количественное влияние каждого фактора.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Pilbrow, D. Garama, A. Carne. Carotenoid-binding proteins; accessories to carotenoid function // Paper in Press. 2012. V. 59. № 190. P. 1–3.
2. J. Deng, L. Xiong, Z. Zuo. Trans-sodium crocetinate provides neuroprotection against cerebral ischemia and reperfusion in obese mice // J. Neurosci. Res. 2015. V. 93. P. 615–622.
3. M.A. Gammone, N. D'Orazio. Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 2196–2214.
4. В.Д. Пономарев. Экстрагирование лекарственного сырья. – М.: Медицина, 1976. С. 164-184.
5. В.Д. Пономарев, В.Г. Беликов, Н.И. Коковкин-Щербак. Математические методы в фармации. – М.: Медицина, 1983. С. 101–150.
6. Я.И. Абрамова, В.С. Чучалин, Е.М. Теплякова и др. Разработка технологии экстракта желчегонного сбора // Фармация. 2012. № 2. С. 38–41.
7. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента // Государственная фармакопея РФ, 13-е изд. – М.: НЦЭСМП, 2015. URL: http://www.femb.ru (дата обращения 03.02.2017).

УДК 617-7 : 615.46 : 615.47 : 615.032 : 615.22

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ НАНЕСЕНИЯ ПОКРЫТИЙ НА КОРОНАРНЫЕ СТЕНТЫ, ВЫСВОБОЖДАЮЩИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА (ОБЗОР)

Е.Ю. Загорулько[1]*, А.А. Теслев[1], Е.В. Флисюк[1]

Резюме. Обзор посвящён современным технологиям нанесения полимерных покрытий на коронарные стенты, высвобождающие лекарственные вещества. Описаны наиболее перспективные технологии, а также способы, представляющие на сегодняшний день предмет экспериментального изучения. Указаны ключевые достоинства и недостатки методов погружения, распыления, послойного, струйного, плазмохимического, электростатического и электрохимического нанесения. Приведены примеры клинически одобренных коронарных стентов. Представленный обзор даёт представление о современном уровне технологий нанесения полимерных покрытий на стенты, а также о направлениях их дальнейшего развития.

Ключевые слова: стент, полимер, покрытие, лекарственное вещество, медицинские изделия, технология.

MODERN COATING TECHNOLOGIES FOR DRUG ELUTING CORONARY STENTS (REVIEW)

E.Y. Zagorulko[1]*, A.A. Teslev[1], E.V. Flisyuk[1]

Abstract. The review is devoted to modern polymer coating technologies for drug-eluting coronary stents. The most promising technologies and also the methods which are the subject of experimental investigation have been described. Key advantages and disadvantages of the dip, spray, layer-by-layer, ink-jet, and plasma coating, electrostatic coating and electrochemical deposition methods have been shown. The examples of clinically proven coronary stents have been given. The review illustrates the current level of polymer coating technologies for stents, and also their further development trends.

Keywords: stent, polymer, coating, drug substance, medical devices, technology.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Ministry of Healthcare, 14, lit. A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: elena.zagorulko@pharminnotech.com
Тел.: +7 (921) 793 23 76

ВВЕДЕНИЕ

Стентом называют упругую металлическую или пластиковую конструкцию в форме цилиндрического каркаса, помещаемую в просвет полых органов и сосудов для расширения участка, суженного патологическим процессом.

Среди коронарных стентов выделяют следующие виды:

1. Непокрытые (bare-metal stents, BMS).

2. Покрытые (covered stents):

2.1. Стенты с биосовместимым покрытием, не содержащие лекарственные средства

2.2. Стенты, высвобождающие лекарственные средства (drug-eluting stents, DES):

а) с полимерным небиоразлагаемым покрытием (DES with durable polymer);

б) с полимерным биодеградируемым покрытием (DES with biodegradable polymer);

в) без полимерного покрытия (polymer-free DES).

3. Биодеградируемые, рассасывающиеся стенты, скаффолды (bioresorbable, bioabsorbable stents, scaffolds) [1–7].

Чаще всего для изготовления непокрытых металлических стентов (BMS) используют нержавеющую сталь, сплавы кобальта и хрома, платину, никель, титан и др. [8]. Частота развития рестенозов при имплантации стентов подобного рода составляет 20–40% [9].

Данное обстоятельство послужило причиной разработки стентов с поверхностями, покрытыми полимерными материалами, содержащими и постепенно высвобождающими лекарственные средства (ЛС), – DES [10, 11]. В состав полимерного покрытия могут входить иммунодепрессанты (сиролимус, такролимус, эверолимус), ингибиторы пролиферации (паклитаксел, дактиномицин), противовоспалительные средства (дексаметазон), антикоагулянты (гепарин) и др. [2, 5, 6, 8, 12]. При имплантации стентов с лекарственным по-

крытием частота развития рестенозов у больных ишемической болезнью сердца снизилась до 6–8% [4, 9].

Существует два типа стентов, содержащих ЛС: резервуарные и матричные системы.

В системах резервуарного типа ЛС находится в порах или полостях основного материала стента, покрытого слоем полимера, который обеспечивает заданную скорость высвобождения ЛС.

В системах матричного типа ЛС равномерным образом распределено по поверхности стента в составе полимерной оболочки [2, 13].

НАНЕСЕНИЕ ПОКРЫТИЯ НА СТЕНТЫ

ЛС может быть нанесено на весь стент, только на его внешнюю (соприкасающуюся с сосудистой стенкой, аблюминальное покрытие) или внутреннюю (обращенную в просвет сосуда) поверхности. Многие современные DES имеют аблюминальное покрытие [14].

Полимеры могут быть нанесены непосредственно на металлический каркас или на пассивное покрытие стента. Такое покрытие улучшает как механические свойства стента, так и препятствует контакту металла с биологическими жидкостями после биодеградации полимера. Для этих целей используют карбид кремния (покрытие PROBIO®), углерод (алмазоподобное покрытие BioDiamond®), оксиды металлов (TiO_2, Al_2O_3, IrO_2) или полимерные соединения (поли(п-ксилилен), парилен С) [2, 4–6, 8, 15, 16].

В стентах первого и второго поколений, высвобождающих ЛС, использовали небиоразлагаемые полимеры, такие как поли(стирол-блок-изобутилен-блок-стирол), сополимер этилена и винилацетата, поли(н-бутилметакрилат), сополимер винилиденфторида и гексафторпропилена и др. Часто для получения биодеструктируемой оболочки коронарных стентов применяют полимолочную кислоту, а также ее сополимеры с гликолевой кислотой, ε-капролактоном и другими соединениями [1, 2, 8, 13, 17, 18]. Характеристика некоторых полимеров, применяемых для покрытий стентов, представлена в таблице 1.

Свойства полимерной оболочки определяются в первую очередь физико-химическими свойствами полимера, а также способом его нанесения на поверхность стента [19].

В настоящее время описаны следующие технологии нанесения покрытий на коронарные стенты:

1) погружение (Dip coating);

2) распыление (Spray coating);

3) технология послойного нанесения (Layer-by-Layer stent coating);

4) струйное нанесение (Ink-jet coating);

5) плазмохимическое нанесение (Plasma coating);

6) электростатическое нанесение (Electrostatic stent coating);

7) электрохимическое осаждение (Electrochemical deposition) [2, 4, 5, 12, 20].

Технологии погружения и распыления являются наиболее распространенными способами нанесения полимерной оболочки на поверхность стентов, высвобождающих лекарственные вещества (ЛВ).

Некоторые характеристики клинически одобренных DES с покрытиями, полученными с применением различных технологий, представлены в таблице 2.

Погружение (dip coating) является наиболее простым способом нанесения полимерных покрытий на поверхность стента. Так, компанией Cordis Corporation (США) в 2003 году был получен первый стент, содержащий ЛС, – Cypher® [2, 20].

В наиболее простом случае технология нанесения покрытия таким методом заключается в следующем: стент погружают в раствор, содержащий полимер и ЛС в органическом растворителе, выдерживают в нем определенное время, после чего вынимают из жидкости и удаляют растворитель. Процесс повторяют до получения покрытия заданной толщины. Схема процесса представлена на рисунке 1 [20].

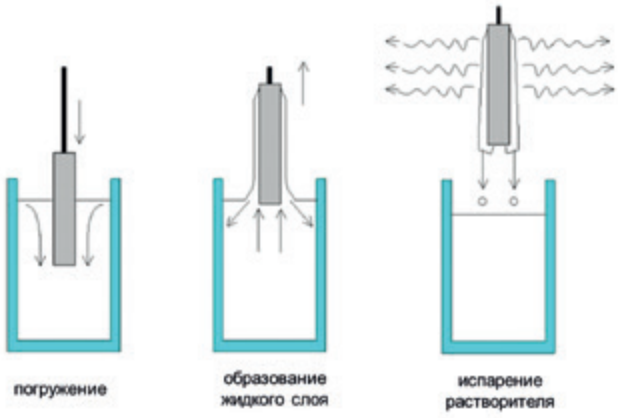


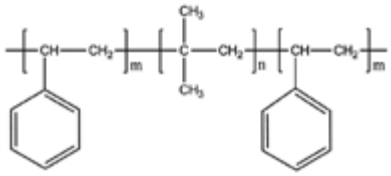
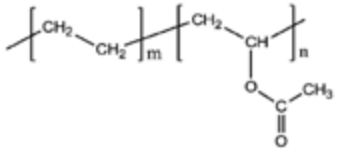
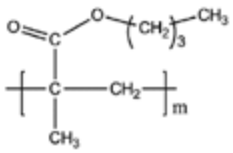
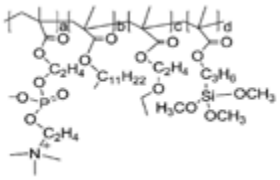
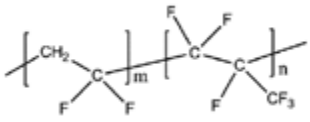
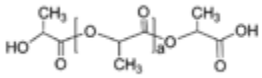
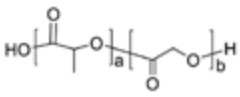
Рисунок 1. Схема нанесения покрытия на стент погружением [20]

Условия испарения растворителя определяются его физико-химическими свойствами, а также свойствами полимера и ЛС. Описан процесс высушивания в насыщенной влагой атмосфере под вакуумом при температуре около 20 °С [2].

Для интенсификации процесса удаления растворителя может быть использовано различное оборудование. Так, описано устройство, включающее шпиндель с диаметром, меньшим диаметра стента (*undersized mandrel*). Вращение шпинделя со стентом после нанесения раствора полимера обеспечивает равномерное распределение покрытия по поверхности стента и удаление излишков пленкообразующего

Таблица 1.

Характеристика некоторых полимеров, применяемых для покрытий стентов [2, 8, 13, 17]

Химическое название	Название на английском, сокращение	Структурная формула	Свойства
поли(стирол-блок-изобутилен-блок-стирол)	poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene), SIBS		небиоразлагаемый
сополимер этилена и винилацетата	poly(ethylene-co-vinyl acetate), PEVA		небиоразлагаемый
поли(*н*-бутилметакрилат)	poly(n-butyl methacrylate), PBMA		небиоразлагаемый
фосфорилхолин	phosphorylcholine, PC		небиоразлагаемый
сополимер винилиденфторида и гексафторпропилена	poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene), PVDF-HFP		небиоразлагаемый
полимолочная кислота, полилактид	poly-lactic acid, PLA		биоразлагаемый
сополимер молочной и гликолевой кислот	poly-lactide-co-glycolide acid, PLGA, PLG, PLGC		биоразлагаемый

раствора с его внутренней поверхности [2]. Применение подобного устройства описано также и для нанесения покрытия на основе поливинилпирролидона, содержащего доксорубицин, на поверхность билиарного стента [23].

Вместо органического растворителя может быть использована эмульсия, содержащая полимер. Действующее вещество растворяют в гидрофильной или липофильной фазе или диспергируют, если оно нерастворимо [2].

Недостатком данного метода является сложность обеспечения равномерности покрытия заданной толщины. При повторном погружении стента органический растворитель может растворять уже нанесенные слои. Кроме того, существует возможность образования мостиков и спаек между частями стента [20, 24].

Распыление (spray coating) раствора полимера является одним из наиболее распространенных способов нанесения покрытия на поверхность стента. Впервые эта технология была использована в 2004 году при создании стента Taxus Express®, содержащего паклитаксел и полимер поли(стирол-блок-изобутилен-блок-стирол) (SIBS). Тогда система включала распылительную насадку и насос, подающий из резервуара раствор полимера и ЛС в органическом растворителе. Раствор в виде микрокапель распыляли в виде аэродисперсии на поверхность стента, обычно для этого использовали пневмораспылительные форсунки *(air-assisted spray nozzles)*. Покрытый стент высушивали в течение трех часов при температуре 65–70 °С [2, 24].

В некоторых случаях покрытие, нанесенное таким способом, неравномерно по толщине, а в слоях могут образовываться трещины. Кроме того, вероят-

Таблица 2.

Клинически одобренные стенты и покрытия, высвобождающие ЛВ [2, 8, 20–22]

Технология	Название стента	ЛВ	Полимеры	Производитель	Дополнительная информация
Погружение	Cypher®	сиролимус	поли(п-ксилилен), сополимер этилена и винилацетата + поли(н-бутилметакрилат)	Cordis Corporation, США	Первое поколение DES: внутреннее покрытие из поли(п-ксилилена), в середине смесь полимеров с ЛВ, внешний слой из поли(н-бутилметакрилата) без ЛВ
	ZoMaxx®	зотаролимус	фосфорилхолин -1036	Abbott Vascular, Великобритания	Платформа Tri-Maxx®, нержавеющая сталь / тантал
Распыление	Taxus®	паклитаксел	поли(стирол-блок-изобутилен-блок-стирол)	Boston Scientific, США	Первое поколение DES (2004), платформа из нержавеющей стали
	XIENCE V®	эверолимус	поли(н-бутилметакрилат), сополимер винилиденфторида и гексафторпропилена	Abbott Vascular, Santa Clara, CA, США	Платформа кобальт / хром
	Biomatrix Flex™	биолимус А9	полимолочная кислота	Biosensors International	Платформа из нержавеющей стали
	Yukon® Choice^{DES+}	сиролимус	без полимера	TransluminaGmbH (Германия)	Покрытие на Transluminal Stent Coating Machine™ (Translumina GmbH, Германия) для polymer-free DES платформа – нержавеющая сталь
Послойное нанесение	BX Velocity stent with Hepacoat®	гепарин	аминополиэтиленимин + сульфат декстрана	Cordis Corporation, США	Покрытие Carmeda® Bioactive Surface

ны значительные потери пленкообразующего раствора с ЛС.

В настоящее время созданы более сложные устройства для покрытия стента методом распыления. Общими элементами таких конструкций являются поддерживающий элемент, на котором размещается стент, распылительное устройство (эти части могут перемещаться друг относительно друга в различных направлениях) и система для получения и анализа изображения покрытия, позволяющая автоматически контролировать процесс. Таким способом получены стенты XIENCE V® (Abbott Cardiovascular Systems, Великобритания) и Biomatrix Flex™ (Biosensors International Ltd., Швейцария). [2, 20, 24].

Некоторые преимущества дает использование ультразвука для распыления раствора полимера. Схематично этот процесс изображен на рисунке 2 [20].

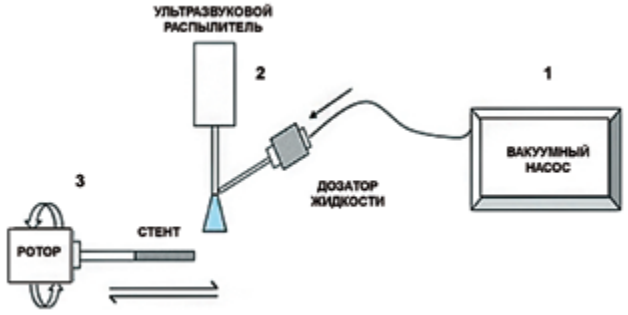


Рисунок 2. Схема ультразвукового распыления: раствор полимера с помощью вакуумного насоса 1 подается в систему ультразвукового распылителя 2, откуда в виде мелких капель попадает на поверхность стента 3, помещенного на вращающуюся ось [20]

Ультразвуковые мелкодисперсные распылители (*ultrasonic atomizing spray nozzles)* разработаны компанией Sono-Tek Corporation, США (рисунок 3).

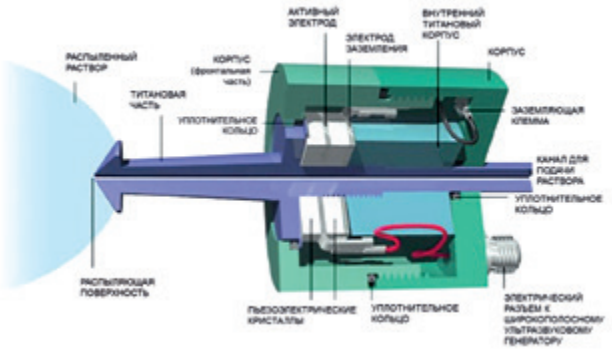


Рисунок 3. Схема ультразвукового мелкодисперсного распылителя (форсунки) компании Sono-Tek Corporation, США [25]

В отличие от распыления под повышенным давлением использование ультразвуковых распылителей позволяет независимо контролировать расход газа, скорость распыления раствора и размер капель. Установлено, что воздействие ультразвука также препятствует агломерации частиц в распыляемом растворе (рисунок 4) [25, 26].

Ультразвуковые распылители различных конструкций представлены на рисунке 5.

В устройстве для нанесения полимерного покрытия на стенты MicroMist Stent Coating System™ (Sono-Tek Corp., США) ультразвуковое распыление происходит в потоке газа низкого давления, что позволяет добиться высокой точности нанесения покрытия [27].

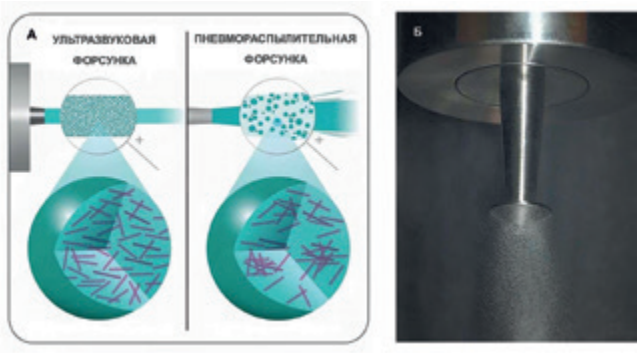


Рисунок 4. Характеристика потока распыляемой жидкости при использовании форсунок разного типа (А) и внешний вид ультразвуковой форсунки (Б) [26]

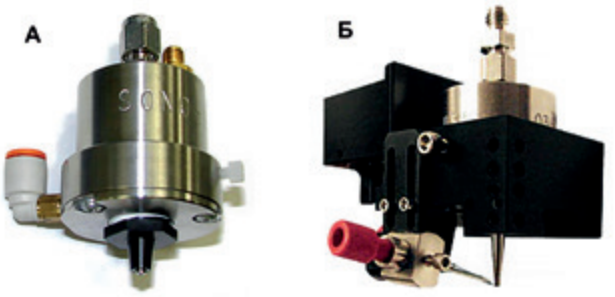


Рисунок 5. Ультразвуковые форсунки устройств для нанесения полимерного покрытия на стенты MicroMist Stent Coating System™ (А) и AccuMist Stent™ (Б) (Sono-Tek Corp., США) [27, 28]

Внешний вид устройства для нанесения покрытия на стенты MediCoat™ DES4000 (Sono-Tek Corp., США) представлен на рисунке 6.

Известны покрытия стентов смесью поли(н-бутилметакрилата), N-винилпирролидона и поли(н-гексил-метакрилата) с зотаролимусом, а также сополимером молочной и гликолевой кислот с куркумином, описано нанесение на поверхность стента раствора полимолочной кислоты указанным методом [2, 30, 31].

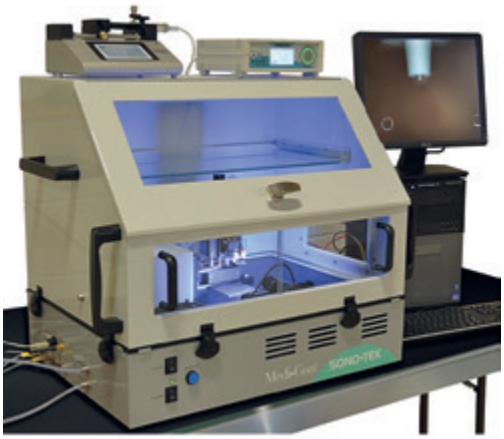


Рисунок 6. Устройство для нанесения покрытия на стенты MediCoat™ DES4000 (Sono-Tek Corp., США) [29]

Распыление раствора покрытия на поверхность стента под действием ультразвука используется также в устройстве SoniCoater for DES (Noanix® Corporation, Корея) [32].

Для нанесения ЛВ на стенты без полимерной оболочки (polymer-free DES) компанией Translumina GmbH (Германия) разработан аппарат Translumina Stent Coating Machine™ (SCM) для нанесения лекарственного вещества на металлические стенты непосредственно перед их имплантацией, что позволяет осуществлять индивидуальный подбор дозы ЛС. Это особенно актуально с точки зрения учета особенностей каждого пациента в рамках персонализированной медицины. Такой способ используется для стентов Yukon® Choice^{DES+} (Translumina GmbH, Германия) [2, 21].

В основе технологии **послойного нанесения (Layer-by-Layer Stent Coating, LBL)** лежит иммобилизация макромолекул противоположно заряженных полимеров и лекарственных средств ЛС на металлических стентах. С применением этой технологии создано биоактивное покрытие, содержащее гепарин, Carmeda® Bioactive Surface (Carmeda AB, Швеция). На металлическую поверхность стента наносят вначале слой положительно заряженного полимера (аминополиэтиленимин), затем полимер, содержащий функциональные группировки с отрицательныеми зарядами (сульфат декстрана). Молекулы частично расщепленного гепарина через альдегидную группу ковалентно присоединяют к функциональным аминогруппам третьего слоя катионного полимера [2, 22].

Покрытие Duraflo™ II coating (Baxter Healthcare Corporation, США) с гепарином является еще одним примером применения технологии послойного нанесения для покрытия стентов. Молекулы бензалкония хлорида, имеющие липофильную и гидрофильную части, выступают в качестве связывающего агента для молекул гепарина [8, 33]. Схема строения многослойного покрытия Duraflo™ II coating представлена на рисунке 7.

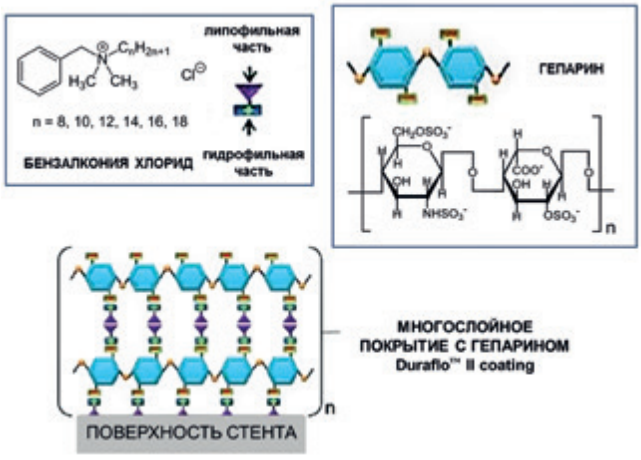


Рисунок 7. Схема многослойного покрытия с гепарином Duraflo™ II coating (Baxter Healthcare Corp., США) [33]

Основной особенностью технологии струйной печати **(Ink-jet coating)** является возможность создания управляемого потока капель, которые могут быть направлены в строго определенные места на поверхности стента. Схема процесса нанесения покрытия таким способом представлена на рисунке 8.

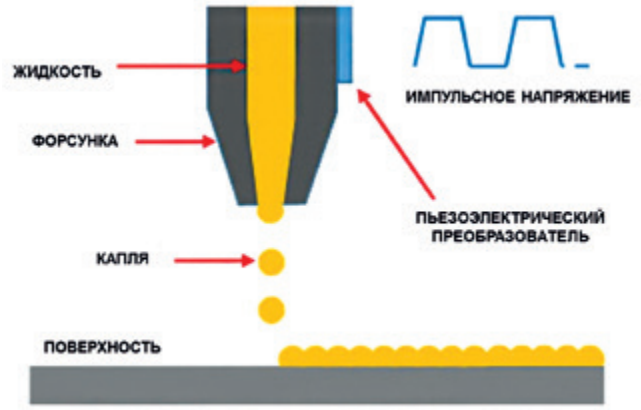


Рисунок 8. Процесс нанесения покрытия при использовании технологии струйной печати [34]

Одним из вариантов использования низкотемпературной плазмы атмосферного давления для нанесения покрытий является система распыления плазмы воздуха *(air plasma spray system)*, общая схема которой приведена на рисунке 9 [41].

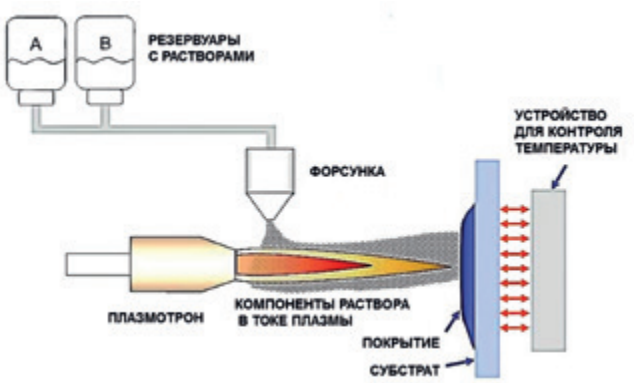


Рисунок 9. Система распыления плазмы воздуха [41]

Струйная технология позволяет воспроизводить сложные покрытия, которые могут быть многослойными, с различными ЛС и полимерами в каждом слое [2, 35]. Эта технология была использована для покрытия стента Medstent слоем сополимера молочной и гликолевой кислот, содержащим паклитаксел [2]. В работе Scoutaris с соавторами описано исследование *in vivo* стента с покрытием из полимолочной кислоты, содержащим симвастатин и паклитаксел и полученным с помощью технологии струйной печати [36].

В настоящее время стенты с полимерным покрытием, полученным с помощью струйной технологии, проходят клинические испытания [2].

Различные способы применения неравновесной низкотемпературной плазмы в технологии стентов объединяют общим названием **Plasma coatings.** В настоящее время плазмохимические технологии используют в основном для нанесения неорганических покрытий и модификации поверхности металлических стентов.

В конце 1960-х гг. впервые была использована плазменная обработка полимеров для улучшения их биосовместимости [37]. Плазменное воздействие позволяет управляемо изменять свойства полимерных материалов, при этом происходит изменение свободной энергии поверхности, ее смачиваемости, капиллярности, влагопоглощения, диэлектрических, адгезионных свойств и др. В настоящее время это один из наиболее широко применяемых методов для подготовки полимерных и металлических имплантатов [37–40].

Технология плазмоиндуцированного холодного напыления (plasma-induced cold deposition technique, PICDT) разработана компанией PlasmaChem GmbH (Германия) для нанесения углеродной пленки на поверхность металлических стентов (алмазоподобное покрытие, линейка стентов BioDiamond® DLC) [16].

Одним из широко используемых способов применения низкотемпературной плазмы для создания покрытий стентов является плазмохимическое осаждение из газовой фазы (plasma enhanced chemical vapour deposition, PECVD). При этом процессе на металлический стент воздействует плазма с распыленным в ней материалом покрытия, который при определенных условиях оседает на поверхности стента в виде тонкой пленки [20, 42]. На основе PECVD компанией Biotronik (Германия) разработана технология PROBIO® – нанесение тонкой пленки карбида кремния на поверхность металлических стентов. Такое покрытие используется, например, в стентах марки Orsiro® [15].

На процессе химического осаждения из газовой фазы в атмосфере низкотемпературной плазмы основана технология piCVD (plasma initiated chemical vapor deposition). Вариантом применения этой технологии является нанесение покрытия на стенты с использованием реакций полимеризации, протекающих по свободнорадикальному механизму. При этом молекулы нагретого мономера, вводимого в реакционную камеру в газовой фазе, адсорбируются на охлаждаемой подложке (металлический стент). После этого под действием ультрафиолетового света происходит реакция фотополимеризации, в результате которой на поверхности стента происходит образование тонкой полимерной пленки. Технология piCVD позволяет конт-

ролировать молекулярную массу образующегося соединения, плотность сшивки молекул мономера и толщину полимерного покрытия [30, 42].

В работе Song с соавторами эту технологию использовали для полимеризации на поверхности стента 1,2-диаминоциклогексана с последующим присоединением к свободным аминогруппам полимера молекул α-липоевой кислоты [43]. Стадии этого процесса представлены на рисунке 10.

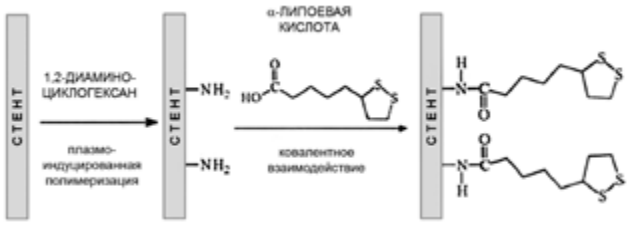


Рисунок 10. Процесс образования покрытия стента с α-липоевой кислотой [43]

Известны исследования по созданию покрытия из поли(2-гидроксиэтилметакрилата) на поверхности кобальт-хромового стента с применением технологии piCVD [30].

В настоящее время нанесение полимерного покрытия на стенты плазмохимическими способами представляет собой предмет экспериментального изучения [2, 20, 30, 40, 43].

Известны разработки по созданию полимерных покрытий стентов с помощью **электрохимического осаждения (electrochemical deposition)** и **электростатического нанесения** [2, 20].

В процессе электрохимического осаждения покрытие образуется в результате реакции полимеризации, протекающей в растворе на поверхности металлического стента под действием электрического тока. В качестве мономеров могут быть использованы пиррол и производные фенола [20].

Технология электростатического нанесения порошка (Electrostatic dry powder deposition technology, EDPDT) была разработана компанией Phoqus Pharmaceuticals Ltd. (Великобритания). На поверхность стента наносят полимер в виде порошка, а затем сплавляют его до получения однородного слоя. ЛВ при этом могут быть нанесены в виде отдельного слоя или в смеси с полимером [44].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный обзор литературных данных свидетельствует, что в настоящее время технология нанесения полимерных покрытий на коронарные стенты с помощью распыления является наиболее распространённым методом. В настоящее время широкое применение находят системы с ультразвуковым распылением.

При этом используется технологическое оборудование различных конструкций – MediCoat™ DES4000, MediCoat™ II (Sono-Tek Corp., США), SoniCoater for DES (Noanix® Corporation, Корея) и др.

Для исследовательских целей чаще всего используется метод погружения, как наиболее простой с точки зрения применяемого аппаратурного оформления процесса, но в то же время не позволяющий обеспечить достаточно высокую равномерность нанесения покрытия, характеризующийся большим расходом материала и трудно поддающийся валидации.

Одной из перспективных технологий нанесения является метод струйной печати, позволяющий обеспечить высокую равномерность покрытия и воспроизводимость, а также способность нанесения многослойных покрытий на поверхности со сложным рельефом.

Отдельного внимания заслуживает рассмотрение плазмохимической обработки, широко используемой для создания неорганических покрытий и модификации полимерных поверхностей с целью придания им свойств биосовместимости.

Нанесение ЛС на металлические стенты непосредственно перед их имплантацией позволяет проводить индивидуальный подбор дозировок, что открывает новые возможности в направлении персонализированной медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. P. Roopmani, S. Sethuraman, S. Satheesh et al. The metamorphosis of vascular stents: passive structures to smart devices // RSC Advances. 2016. V. 6 (4). P. 2835–2853.
2. D. Douroumis, I. Onyesom. Novel coating technologies of drug eluting stents // Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials. 2011. V. 6. P. 87–125.
3. P.P. Karjalainen, W. Nammas, J.K. Airaksinen. Optimal stent design: past, present and future // Interventional Cardiology. 2014. V. 6(1). P. 29–44.
4. F. Nazneen, G. Herzog, D.W. Arrigan et al. Surface chemical and physical modification in stent technology for the treatment of coronary artery disease // Journal of Biomedical Materials Research Part B. 2012. V. 100B. Is. 7. P. 1989–2014.
5. A. Franzone, E. Stabile, B. Trimarco. Peripheral drug-eluting technology // Cardiology Clinics. 2015. V. 33(1). P. 151–162.
6. S. Vaina, P.W. Serruys. Progressive stent technologies: new approaches for the treatment of cardiovascular diseases // Expert Opinion on Drug Delivery. 2006. V. 3(6). P. 783–797.
7. W.P. Chen, H.B. Zhan. Recent developments of drug eluting stent coatings // Acta Pharmacologica Sinica. 2011. V. 46(11). P. 1301–1307.
8. Materials and Coatings for Medical Devices: Cardiovascular. – ASM International. 2009. 450 p.
9. I. Akin, H. Schneider, H. Ince. Second- and third-generation drug-eluting coronary stents: progress and safety // Herz. 2011. V. 36(3). P. 190–197.

10. A. Strohbach, R. Busch Polymers for Cardiovascular Stent Coatings // International Journal of Polymer Science. 2015. V. 2015. URL: http://dx.doi.org/10.1155/2015/782653 (дата обращения 26.10.2016).
11. С.В. Губкин. Современные стенты // Медицинский журнал. 2014. № 1. С. 139–141.
12. B. O'Brien, H. Zafar, A. Ibrahim et al. Coronary stent materials and coatings: a technology and performance update // Annals of Biomedical Engineering. 2016. V. 44(2). P. 523–535
13. W. Chen, T. Habraken, W.E. Hennink et al. Polymer-free drug-eluting stents: an overview of coating strategies and comparison with polymer-coated drug-eluting stents // Bioconjugate Chemistry. 2015. V. 26 (7). P. 1277–1288.
14. M.G. Mennuni, P.A. Pagnotta, G.G. Stefanini. Coronary stents: the impact of technological advances on clinical outcomes // Annals of Biomedical Engineering. 2016. V. 44. Is. 2. P. 488–496.
15. Orsiro. Hybrid drug-eluting stent. URL: http://www.orsiro.com/en/product-details (дата обращения 26.10.2016).
16. Coronary Bare Stents. URL: http://www.plasmachem.com/dlc-products.html (дата обращения 27.10.2016).
17. А.А. Теслев, Е.В Флисюк. Современные материалы для внутрисосудистых стентов // Сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 10–11 ноября 2015. – Спб.: СПХФА, 2015. С. 455–460.
18. С.А. Кедик, Е.С. Жаворонок, И.П. Седишев и др. Полимеры для систем доставки лекарственных веществ пролонгированного действия (обзор). Полимеры и сополимеры молочной и гликолевой кислот // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 2(3). С. 18–35.
19. M. Gagliardi. Experimental and computational study of mechanical and transport properties of a polymer coating for drug-eluting stents // Therapeutic Delivery. 2015. V. 6 (11). P. 1255–1268.
20. M. Livingston, A. Tan. Coating techniques and release kinetics of drug-eluting stents // Journal of Medical Devices. 2016. V. 10(1). P. 010801-1 – 010801-8.
21. Yukon Choice DES + Translumina – The polymer-free DES solution. Coronary Stent System for Drug Application. URL: http://www.pro-4-pro.com/media/product/9114/attachment_en-1398243315.pdf (дата обращения 18.11.2016).
22. Carmeda Bioactive Surface. Medtronic. URL: http://www.medtronic.com/us-en/healthcare-professionals/products/cardiovascular/cardiopulmonary/carmeda-bioactive-surface.html (дата обращения 26.10.2016).
23. А.Г. Бебуришвили, И.В. Запороцкова, Е.Г. Спиридонов и др. О возможности создания нового лекарственного покрытия на поверхности билиарного стента // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2014. № 2(50). С. 123–130.
24. Е.Ю. Загорулько, А.А. Теслев. Технологии полимерных покрытий коронарных стентов, высвобождающих лекарственные вещества // Сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 9-10 ноября 2016. – Спб.: СПХФА, 2016. С. 316–319.
25. Ultrasonic atomization for advanced coating of balloon catheters. Sono-tek. URL: http://www.sono-tek.com/wp-content/uploads/2012/01/Medical-Balloon-Coating-Article.pdf (дата обращения 26.10.2016).
26. Carbon Nanotube Spray Coating. Sonotekcorp. URL: https://www.youtube.com/watch?v=CB7rm17wYzE (дата обращения 18.11.2016).
27. MicroMist Stent Coating System. Sono-tek. URL: http://www.sono-tek.com/micromist-stent/ (дата обращения 26.10.2016).
28. AccuMist Stent. Sono-tek. URL: http://www.sono-tek.com/accumist-stent/ (дата обращения 26.10.2016).
29. MediCoat DES3000 for Stent Coating. Sono-tek. URL: http://www.sono-tek.com/medicoat-des-3000/ (дата обращения 26.10.2016).
30. T.M. Bedair, S.J. Yu, S.G. Im et al. Effects of interfacial layer wettability and thickness on the coating morphology and sirolimus release for drug-eluting stent // Journal of Colloid and Interface Science. 2015. V. 460. P. 189–199.
31. M. McDermott, S.Chatterjee, X. Hu et al. Application of Quality by Design (QbD) approach to ultrasonic atomization spray coating of drug-eluting stents // AAPS PharmSci-Tech. 2015. V. 16. P. 811–823.
32. Coaters. Noanix. URL: http://www.noanix.com/eng/products. (дата обращения 18.11.2016).
33. L.C. Su, Y.H. Chen, M.C. Chen. Dual drug-eluting stents coated with multilayers of hydrophobic heparin and sirolimus // ACS Applied Materials & Interfaces. 2013. V. 5. P. 12944–12953.
34. Inkjet printing process. URL: http://phys.org/news/2015-05-inkjet-kesterite-solar-cells.html (дата обращения 18.11.2016).
35. P.J. Tarcha, D. Verlee, H.W. Hui. The application of ink-jet technology for the coating and loading of drug-eluting stents // Annals of Biomedical Engineering. 2007. V. 35(10). P. 1791–1799.
36. N. Scoutaris, F. Chai, B. Maurel et al. Development and biological evaluation of Inkjet printed drug coatings on intravascular stent // Molecular Pharmaceutics. 2016. V. 13. P. 125–133.
37. Th. von. Woedtke, S. Reuter, K. Masura et al. Plasmas for medicine // Physics Reports. 2013. V. 530. Is. 4. P. 291–320.
38. Ю.И. Ходыревская, С.И. Твердохлебов, Ю.А. Кудрявцева. Плазмохимическое модифицирование полимерных материалов, предназначенных для сердечно-сосудистой хирургии, с целью управления степенью смачиваемости // Известия Томского политехнического университета. Сер.: Математика и механика. Физика. 2014. Т. 325. № 2. С. 158–165.
39. Е.Ю. Загорулько, М.Г. Ожигова. Плазмохимическая модификация поверхности материалов // Сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации», Санкт-Петербург, 10–11 ноября 2015. – Спб.: СПХФА, 2015. С. 246–249.
40. A. Rudolph, M. Teske, S. Illner et al. Surface modification of biodegradable polymers towards better biocompatibility and lower thrombogenicity // PLoS ONE. 2015. V. 10(12). doi: 10.1371/journal.pone.0142075. URL: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142075 (дата обращения 26.10.2016).
41. The Power of Plasma. URL: http://www.ceramicindustry.com/articles/85751-the-power-of-plasma (дата обращения 18.11.2016).
42. CVD polymers: fabrication of organic surfaces and devices / Ed. by Karen K. Gleason. – New Jersey: J.Wiley & Sons, 2015. 400 p.
43. S.J. Song, K.S. Kim, K.H. Kim. Preparation of a biocompatible stent surface by plasma polymerization followed by chemical grafting of drug compounds // Journal of Materials Chemistry. 2009. V. 19(20). P. 3248–3252.
44. R.K. Nukala, H. Boyapally, I.J. Slipper. The application of electrostatic dry powder deposition technology to coat drug-eluting stents // Pharmaceutical Research. 2010. V. 27. Is. 1. P. 72–81.

УДК 615.468.6; 66.095.26; 922.3; 577.12; 615.273.53

МОДИФИКАЦИЯ И СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ГРУПП ГЕПАРИНА НА ПОВЕРХНОСТИ ШОВНОГО МАТЕРИАЛА

Т.Н. Акентьева[1]*, С.В. Лузгарев[2], А.С. Лузгарев[2], М.А. Резвова[1], Ю.А. Кудрявцева[1]

Резюме. Для придания тромборезистентных свойств хирургической нити перспективным является нанесение покрытия с использованием биополимера класса полиоксиалканоатов и нефракционированного гепарина. Для придания прочности и равномерности антитромботическому покрытию использовали химическую реакцию, которая проходила в несколько этапов. Первая стадия заключалась в инициации центров привитой сополимеризации на поверхности материала методом озонирования. На втором этапе создавали дополнительный подслой полиметакрилоилхлорида, имеющий в своем составе активные хлорангидридные группы, которые могут образовывать с гепарином прочные ковалентные связи. Третьей стадией стала химическая прививка гепарина на образованный подслой из его раствора в бикарбонатном буфере при пониженной температуре. Оценку качества присоединения гепарина к шовному материалу оценивали с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния. Полученные результаты показали, что модификация шовного материала с помощью метода химического инициирования позволяет прочно закрепить гепарин на поверхности нити.

Ключевые слова: шовный материал, модификация, биополимер, гепарин.

MODIFICATION AND METHOD OF DETERMINING OF ACTIVE GROUPS OF HEPARIN ON THE SURFACE OF SUTURE MATERIAL

T.N. Akentyeva[1]*, S.V. Luzgarev[2], A.S. Luzgarev[2], M.A. Rezvova[1], Y.A. Kudryavtseva[1]

Abstract. The coating with the application of biopolymers of polyhydroxyalkanoate class and unfractionated heparin is perspective for giving thromboresistant properties to a surgical suture. We used a chemical reaction which was performed in several stages to give strength and uniformity to the antithrombotic coating. The first stage was the initiation of the centers of graft copolymerization on the surface of the material by ozonation. At the second stage we created an additional underlayer of polymethacryloylchloride having active acid chloride groups in its content, which can form strong covalent links with heparin. The third stage was a chemical grafting of heparin on the formed underlayer from its solution in bicarbonate buffer at a reduced temperature. Quality assessment of heparin addition to the suture material was evaluated by Raman scattering spectroscopy. The obtained results showed that the modification of the suture material with the help chemical initiation method allows to firmly secure the heparin on the surface of the suture.

Keywords: suture material, modification, biopolymer, heparin.

1 – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6

2 – ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, д. 6

1 – Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6, Sosnovy blvd., Kemerovo, 650002, Russia

2 – Kemerovo State University, 6, Red str., Kemerovo, 650000, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: t.akentyeva@mail.ru, silikem@list.ru
Тел.: 8 (923) 606 07 07

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большинство оперативных вмешательств проводится с использованием шовного материала, который должен обладать рядом важных свойств: антибактериальной активностью, био- и гемосовместимостью. В арсенале хирургов присутствует большое разнообразие различного шовного материала, в том числе и модифицированного [1–3]. Наиболее широко применяют шовный материал, обладающий собственной антибактериальной активностью [4, 5]. Для сердечно-сосудистой хирургии, и в особенности при реконструктивных операциях на сосудистом бассейне актуально использование шовного материала, обладающего выраженными тромборезистентными свойствами. Улучшенная гемосовместимость является важным свойством для шовного материала, который будет находиться в контакте с кровью во время клинического применения. С целью повышения степени гемосовместимости синтетических материалов в настоящее время чаще всего проводят гепаринизацию поверхностей изделий различными методами. Гепарин – один из наиболее интенсивно изученных гликозаминогликанов, естественный антикоагулянт, синтезируемый в организме, который ингибирует образование тромбина или некоторых других протеаз коагуляции и предотвращает образование сетей фибрина [6]. Преимуществом гепарина является также наличие в его структуре химически актив-

ных карбоксильных и аминогрупп, благодаря чему возможна ковалентная прививка антикоагулянта к модифицируемой поверхности [7]. Для придания гемосовместимых свойств протезам артерий широко применяют нефракционированный или низкомолекулярный гепарин [6–8]. Подобные шовные материалы имеют серьезные перспективы для клинического применения.

Повысить биосовместимость нити возможно путем создания на ее поверхности дополнительного слоя, состоящего из биодеградируемых полимеров природного происхождения, которые распадаются в организме человека с образованием простых нетоксичных соединений. Наибольший интерес представляет биополимер микробиологического происхождения – полигидроксибутират (ПГБ), представитель класса полиоксиалканоатов [9, 10]. Благодаря гемо- и биосовместимости, высоким прочностным характеристикам, ПГБ апробирован в качестве сырья для производства различных медицинских изделий. Кроме того, ПГБ выдерживает необходимые условия стерилизации без ухудшения исходных свойств и хорошо растворяется в доступных органических растворителях. В исследованиях, проведенных ранее, было доказано, что ПГБ обеспечивает прочное и равномерное покрытие полипропиленовой нити, данная модификация не оказывает отрицательного влияния на основные компоненты крови – тромбоциты и эритроциты [9].

Однако в настоящее время такой шовный материал отсутствует на рынке.

Цель исследования: разработка технологии нанесения биоактивного покрытия на поверхность шовного материала с целью повышения тромборезистентных свойств нити.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе использовали нить на основе полипропилена Serapren 3,0. Для последующей модификации на поверхность шовного материала наносили слой биодеградируемого полимера – 3-полигидроксибутирата (ПГБ) с молекулярной массой 2591000 Да, синтезированного в институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (г. Пущино, Московская область).

Модификацию шовного материала нефракционированным гепарином «Биохими» (Biochemie, Австрия) проводили в три стадии. Первая стадия заключалась в инициации центров привитой сополимеризации на поверхности материала методом озонирования. На втором этапе создавали дополнительный подслой полиметакрилоилхлорида, имеющий в своем составе активные хлорангидридные группы, которые могут образовывать с гепарином прочные ковалентные связи. Для его создания использовали метакрилоилхлорид (хлорангидрид метакриловой кислоты) квалификации «ч» (ТУ 6-09-14-2270-89, очищен перегонкой при пониженном давлении). Прививка метакрилхлорида к ПГБ проводилась из газовой фазы при нагревании. На третьем этапе проводили химическую прививку гепарина на образованный подслой из его раствора в бикарбонатном буфере при пониженной температуре.

Исследование полноты присоединения гепарина к субстрату проводили методом спектроскопии комбинационного рассеяния (рамановской спектроскопии) с применением прибора T64000 (Horiba, Япония) путем сканирования поверхности образца. Для расшифровки и интерпретации полученных результатов использовали литературные справочные данные по рамановской спектроскопии [11–15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В сердечно-сосудистой хирургии наиболее часто применяют нити на основе полипропилена, однако несмотря на все преимущества данного вида шовного материала, его био- и гемосовместимые свойства далеки от идеала.

С целью модификации подобных шовных материалов и придания им специфических свойств применяют различные технологии [5, 8, 16]. В литературе приведены сведения о возможности химической прививки гепарина к поверхности различных полимеров [6, 7]. Для этого полимерный субстрат модифицируют с помощью привитой сополимеризации с метакрилоилхлоридом, который в последующем реагирует с гепарином с образованием прочных ковалентных сложноэфирных связей. Однако используемый для привитой сополимеризации радиационный метод с применением γ-излучения является технически сложным, небезопасным и малопригодным для крупного производства. Наиболее перспективным представляется изучение возможности химического инициирования привитой сополимеризации. Для данной цели перспективным является озонирование несущего полимера (субстрата), позволяющее образовать на его поверхности активные группы, которые могут в дальнейшем инициировать прививку мономера по радикальному механизму. Метод озонирования является альтернативным способом инициирования процесса прививочной полимеризации и имеет свои преимущества перед радиационным и химическим способами.

Прививку гепарина к ПГБ-модифицированной поверхности проводили в три стадии. Первая стадия заключалась в озонировании субстрата. При этом на его поверхности ПГБ образуются активные группы –OOOH и –OOH, которые являются инициаторами привитой сополимеризации (рисунок 1).

Данная стадия проводилась путем выдержки субстрата в токе озоново-воздушной смеси (0,14% об. озона) со скоростью 1 л/мин в течение часа при комнатной температуре (25 ºС).

На втором этапе методом привитой сополимеризации проводили нанесение активного подслоя, име-

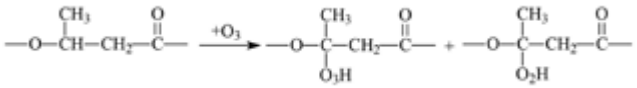


Рисунок 1. Образование активных групп –OOOH и –OOH на поверхности ПГБ

ющего в своем составе хлорангидридные группы (рисунок 2).

Реакция проводилась при выдерживании субстрата в парах хлорангидрида метакриловой кислоты при температуре 80–90 ºС в течение 3 ч с предварительным вакуумированием до остаточного давления 5 мм рт. ст. для удаления воздуха.

Третьей стадией стала химическая прививка гепарина к подслою (рисунок 3).

Химическая прививка проводилась при выдерживании субстрата в растворе гепарина (0,5%) в бикарбонатном буферном растворе (0,1 моль/л $NaHCO_3$) при температуре 0–5 ºС в течение 10 ч при комнатной температуре.

Использование метода спектроскопии комбинационного рассеяния позволило определить изменения в поверхностном составе и установить, прошла ли прививка. Как видно из полученных данных, в спектре обработанного образца наблюдалось большое количество отличий от исходного шовного материала и нити, покрытой только ПГБ. Области спектра, где имеются наиболее заметные изменения, выделены красными фигурными скобками (рисунок 4).

Данный метод позволяет выявить изменения, полученные после нанесения модифицирующего слоя.

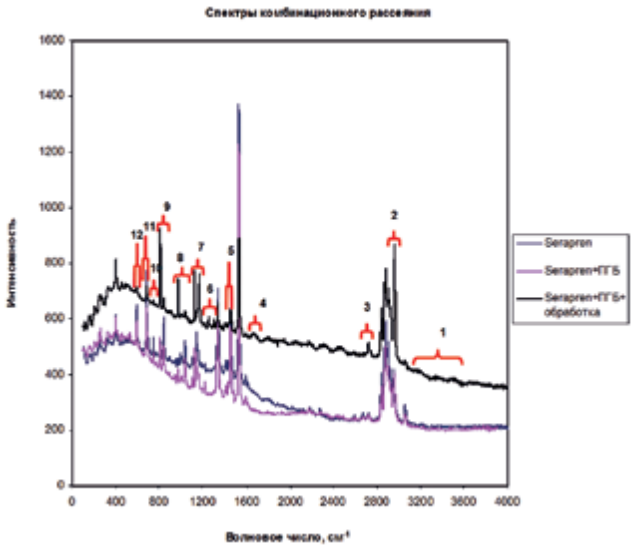


Рисунок 4. Области спектра, иллюстрирующие наиболее заметные изменения после нанесения модифицирующего слоя

При исследовании образцов полипропиленовой нити без модификации были обнаружены скелетные колебания, характерные для химического состава полипропилена, с волновым числом 748 $см^{-1}$. После модификации шовного материала раствором ПГБ появились волновые пики, характерные для –C–O–C– (841 $см^{-1}$) и -CH_2OH (593 $см^{-1}$) групп ПГБ (таблица 1).

Наиболее важные изменения в спектре субстрата отображены в новых волновых пиках, которые характерны для OH– и COO^- – группы гепарина и групп гидролизованного привитого полиметакрилоилхлорида с волновым числом 3150-3600 и 1680 $см^{-1}$ соответственно. Также и пики SO_2 (1306 $см^{-1}$) – сульфамидных,

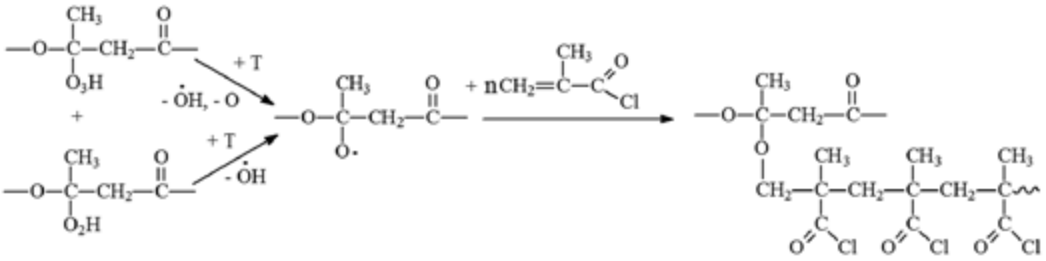


Рисунок 2. Нанесение активного подслоя, имеющего в своем составе хлорангидридные группы

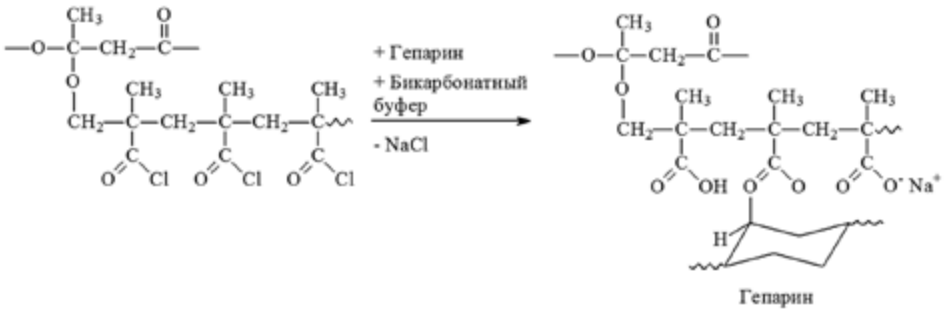


Рисунок 3. Химическая прививка гепарина к подслою

CO–NH– (1254 $см^{-1}$) – ацетамидных групп гепарина и C–C (973 $см^{-1}$) – связи циклогексановых колец гепарина свидетельствуют об эффективной прививке гепарина к полимеру (таблица 2).

Таблица 1.

Появление волновых пиков после модификации шовного материала раствором ПГБ

№	Волновое число, $см^{-1}$	Возможное соотнесение
		Изменения в данных областях спектра комбинационного рассеяния характеризуют закрытие поверхности субстрата привитым продуктом от зондирующего света спектрометра
1	1453	$–CH_2–$ – группы полипропилена, ПГБ и полиметакрилоилхлорида
2	1143	–C–O–C– – группы ПГБ
3	841	–C–O–C– – группы ПГБ
4	748	Скелетные колебания полипропилена
5	593	$–CH_2OH$ – концевые группы ПГБ

Таблица 2.

Эффективная прививка гепарина к полимеру

№	Волновое число, $см^{-1}$	Возможное соотнесение
1	3150–3600	OH – группы гепарина и карбоксильных групп гидролизованного привитого полиметакрилоилхлорида
2	1680	COO– – карбоксилатные группы гепарина и гидролизованного привитого полиметакрилоилхлорида
3	1306	SO_2 – сульфамидные группы гепарина
4	1254	CO–NH– – ацетамидные группы гепарина
5	1168	SO_2 – сульфамидные группы гепарина
6	973	C–C – связи циклогексановых колец гепарина

Увеличение интенсивности пиков, характерных для C–H-связи групп –OCH– привитого гепарина, в дополнение к группам ПГБ $–OCH_2–$, с волновым числом, равным – 2962 $см^{-1}$, также говорят о химическом присоединении гепарина к покрытию из ПГБ (таблица 3).

Таблица 3.

Химическое присоединение гепарина к покрытию из ПГБ

№	Волновое число, $см^{-1}$	Возможное соотнесение
1	2962	C–H-связи групп –OCH– привитого гепарина в дополнение к группам ПГБ $–OCH_2–$
2	809	групповые C–C–O-связи гидроксильных групп гепарина в дополнение к аналогичным концевым группам ПГБ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный способ химической модификации хирургического шовного материала замечателен тем, что нанесенный гепарин прочно закрепляется на поверхности полимера. Нанесенное покрытие не будет слущиваться и вымываться естественной средой организма, а гепарин будет высвобождаться по мере биодеградации полимера достаточно длительный период времени, оказывая необходимый терапевтический эффект.

Полученные результаты доказали, что нанесение гепарина на покрытую ПГБ поверхность полипропиленовой хирургической нити с помощью химической прививки позволяет прочно закрепить гепарин на поверхности полимера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.М. Мохов. Этапы разработки новых биологически активных шовных материалов и результаты их применения в экстренной абдоминальной хирургии // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2009. № 6. С. 25–28.
2. Г.М. Патахов, М.Г. Ахмадудинов. Биоактивные шовные материалы в гепаторафии // Фундаментальные исследования. 2011. № 7. С. 124–126.
3. S.I. Shkurenko, T.S. Idiatulina. Nikant Biologically Active Surgical Sutures // Fibre Chemistry. 2002. V. 34. Is. 5. P. 346–349.
4. А.С. Князюк, А.Н. Лызиков, Д.А. Зиновкин и др. Влияние нового антибактериального шовного материала на течение раневого процесса в эксперименте // Проблемы здоровья и экологии. 2015. № 1(43). С. 48–53.
5. J.-C. Harnet, E. Le Guen, V. Ball et al. Antibacterial protection of suture material by chlorhexidine functionanalized polyelectrolyte multilayer films // J. Mater Sci.: Mater Med. 2009. № 20. P. 185–193.
6. Q. Bingsong, M. Weizhong, Z. Rong, T. Mei, Z. Jianhao, Z. Zhengang. Microwave-assisted Immobilization of Heparin onto Polyurethane Surface for Improving Blood Compatibility // Journal of Wuhan University of Technology. 2014. V. 29. Is. 5. P. 1071–1077.
7. S. Murugesan, J. Xie, R. Linhardt. Immobilization of Heparin: Approaches and Applications // Current Topics in Medicinal Chemistry. 2008. № 8. P. 80–100.
8. Патент СССР № 1077251. Способ получения гемосовместимых полимерных материалов / Платэ Н.А., Бурдыгина И.Ф., Чупов В.В., Валуев Л.И., Часовников И.А., Кабанов В.Я.; опубл. 1982.
9. Т.Н. Акентьева, В.В. Борисов, Ю.А. Кудрявцева. Влияние покрытия на основе полиоксиалкноатов на свойства шовного материала // Ангиология и сосудистая хирургия. 2014. Т. 2. № 4. С. 42–47.
10. Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая, П.В. Миронов, А.В. Горева. Структура и физико-химические свойства гибридного композита полигидроксибутират/волластонит // Перспективные материалы. 2009. № 1. С. 43–50.
11. А.Х. Купцов, Г.Н. Жижин. Фурье-спектры комбинационного рассеяния и инфракрасного поглощения полимеров. Справочник. - М.: ФИЗМАТЛИТ, 2001. 656 с.
12. P. Adapa, C. Karunakaran, L. Tabil, G. Schoenau. Potential Applications of Infrared and Raman Spectromicroscopy for Agricultural Biomass // Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal. Manuscript 1081. 2009. V. 9. P. 1–25.
13. D. Lin-Vien, N. Colthup, W. Fateley and J. Graselli. The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. – Boston: Academic Press, 1991. 503 p.
14. G. Socrates. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts, 3rd ed. – NY: John Wiley & Sons, 2001. 347 p.
15. J. Workman Jr. The Handbook of Organic Compounds. Three-Volume Set. Volume 1–3: NIR, IR, R, and UV-Vis Spectra Featuring Polymers and Surfactants. – Boston: Academic Press, 2000. 1493 p.
16. В.Е. Рыкалина, С.И. Шкуренко, Е.В. Монахова и др. Совершенствование функциональных свойств хирургических нитей методом поверхностной модификации полимерными композициями // Химические волокна. 2011. № 1. С. 57–62..

УДК 615.4

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЭКСТЕМПОРАЛЬНОМ ИЗГОТОВЛЕНИИ ПОРОШКОВ

А.В. Беляцкая[1]*, И.И. Краснюк[1], И.И. Краснюк (мл.)[1], О.И. Степанова[1], Л.А. Король[1], О.В. Растопчина[1]

Резюме. В статье отмечается важность аптечного изготовления лекарственных препаратов. Проведен анализ рецептов, поступающих в аптеки г. Москвы. Изучена структура экстемпоральных лекарственных препаратов в соответствии с классификацией по агрегатному состоянию. Выявлено использование готовых лекарственных препаратов в экстемпоральной технологии изготовления порошков для детей. Данное обстоятельство обусловлено отсутствием современных фармацевтических субстанций в аптеках. В статье рассмотрен юридический аспект проблемы.

Ключевые слова: изготовление лекарственных препаратов в аптеке, экстемпоральное изготовление лекарственных препаратов, изготовление порошков, порошки.

USAGE OF FINISHED DOSAGE FORMS IN THE MANUFACTURE OF EXTEMPORANEOUS POWDERS

A.V. Belyatskaya[1]*, I.I. Krasnyuk[1], I.I. Krasnyuk (jr.)[1], O.I. Stepanova[1], L.A. Korol[1], O.V. Rastopchina[1]

Abstract. The article highlights the importance of the pharmaceutical drugs manufacturing. There are analysis of prescriptions coming from pharmacies in Moscow. There are investigated the structure of extemporaneous drugs in accordance with the classification of the state of aggregation. The article revealed the use of ready-made drugs in extemporaneous technology of powder for children manufacturing. This circumstance is due to the lack of modern pharmaceutical substances in pharmacies. The article deals with the legal aspect of the problem.

Keywords: preparation of medicines in the pharmacy, the extemporaneous preparation of medicines, manufacturer of powder in the pharmacy, powders.

1 – ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

1 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: av.beliatskaya@mail.ru
Тел.: 8 (495) 691 00 73

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире до середины XX века лекарственные препараты (ЛП) чаще всего изготавливались в аптеках небольшими сериями или в качестве индивидуальных препаратов для определенного больного. К 60-м годам XX столетия ситуация изменилась и производство ЛП было переведено на промышленную основу.

Несмотря на данную тенденцию, в Советском Союзе была создана и функционировала мощная система изготовления и контроля качества ЛП в условиях аптек. Изменение экономической ситуации в стране в 90-е годы XX века привело к закрытию многих производственных отделов аптечных учреждений.

В Российской Федерации развитие промышленного производства ЛП тоже сопровождается уменьшением числа производственных аптек, а также номенклатуры и объемов ЛП экстемпорального изготовления. Данная тенденция связана не только со значительным расширением ассортимента препаратов промышленного производства, но и со снижением номенклатуры и объемов выпуска субстанций отечественными предприятиями, несоответствием фасовки предлагаемых субстанций реальным потребностям производственных аптек, высокими затратами и низкой рентабельностью внутриаптечного изготовления ЛП, дополнительным контролем со стороны контрольно-аналитических лабораторий и других регулирующих органов и т.д. [1, 2].

Между тем наличие производственного отдела в аптечном учреждении – важный, социально значимый показатель качества лекарственного обеспечения населения, доступности лекарственной помощи, широты спектра предоставляемых аптеками фармацевтических услуг.

Экстемпоральное изготовление по-прежнему остается востребованной фармацевтической услугой в связи с тем, что существует значительная группа ЛП, которые не могут быть заменены аналогичными препаратами промышленного производства. К ним относятся: стерильные растворы для внутреннего употребления новорожденными (не содержащие стабилизаторов и консервантов), растворы окислителей, растворы коллоидных препаратов серебра (например, растворы колларгола и повиаргола), некоторые стерильные растворы для наружного применения, растворы для электрофореза и т.д. [3, 4].

Экстемпоральные ЛП – являются важным элементом фармацевтической помощи, так как в условиях аптеки изготавливают препараты, в максимальной степени обеспечивающие индивидуальный подход при лечении конкретного больного с учетом анатомо-физиологических, возрастных особенностей организма (педиатрия, гериатрия); имеющие ограниченный срок годности, что не позволяет производить их массово в условиях фармацевтического производства.

Также для ЛП экстемпорального изготовления зачастую характерна более низкая стоимость по сравнению с препаратами промышленного производства, что делает доступными ЛП аптечного изготовления для малообеспеченных слоев населения и снижает стоимость лечения стационарных больных.

На данный момент одной из целевых групп потребителей экстемпоральных ЛП является педиатрическая группа больных. В последние десятилетия существенно изменилась фармакотерапия новорожденных и детей раннего возраста. В медицинскую практику прочно вошло назначение детям этой категории сердечно-сосудистых средств (сердечные гликозиды, ингибиторы ангиотензипревращающего фермента (АПФ), корректоры нарушений мозгового кровообращения), адренолитических средств (бета-адреноблокаторы), диуретиков, гормонов и др. [5].

Однако фармацевтическая промышленность не выпускает препараты данных фармакологических групп в дозировках, предназначенных для приема новорожденными пациентами и детьми раннего возраста. Вследствие этого врачи вынуждены выписывать рецепты для экстемпорального изготовления ЛП, содержащих лекарственные средства (ЛС) приведенных выше фармакологических групп, как правило, в виде лекарственной формы (ЛФ) порошки.

К сожалению, аптечный ассортимент фармацевтических субстанций весьма ограничен: в нем, как правило, отсутствуют современные субстанции, позволяющие изготовлять высокоэффективные препараты, обладающие антигипертензивным, психотропным, диуретическим действием [5, 6]. Это обусловлено прежде всего тем, что потребности аптек в таких субстанциях крайне невелики и могут составлять от 5 до 10–25 г в год. В то время как минимальная фасовка некоторых субстанций, зарегистрированных в РФ, исчисляется на порядок более высокими цифрами. Например, по данным Государственного реестра лекарственных средств на 01.10.2016 г., минимальная фасовка фармацевтических субстанций таких веществ, как дигоксин, составляет 0,5 кг, пропранолол – 0,1 кг, винпоцетин – 0,1 кг. Отсутствие современных субстанций в аптеках приводит к тому, что для изготовления ЛП для детей (содержащих сердечно-сосудистые и адренолитические средства, диуретики, гормоны) специалисты рецептурно-производственных отделов вынуждены использовать готовые ЛП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью выявления наиболее часто встречающихся прописей для педиатрической группы населения, при изготовлении которых в аптеках используются готовые ЛП, было проведено анкетирование в рецептурно-производственных отделах аптек.

Объектом изучения служили рецепты, поступающие в аптеки от населения для изготовления индивидуальных ЛП.

Анализировался состав рецептурных прописей с целью выявления наиболее часто используемых готовых ЛП в составе порошков экстемпорального изготовления.

Таким образом, была проанализирована экстемпоральная рецептура, поступившая в рецептурно-производственные отделы 45 аптечных организаций г. Москвы в период с 4.03.2016 по 24.03.2016 г.

В таблице 1 приведено количество рецептов, поступающих в смену в рецептурно-производственные отделы, по данным руководителей этих аптек.

Таблица 1.

Количество рецептов, поступающих в смену в рецептурно-производственные отелы

Количество рецептов в смену	менее 10	10–20	20–30	30–50	50–70	70–100
Число аптек, %	1 (2,2%)	8 (17,8%)	12 (26,7%)	15 (33,3%)	8 (17,8%)	1 (2,2%)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура экстемпоральной рецептуры значительно видоизменилась за последние десятилетия. В ходе анализа рецептуры, поступавшей в РПО аптечных организаций, было установлено, что наиболее часто в аптеках изготавливаются жидкие ЛФ, а именно суспензии и растворы для наружного применения. Данные, приведенные в таблице 2, показывают, что

в чуть меньшем количестве изготавливаются мягкие ЛФ, причем в подавляющем числе случаев речь идет об изготовлении мазей, а суппозитории изготавливают крайне редко. В меньшей степени изготавливаются микстуры, порошки, стерильные ЛФ (прежде всего глазные капли).

В результате изучения рецептуры, поступавшей в рецептурно-производственные отделы аптечных организаций, было установлено, что врачи часто выписывают в составе порошков фармацевтические субстанции, отсутствующие в аптеках. Причем 90% таких рецептов назначаются для пациентов в возрасте до 5 лет. Чаще всего встречаются прописи, предназначенные для внутреннего применения, представляющие собой комбинацию сердечно-сосудистых средств, адренолитических средств, диуретиков, гормонов с сахаром или глюкозой. Наиболее часто в составе порошков выписываются следующие фармацевтические субстанции, отсутствующие в аптеках: дигоксин, спиронолактон, пропранолол, атенолол, гидрокортизон, винпоцетин, каптоприл, калия и магния аспарагинат, фуросемид, силденафил. В таблице 3 приведены примеры таких прописей.

Таблица 2.

Структура экстемпоральной рецептуры, поступившей в рецептурно-производственные отделы 45 аптечных организаций г. Москвы в период с 4.03.2016 по 24.03.2016 г., в соответствии с классификацией по агрегатному состоянию

Лекарственные формы		%
Мягкие лекарственные формы	Мази	32
	Суппозитории	2
Твердые лекарственные формы	Порошки	5
Жидкие лекарственные формы	Растворы для наружного применения	20
	Микстуры (растворы для внутреннего применения)	7
	Суспензии	33
	Офтальмологические растворы	1

Необходимость уменьшения дозировки действующего вещества для педиатрической группы пациентов вынуждает врачей выписывать рецепты для экстемпорального изготовления ЛП. А в аптеках, ввиду отсутствия субстанций действующих веществ, становятся перед сложным и неоднозначным выбором: либо не изготавливать препарат, либо изготавливать, но с использованием готовых ЛП (чаще всего таблеток или капсул). При этом в состав ЛП поступает не только действующее вещество, но и вспомогательные вещества, использованные при производстве готовых ЛП.

Таблица 3.

Прописи рецептов, содержащих лекарственные вещества, фармацевтические субстанции которых отсутствуют в аптеках

Rp.: Digoxini 0,000015 Sacchari 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 60 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 2,5 мес.	Rp.: Digoxini 0,000016 Sacchari albi ad 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 60 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 1 мес.	Rp.: Digoxini 0,00002 Glucosi 0,25 Misce fiat pulvis Da tales doses № 40 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 3 мес.
Rp.: Captoprili 0,002 Glucosi 0,1 Misce fiat pulvis Da tales doses № 30 S. По 1 порошку 3 раза в день Возраст пациента 3 года 10 мес.	Rp.: Captoprili 0,004 Sacchari 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 60 S. По 1 порошку 3 раза в день Возраст пациента 3 года 10 мес.	Rp.: Captoprili 0,005 Glucosi 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 150 S. По 1 порошку 3 раза в день Возраст пациента 1 год 4 мес.
Rp.: Propranololi 0,002 Glucosi 0,1 Misce fiat pulvis Da tales doses № 180 S. По 2 порошка 3 раза в день. Возраст пациента 5 мес.	Rp.: Propranololi 0,0055 Glucosi ad 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 90 S. По 1 порошку 3 раза в день. Возраст пациента 7 мес.	Rp.: Propranololi 0,00675 Glucosi 0,75 Misce fiat pulvis Da tales doses № 40 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 9 мес.
Rp.: Sildenafili 0,002 Glucosi 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 10 S. По 1 порошку 1 раз в день. Возраст пациента 5 мес.	Rp.: Sildenafili 0,003 Glucosi 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 10 S. По 1 порошку 1 раз в день. Возраст пациента 6 мес.	Rp.: Sildenafili 0,004 Sacchari 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 20 S. По 1 порошку 1 раз в день. Возраст пациента 8 мес.
Rp.: Vinpocetini 0,0008 Sacchari 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 20 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 1,5 мес.	Rp.: Vinpocetini 0,001 Glucosi 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 20 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 2 мес.	Rp.: Vinpocetini 0,0015 Glucosi 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 20 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 3 мес.
Rp.: Spironolactoni 0,008 Sacchari 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 60 S. По 1 порошку в 16,00 и 20,00. Возраст пациента 1,5 мес.	Rp.:Spironolactoni 0,012 Glucosi 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 60 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 8 мес.	Rp.: Spironolactoni 0,025 Glucosi 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 20 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 3 года.
Rp.: Furosemidi 0,001 Glucosi 0,1 Misce fiat pulvis Da tales doses № 20 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 7 мес.	Rp.: Furosemidi 0,002 Sacchari 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 30 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 9 мес.	Rp.: Furosemidi 0,003 Glucosi 0,2 Misce fiat pulvis Da tales doses № 30 S. По 1 порошку 2 раза в день. Возраст пациента 9 мес.

В соответствии с частью 1 статьи 56 Федерального закона РФ от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ (ред. от 03.07.2016 г.) «Об обращении лекарственных средств»: «Изготовление ЛП аптечными организациями, ветеринарными аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность, осуществляется по рецептам на ЛП, по требованиям медицинских организаций, ветеринарных организаций в соответствии с правилами изготовления и отпуска ЛП, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти» [7].

«Правила изготовления и отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность» были утверждены приказом Министерства здравоохранения РФ № 751н от 26.10.2015 г. и вступили в силу 1 июля 2016 г.

В соответствии с пунктом 3 раздела 1 «Общие положения»: «При изготовлении лекарственных препаратов используются фармацевтические субстанции, включенные в государственный реестр ЛС для медицинского применения» [8]. Такая же формулировка содержится в части 2 статьи 56 Федерального закона РФ от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [7].

В статье 4 Федерального закона РФ от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ дается следующее определение фармацевтической субстанции: это лекарственное средство в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, которое предназначено для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяет их эффективность [7].

Вследствие, всего вышесказанного сотрудники аптек оказываются в непростой ситуации. Юридически в рецептурно-производственном отделе аптеки не должны изготавливать ЛП в случае отсутствия в ней необходимой фармацевтической субстанции. Однако отказ в изготовлении ЛП для новорожденных и детей раннего возраста, нуждающихся в назначении сердечно-сосудистых средств, адренолитических средств, диуретиков в крайне малых дозировках, приведет к невозможности своевременной и крайне необходимой медикаментозной терапии пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Решением данной проблемы может стать только расширение в рецептурно-производственных отделах аптек ассортимента современных фармацевтических субстанций. Для этого необходимо создание специальной структуры для проведения полномасштабного исследования современной рецептуры, поступающей в производственные отделы аптек, которое охватывает длительный временной период (не менее полугода), с целью формирования полного перечня необходимых фармацевтических субстанций и определения потребностей в них с их последующей закупкой у отечественных производителей готовых ЛП. В случае крупных игроков рынка, таких, например, как ГБУЗ «ЦЛО ДЗМ» и АО «Столичные аптеки», возможна закупка необходимых современных фармацевтических субстанций и организация изготовления ЛП с ними на базе нескольких аптек.

Несмотря на некоторые сложности, изготовление ЛП в аптеках остается важным средством персонализации лечения и является неотъемлемой составляющей качественной медицинской помощи. Для некоторых групп населения – новорожденных и детей в возрасте до 1 года, гериатрических пациентов – изготовленный по индивидуальному рецепту ЛП является единственной надеждой на выздоровление.

ЛИТЕРАТУРА

1. М.Б. Левин, А.В. Солонина. Производственная деятельность аптек: проблемы и перспективы // Новая аптека. 2002. № 1. С. 13–16.
2. Ф.Р. Леонтьева, Р.С. Сафиуллин, Р.И. Ягудина. Аптечное изготовление ЛС. Эффективное решение проблемы // Новая аптека. 2004. № 3. С. 26–33.
3. В.А. Егоров, Е.П. Гладунова, М.Р. Дударенкова и др. Экономические подходы к ценообразованию на экстемпоральные лекарственные средства // Фармация. 2010. № 6. С. 25–27.
4. И.А. Наркевич, Е.В. Похваленко. Экстемпоральные лекарственные препараты для новорожденных // Фармация. 2013. № 7. С. 27–29.
5. Т.Л. Мороз, О.А. Рыжова. Проблемы лекарственного обеспечения лечебно-профилактических учреждений в связи с сокращением внутриаптечного изготовления лекарственных препаратов // Ремедиум. 2015. № 1–2. С. 43–46.
6. С.Н. Егорова, Е.В. Неволина. Аптечное изготовление лекарственных форм: проблемы, требующие правового решения // Вестник Росздравнадзора. 2013. № 6. С. 36–38.
7. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 03.07.2016) «Об обращении лекарственных средств» (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2017).
8. Приказ Минздрава России от 26.10.2015 № 751н «Об утверждении правил изготовления и отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность» (зарегистрировано в Минюсте России 21.04.2016 № 41897).

IMACO GROUP

ДОСТУПНЫЕ КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ В ОБЛАСТИ ФАСОВКИ ЖИДКИХ И ВЯЗКИХ ПРОДУКТОВ ОТ ЕВРОПЕЙСКОГО ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ
6 000 флаконов в час



ДИАПАЗОН доз **1-250 мл**

ГК "Фармконтракт" - эксклюзивный дистрибьютор чешской компании IMACO Group в России

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

ЛАБОРАТОРНЫЙ ИНЖИНИРИНГ ОТ ГК «ФАРМКОНТРАКТ»

В рамках создания и модернизации лабораторных комплексов для пищевой отрасли ГК «Фармконтракт» осуществляет весь комплекс услуг по разработке проекта, сопровождению проектировочных решений вплоть до окончания строительно-монтажных работ. Среди наших услуг: проектирование и создание инженерных систем, производство, поставка и монтаж ограждающих конструкций и локальных чистых зон.

Лабораторный промышленный инжиниринг от ГК «Фармконтракт» включает в себя не только стандартные проектировочные решения относительно инженерных систем и чистых помещений, но и разработку специальной конфигурации оборудования с учетом ТЗ и спецификой производства.

1 ОТБОР ПРОБ

Пробоотборники



ИЗМЕЛЬЧЕНИЕ ОБРАЗЦА

2 Мельницы IKA



ПРОБОПОДГОТОВКА

3.1 УПАРИВАНИЕ ПРОБЫ
Ротационный испаритель BUCHI R-300



ПРОБОПОДГОТОВКА

3.2 ТВЕРДОФАЗНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ
твердофазный экстрактор SPE-DEX 4790



ПРОБОПОДГОТОВКА

3.3 Сушильный шкаф BINDER



4 ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ

БИК-Фурье BUCHI



4.1 ЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Атомно-абсорбционный спектрофотометр Agilent 240



4.2 АНАЛИЗ ВЛАЖНОСТИ

Титратор 831 KF от Metrohm AG



4.3 АМИНОКИСЛОТНЫЙ АНАЛИЗ

ВЭЖХ-система Agilent 1260 Infinity



4.4 АНАЛИЗ БЕЛКА/АЗОТА МЕТОДОМ КЬЕЛЬДАЛЯ

Системы BUCHI



УДК 621.039.8

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В МЕДИЦИНСКИХ ОРГАНИЗАЦИЯХ

Г.Е. Кодина[1], А.О. Малышева[1]*

Резюме. Одним из основных средств ядерной медицины является радиофармацевтический препарат (РФП), представляющий собой композицию, включающую радиоактивный изотоп в определенной химической форме. Процедура контроля качества, а именно определение радиохимической чистоты РФП, изготовленного в медицинской организации, перед введением пациенту является обязательной во всех развитых странах мира еще с середины 1980-х годов. В нашей стране фактически аналогичная процедура стала обязательной с начала 2016 г. наряду с другими мероприятиями, выполнение которых должно гарантировать высокое качество и безопасность процедур ядерной медицины в соответствии с вступившим в силу с 01 января 2016 г. приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 27.04.2015 г. № 211н «Об утверждении порядка изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов непосредственно в медицинских организациях». В статье представлены основные подходы к проведению контроля качества изготавливаемых непосредственно в медицинских организациях радиофармацевтических препаратов для определения их радиохимической чистоты.

Ключевые слова: ядерная медицина, радиофармацевтические препараты, контроль качества, радиохимическая чистота, радиохимические примеси.

QUALITY CONTROL OF RADIOPHARMACEUTICALS IN MEDICAL INSTITUTIONS

G.E. Kodina[1], A.O. Malysheva[1]*

Abstract. One of the major nuclear medicine agent is radiopharmaceutical (RPh) which is a composition comprising a radioactive isotope in certain chemical form. Quality control, namely the determination of radiochemical purity of radiopharmaceuticals produced in a medical institution, prior to administration to the patient is mandatory in all developed countries of the world since the mid-1980s. In our country, virtually the same procedure has been mandatory since the beginning of 2016, along with other measures, the implementation of which should guarantee the high quality and safety of nuclear medicine procedures according to the Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from 27.04.2015 N 211n «On approval of the radiopharmaceutical preparation directly in medical institutions», which came into force from January 01, 2016. This article presents the main approaches to the implementation of quality control (determination of radiochemical purity) of radiopharmaceuticals manufactured directly in the medical institutions.

Keywords: nuclear medicine, radiopharmaceuticals, quality control, radiochemical purity, radiochemical impurities.

1 – ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123182, Россия, г. Москва, ул. Живописная, д. 46

1 – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center FMBA Russia, 46, Zhivopisnaya str., Moscow, 123182, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: an-malysheva@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Технологии ядерной медицины, применяемые практически во всех направлениях современной медицины, бурно развиваются в нашей стране в последние годы и становятся доступными широкому кругу пациентов. Одним из основных средств ядерной медицины является радиофармацевтический препарат (РФП), представляющий собой композицию, включающую радиоактивный изотоп в определенной химической форме. Ядерно-физические свойства изотопа (характер излучения и период полураспада) обуславливают возможность его применения в диагностике (то есть получении изображений и функциональных характеристик органов и систем нашего организма, имеющих различный характер в норме и при наличии патологического процесса) или терапии за счет поражающего действия излучения исключительно по отношению к патологическим очагам.

В соответствии с Федеральным законом от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (статья 13, п. 5, пп. 5) «государственной регистрации не подлежат радиофармацевтические лекарственные препараты, изготовленные непосредственно в медицинских организациях в порядке, установленном уполномоченным федеральным органом исполнительной власти». Указанный порядок утвержден приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации [1], который вступил в силу с 01 января 2016 г. В целом перечень таких РФП на сегодняшний день насчитывает порядка 20 наименований. В соответствии с условиями синтеза (изготовления) РФП непосредственно в медицинской организации они могут быть разделены на 2 группы:

1) РФП, синтезированные на базе циклотронов, расположенных непосредственно в медицинской организации;

2) РФП, изготовленные на основе генераторных радионуклидов.

РФП первой группы в настоящее время относятся к номенклатуре препаратов, используемых в центрах позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ). Это в основном фтордезоксиглюкоза, ^{18}F (ФДГ, ^{18}F) и некоторые другие препараты ^{18}F, а также органические соединения, меченные ^{11}C; в некоторых ПЭТ-центрах синтезируют и используют аммоний, ^{13}N и значительно реже $H_2{}^{15}O$.

Обычно структура медицинского ПЭТ-центра включает циклотрон, радиохимическую лабораторию и собственно отделение ПЭТ, где выполняют исследования пациентов. В радиохимической лаборатории имеются специальные помещения для синтеза РФП и контроля их качества, специальное оборудование – автоматизированные модули синтеза, установленные в защитных боксах и управляемые с помощью программируемых интерфейсов, а также персонал – специалисты, получившие базовое высшее физическое или химическое образование и освоившие программы дополнительного образования в области радиохимии и фармации. Как правило, фирма, выполняющая проектирование и строительство и/или поставку оборудования в период организации ПЭТ-центра, в течение пусконаладочного периода обеспечивает стажировку будущего персонала в крупных зарубежных центрах. Таким образом, изготовление и контроль качества РФП первой группы проводят высококвалифицированные радиохимики (за пределами нашей страны общепринятой является специальность «радиофармацевт», которая сейчас только начинает зарождаться в нашей стране), что гарантирует получение РФП, соответствующих предписанным эффективности и безопасности.

Изготовление РФП второй группы обычно входит в служебные обязанности среднего медицинского персонала лабораторий (отделений) радионуклидной диагностики.

В связи с вышеизложенным целью работы является описание некоторых аспектов проведения контроля качества РФП, изготавливаемых непосредственно в медицинских организациях.

РАДИОНУКЛИДНЫЕ ГЕНЕРАТОРЫ

Радионуклидный генератор – устройство, представляющее собой стеклянную колонку, помещенную в защитный кожух. Внутри колонки находится сорбент, содержащий прочно закрепленный материнский радионуклид, в результате радиоактивного распада которого в колонке накапливается дочерний радионуклид. Последний извлекают из генератора, путем пропускания через колонку подходящего растворителя – элюента, который не может «смыть» материнский радионуклид. Например, на рисунке 1 изображен генератор технеция-99м (производство НИФХИ им. Л.Я. Карпова, г. Обнинск), наиболее широко применяемый уже в течение более 40 лет в технике однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ). Материнским радионуклидом в этом генераторе является молибден-99. Обычно генераторную пару радионуклидов изображают следующим образом: ^{99}Mo/^{99m}Tc.

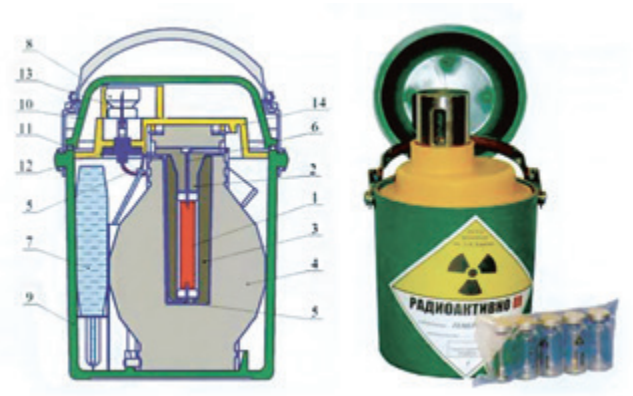


Рисунок 1. Схема конструкции и внешний вид генератора ^{99}Mo/^{99m}Tc производства НИФХИ им. Л.Я. Карпова (г. Обнинск, Россия)

1 – колонка; 2, 3 – уплотнитель; 4 – защитный кожух; 5 – линия элюента; 6 – линия элюата; 7 – емкость для элюэнта; 8 – заглушка для линии элюата; 9 – корпус генератора; 10 – крышка корпуса при транспортировании; 11 – зажим; 12 – стерилизующий фильтр; 13, 14 – крышка корпуса при эксплуатации

В таблице 1 представлены сведения о некоторых генераторах, применяемых в медицине. Кроме генератора ^{99}Mo/^{99m}Tc, уже в течение нескольких лет за рубежом активно используются ПЭТ генераторы ^{82}Sr/^{82}Rb и особенно ^{68}Ge/^{68}Ga. Во многих странах, в том числе и в России, проводятся интенсивные клинические исследования с препаратами на основе генератора ^{188}W/^{188}Re для радионуклидной терапии (РНТ). Остальные пока находятся на стадии лабораторных исследований и/или технически сложны для применения непосредственно в медицинских организациях.

РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ГЕНЕРАТОРА ТЕХНЕЦИЯ-99М

Во всем мире более 85% процедур радионуклидной диагностики проводится методом ОФЭКТ как раз с ^{99m}Tc. Поэтому проблема обеспечения качества РФП, которые сегодня изготавливаются и используются в повседневной практике медицинской организации (в России более 250 таких организаций), связана в первую очередь со строгим соблюдением инструкций по изготовлению препаратов ^{99m}Tc.

Таблица 1.

Характеристики некоторых генераторных пар, применяемых в ядерной медицине

Материнский радионуклид	$T_{1/2}$	Дочерний радионуклид	$T_{1/2}$	Область применения
^{62}Zn	9,26 ч	^{62}Cu	9,7 мин	ПЭТ
^{68}Ge	**270,8 сут**	**^{68}Ga**	**68,0 мин**	**ПЭТ**
^{81}Rb	4,58 ч	^{81m}Kr	13 с	ОФЭКТ
^{82}Sr	25,0 сут	^{82}Rb	1,25 мин	ПЭТ
^{90}Sr	28,7 года	^{90}Y	64,26 ч	РНТ
^{99}Mo	**66,02 ч**	**^{99m}Tc**	**6,01 ч**	**ОФЭКТ**
^{188}W	**60 сут**	**^{188}Re**	**16,98 ч**	**РНТ**
^{212}Pb	10,6 ч	^{212}Bi	1 ч	РНТ
^{225}Ac	10,0 сут	^{213}Bi	47 мин	РНТ

Для изготовления препарата в медицинском учреждении во флакон (рисунок 2), содержащий стерильный реагент (лиофилизат) – лиофилизированную смесь нерадиоактивных компонентов лекарственной формы препарата, вводят определенное количество стерильного раствора натрия пертехнетата, ^{99m}Tc, полученного из генератора ^{99}Mo/^{99m}Tc.



Рисунок 2. Внешний вид лиофилизатов, выпускаемых ООО «ДИАМЕД» (г. Москва, Россия), для изготовления РФП и вторичной упаковки для них

Семивалентный Tc (а именно в таком состоянии в виде пертехнетата натрия находится ^{99m}Tc в элюате генератора) не склонен к комплексообразованию, в то время как Tc с более низкими степенями окисления является реакционноспособным и образует комплексные соединения [2]. Это и обуславливает возможность получения большого количества различных РФП, обладающих свойствами накапливаться в различных органах и/или системах организма. Поэтому реагент (лиофилизат) для получения РФП, как правило, содержит восстановитель (обычно двухлористое олово – $SnCl_2$), которое переводит ^{99m}Tc в необходимое окислительное состояние, и комплексующий (или коллоидообразующий) агент, который является «проводником» радионуклида, то есть комплекс ^{99m}Tc именно с этим веществом обеспечит возможность визуализации конкретного патологического очага или процесса. В ряде случаев в состав реагента включают буферные смеси, стабилизаторы и т.п. [3]. Таким образом, на первый взгляд кажется, что для изготовления того или иного препарата нужно проделать практически одинаковые процедуры. Однако это не так. В соответствии с химией процессов, которые происходят при растворении лиофилизата в элюате из генератора, нужны различные условия для получения различных РФП. Это объемная активность и объем вводимого во флакон с лиофилизатом элюата. При этом соблюдение необходимого объема обеспечит необходимое значение кислотности (pH) препарата, при котором образуется интересующий нас комплекс. В некоторых случаях требуется выдержка полученного раствора в течение определенного времени и/или нагревание.

В таблице 2 перечислены РФП ^{99m}Tc, применяемые в настоящее время в российских клиниках, и условия их получения.

Таблица 2.

Перечень РФП ^{99m}Tc, применяемых в настоящее время в российских клиниках, и условия их получения

РФП и его назначение		Объемная активность, МБк/мл	Объем элюата, мл	pH	Время до готовности, мин	Срок годности, ч
Пирфотех, ^{99m}Tc Сцинтиграфия скелета, мечение эритроцитов *in vivo*		185–1480	5–10	5–7	п/ раств.*	3
Технефор, ^{99m}Tc	Сцинтиграфия скелета	185–740	5	3–4	п/ раств.	5
Фосфотех, ^{99m}Tc		185–740	5	5–7	20 мин	5
Резоскан, ^{99m}Tc		185–740	5	4–6	20 мин	5
Пентатех, ^{99m}Tc Динамическое исследование почек, головного мозга и др.		75–1500	5	5–6	30 мин	5
Технефит, ^{99m}Tc Сцинтиграфия печени и селезенки		185–1480	5	2,5–4	п/ раств.	5
Бромезида, ^{99m}Tc Динамическое исследование гепатобилиарной системы		37–185	1–8	4,5–5,3	30 мин	6
Технетрил, ^{99m}Tc Оценка перфузии миокарда, визуализация новообразований молочной железы		37–1850	3	5,3–5,9	15 мин, 100 °C	5
Технемаг, ^{99m}Tc Оценка функционального состояния почек и мочевыделительной системы		37–185	4	5–6	15 мин, 100 °C	5
Макротех, ^{99m}Tc Сцинтиграфия легких		37–148	2–8	4–7	15–20 мин	5
Технемек, ^{99m}Tc Статическая сцинтиграфия почек		37–222	5	2,8–3,3	30 мин	5
Теоксим, ^{99m}Tc Оценка перфузии головного мозга, мечение лейкоцитов *in vitro*		37-148	5	9,0-9,8	п/ раств.	0,5

Примечание: * – препарат готов сразу после растворения лиофилизата.

ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА ГОТОВОГО РФП

В соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации [4] перечень основных показателей качества, которым должны соответствовать радиофармацевтические лекарственные препараты, изготавливаемые в медицинских учреждениях, включает:

- состав (по расчету);
- описание (например, бесцветная прозрачная жидкость);
- pH;
- объёмную активность;
- радиохимическую чистоту (радиохимические примеси);
- условия хранения, включая меры предосторожности;
- срок годности.

Для РФП, получаемых на циклотронах (1-й группы), обязательно контролируют радионуклидную чистоту, то есть наличие или отсутствие примесей других радионуклидов, которые могли образоваться в результате побочных ядерных реакций. В элюате радионуклидного генератора этот показатель гарантируется технологией изготовителя генератора, и поэтому в медицинской организации контроль не требуется.

Основным показателем качества любого РФП, в том числе и изготовленного с использованием элюата генератора, является радиохимическая чистота (РХЧ). Это отношение активности радионуклида, который присутствует в препарате в устойчивой химической форме основного вещества, к общей активности радионуклида в этом препарате, выраженное в процентах. То есть это содержание нужного нам меченого соединения, которое определяет в клинике требуемую фармакокинетику препарата, достоверность получаемой информации и диагностическую или терапевтическую эффективность, а также безопасность соответствующей медицинской процедуры (то есть отсутствие нежелательного накопления радионуклида в интактных органах, что связано с необоснованными лучевыми нагрузками).

Для определения РХЧ наиболее часто используют метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), иногда бумажную хроматографию или электрофорез. Принцип метода заключается в том, что подвижная фаза (исследуемый препарат и растворитель) движется по слою сорбента (неподвижная фаза) за счет капиллярных эффектов. Иногда для этих целей используют электрофорез (в таком случае полученная полоска с распределенным препаратом называется электрофореграмма). Скорость движения различных химических форм радионуклида относительно неподвижной фазы оказывается различной, и за счет этого происходит разделение примесей и основной формы РФП. Неподвижная фаза обычно представляет собой тонкослойную хроматографическую полоску (ХП) шириной порядка 10–15 мм и длиной до 100 мм, на которой отмечается линия старта – место нанесения препарата и линия фронта – место, до которого поднимается растворитель. Подробное описание методик можно найти в [5]. На рисунке 3 представлено условное изображение процесса разделения, а также результат определения РХЧ с помощью специального прибора – сканера хроматограмм. Однако это идеальный случай: основное вещество продвигается по длине хроматограммы отдельно от примесей. Если не удается подобрать такую систему, определяют содержание примесей в нескольких (2–3) различных системах и вычисляют РХЧ (%) = 100 – сумма примесей (%).

Процедура определения РХЧ радиофармацевтического препарата, изготовленного в медицинской организации, перед введением пациенту является обязательной во всех развитых странах мира еще с середины 1980-х годов. В нашей стране фактически аналогичная процедура стала обязательной с начала 2016 г. наряду с другими мероприятиями, выполнение которых должно гарантировать высокое качество и безопасность процедур ядерной медицины в соответствии с [1], что иллюстрирует представленная ниже схема (рисунок 4).

С 2016 г. в ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России проводится разработка макетов документации по изготовлению и обеспечению качества, а также экспресс-методов контроля РХЧ РФП, изготавливаемых на основе радионуклидных генераторов. Кроме того, с целью организации специализированной подготовки персонала в рамках программ дополнительного профессионального образования, реализуемых в Институте последипломного профессионального образования (ИППО ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России), разработан и введен специальный цикл «Повышение квалификации лиц, ответственных за изготовление и обеспечение качества радиофармацевтических лекарственных средств на основе генераторных радионуклидов непосредственно в медицинской организации».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вступление в силу новых законодательных актов в области обращения лекарственных средств, а именно в области изготовления радиофармацевтических лекарственных средств непосредственно в медицинских организациях, диктует новые современные подходы к контролю качества РФП, направленные на гарантированное высокое качество и безопасность процедур

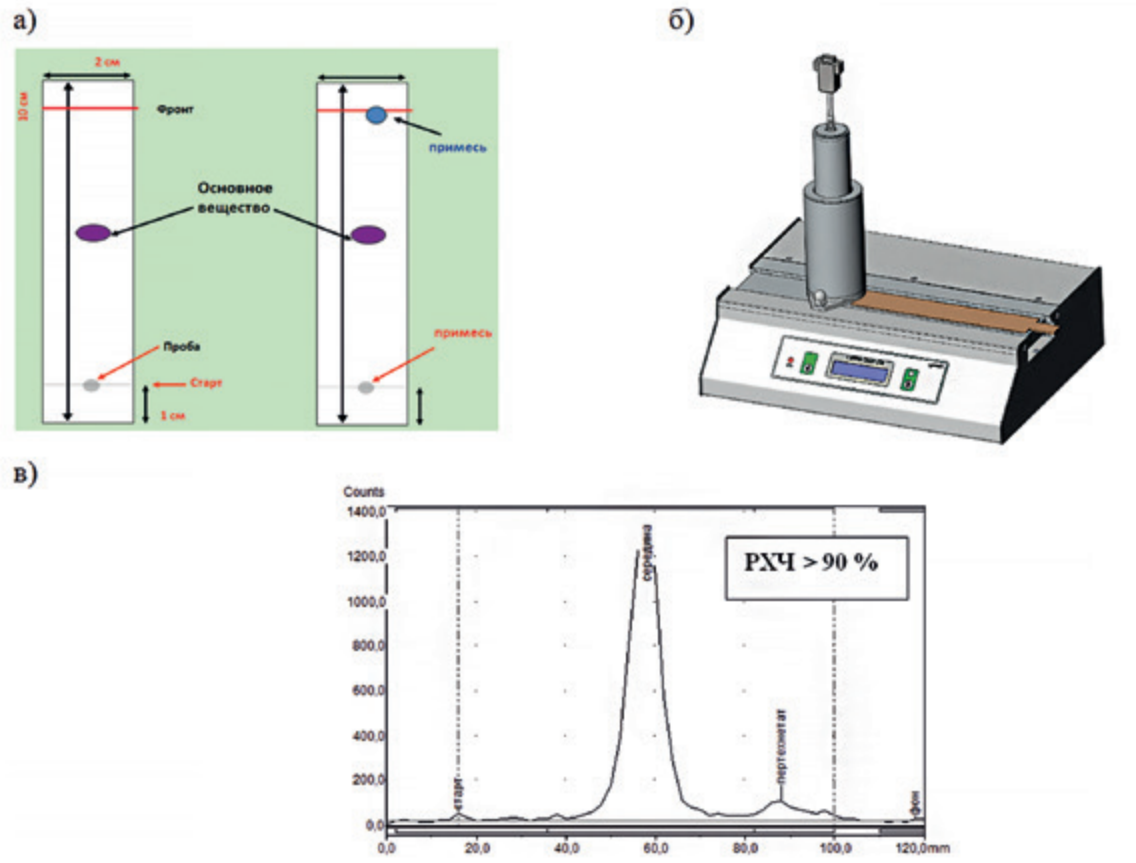


Рисунок 3. **Иллюстрация процесса определения РХЧ:**

а) распределение компонентов препарата по длине хроматографической полоски при разделении; б) сканер хроматограмм («Гамма-Скан-01А», ООО «НТЦ Амплитуда», Россия); в) результат обработки хроматограммы



Рисунок 4. **Схема процедур ядерной медицины, обеспечивающих качество РФП**

ядерной медицины. Разработка и внедрение в клиническую практику экспресс-методов определения радиохимической чистоты изготовленных РФП позволит провести анализ радиофармацевтических препаратов до их введения пациенту, что способствует качественному выполнению диагностического исследования. Для скорейшего освоения средним медицинским персоналом методов контроля качества РФП, наряду с оснащением медицинских учреждений сканерами хроматограмм, особенно актуальна задача организации специализированной подготовки персонала в рамках программ дополнительного профессионального образования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 27.04.2015 г. № 211н «Об утверждении порядка изготовления радиофармацевтических лекарственных препаратов непосредственно в медицинских организациях»; зарегистрирован в Минюсте России 29.05.2015 г.
2. И.Г. Тананаев, С.И. Ровный, Б.Ф. Мясоедов. Технеций // Учебное пособие для вузов. – Озерск: РИЦ ВРБ ФГУП «ПО «Маяк», 2006. 82 с.
3. Г.Е. Кодина, Р.Н. Красикова. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины. – М.: МЭИ, 2014. 282 с.
4. ОФС.1.11.0001.15 Радиофармацевтические лекарственные препараты // Государственная фармакопея. XIII изд.
5. Н.С. Божко, С.Ю. Антропов, С.В. Коростин, Г.Е. Кодина, А.О. Малышева. Оценка точности определения радиохимической чистоты радиофармпрепаратов с использованием сканера хроматограмм // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2014. № 4(59). С. 58–66.

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 анализов 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

TLC-сканер RAYTEST
Проведение количественного и качественного анализа РФП

Гамма-спектрометр RAYTEST
Определение спектра радиоактивного излучения РФП

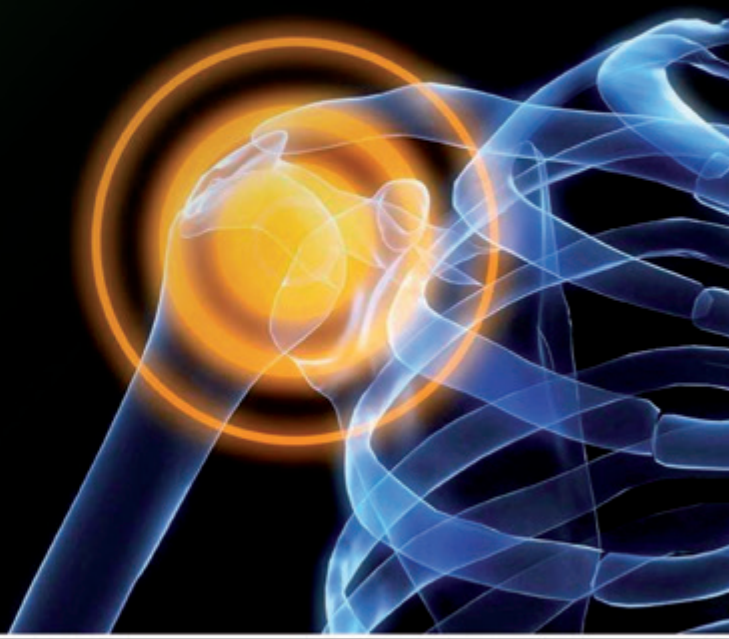
Radio-HPLC детектор RAYTEST
γ-детектирование при проведении ВЭЖХ

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 615.07

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ КАТИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО БАКТЕРИОПУРПУРИНИМИДА ДЛЯ АНТИМИКРОБНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

А.М. Фролова[1]*, Д.А. Графов[1], В.С. Тюкова[2,3], Е.В. Ворфоломеева[2,3], Н.А. Кирьянов[2,3], Е.В. Филоненко[4], А.В. Панов[2,3], М.А. Грин[3], С.А. Кедик[2,3]

Резюме. В данной работе представлены основные показатели, регламентируемые Государственной фармакопеей РФ XIII издания [1], которые могут применяться для стандартизации катионного производного бактериопурпуринимида. Анализ данного соединения проводится с целью его последующего использования в качестве фармацевтической субстанции (ФС), преимущественным путём применения которой является антимикробная фотодинамическая терапия (ФДТ).

Ключевые слова: стандартизация, контроль качества, фармацевтическая субстанция, антимикробная фотодинамическая терапия, катионное производное, бактериопурпуринимид.

STANDARDIZATION OF CATIONIC DERIVATIVE OF BAKTERIOPURPURINIMID AS PHARMACEUTICAL SUBSTANCE FOR ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY

A.M. Frolova[1]*, D.A. Grafov[1], V.S. Tukova[2,3]*, E.V. Vorfolomeeva[2,3], N.A. Keryanov[2,3], E.V. Feelonenko[4], A.V. Panov[2,3], M.A. Green[3], S.A. Kedeek[2,3]

Abstract. In this paper key indicators due to Pharmacopoeia XIII [1] that can be used to standardize the cationic derivative of bakteriopurpurinimid as pharmaceutical substance (PS) are presented. The prime application of this compound to be a photosensitiser for antimicrobial photodynamic therapy (PDT).

Keywords: standardization, quality control, pharmaceutical substance, antimicrobial photodynamic therapy, cationicderivative, bakteriopurpurinimid.

1 – ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева» (РХТУ им. Д.И. Менделеева), 125480, Россия, г. Москва, 125047, Миусская пл., д. 9

2 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ), 119571, Россия, г. Москва, Вернадского пр-т, д. 78

3 – ЗАО «Институт фармацевтических технологий», 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21/32, стр.1

4 – ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» (МНИОИ им. П.А. Герцена), Россия, 125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр., д. 3

1 – D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 9, Miusskaya Pl., Moscow, 125480, Russia

2 – Technological university of Moscow, 78, Vernadskogo Ave, Moscow, 119571, Russia

3 – LLC «Institute of pharmaceutical technology», 21/32, Skolkovskoe highway, Moscow, 121353, Russia

4 – P.A. Gercen scientific-research oncological institute of Moscow, 3, 2-d Botkinskiy proezd., Moscow, 125284, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: anastasiafrolova1994@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени известно более 10 тыс. природных и синтетических антибиотиков [2], которые проявляют бактерицидную активность, ингибируя биосинтез белков клеточных стенок у бактерий на этапе их поперечного сшивания. Однако на данный момент в отношении большого количества активных соединений бактерии выработали обособленный механизм защиты [3].

Антимикробная ФДТ является достаточно новым, перспективным методом лечения заболеваний, вызванных разными видами бактерий. Эффективность метода показана как на грамотрицательных, так и на грамположительных бактериях, а главным отличием от лечения антибиотиками является отсутствие резистетности к фотосенсибилизатору [4].

Порфирины и родственные соединения находят широкое применение в различных областях науки, техники и медицины благодаря их уникальным фотофизическим свойствам [5]. Особое место среди них занимают природные соединения, в частности производные хлорофилла и бактриохлорофилла, которые активно используются в антимикробной ФДТ и флуоресцентной диагностике (ФД) рака и доброкачественных новообразований.

На основе знаний о строении патогенных микроорганизмов [6] был сделан вывод, что универсальными фотосенсибилизаторами для

антимикробной ФДТ являются молекулы с положительными зарядами. Были синтезированы фотосенсибилизаторы, содержащие пиридиновые группы, на основе порфиринов, фталоцианинов и фуллерена C_{60} [7]. Одним из полученных фотосенсбилизаторов является катионное производное бактериопурпуринимида (БПИ).

В литературе описываются различные методы синтеза фотосенсибилизаторов на основе катионных производных [8, 9].

В данной работе представлены исследования, которые позволяют стандартизовать катионное производное БПИ для его дальнейшего применения в качестве ФС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Согласно общей фармакопейной статье (ОФС) 1.1.0006.15 обязательными показателями, регламентирующими качество ФС, являются описание, растворимость, подлинность, родственные примеси, потеря в массе при высушивании, сульфатная зола, тяжелые металлы, остаточные органические растворители, микробиологическая чистота и количественное определение.

Стандартизации подвергалось шесть лабораторных серий вещества.

Визуально было установлено, что ФС на основе катионного производного БПИ представляет собой кристаллический порошок от багрового до тёмно-бордового цвета.

При проведении испытания согласно ОФС 1.2.1.0005.15 было установлено, что ФС на основе катионного производного БПИ растворима в хлороформе, этаноле, малорастворим в этилацетате, практически нерастворим в воде. Данные о растворимости испытуемого вещества используются при подборе растворителей при проведении дальнейших испытаний по параметрам стандартизации.

Показатель подлинности вводится для установления достоверной природы исследуемого вещества, его полного структурного соответствия предоставляемой ФС. Для установления подлинности ФС предлагается использовать один из двух методов: метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса на ядрах ^1H (^1H-ЯМР-спектроскопия) или метод абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях. В рамках исследования было решено проанализировать испытуемый образец обоими предложенными методами с целью получения более подтвержденного результата, позволяющего обосновать подлинность катионного производного БПИ.

Установление подлинности методом ^1H-ЯМР-спектроскопии (ОФС.1.2.1.1.0007.15) представляет собой высокочувствительный, точный метод анализа, позволяющий получить более полное и достоверное преставление о строении химического соединения, тем самым подтвердив его подлинность. $_1H$-ЯМР-анализ осуществляют путем сравнения спектра испытуемого образца со спектром стандартного образца или с опубликованным эталонным спектром. Спектры стандартных и испытуемых образцов должны быть получены в одинаковых условиях. Пики в сравниваемых спектрах должны совпадать по положению, интегральной интенсивности и мультиплетности, значения которых следует приводить при описании спектров (отклонения значений химического сдвига испытуемого и стандартных образцов должны быть в пределах ±0,1 м.д.)

На ^1H-ЯМР-спектре раствора испытуемого образца должны наблюдаться характерные сигналы положения, интегральные интенсивности, мультиплетности и химические сдвиги сигналов которых должны соответствовать: 10,14 (д, J15Hz, 1H, пиридин); 9,28 (м, J2Hz, пиридин); 9,11 (с, 10-H); 8,60 (д, J3Hz, 5-H); 8,48 (д, J6Hz, 20-H); 8,40 (т, J6Hz, 1H, пиридин); 5,05 (м, 17-H); 4,73 (с, N-CH_3, пиридин); 4,16 (м, 18-H, 7-H); 3,92 (м, 8-H); 3,49 (с, 12-CH_3); 3,45 (с, 17^5-CH_3); 3,43 (с, 2-CH_3); 3,09 (с, 3^2-CH_3); 2,54 (м, 8^1-CH_2); 2,33 (м, 17^2-CH_2); 2,29 (м, 17^1-CH_2); 1,94 (м, 7-CH_3); 1,71 (д, J9Hz, 18-CH_3); 0,99 (т, J7Hz, 8^2-CH_3); -0,3 (с, NH); –0,6 (с, NH).

На рисунке 1 представлен ^1H-ЯМР-спектр катионного производного БПИ.

Около 50 мг образца растворяли в дейтерированном хлороформе («Химсервис», Россия), к которому добавляли тетраметилсилан (из каталога ChemBioTrade, 75-76-3) для калибровки химического сдвига. Далее образец переносили в ампулу для ЯМР диаметром 5 мм, укупоривали и вводили в магнит ЯМР-спектрометра Avance Bruker DPX-300 для регистрации спектра при 40 °С с рабочей частотой на протонах 300 МГц.

Менее трудоёмким и более распространённым методом подтверждения подлинности химического соединения является метод абсорбционной спектрофотометрии (ОФС.1.2.1.1.0003.15). Спектр поглощения раствора ФС в хлороформе должен иметь максимумы при 366±2 нм, 551±2 нм, 825±2 нм. УФ-спектры поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца катионного производного БПИ, зарегистрированные при температуре 20 °С в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно хлороформа, в области длин волн от 190 до 900 нм должны иметь идентичные максимумы.

Около 100 мг (точная навеска) испытуемого образца помещали в мерную колбу, растворяли в хлороформе (х.ч., «ЛаборКомплект», Россия) и доводили до метки тем же растворителем (Раствор А). Аликвоту пробы 125 мкл помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки хлороформом хлороформом (Раствор, Россия) (Раствор В). Спектр поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-104 фирмы «Аквилон» при термостатировании до 20 °С в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно хлороформа в области длин волн от 190 до 900 нм. На рисун-

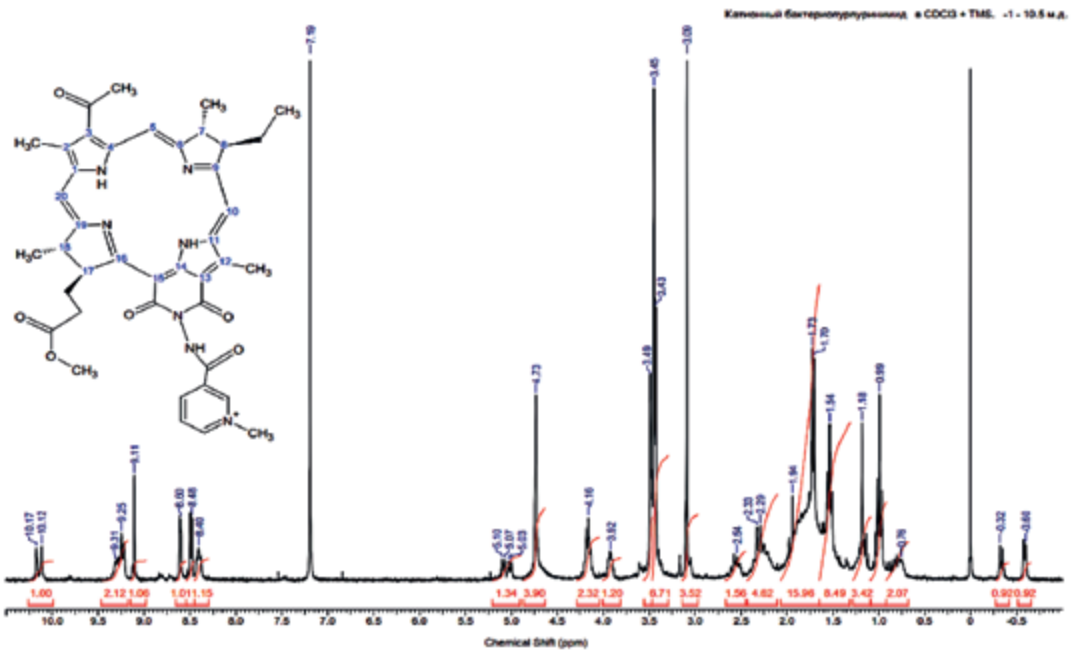


Рисунок 1. ^{1}**Н-ЯМР-спектр катионного производного БПИ**

ке 2 представлен УФ-спектр катионного производного БПИ.

Идентификация родственных примесей проводится для осуществления контроля за наличием продуктов возможного разложения ФС и технологических примесей, возникновение которых обусловлено технологией производства. Примеси могут представлять собой соединения с установленным химическим строением (идентифицированные) и соединения, строение которых неизвестно (неидентифицированные). Параметры содержания родственных примесей в ФС устанавливаются в зависимости от их безопасности.

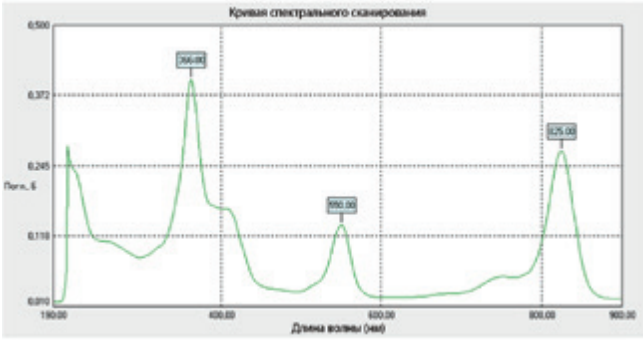


Рисунок 2. УФ-спектр катионного производного БПИ

Для контроля уровня примесей обычно используют хроматографические методы с использованием стандартных образцов и реже спектроскопические методы.

Определение родственных примесей в ФС проводят с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии с ГФ XIII, Т. 1, С. 496 с последующим расчётом при помощи метода внутренней нормировки. Типичная хроматограмма испытуемого раствора представлена на рисунке 3.

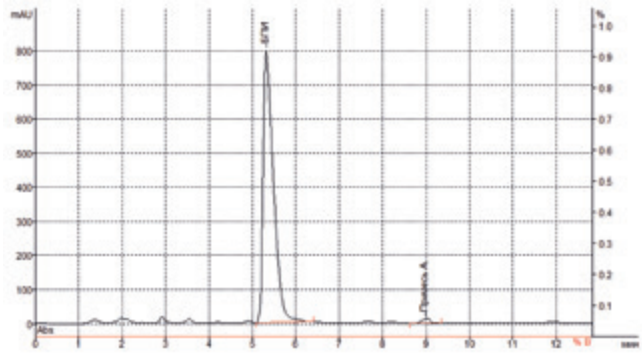


Рисунок 3. Типичная хроматограмма катионного производного БПИ, полученная в ходе анализа методом ВЭЖХ

Стандарт:

стандартный образец метилового эфира (N'-никотинил)-N-аминобактериопурпуринимида (98,4%, МТУ, Россия).

Реактивы:

– вода (Milli-Q);

– пентилсульфоната натрия (х.ч., «Диафарм СМ», Россия);

– ацетонитрил для ВЭЖХ (Scharlau, № AC03292500).

Подвижную фазу А получают следующим образом. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 870+0,5 мг пентилсульфоната натрия, приливают 100–200 мл дистиллированной воды, тщательно пере-

мешивают и доводят объём раствора до метки дистиллированной водой. Доводят pH до 3,5 ортофосфорной кислотой.

Для получения подвижной фазы В смешивали 400 мл подвижной фазы А и 600 мл ацетонитрила. Полученный раствор фильтровали и дегазировали.

В качестве холостой пробы использовали подвижную фазу.

Изначально для приготовления испытуемого раствора брали навеску 5,0 мг испытуемого образца вследствие отсутствия достаточного количества вещества после синтеза, помещали в мерную пробирку «Эппендорф» вместимостью 1,5 мл, растворяли в 0,5 мл ацетонитрила и доводили ПФ А до метки 1 мл. Полученный раствор тщательно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре 5 мин. Концентрация раствора – 5,0 мг/мл.

В дальнейшем благодаря более точному проведению синтеза появилась возможность получать испытуемое вещество в больших количествах. Поэтому для приготовления испытуемого раствора брали навеску 50,0 мг испытуемой субстанции, помещали в мерную колбу объемом 10 мл, растворяли в 5 мл ацетонитрила и доводили ПФ А до метки. Полученный раствор тщательно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре 5 мин. Концентрация раствора оставалась неизменной – 5,0 мг/мл.

Хроматографические условия.

– Колонка Luna C18(2), размер зерна – 5 µ, 150×4,6 мм (Phenomenex).

– Соотношение подвижных фаз А:В – 40:60.

– Скорость потока – 1 мл/мин.

– Используется изократический режим элюирования.

– Детектор спектрофотометрический.

– Длина волны – 360 нм.

– Температура колонки – 30 °С.

– Количество образца – 20 мкл.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

1. Эффективность колонки по пику метилового эфира (N'никотинил)-N-бактериопурпуринимида на хроматограммах стандартного раствора должна составлять не менее 5000 теоретических тарелок;
2. Относительное стандартное отклонение площадей пиков метилового эфира (N'никотинил)-N-бактериопурпуринимида на хроматограммах стандартного раствора № 1 должно составлять не более 5%.

В хроматограф, выведенный на рабочий режим, вводили раствор холостой пробы. На хроматограмме отмечали системные пики. В хроматограф, выведенный на рабочий режим, вводили испытуемый раствор. Идентифицировали компоненты и определяли их площади. Системные пики, присутствующие на хроматограмме раствора холостой пробы, не учитываются. Определяли параметры пригодности системы. Каждый из растворов вводили не менее 5 раз.

Метод внутренней нормализации предполагает, что пики всех возможных компонентов смеси зафиксированы на хроматограмме и сумма их площадей (S_i) равна 100%. Различия в чувствительности детектора к разным компонентам учитывается введением поправочных коэффициентов (K_i). Расчет проводили *по формуле:*

$$X(\%) = \frac{S_i \cdot K_i}{\sum_{i=1}^{n} (S_i \cdot K_i)} \cdot 100,$$

где n – число компонентов смеси; S_i – площадь хроматографического пика; K_i – поправочные коэффициенты для каждого *i*-го компонента.

В настоящее время катионное производное БПИ находится на стадии доклинических исследований, продолжается активное изучение свойств его возможных примесей. На данный момент установлено, что определяемая родственная примесь не является высокотоксичной, представляя собой исходный компонент последней стадии синтеза катионного производного БПИ. В рамках проводимых исследований эмпирически при соблюдении вышеописанных условий ВЭЖХ анализа было выявлено, что в катионном производном БПИ количественное содержание примеси метилового эфира (N'-никотинил)-N-аминобактериопурпуринимида должно быть не более 0,5%, а количество неидентифицированных примесей – не более 2%.

Испытание, проводимое для определения потери в массе при высушивании, вводят для контроля уровня влажности и возможного содержания летучих веществ в субстанции (растворители, используемые в синтезе).

Точную навеску испытуемого вещества помещали в предварительно высушенный до постоянной массы и взвешенный бюкс. Пробу сушили с открытой крышкой бюкса в защищенном от света месте до постоянной массы. Открытый бюкс вместе с крышкой помещали в эксикатор для охлаждения на 50 мин, после чего закрывали крышкой и взвешивали. Последующие взвешивания проводили после каждого часа дальнейшего высушивания до достижения постоянной массы.

Содержание сульфатной золы в ФС, как правило, не должно превышать 0,1%, что контролируется стандартным методом, описанным в фармакопейной статье ОФС.1.2.2.2.0014.15. Контроль содержания сульфатной золы позволяет судить о загрязненности ФС ионами металлов.

Фарфоровый тигель прокаливали при температуре 550–650 °С в течение 30 мин, охлаждали в лабораторном эксикаторе фирмы SciLabware (Великобритания) над силикагелем (СТО 61182334-004-2011) и взвешивали по окончании прокаливания.

Точную навеску испытуемого вещества (около 1 г) помещали в предварительно прокаленный тигель, смачивали 1 мл серной концентрированной кислоты (х.ч., «ТРАНСКЕМИКЛ-экспресс», Россия) и осторожно (избегая сильного вспенивания вещества) нагревали на электрической плитке с закрытым нагревательным элементом и терморегулятором до обугливания. После охлаждения смачивали остаток 1 мл серной концентрированной кислотой и осторожно нагревали до удаления паров серной кислоты. Затем тигель помещали в лабораторную муфельную печь фирмы «Сикрон» и прокаливали при температуре 550–650 °С до тех пор, пока остаток полностью не превратился в пепел. По окончании прокаливания тигель охлаждали в эксикаторе фирмы SciLabware (Великобритания), взвешивали и рассчитывали процентное содержание остатка.

Определение предела содержания тяжелых металлов в ФС основано на максимальной суточной дозе препарата, произведенного из данной ФС, и длительности его возможного применения. Содержание тяжелых металлов в ФС не должно превышать 0,001% (ОФС.1.2.2.2.0012.15).

Готовили испытуемый раствор. Для этого зольный остаток, полученный после сжигания 1 г испытуемого образца в присутствии серной кислоты концентрированной, обрабатывали при нагревании на сетке 2 мл насыщенного раствора аммония ацетата (AppliChem, A4716,0250), нейтрализованного раствором натрия гидроксида («ТРАНСКЕМИКЛ-экспресс», Россия), прибавляли 3 мл воды дистиллированной и фильтровали в пробирку через беззольный фильтр, предварительно промытый 1% раствором уксусной кислоты («ТРАНСКЕМИКЛ-экспресс», Россия), а затем – горячей водой дистиллированной. Тигель и фильтр промывали 5 мл воды дистиллированной, пропуская её через тот же фильтр в ту же пробирку.

Приготовление эталонного раствора 1 состоит в том, что в тигель помещали серную концентрированную кислоту в количестве, взятом для сжигания испытуемого образца, и далее поступали, как с испытуемым образцом, но промывание тигля и фильтра производили лишь 3 мл воды дистиллированной, после чего к фильтрату прибавляли 2 мл стандартного раствора иона свинца с концентрацией 5 мкг/мл (ГСО 7252-96, «Уральский завод химических реактивов», Россия).

Готовили эталонный раствор 2. Для этого в тигель помещали серную кислоту концентрированную в количестве, взятом для сжигания испытуемого образца, и далее поступали, как с испытуемым образцом, но промывание тигля и фильтра производили лишь 3 мл воды дистиллированной, после чего к фильтрату прибавляли 2 мл стандартного раствора иона свинца с концентрацией 10 мкг/мл (ГСО 7252-96, «Уральский завод химических реактивов», Россия)

Контрольный раствор готовили так же, как и испытуемый раствор, но без испытуемого образца.

К полученным растворам прибавляли по 1 мл разведенной 30% уксусной кислоты («ТРАНСКЕМИКЛ-экспресс», Россия), 2 капли 2% раствора натрия сульфида, перемешивали и через 1 мин сравнивали окраску растворов. В сравниваемых растворах допустима слабая опалесценция от выделившейся серы.

При проведении испытания ФС на остаточные количества органических растворителей следует учитывать следующее. Содержание растворителей 1 класса токсичности всегда контролируется независимо от стадии их использования. Присутствие растворителей 2 класса токсичности обязательно должно контролироваться при их применении на последней стадии производства ФС, а для используемых не на последней стадии в нормативной документации должен быть предусмотрен контроль их остаточного содержания либо должно быть приведено обоснование отсутствия соответствующего контроля. В ФС контроль растворителей 3 класса токсичности необходим, если они используются на последней стадии производства.

Поскольку при синтезе катионного производного БПИ были использованы растворители 2 класса токсичности (пиридин, хлороформ) и растворитель с недостаточно обоснованной токсичностью (н-гексан), их остаточное количество должно контролироваться.

Определение остаточного содержания каждого из растворителей проводили с использованием газожидкостной хроматографии (ГЖХ).

Испытание для пиридина проводили на газовом хроматографе «Кристаллюкс-4000М» («Аквилон», Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение компонентов выполняли на колонке ZB-WAX с размером 30 м х 0,25 мм и номинальной толщиной пленки 0,25 мкм.

Реактивы:

этанол-ректификат (ГОСТ 5964-93).

Стандартный образец:

пиридин (№ L04893, AlfaAesar, Германия).

Для приготовления стандартного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл вносили 50 мг пиридина, прибавляли 80 мл этанола-ректификата, растворяли и доводили этанолом-ректификатом до метки. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили этанолом-ректификатом до метки.

Для приготовления испытуемого раствора в мерную колбу вместимостью 10 мл вносили 500 мг испытуемого образца, прибавляли 8 мл этанола-ректификата, растворяли и доводили этанолом до метки.

Хроматографические условия:

Термостат при t=35–300 °С.

Температура колонки – 200 °С.

Температура испарителя – 250 °С.

Температура детектора – 260 °С.

Газ-носитель – гелий.

Давление на входе в колонку – 10 psi.

Деление потока – 1/10.

Расход водорода – 30 мл/мин.

Расход воздуха – 300 мл/мин.

Объем анализируемой пробы – 1,0 мкл.

Продолжительность анализа – 10 мин.

Перед началом испытания проводили проверку пригодности хроматографической системы. В хроматограф, выведенный на рабочий режим, последовательно вводили 5 раз стандартный раствор. Хроматографическая система считается пригодной для анализа при выполнении следующих условий:

1) эффективность колонки по пику пиридина на хроматограммах стандартного раствора составляет не менее 3000 теоретических тарелок;
2) хвостовой фактор для пика определяемого вещества на хроматограмме стандартного раствора составляет не более 2;
3) среднеквадратичное отклонение площади пика пиридина на 5 хроматограммах стандартного раствора составляет не более 5%.

Для определения остаточного содержания пиридина в ФС в колонку хроматографа последовательно вводили стандартный раствор и испытуемый раствор по 5 раз каждый.

Типичная хроматограмма испытуемого раствора представлена на рисунке 4.

Содержание пиридина в исследуемом образце (X, %) определяли по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 10 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 100 \cdot 50 \cdot a_1 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot 500},$$

где S_1 – площадь пика примеси пиридина на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика пиридина на хроматограмме стандартного раствора; a_1– навеска испытуемого образца, мг; a_0 – навеска стандартного образца, мг; P – содержание основного вещества в стандартном образце, %.

Эмпирическим путём на данном этапе исследований было установлено, что содержание пиридина в ФС должно быть не более 0,02% (200 ppm).

Испытание для хлороформа проводили на газовом хроматографе «Кристаллюкс-4000М» («Аквилон», Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение компонентов выполняли на капиллярной колонке SPB-624 (неподвижная фаза: 6% полицианопропилфенилсилоксана и 94% полидиметилсилоксана) размером 30 м х 0,53 мм и номинальной толщиной пленки 3 мкм или аналогичной. Температура колонки программируется от 40 °С (задержка 5 мин) до 150 °С со скоростью нагрева 12 °С/мин (задержка 5 мин).

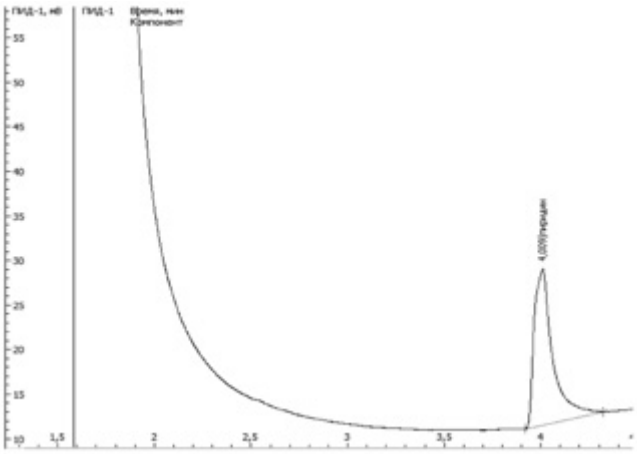


Рисунок 4. Типичная хроматограмма катионного производного БПИ, полученная в ходе анализа остаточного содержания пиридина методом ГЖХ

Реактивы:

метанол (х.ч., «Химреактив», Россия).

Стандартный образец:

хлороформ (х.ч., Merck, кат. № 102445).

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 60 мг стандартного образца хлороформа и растворяли в метаноле, объем раствора доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили метанолом до метки, тщательно перемешивали. 0,1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, перемешивали и доводили метанолом до метки. Раствор использовали свежеприготовленным.

Для приготовления испытуемого раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 10 мг (точная навеска) исследуемого вещества и растворяли в метаноле, объем раствора доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Хроматографические условия:

Температура инжектора – 150 °С.

Температура детектора – 250 °С.

Газ-носитель – азот.

Поток газа-носителя – 30 мл/мин.

Поток водорода – 30 мл/мин.

Поток воздуха – 300 мл/мин.

Объем вводимой пробы – 1 мкл.

Перед началом испытания проводили проверку пригодности хроматографической системы. Для этого в хроматограф вводили 5 раз стандартный раствор и записывали хроматограммы. Хроматографическая система считается пригодной для анализа при выполнении следующих условий:

1) для пика хлороформа относительное стандартное отклонение должно быть не более 5%;

2) коэффициент асимметрии должен быть не более 3;

3) эффективность колонки по пику хлороформа не менее 5000 теоретических тарелок.

Для определения остаточного содержания хлороформа в анализируемом образце в колонку хроматографа последовательно вводили стандартный раствор и испытуемый раствор по 5 раз каждый.

Типичная хроматограмма испытуемого раствора представлена на рисунке 5.

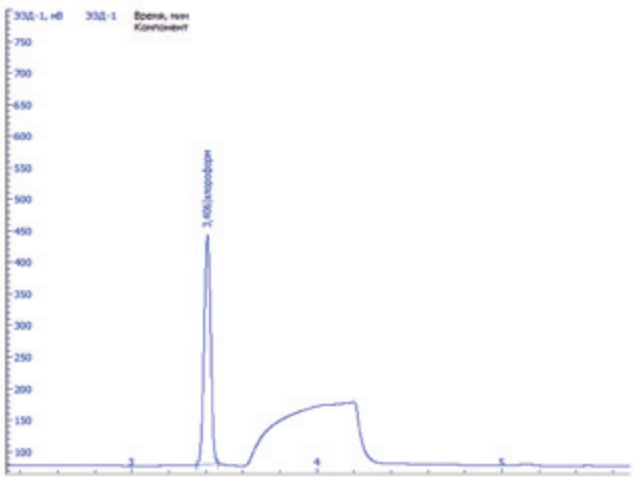


Рисунок 5. Типичная хроматограмма катионного производного БПИ, полученная в ходе анализа остаточного содержания хлороформа методом ГЖХ

Содержание хлороформа в исследуемом соединении (X) в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot 10000},$$

где S_1 – площадь пика хлороформа на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика хлороформа на хроматограмме стандартного раствора; a_1 – навеска испытуемого образца, мг; a_0 – навеска стандартного образца, мг; P – содержание хлороформа в стандартном образце, %.

Эмпирическим путём на данном этапе исследований было установлено, что содержание хлороформа в ФС должно быть не более 0,006% (60 ppm).

Для определения содержания н-гексана в исследуемом соединении применяли газовый хроматограф «Кристаллюкс-4000М» («Аквилон», Россия) с пламенно-ионизационным детектором. Разделение компонентов выполняли на капиллярной колонке SPB-624 (неподвижная фаза: 5% полицианопропилфенилсилоксана и 95% полидиметилсилоксана) размером 30 м х 0,53 мм и номинальной толщиной пленки 3 мкм или аналогичной. Температура колонки программируется от 40 °С (задержка 5 мин) до 150 °С со скоростью нагрева 5 °С/мин (задержка 5 мин).

Реактивы:

этанол-ректификат (ГОСТ 5964-93).

Стандартный образец:

н-гексан (ч.д.а., Acros CAS N: 110-54-3).

Для приготовления стандартного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 290 мг (точная навеска) *н*-гексана и растворяли в 100 мл этанола-ректификата, объем раствора доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, и доводили объем раствора до метки этанолом-ректификатом и перемешивали. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, перемешивали и доводили этанолом-ректификатом до метки. Раствор использовали свежеприготовленным.

Для приготовления испытуемого раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 10 мг (точная навеска) исследуемого образца и растворяли в этаноле-ректификате, объем раствора доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Хроматографические условия:

Температура инжектора – 175 °С.

Температура детектора – 250 °С.

Газ-носитель – азот.

Поток газа-носителя – 30 мл/мин.

Поток водорода – 30 мл/мин.

Поток воздуха – 300 мл/мин.

Объем вводимой пробы – 1 мкл.

Перед испытанием проводили тестирование пригодности хроматографической системы. В хроматограф вводили стандартный раствор 5 раз и записывали хроматограммы. Хроматографическая система считается пригодной для анализа при выполнении следующих условий:

1) для пика *н*-гексана относительное стандартное отклонение должно быть не более 15%;

2) коэффициент асимметрии должен быть не более 3;

3) эффективность колонки по пику *н*-гексана не менее 5000 теоретических тарелок.

Для определения содержания *н*-гексана в анализируемом образце в колонку хроматографа последовательно вводили стандартный раствор и испытуемый раствор по 5 раз каждый.

Типичная хроматограмма испытуемого раствора представлена на рисунке 6.

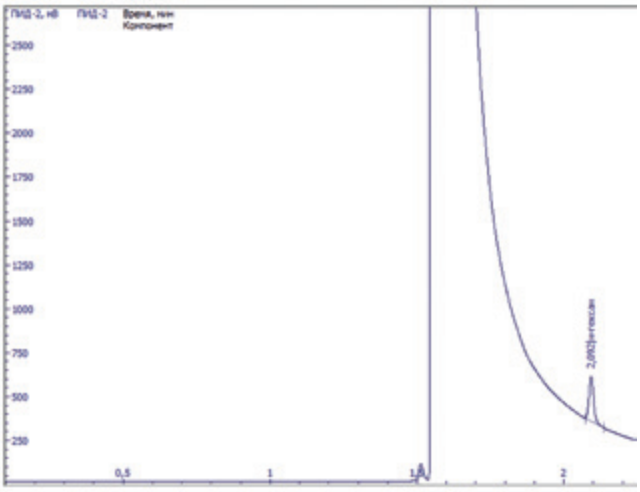


Рисунок 6. Типичная хроматограмма катионного производного БПИ, полученная в ходе анализа остаточного содержания *н*-гексана методом ГЖХ

Содержание *н*-гексана в исследуемом образце (X) в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_1 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_1 \cdot 10000},$$

где S_1 – площадь пика *н*-гексана на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика *н*-гексана на хроматограмме стандартного раствора; V – объем *н*-гексана, взятый для приготовления стандартного раствора, a_1 – субстанции испытуемого образца, г; a_0 – навеска стандартного образца, мг; P – содержание *н*-гексана в стандартном образце, %.

Эмпирическим путём на данном этапе исследований было установлено, что содержание *н*-гексана в ФС должно быть не более 0,029% (290 ppm).

ФС катионного производного БПИ в дальнейшем планируется использовать для создания парентеральной стерильной лекарственной формы, поэтому необходимо провести анализ на микробиологическую чистоту и содержание бактериальных эндотоксинов.

Микробиологическая чистота катионного производного БПИ как фармацевтической субстанции должна соответствовать требованиям категории 1.2. Б согласно ОФС.1.2.4.0002.15. Для проведения анализа на содержание бактериальных эндотоксинов готовили исходный раствор ФС в диметилсульфоксиде с концентрацией 1 мг действующего вещества на 0,5 мл, а затем разводили его не менее чем в 20 раз (ГФ XIII, Т. 1, С. 956). Предельное содержание бактериальных эндотоксинов в субстанции должно составлять не более 5 ЕЭ/мг.

Ещё одним важнейшим параметром, необходимым для стандартизации катионного производного БПИ в качестве ФС, является его количественное определение. На основании данного показателя можно установить содержание катионного производного БПИ в испытуемом образце. Это не только помогает зарегистрировать чистоту и соответствие анализируемого вещества стандартному, но и позволит в дальнейшем при использовании стандартизуемой ФС для создания лекарственной формы нормировать дозировку препарата.

Для количественного определения стандартизуемого образца благодаря доступности, малой трудоёмкости и возможности применения для качественного анализа был выбран метод УФ-спектроскопии.

Около 10 мг (точная навеска) анализируемого образца помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 5 мл хлороформа, доводили до метки тем же растворителем и перемешивали. Измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре СФ-104 фирмы «Аквилон» при максимуме 825±2 нм, при котором проявляется биологическая активность исследуемого соединения при использовании для ФДТ.

Количественное содержание (X) катионного производного бактериопурпуринимида в анализируемом образце в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot V \cdot 100 \cdot (100 - W)}{k \cdot a},$$

где A – оптическая плотность раствора катионного производного БПИ при λ=825±2 нм; k – коэффициент экстинкции, равный 0,9964; V – объём испытуемого раствора, мл; a – масса пробы испытуемого образца, мг.

Испытуемый образец должен содержать не менее 90,0% и не более 110,0% в пересчёте на сухое вещество.

Описываемые показатели позволяют с наибольшей точностью определить соответствие качества ФС на основе катионного производного БПИ установленным стандартам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антимикробная ФДТ является достаточно перспективным методом для борьбы с патогенной микрофлорой на основании использования положительно

заряженного производного порфирина – катионного производного бактериопурпуринимида в качестве ФС.

Для того чтобы с наибольшей точностью охарактеризовать катионное производное БПИ как фармацевтическую субстанцию, был исследован ряд параметров, регламентируемых Государственной фармакопеей РФ XIII издания в качестве наиболее значимых и необходимых для стандартизации ФС, которое в дальнейшем планируется использовать для получения парентеральной лекарственной формы.

На основании исследований, проведенных с применением наиболее современных, точных и пригодных для анализа методов, по каждому из испытуемых показателей были получены соответствующие экспериментальные данные, на основании которых был разработан проект спецификации на продукт, представленный в таблице 1.

Полученные данные представляют собой научную и техническую ценность, являясь материалом, не только позволяющим оценить качество получаемого катионного БПИ, но и предоставляющим возможность приступить к дальнейшему получению и изучению лекарственной формы на основе данного соединения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований полученное на основе порфирина химическое соединение, представляющее собой производное бактериохлорофилла *a* – метилового эфира 13^3-N-(N-метилникотинил) бактериопурпуринимида, было стандартизовано в качестве фармацевтической субстанции и может в дальнейшем применяться в новых лекарственных формах, в частности для антимикробной ФДТ.

Работа выполнена в рамках гранта президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ РФ (НШ-7946.2016.11).

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея РФ, XIII издание. – М.: ФЭМБ, 2015. 1294 с.
2. А.Т. Солдатенков, Н.М. Колядина, И.В. Шендрик. Основы органической химии лекарственных веществ. – М.: Мир, 2007. 192 с.
3. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – С.: НИИАХ СГМА, 2002. 586 с.
4. T. Maisch. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment // Mini-reviews in Medicinal Chemistry. 2009. V. 9. P. 947–983.
5. J.M. Lim, Z.S. Yoon, J.-Y. Shin, K.S. Kim, M.-C. Yoon, D. Kim. The photophysical properties of expanded porphyrins: relationships between aromaticity, molecular geometry and non-linear optical properties // Chemical Communications. 2008. V. 3.
6. А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. Микробиология. 3-е изд., испр. – М.: Академия, 2009. 352 с.
7. T. Dai, Y.-Y. Huang, M. Hamblin. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2009. V. 6. P. 170–188.
8. М.Г. Страховская, Н.С. Беленикина, В.В. Никитина, С.Ю. Коваленко, И.Б. Коваленко, А.В. Аверьянов, А.Б. Рубин. Перспективный фотосенсибилизатор для антимикробной фотодинамической терапии // Клиническая практика. 2013. № 1. С. 25–30.
9. X. Ragàs, D. Sánchez-García, R. Ruiz-González, T. Dai, M. Agut, R. Hamblin, S. Nonell Cationic. Porphycenes as Potential Photosensitizers for Antimicrobial Photodynamic Therapy // Journal of Medical Chemistry. 2010. V. 53. P. 7796–7803.

Таблица 1.

Проект спецификации на ФС катионное производное БПИ

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный	Кристаллический порошок от бордового до тёмно-бордового цвета
Растворимость	ГФ XIII	Растворим в хлороформе, этаноле, малорастворим в этилацетате, практически нерастворим в воде
Подлинность	^{1}H-ЯМР-спектроскопия	^{1}H-ЯМР-спектр 2% раствора субстанции, зарегистрированный в $CDCl_3$, по положению, интегральным интенсивностям, мультиплетности и химическим сдвигам сигналов должен соответствовать прилагаемому спектру (рисунок 1)
	Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях	Спектр поглощения 0,01 мг/мл субстанции в хлороформе в области от 190 до 900 нм должен иметь максимумы поглощения при 366±2 нм, 551±2 нм, 825±2 нм (рисунок 2)
Родственные примеси	ВЭЖХ	Метиловый эфир (N′-никотинил)-N-аминобактериопурпуринимида – не более 0,5%. Неидентифицированные примеси – не более 2%
Сульфатная зола	ГФ XIII	Не более 0,1%
Тяжелые металлы	ГФ XIII	Не более 0,001%
Потеря в массе при высушивании	ГФ XIII	Не более 5,0%
Остаточные органические растворители	ГЖХ	Пиридин – не более 0,02%. Хлороформ – не более 0,006%. *H*-гексан – не более 0,029%
Микробиологическая чистота	ГФ XIII	Категория 1.2 Б
Бактериальные эндотоксины	ГФ XIII	Не более 5 ЕЭ/мг
Количественное определение	Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях	Не менее 90,0% и не более 110,0% в пересчёте на сухое вещество
Упаковка	По 100 мг во флаконе из темного стекла	
Маркировка	В соответствии с нормативной документацией (НД)	
Хранение	В сухом темном месте при температуре от 2 до 8 °С	
Срок годности	1 год	



BUCHI
SWITZERLAND

Добро пожаловать в наномир
Субмикронные частицы диаметром 200 нм - 5 мкм

Новая распылительная сушилка Nano Spray Dryer B-90 HP – идеальный способ преобразования жидкого образца в порошок.

- Создание субмикронных частиц из небольших объемов образца.
- Защита ценного образца благодаря бережным условиям процесса.
- Безопасная работа с органическими растворителями.
- Высокая производительность сушки.

Официальный дистрибьютор BUCHI:
8 495 252 00 98 (Центральный офис в Москве)
8 800 333 42 24 (Бесплатный звонок по России)
info@phct.ru || www.phct.ru

Фармконтракт
группа компаний

www.buchi.com/nano

Quality in your hands

УДК 615.07

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ГИДРОФИЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ПАРАБЕНОВ

А.С. Осипов[1]*, О.А. Попова[1], А.И. Сулименкова[1], М.В. Нездольева[1]

Резюме. Исследована возможность применения хроматографической колонки Zorbax NH_2, 150×4,6 мм (5 мкм), для разделения эфиров 4-гидроксибензойной кислоты (парабенов). Разделение анализируемых соединений на колонках с аминосорбентами в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий возможно при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 95%. Разрешение между пиками парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий существенно меньше, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии. В отличие от аминогрупп нитрильные группы колонки Zorbax XDB CN практически не обладают сродством к фенольным гидроксильным группам парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. Хроматографическая колонка Zorbax NH_2 может быть использована для определения нормируемой примеси в парабенах – эфирах 4-гидроксибензойной кислоты [подвижная фаза: ацетонитрил – 1% уксусная кислота в воде (80:20)].

Ключевые слова: ВЭЖХ, жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий, эфиры 4-гидроксибензойной кислоты (парабены); Фармакопея США, Европейская Фармакопея.

APPLICATION OF HYDROPHYILIC INTERACTIONS LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR PARABENS ANALYSIS

A.S. Osipov[1]*, O.A. Popova[1], A.I. Sulimenkova[1], M.V. Nezdolieva[1]

Abstract. There are results of the possibility of applying a chromatographic column Zorbax NH_2 150x4,6 mm (5 μm) to separate the esters of 4-hydroxybenzoic acid (parabens). Separation of test compounds on the column with aminosorbents in hydrophilic interaction chromatography is possible at a content of more than 95% of acetonitrile in the mobile phase. The resolution between peaks of parabens in a hydrophilic interaction liquid chromatography is substantially less than in a reverse-phase chromatography. In contrast to the amino nitrile groups Zorbax XDB CN columns practically haven't affinity for the phenolic hydroxyl groups of parabens in a hydrophilic interaction liquid chromatography. Chromatography column Zorbax NH_2 can be used to detect a normalized impurity in paraben – 4-hydroxybenzoic acid [mobile phase: acetonitrile – 1% acetic acid in water (80:20)].

Keywords: HPLC, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC), 4-Hydroxybenzoic Esters (Parabens), United States Pharmacopeia; European Pharmacopeia.

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123182, Россия, г. Москва, ул. Щукинская, д. 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, 127051, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: Osipov@expmed.ru
Тел.: 8 (495) 234 61 04 доб. 31-03

ВВЕДЕНИЕ

Эфиры пара-гидроксибензойной кислоты (название соединений по Европейской Фармакопее), или парабены (название соединений по Фармакопее США), применяют главным образом при изготовлении суспензий и микстур, а также в парфюмерной промышленности в качестве антимикробных консервантов. Наиболее часто применяют метилпарабен (нипагин) и пропилпарабен (нипазол), их обычно используют совместно в соотношении по массе 4:1. Кроме того, бутилпарабен применяют в качестве пластификатора при изготовлении лекарственных форм. Условия хроматографирования парабенов полностью гармонизированы в соответствующих фармакопейных статьях Европейской Фармакопеи и Фармакопеи США. Следует, однако, отметить, что наряду с нейтральными (фенольными) формами парабенов в Фармакопее США описаны натриевые (растворимые) формы парабенов [1, 2]. В монографиях зарубежных фармакопей приведена методика хроматографирования парабенов на колонках С18, 150×4,6 мм (5 мкм), при длине волны 272 нм. В качестве подвижной фазы применяют смесь 6,8 г/л KH_2PO_4 в воде – метанол (35:65). Скорость потока – 1,3 мл/мин. Данные условия хроматографирования применяют при анализе метил-, этил- и пропилпарабенов. При анализе бутилпарабена соотношение компонентов подвижной фазы – 50:50. Изменение состава подвижной фазы вызвано необходимостью определения специфичной примеси в консерванте – изобутилпарабена [3]. Во всех монографиях на парабены нормируется содержание 4-гидроксибензойной кислоты (примеси А). Следует отметить, что в условиях предложенных фармакопейных методик

4-гидроксибензойная кислота элюируется с колонки до парабенов (относительное время удерживания – 0,1 относительно бутилпарабена). Данные хроматографические методики являются примером обращенно-фазовой хроматографии.

По причине присутствия фенольных гидроксильных групп в молекулах анализируемых соединений и в антиоксидантах бутилгидроксианизоле и бутилгидрокситолуоле [4, 5] можно ожидать схожести поведения парабенов и этих антиоксидантов на колонках с аминосорбентами в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий [6].

Цель работы – исследование возможности применения жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) для анализа парабенов в лекарственных препаратах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась с использованием хроматографа Agilent, серия 1100, с диодно-матричным детектором (Agilent Technologies, США). Разделение парабенов осуществляли на следующих колонках: Zorbax XDB C18, 150×4,6 мм (5 мкм); Zorbax XDB CN, 150×4,6 мм (5 мкм); Zorbax NH_2, 150×4,6 мм (5 мкм) (Agilent Technologies, США).

Детектирование осуществляли при 260 и 272 нм (детектор DAD G1515B). Скорость потока элюента – 1,0 мл/мин. Ввод образцов в объёме 5 мкл. В работе использовали стандартные образцы метил-пара-гидроксибензоата (серия 4,0; 99,8%), этил-пара-гидроксибензоата (серия 2,8; 99,8%) Европейской Фармакопеи, стандартный образец пропилпарабена (серия J1J025; 100,0%) Фармакопеи США. Стандартный образец *n*-бутил-4-гидроксибензоата (бутилпарабен), 99,0%, серия 1028679 (ABCR GmbH, Германия). Стандартный образец 4-гидроксибензойной кислоты н-гептилового эфира (*н*–гептилпарабен), 99,0%, серия 20608 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Германия). Стандартный образец 4-гидроксибензойной кислоты, 99,0%, серия STBC6703V (Sigma-Aldrich, США). Стандартные образцы растворяли в смеси ацетонитрил – вода (95:5) (хроматография гидрофильных взаимодействий) либо ацетонитрил – вода (50:50) (обращенно-фазовая хроматография). Перед введением в хроматограф все пробы центрифугировали при 11 тыс. об/мин в течение 7 мин (центрифуга ELMI CM 50, Латвия).



ВЭЖХ Agilent 1260

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий свойства колонок с аминосорбентами могут быть в зависимости от анализируемых объектов как близки [7, 8], так и кардинально отличаться от колонок с нитрильными сорбентами [6, 9]. В таблице 1 приведены некоторые результаты хроматографирования модельной смеси парабенов в условиях обращенно-фазовой хроматографии [на колонках Zorbax XDB C18, 150×4,6 мм (5 мкм), и Zorbax XDB CN, 150×4,6 мм (5 мкм)] и хроматографии гидрофильных взаимодействий [на колонке Zorbax NH_2, 150×4,6 мм (5 мкм)].

Следует отметить, что отклик детектора при 260 нм в 1,6 раза больше, чем при детектировании парабенов при 272 нм; учитывая невысокое содержание парабенов в лекарственных препаратах, детектирование при 260 нм более предпочтительно.

На рисунке 1 приведена хроматограмма разделения модельной смеси парабенов в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий. Следует отметить, что при этом меняется очерёдность элюирования анализируемых соединений по сравнению с обращённо-фазовой хроматографией. Также необходимо отметить, что разрешение между пиками анализируемых парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий существенно меньше, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии (таблица 1, рисунок 2). Полученные данные указывают, что применение данной разновидности хроматографии для анализа гомологического ряда парабенов нерационально. Напротив, на колонке с аминосорбентом Zorbax NH_2 нормируемая примесь в парабенах – 4-гидроксибензойная кислота – может быть уверенно проанализирована (рисунок 3). Данная примесь элюируется позже парабенов, которые в условиях анализа 4-гидроксибензойной кислоты практически не удерживаются хроматографической колонкой. В свою очередь, в условиях разделении парабе-

нов при проведении гидрофильной хроматографии 4-гидроксибензойная кислота не вымывается с хроматографической колонки за время проведения измерений. Следует отметить, что с увеличением доли ацетонитрила в подвижной фазе и, соответственно, сокращением доли уксусной кислоты увеличивается время удерживания 4-гидроксибензойной кислоты (таблица 2), что указывает на ионообменный вариант жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. В результате этого процесса 4-гидроксибензойная кислота вытесняется с аминогрупп сорбента уксусной кислотой.

Таблица 1.

Времена удерживания и разрешение между пиками метил-, этил-, бутил- и *н*-гептилпарабена при различных условиях хроматографирования*

Колонка, состав подвижной фазы	Разрешение между пиками метил- и этилпарабена	Разрешение между пиками бутил- и гептилпарабена	Время удерживания метилпарабена, мин	Время удерживания бутилпарабена, мин	Время удерживания *н*-гептилпарабена, мин
Zorbax XDB C18, 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 50 мМ KH_2PO_4 (4:6)	9,78	16,08	2,94	6,07	69,58
Zorbax XDB CN, 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – вода (4:6)	3,43	5,09	2,72	3,65	8,30
Zorbax NH_2, 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 2 мМ KH_2PO_4 (95:5)	1,57	1,94	5,31	4,79	4,48
Zorbax NH_2, 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 2 мМ KH_2PO_4 (98:2)	1,95	2,07	11,29	10,02	9,29

Примечание: * – средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования.

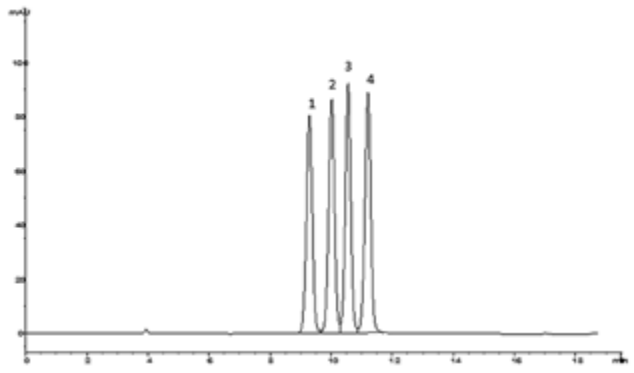


Рисунок 1. Хроматограмма разделения модельной смеси стандартных образцов парабенов. Условия анализа: колонка Zorbax NH_2, 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил – 2 мМ KH_2PO_4 (98:2); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование – 260 нм. 1 – *н*-гептилпарабен, 2 – бутилпарабен, 3 – этилпарабен, 4 – метилпарабен

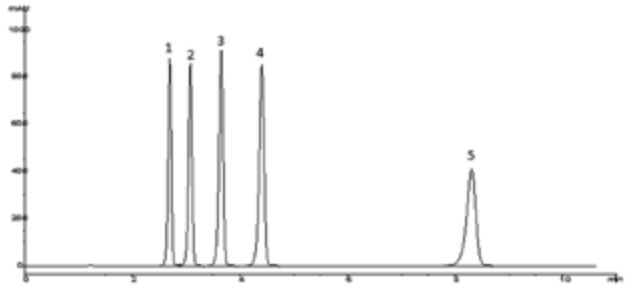


Рисунок 2. Хроматограмма разделения модельной смеси стандартных образцов парабенов. Условия анализа: колонка Zorbax XDB CN, 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил – вода (40:60); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование – 260 нм. 1 – метилпарабен, 2 – этилпарабен, 3 – пропилпарабен, 4 – бутилпарабен, 5 – *н*-гептилпарабен

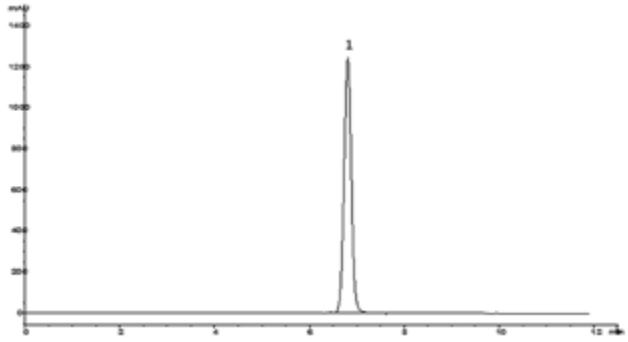


Рисунок 3. Хроматограмма стандартного образца 4-гидроксибензойной кислоты. Условия анализа: колонка Zorbax NH_2, 150×4,6 мм (5 мкм); подвижная фаза: ацетонитрил – 1% уксусная кислота в воде (80:20); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование – 260 нм. 1 – 4-гидроксибензойная кислота

Таблица 2.

Параметры хроматографирования 4-гидроксибензойной кислоты*

Колонка, состав подвижной фазы	Время удерживания 4-гидроксибензойной кислоты, мин	Эффективность колонки по пику 4-гидроксибензойной кислоты (теоретич. тарелок)	Коэффициент асимметрии пика 4-гидроксибензойной кислоты
Zorbax NH_2, 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 1% CH_3COOH (70:30)	4,95	8780	0,97
Zorbax$_2$, 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 1% CH_3COOH (80:20)	6,81	10040	1,01
Zorbax NH_2, 150×4,6 мм (5 мкм); ацетонитрил – 1% CH_3COOH (90:10)	19,91	11010	1,01

Примечание: * – средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования.

В отличие от аминогрупп нитрильные группы практически не обладают сродством к фенольным гидроксильным группам парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. Так, при увеличении содержания ацетонитрила в подвижной фазе с 90% до 99,9% время удерживания метилпарабена на колонке Zorbax XDB CN, 150×4,6 мм (5 мкм), возрастало только с 1,64 мин до 1,73 мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа парабенов нерационально. Разрешение между пиками парабенов в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий существенно меньше, чем в условиях обращенно-фазовой хроматографии. Напротив, на колонке с аминосорбентом Zorbax NH_2 в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий нормируемая примесь в парабенах – 4-гидроксибензойная кислота – может быть уверенно проанализирована. Данная примесь элюируется позже парабенов, которые в условиях анализа 4-гидроксибензойной кислоты практически не удерживаются хроматографической колонкой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monograph: Methyl parahydroxybenzoate // European Pharmacopoeia, ed. 8.0.
2. Monograph: Methylparaben Sodium // United States Pharmacopoeia, 39 ed.
3. Monograph: Butyl Hydroxybenzoate // British Pharmacopoeia, 2012.
4. К.В. Ноздрин, А.А. Великородный, А.С. Осипов, Г.М. Родионова. Оптимизация условий хроматографирования бутилгидроксианизола и бутилгидрокситолуола при совместном присутствии // Фармация. 2007. № 5. С. 7–10.
5. А.С. Осипов, Е.Н. Орлов. Применение колонок с оптически активными сорбентами для разделения позиционных изомеров // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46. № 5. С. 28–31.
6. 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.
7. 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. С. 51–53.
8. 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.
9. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, Л.А. Трухачёва. Применение жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий для анализа органических нитратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 3. С. 108–111.



УДК 547.785.51

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОДУКТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ 1,3-ОКСАЗИНОВ-6-ОНОВ С *N*-НУКЛЕОФИЛЬНЫМИ РЕАГЕНТАМИ

Л.Н. Овсянникова[1]*, Б.Ю. Лалаев[1], И.П. Яковлев[1], Г.В. Ксенофонтова[1]

Резюме. Целью работы было изучение противомикробной и противогрибковой активности продуктов взаимодействия 2,5-замещенных 4-гидрокси-6*H*-1,3-оксазин-6-онов с *N*-нуклеофилами. Активность полученных веществ проверяли на тест-культурах *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и Candida albicans соответственно. У исследуемых соединений выявлен выраженный противогрибковый эффект.

Ключевые слова: 1,3-оксазин-6-оны, бензимидазол-2-илгидразин, бензтиазол-2-илгидразин, 1,2,4-триазол, противомикробная активность, противогрибковая активность.

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE REACTION PRODUCTS OF 1,3-OXAZIN-6-ONES WITH *N*-NUCLEOPHILES

L.N. Ovsyannikova[1]*, B.U. Lalaev[1], I.P. Yakovlev[1], G.V. Ksenofontova[1]

Abstract. The aim of the research was investigation of the antimicrobial and antifungal activity of the reaction products of 2,5-substituted 4-hydroxy-6*H*-1,3-oxazin-6-ones with *N*-nucleophiles. The activity of the obtained substances was tested on the test-cultures *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* и *Candida albicans*, respectively. The significant antifungal effect of the studied compounds was revealed.

Keywords: 1,3-oxazin-6-ones, benzimidazol-2-yl-hydrazine, benzothiazol-2-yl-hydrazine, 1,2,4-triazole, antimicrobial activity, antifungal activity.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

1 – Federal State Educational Institution of Higher Education of St. Petersburg Chemical-Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of Russia, 14, lit. A, St. Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: lilia.ovsyannikova@pharminnotech.com
Тел.: 8 (921) 929 39 17

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время исследования в области химии биологически активных азинов занимают одно из ведущих мест в химии гетероциклических соединений. Наиболее изученной группой среди диазинов являются производные пиримидинов [1]. Среди них наименее изученной группой остаются ненасыщенные оксопроизводные 1,3-оксазинов.

Многие 1,3-оксазин-6-оны используются в качестве исходных соединений для получения разнообразных ациклических и гетероциклических систем, синтез которых другими методами невозможен или многостадиен. Они являются структурными аналогами природных пиримидинов, играющих определяющую роль во многих физиологических процессах живых организмов, и обладают антимикробной, противогрибковой, противовирусной, противоопухолевой активностью. Поэтому поиск новых биологически активных веществ среди продуктов взаимодействия 2,5-замещённых-4-гидрокси-6*H*-1,3-оксазин-6-онов с *N*-нуклеофильными реагентами является актуальной задачей.

Ранее [2, 3] были получены 1,3-оксазины с различными заместителями во втором положении (2-арил, 2-алкилсульфанил, 2-метокси), исследования которых показали, что они обладают анальгетической, седативной, антимикробной активностью. Однако в предыдущих исследованиях некоторые реакции и биологическая активность с *N*-нуклеофильными реагентами не были изучены.

Целью работы явилось изучение биологической активности новых производных 1,2,4-триазолов.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1) синтез новых производных 1,2,4-триазолов;

2) прогноз биологической активности с помощью программы PASS;

3) исследование противомикробной и противогрибковой активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами впервые была изучена реакция 2,5-замещённых-4-гидрокси-6*H*-1,3-оксазин-6-онов (I(а-г)) с бензтиазол-2-илгидразином (II) и бензимидазол-2-илгидразином (III) в среде безводного метанола (х.ч., ЗАО «Вектон», Россия) без нагревания при постоянном перемешивании в течение 40–48 ч. Реакция протекает с раскрытием по C^2 оксазинового цикла и приводит к образованию производного 1,2,4-триазола (IV(а-г), V(а-г)) (рисунок 1).

Строение полученных соединений доказано физико-химическими методами ^{1}H-ЯМР-, ^{13}C-ЯМР-, ИК- и УФ-спектроскопии [4–7].

Среди полученных 1,2,4-триазолов обнаружены соединения с биологической активностью. Из литературных данных среди 1,2,4-триазолов известны вещества с противогрибковой, противовирусной, противораковой, психотропной и другими видами биологической активности. Широко известна группа производных 1,2,4-триазола, применяемых для лечения грибковых заболеваний, – флуконазол, итраконазол и др.

Для прогнозирования различных видов биологической активности все полученные соединения были проанализированы при помощи программы PASS (Prediction of Activity Spectrafor Substances) с использованием веб-сервиса http://pharmaexpert.ru/passonline. Результаты показали высокую вероятность противогрибковой, противомикробной, противовирусной активности. Поэтому полученные 1,2,4-триазолы были исследованы на противомикробную и противогрибковую активности.

Исследования противомикробной активности полученных соединений проведены на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава РФ. Антибактериальную активность исследовали на тест-культурах микроорганизмов *Escherihia coli* штамм АТСС 25922, *Staphylococcus aureus* штамм Р 209. Антимикробное действие полученных соединений определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде – пептонном бульоне (МПБ) с последующим высевом на плотную питательную среду – мясо-пептонный агар (МПА) для определения минимальной подавляющей концентрации исследуемых соединений.

Исходные растворы производных 1,2,4-триазолов готовили в 50%-м водном ДМСО (диметилсульфоксид, х.ч., ЗАО «Вектон», РФ) из-за их ограниченной растворимости в воде.

Для приготовления взвеси бактериальных культур использовали 2-суточные культуры, выращенные на МПА. Готовили взвесь по бактериальному стандарту мутности Мак-Фарланда ($2{\cdot}10^8$ КОЕ/мл), затем полученную суспензию разводили до концентрации 10^6 КОЕ/мл и вносили по 0,1 мл в каждую пробирку ряда. Микробная нагрузка составляла 10^5 КОЕ/мл.

Бактериальные культуры выращивали в течение 24 ч при температуре 37 °С. Антимикробный эффект определяли по отсутствию роста тест-микроорганизма в МПБ при минимальной концентрации вещества, а характер противомикробного действия (бактериостатическое или бактерицидное) – по отсутствию роста на плотной питательной среде.

Исследование противогрибковой активности полученных соединений проводили на тест-культуре *C. albicans* АТСС 885-653 (из коллекции культур ФГБОУ ВО СПХФА). Противогрибковую активность определяли методом двукратных серийных разведений на жидкой питательной среде Сабуро с последующим высевом на плотную питательную среду для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) исследуемых соединений. Исходные растворы производных 1,2,4-триазолов готовили в 50%-м водном диметилсульфоксиде из-за их ограниченной растворимости в воде.

Для приготовления взвеси дрожжевых культур использовали 2-суточные культуры, выросшие на плотной питательной среде Сабуро. Готовили взвесь

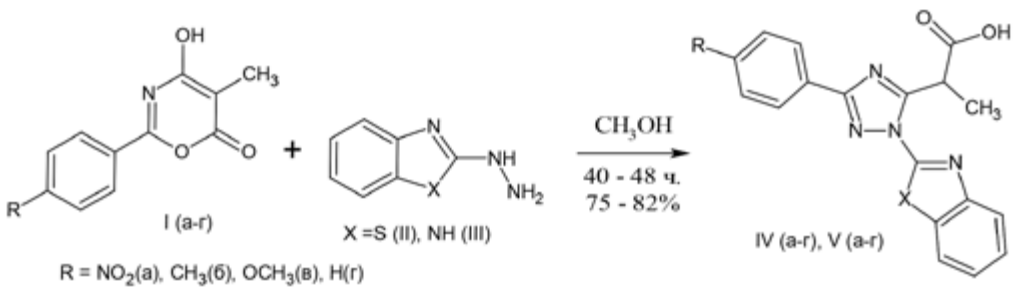


Рисунок 1. Схема синтеза 1,2,4-триазолов

по стандарту Мак-Фарланда ($2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл), затем полученную суспензию разводили до концентрации 10^5 КОЕ/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования противомикробной и противогрибковой активности представлены в таблице 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённые исследования позволили получить новые производные 1,2,4-триазолов, которые обладают противогрибковой активностью.

Антифунгальная активность исследованных соединений оказалась сопоставима с препаратом сравнения – флуконазолом в отношении дрожжей *Candida* spp.

Полученные 1,2,4-триазолы не обладают антибактериальной активностью в отношении *St. aureus* и *E. coli*. Однако противостафилококковое действие синтезированных веществ среди 1,2,4-триазолов (IVa; Va) несколько увеличилось после введения в бензольное кольцо нитрогруппы, МПК при этом составляла 12,5 мкг/мл.

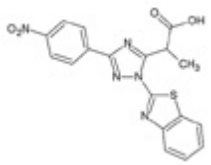
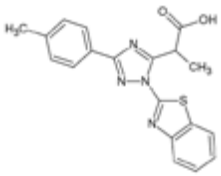
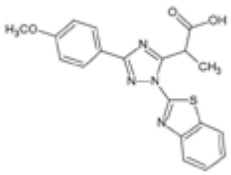
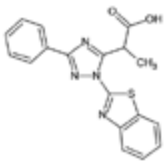
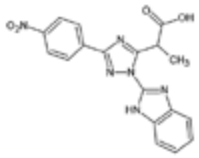
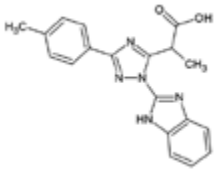
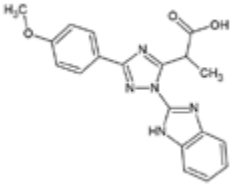
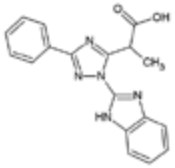
Следует отметить, что некоторые исследуемые образцы (IVг; Vв; Vг) оказывали статическое действие на тест-культуры *St. aureus* и *E. coli*.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.Э. Потапова, Е.В. Куваева, И.П. Яковлев, Е.В. Федорова, А.Е. Щеголев. Синтез и биологическая активность 2,5-замещённых 6-гидрокси-пиримидин-4(3Н)-онов // Бутлеровские сообщения. 2015. Т. 44. № 11. С. 65–68.
2. В.Э. Захс, И.П. Яковлев, Б.А. Ивин. Исследование азинов и азолов. 61. О взаимодействии малонилдихлорида с ароматическими амидами // ХГС. 1987. № 3. С. 382–385.
3. Б.Ю. Лалаев, И.П. Яковлев, В.Э. Захс. Синтез 5-алкил(арил)-2-алкилсульфанил(алкокси)-4-гидрокси-6*H*-1,3-оксазин-6-онов // Журнал общей химии. 2005. Т. 75. № 3. С. 46.
4. Л.Н Овсянникова, Б.Ю. Лалаев, И.П Яковлев, Т.Л. Семакова. Особенности реакций 2,5-замещённых 4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов с бензимидазол-2-илгидразином // ЖОРХ. 2016. Т. 52. Вып. 4. С. 617–618.
5. Патент № 2603958 РФ, МПК C 07 D 417/04, A 61 K 31/428, A 61 P 31/04. Замещённые 2-(1-(1,3-бензотиазол-2-ил)-3-фенил-1Н-1,2,4-триазол-5-ил) пропановые кислоты и способ их получения / Овсянникова Л.Н., Лалаев Б.Ю., Яковлев И.П., Ксенофонтова Г.В., Семакова Г.В.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России. – № 2015147573/04; заявл. 05.11.15; опубл. 10.12.16, Бюл. № 34. 13 с.
6. Л.Н. Овсянникова, А.Т. Фам, Г.В. Ксенофонтова, Б.Ю. Лалаев, И.П. Яковлев. Реакция 1,3-оксазин-6-онов с 2,4-дигидразинил-6-метилпиримидином // Тезисы докладов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». – Санкт-Петербург. 2016. С. 463–465.
7. Л.Н. Овсянникова, Ле Нгок Ан, Т.Л. Семакова, Б.Ю. Лалаев, И.П. Яковлев. Реакции некоторых 4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов с бензимидазол-2-илгидразином // Тезисы докладов V научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных (с международным участием) «Неделя науки – 2015». – Санкт-Петербург. 2015. С. 61.

Таблица 1.

Противомикробная, противогрибковая активность 1,2,4-триазолов, мкг/мл

№ п/п	Соединение	Формула соединения	Тест-культура		
			C. albicans	*St. aureus*	*E. coli*
			МПК, мкг/мл		
1.	IV а		16	64	12,5
2.	IV б		32	64	16
3.	IV в		32	16	16
4.	IV г		32	32	16
5.	V а		16	12,5	12,5
6.	V б		32	16	12,5
7.	V в		16	32	12,5
8.	V г		32	16	16

Julabo
THE TEMPERATURE CONTROL COMPANY

PRESTO®

Максимальная производительность

- диапазон температур от -92 до +250 °C
- мобильное устройство с закрытыми боковыми стенками, не имеющими вентиляционных решёток, что позволяет разместить термостат в любом пространстве

Диапазон температур от -92 до +250 °C

Низкие температуры - уже не проблема!

PRESTO® A45 позволяет достигать -36 ° C в реакторе объемом 30 л



Мощность охлаждения до 36 кВт

Системы PRESTO® идеальны для охлаждения до низких температур

PRESTO® A80 может обеспечить эффективное охлаждение до -80 ° C





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 547.854.83

ФОРМИЛИРОВАНИЕ 2-(МЕТИЛТИО)ПИРИМИДИН-4,6-ДИОЛА В УСЛОВИЯХ РЕАКЦИИ ВИЛЬСМЕЙЕРА – ХААКА (КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ)

Е.С. Офицерова[1]*, А.А. Шкляренко[1], И.П. Яковлев[1], Е.В. Федорова[1]

Резюме. Изучена реакция формилирования по Вильсмейеру – Хааку 2-(метилтио)пиримидин-4,6-диола. Установлено, что на строение продуктов реакции существенное влияние оказывает избыток хлорокиси фосфора. Подобраны оптимальные условия проведения реакции формилирования для получения индивидуального соединения с высоким выходом. В результате получения смеси продуктов реакции было проведено хроматографическое разделение на колонке, заполненной силикагелем Silica 60.

Ключевые слова: формилирование, реагент Вильсмейера – Хаака, нуклеофильное замещение.

FORMYLATION OF 2-(METHYLTHIO)PYRIMDINE-4,6-DIOL IN THE REACTIO CONDITIONS OF VILSMEIER-HAAK (SHORT MESSAGE)

E.S. Ofitserova[1]*, A.A. Shklyarenko[1], I.P. Yakovlev[1], E.V. Fedorova[1]

Abstract. The reaction of formylation by Vilsmeier – Haack was held. The effect of excess phosphorus oxychloride in the direction of the reaction. Optimal conditions were conducting formylation reaction to obtain a single compound with a high yield. The result of the reaction product mixture was conducted chromatographic separation on a column packed with silica gel 60 Silica.

Keywords: formylation, Vilsmeier – Haack reagent, nucleophilic substitution.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава РФ), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

1 – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 14, lit. A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: OfizerovaES@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

В продолжение работ по изучению реакции формилирования производных 2-тиопиримидин-4,6-диолов и с целью поиска биологически активных соединений на их основе [1] нами была исследована реакция формилирования по Вильсмейеру – Хааку 2-(метилтио)пиримидин-4,6-диола. Установлено, что одновременно с формилированием протекает нуклеофильное замещение одной или двух гидроксигрупп в пиримидиновом кольце на атом хлора [2]. Как и в случае с этил[(4,6-дигидроксипиримидин-2-ил)] сульфанилацетатом [3], при изменении мольного соотношения субстрат **1** : хлорокись фосфора могут образовываться различные продукты реакции (таблица 1, схема 1).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами была изучена реакция формилирования с использованием бензола [х.ч. («Вектон», Россия)] в качестве растворителя в соотношении 1:15 по отношению к загружаемому субстрату **1**. К полученной суспензии прибавляют расчетное количество диметилформамида (х.ч., ЗАО «Вектон», Россия) и хлорокиси фосфора (х.ч., ЗАО «Вектон», Россия) (схема 1, таблица 1), нагревают до 80 °С в течение 6 ч. При разделении смеси продуктов реакции хроматографирование проводили в системе «метанол – дихлорметан» (1:15 по объему) [дихлорметан (х.ч., ЗАО «Вектон», Россия); метанол (х.ч., ПАО «Акрон», Россия)].

Таблица 1.

Взаимодействие 2-(метилтио)пиримидин-4,6-диола (1) с реагентом Вильсмейера при различном соотношении реагентов

№ п/п	Соотношение 1 – $POCl_3$, моль/моль	Продолжительность реакции, ч	Продукты реакции	Выход и соотношение продуктов реакции, %
1	1:1	6	**2a** +**2b**	83:17
2	1:1.3	6	**2a** +**2b** + **2c**	15:70:15
3	1:1.5	6	**2a** +**2b** + **2c**	7:83:10
4	1:3	6	**2b**+ **2c**	95:5
5	1:7.25	6	**2b**+ **2c**	85:15
6	1:10	6	**2b**+ **2c**	79:21

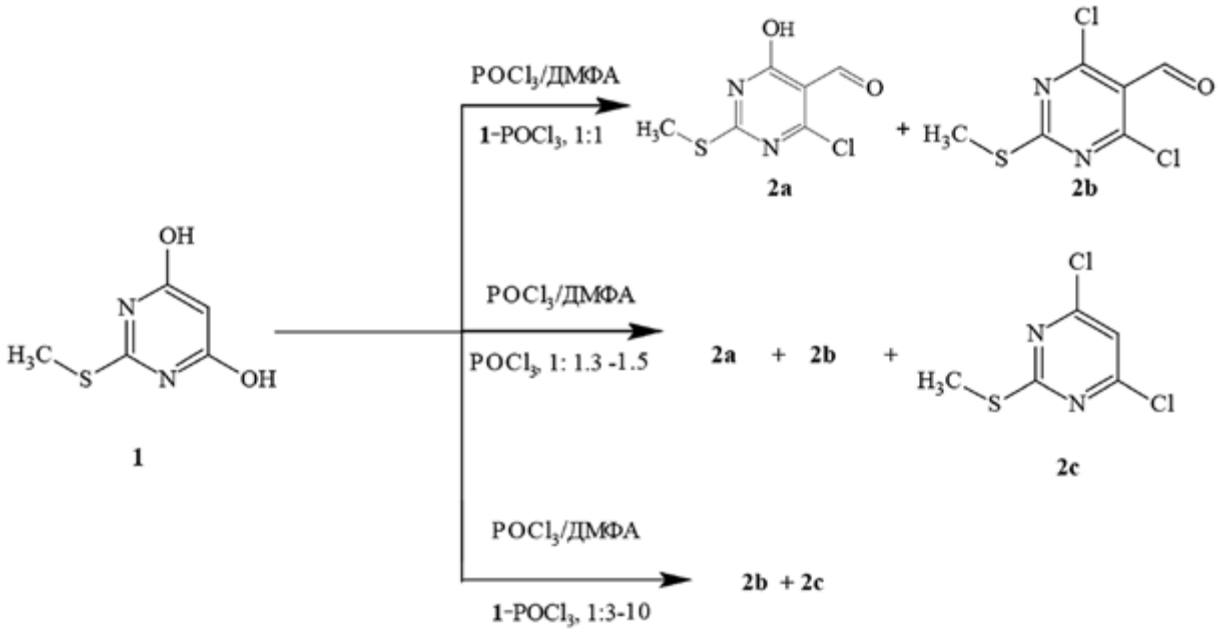


Схема 1. Взаимодействие 2-(метилтио)пиримидин-4,6-диола (1) с реагентом Вильсмейера при различном соотношении реагентов

Взаимодействие 2-(метилтио)пиримидин-4,6-диола (1) с реагентом Вильсмейера при соотношении 1:$POCl_3$=1:1. К суспензии 0,5 г (3,16 ммоль) соединения **1** в 7,5 мл бензола при охлаждении и интенсивном перемешивании добавили смесь 0,49 мл (6,3 ммоль) диметилформамида и 0,29 мл (3,16 ммоль) хлорокиси фосфора. Реакционную массу нагрели до 78–80 °С и выдержали 6 ч. Охладили, добавили мелко расколотый лед (50 г) и перемешивали 1 ч. Добавили 10 мл бензола. Слои разделили, из водного слоя продукты реакции трижды экстрагировали бензолом (3×5 мл). Объединенные экстракты сушили, растворитель отгоняли. Полученный остаток (0,33 г) хроматографировали на колонке, заполненной силикагелем Silica 60 (элюент – метанол : дихлорметан в соотношении 1:15 по объему). Выделили две фракции: фракция 1 (**2a**), Rf 0,21, выход 0,241 г, белые кристаллы, температура возгонки 166–168 °С. Спектр ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$), δ м.д.: 2,64 с (3H, CH_3), 10,23 с (1H, CH), 12,85 с (1H, OH). Найдено, %: C – 35,11; H – 2,38; N – 13,72. $C_6H_5ClN_2O_2S$. Вычислено, %: C – 35,22; H – 2,46; Cl – 17,32; N – 13,69.; фракция 2 (**2b**), Rf 0,55, выход 0,049 г, светло-желтые кристаллы, температура плавления 85–86 °С. Спектр ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$), δ, м.д.: 2,66 с (3H, CH_3), 10,40 с (1H, CH). Найдено, %: C – 32,07; H – 1,79; N – 12,52. $C_6H_4Cl_2N_2OS$. Вычислено, %: C – 32,3; H – 1,81; Cl – 31,78; N – 12,56.

Взаимодействие 2-(метилтио)пиримидин-4,6-диола (1) с реагентом Вильсмейера при избытке $POCl_3$.

а. Соотношение **1**:$POCl_3$ составляет 1:1,3. Опыт проводили аналогично. Из 0,5 г соединения **1** получили 0,58 г продукта реакции, после хроматографирования которого выделили три фракции. Фракция 1 – соединение **2a**, выход 0,083 г (13%), фракция 2 – соединение **2b**, выход 0,385 г (54%), фракция 3 – соединение **2c**, Rf 0,74, выход 0,082 г (13%), белые кристаллы, температура плавления 40–42 °С. Спектр ^{1}H-ЯМР ($CDCl_3$), δ м.д.: 2,57 с (3H, CH_3), 7,04 с (1H, CH). Найдено, %: C – 30.72; H – 2,05; N – 14,33. $C_5H_4Cl_2N_2S$. Вычислено, %: C – 30,79; H – 2,07; Cl – 36,35; N – 14,36.

б. Соотношение **1**:$POCl_3$ составляет 1:1,5. Опыт проводили аналогично. Из 0,5 г соединения **1** получили 0,66 г продукта реакции, после хроматографирования которого выделили две фракции. Фракция 1 – соединение **2a**, выход 0,041 г (6%), фракция 2 – соединение **2b**, выход 0,481 г (68%), фракция 3 – соединение **2c**, выход 0,058 г (9,5%).

в. Соотношение **1**:$POCl_3$ составляет 1:3. К суспензии 2,2 г (13,9 ммоль) 2-(метилтио)пиримидин-4,6-диола (**1**) в 33 мл бензола при охлаждении и интенсивном перемешивании добавили смесь 4 мл (41,7 ммоль) $POCl_3$ и 2,2 мл (27,8 ммоль) диметилформамида. Реакционную массу нагрели до 78–80 °С и выдержали 6 ч. Охладили, добавили мелко расколотый лед (50 г) и перемешивали 1 ч. Добавили 30 мл бензола. Слои разделили, водный слой экстрагировали бензолом (3×10 мл). Объединенные экстракты сушили, растворитель отгоняли. Получили 3,05 г масляного остатка. Остаток перекристаллизовывают из гексана (х.ч., ЗАО «Вектон», Россия). Выпавший светло-желтый осадок представляет соединение **2b,** выход

2,1 г (68%). При отгонке гексана из маточного раствора получают осадок белого цвета, представляющий соединение **2c,** выход 0,153 г (9,5%).

г. Соотношение **1**:$POCl_3$ составляет 1:7,25. Опыт проводили аналогично. Из 0,5 г соединения **1** получили 0,63 г продукта реакции, после хроматографирования которого выделили две фракции. Фракция 1 – соединение **2b**, выход 0,51 г (72%), фракция 2 – соединение **2c**, выход 0,06 г (10%).

д. Соотношение **1**:$POCl_3$ составляет 1:10. Опыт проводили аналогично. Из 0,5 г соединения **1** получили 0,71 г продукта реакции, после хроматографирования которого выделили две фракции. Фракция 1 – соединение **2b**, выход 0,537 г (76%), фракция 2 – соединение **2c**, выход 0,143 г (24%).

Спектры ^{1}H-ЯМР растворов образцов в $CDCl_3$ регистрировали на спектрометре Bruker в DPX-400 (США) с рабочей частотой 400 МГц, используя в качестве стандарта сигнал растворителя. ИК-спектры регистрировали в KBr-дисках в виде суспензии на спектрометре Shimadzu FTIR-8400S (Япония). Масс-спектр записан на жидкостном хроматографе Accela 1250 (Thermo Scientific, США), с масс-селективным детектором Thermo Scientific TSQ Ountum Access (США) и компьютерной системой для сбора и обработки данных Xcalibur (Thermo Scientific, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Реакция формилирования соединения **1** при мольном соотношении субстрат **1** : хлорокись фосфора = 1:1 даёт смесь соединений **2a, 2b** (таблица 1). При увеличении избытка хлорокиси фосфора до 30% (1:1,3) образуется смесь соединений **2a, 2b, 2c**. При мольном соотношении субстрат **1** : хлорокись фосфора = 1:1,5 образуется смесь, в которой содержание соединения **2a** количественно уменьшается, при этом увеличивается содержание соединения **2b.**

Дальнейшее увеличение избытка хлорокиси фосфора приводит к увеличению количества соединения **2c** в образующейся смеси (таблица 1).

В индивидуальном виде соединение **2b** было получено нами при взаимодействии исходного 2-(метилтио)пиримидин-4,6-диола (**1**) с реагентом Вильсмейера при мольном соотношении субстрат **1** : хлорокись фосфора = 1:3, остаточное количество соединения **2c** удаляют перекристаллизацией из гексана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами установлено, что на строение продуктов реакции формилирования по Вильсмейеру – Хааку 2-(метилтио)пиримидин-4,6-диола существенное влияние оказывает избыток хлорокиси фосфора. Увеличение её содержания по отношению к исходному 2-(метилтио)пиримидин-4,6-диолу наряду с реакцией формилирования приводит к замещению одной или двух гидроксигрупп в 2-(метилтио)-пиримидин-4,6-диоле (**1**).

ЛИТЕРАТУРА

1. A.P. Rajput, P.D. Girase. Review article on Vilsmeier – Haack reaction // Int. J. Pharmac. Chem. Biolog. Sci. 2012. V. 3(1). P. 25–43.
2. A.A. Santilli., D.H. Kim, S.V. Wanser // J. Heterocycl. chem. 1971. V. 8. P. 445–453.
3. Е.С. Офицерова, А.А. Шкляренко, И.П. Яковлев, Е.В. Федорова. Формилирование этил[(4,6-дигидроксипиримидин-2-ил)сульфанил]ацетата в условиях реакции Вильсмейера – Хаака // Журнал органической химии. 2016. № 52. С. 1374–1376.

visiopharma | Open Solutions with Holistic Approach



УСТАНОВКА СЕРИАЛИЗАЦИИ

IJS-200 Series стр. 230

Идеальное решение для фармацевтической сериализации упаковки с интуитивно понятным дизайном и интерфейсом программного обеспечения VisioPharma Line Manager (L2), которое имеет полную совместимость с аппаратными средствами

– регулируемые встроенные 2 конвейера для захвата коробки и точной настройки размеров

– струйный принтер высокой производительности для 1D/2D кодов и нанесения читаемых символов на основе технологии струйной термопечати TIJ

– визуальная система оценки и верификации кодов с опциональными OCR / OCV функциями (оптическое распознавание и проверка символов)

– настраиваемые узлы печати и верификации с эффективной производительностью до 300 коробок в минуту

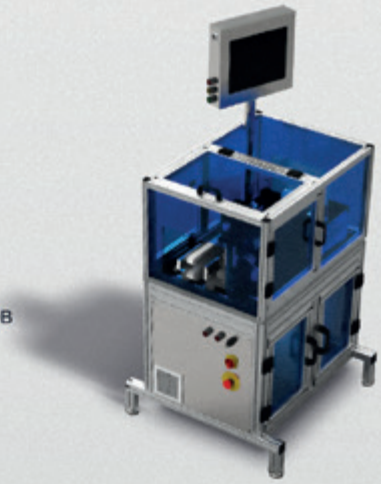
– скорость конвейера 30–60 м/мин

– тип конвейера PU соответствует FDA

– встроенная система отбраковки для некондиционных коробок в закрытую емкость отбраковки

– встроенный шкаф управления, автоматизации и IT компонентов

– соответствие GMP и 21 CFR часть 11.



Доступные решения в рамках комплексного подхода!

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 547.87

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АМИНОПРОИЗВОДНЫХ В РЯДУ 5,7-ДИХЛОРО-4,6-ДИНИТРОБЕНЗОФУРОКСАНА

Л.В. Спатлова[1]*, Л.М. Юсупова[1], З.Н. Бикмухаметова[1]

Резюме. Получены новые аминопроизводные 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксана. Изучена острая токсичность и акарицидная и бактериостатическая активность в отношении золотистого стафилококка и кишечной палочки. У полученных соединений выявлена высокая фармакологическая активность, превосходящая препарат сравнения. Показана актуальность поиска новых соединений в ряду аминопроизводных 5,7-дихлоро-динитробензофуроксана.

Ключевые слова: бензофуроксаны, аминопроизводные, акарицидная активность, бактериостатическая активность, острая токсичность.

SYNTHESIS AND ACARICIDAL, BACTERIOSTATIC ACTIVITY AMONG THE AMINO DERIVATIVES 5,7-DICHLORO-4,6-DINITROBENZOFUROXANA

L.V. Spatlova[1]*, L.M. Yusupova[1], Z.N. Bikmuhametova[1]

Abstract. New amino derivatives of 5,7-dichloro-4,6-dinitrobenzofuroxan where synthesized. IR and elemental analysis proved their structure. Their acaricidal and bacteriostatic activity against *Staphylococcus* and *Escherichia coli* was studied. As a resulti compounds showed a high pharmacological activity, surpassing the reference drug. Relevant search of new compounds among the amino derivatives of 5,7-dichloro-4,6-dinitrobenzofuroxan was showed.

Keywords: benzofuroxan, amino derivatives, acaricidal activity, bacteriostatic activity.

1 – ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», 420015, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 68

1 – Kazan State Technological University, 68, K. Marx str., Kazan, 420015, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: lidanet@inbox.ru
Тел.: 8 (960) 031 72 24

ВВЕДЕНИЕ

В литературе известно, что соединения фуроксанового ряда проявляют биологическую активность разного типа. Антибактериальная и антигрибковая активность обнаружена у бензофуроксанов [1]. Кроме того, производные фуроксанового ряда являются донорами оксида азота и в связи с этим вызывают значительный интерес фармакологов, биохимиков и химиков. В сравнении со многими другими донорами оксида азота они представляют особый интерес в связи с тем, что медленно трансформируются и длительно действуют без развития нитратной толерантности [2]. Таким образом, литературные сведения позволяют рассматривать производные бензофуроксана как один из перспективных классов соединений для синтеза биологически активных веществ.

Особый интерес для синтеза новых биологически активных соединений представляет активный субстрат – 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксан, который был получен впервые авторами под руководством Л.М. Юсуповой [3]. Высокая реакционная способность 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксана позволила синтезировать целый ряд новых биологически активных 5,7-бифункциональных производных 4,6-динитробензофуроксана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На кафедре химии и технологии органических соединений азота под руководством к.х.н, доц. Л.В. Спатловой исследованы реакции конденсации соединений 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксана с различными ароматическими аминами, содержащих в арильной части молекулы заместители R=OH, OCH_3, CH_3. Схема синтеза и структуры соединений приведены на рисунке 1. Были выбраны ароматические амины, содержащие в своей структуре функциональные группы донорного характера. Выбор был не случаен: по данным литературы, эти заместители способствуют увеличению биологической активности [4–6]. С целью увеличения выхода для каждой конкретной реакции подобраны условия реакции, а именно: температура реакции, среда, количество амина. Для синтезированных новых соединений получены ИК-, ПМР-спектры и элементный анализ, которые подтвердили структуру соединений.

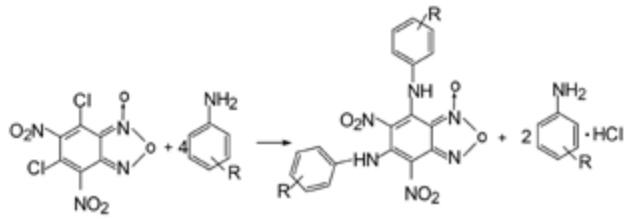


Рисунок 1. Схема синтеза аминопроизводных 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксана

1. ***5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксан.*** ИКС, $см^{-1}$: 1600, 1620 (C=N–O). Вычислено, %: C – 44,9; N – 52,4; Cl – 26,5. Найдено, %: C – 45,3; N – 52,2; Cl – 26,3.
2. ***5,7-бис(2-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофуроксан*** ИКС, $см^{-1}$: 3360 (NH); 1690 (C=N–O), $C_{18}H_{12}N_6O_8$. Вычислено, %: C – 49,0; H – 2,7; N – 19,0.Найдено, %: C – 48,8; H – 2,5; N – 18,3. Спектр ПМР^{1H}, ацетон δ м.д. 9,0 (2H, NH), 7,1 (4H бензола), 3,9 (2H OH).
3. ***5,7-бис(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофуроксан.*** ИКС, $см^{-1}$: 3360 (NH); 1680 (C=N–O), $C_{18}H_{12}N_6O_8$. Вычислено, %: C – 49,0; H – 2,7; N – 19,0. Найдено, %: C – 47,9; H – 2,6; N – 19,0.
4. ***5,7-бис(2-метоксифениламино)-4,6-динитробензофуроксан.*** ИКС, $см^{-1}$: 3360 (NH); 1680 (C=N–O), $C_{20}H_{18}N_6O_8$. Вычислено, %: C – 51,0; H – 3,8; N – 17,8. Найдено, %: C – 49,9; H – 3,4; N – 17,7.
5. ***5,7-бис(4-метоксифениламино)-4,6-динитробензофуроксан.*** ИКС, $см^{-1}$: 3350 (NH); 1680 (C=N–O), $C_{20}H_{18}N_6O_8$. Вычислено, %: C – 51,0; H – 3,8; N – 17,8. Найдено, %: C – 50,9; H – 3,4; N – 17,8.
6. ***5,7-бис(2,6-диметилфениламино)-4,6-динитробензофуроксан.*** ИКС, $см^{-1}$: 3400 (NH); 1680 (C=N–O), $C_{20}H_{14}N_6O_6$. Вычислено, %: C – 47,5; H – 2,7; N – 16,6. Найдено, %: C – 47,1; H – 2,2; N – 16,7; Cl – 13,9.

Оценка биологической активности осуществлялась в соответствии с требованиями Фармакологического комитета, изложенными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств». В качестве препарата сравнения был использован хлорофос и креолин [7].

Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 5100.3-96 «Общие требования к испытательным лабораториям») и приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP) с соблюдением международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.).

Исследование биологической активности полученных соединений проведены КГАВМ им. Н.Э. Баумана. Акарицидную активность препаратов изучали на крысиных клещах, предоставленных лабораторией физиологии патологической физиологии. Для этого по методу А.Д. Приселковой (1949) клещей, взятых от пораженных животных, по 10–20 штук помещали на кусочки хлопчатобумажной ткани (диаметром 8–9 см), которую пропитывали суспензией, содержащей различные концентрации испытуемых соединений, и оставляли в термостате на 24 ч при температуре 28–30 °C. Подсчитывали количество погибших клещей и по формуле G. Karber (1931) определяли среднесмертельную концентрацию соединений ($СК_{50}$).

Бактериостатическую активность соединений изучали методом серийных разведений на штаммах *E. coli* и *St. aureus* (Г.Н. Першин, 1971). За минимальную бактериостатическую концентрацию (МБСК) принимали ту, при которой не происходил рост штаммов культур.

Для оценки токсичности при однократном введении в желудок определяли параметры токсичности и изучали симптомы острого отравления. Острую токсичность изучали на белых крысах весом 170–200 г. Подопытные и контрольные животные были одной линии, вида, возраста, пола, весовых характеристик. Пищевой рацион содержал все необходимые компоненты для нормальной жизнедеятельности животных. В эксперименте были использованы половозрелые белые крысы-самцы с общей массой 210±4 г. Лабораторные животные были приобретены ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности». Статическая группа составляла 10 подопытных и 10 контрольных животных. Определяли максимально переносимую дозу – МПД; дозу, вызывающую гибель 50% животных, – $ЛД_{50}$ и абсолютно смертельную дозу – $ЛД_{100}$. $ЛД_{50}$ и ее доверительные границы вычисляли по методу G. Karber [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований акарицидной активности полученных соединений [9] представлены в таблице 1.

Исследования акарицидной активности показали, что новые соединения обладают акарицидной активностью и превосходят препарат сравнения хлорофос. Из таблицы видно, что соединения, содержащие в своей структуре OH-группировку, значительно увеличивают акарицидную активность.

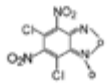
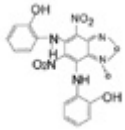
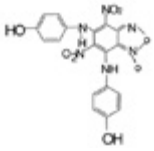
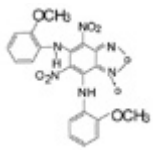
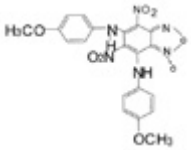
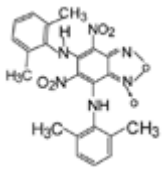
Результаты исследований бактериостатической активности полученных соединений представлены в таблице 2.

Проведенные исследования бактериостатической активности показали, что полученные новые аминопроизводные 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксана превосходят препарат сравнения креолин. Из таблицы видно, что соединения, содержащие в своей структуре OH-, OCH_3-группировки в орто-положении, обладают высокой активностью в отношении золотистого стафилококка, а соединения, содержащие в своей структуре OH-, OCH_3-группировки в пара-

положении, проявляют высокую активность против кишечной палочки.

Таблица 1.

Акарицидная активность аминопроизводных 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксана

Соединения	Акарицидная активность		
	CK_0	CK_{50}	CK_{100}
Хлорофос		**0,7**	
	0,075	0,090	0,08
	0,00025	0,0013125	0,004
	0,00025	0,001	0,004
	0,005	0,12345	0,25
	0,03	0,5845	1
	0,02	0,2255	0,5

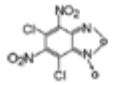
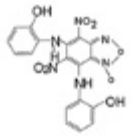
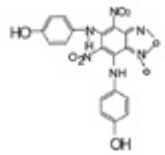
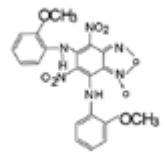
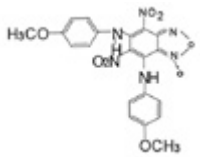
Для полученных соединений была определена острая токсичность. Максимальная концентрация новых аминопроизводных 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксана не вызвала гибели животных (LD_{50}=3000 мг/кг). Таким образом, новые полученные соединения являются малотоксичными и относятся к 4 классу токсичности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный поиск условий позволил получить новые аминопроизводные 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксана. Большинство из синтезированных аминопроизводных дихлородинитробензофуроксана обладают высокой активностью против клещей и бактерий. Полученные соединения являются малотоксичными и относятся к 4 классу опасности. Таким образом, поиск новых аминопроизводных в ряду 5,7-дихлоро-4,6-динитро-бензофуроксана является перспективным и будет продолжен.

Таблица 2.

Бактериостатическая активность аминопроизводных 5,7-дихлоро-4,6-динитробензофуроксана

Соединения	Бактериостатическая активность	
	Золотистый стафилокк	Кишечная палочка
Креолин	**0,07**	**0,05**
	>1	>0,05
	0,004	0,015
	0,06	0,0075
	0,125	0,06
	0,03	0,125

ЛИТЕРАТУРА

1. Л.И. Хмельницкий. Химия фуроксанов: Реакции и применение. – М.: Наука, 1996. 346 с.
2. В.Г. Граник. Фуроксанопиримидины как экзогенные доноры оксида азота // Хим.-фарм. журнал. 2002. № 10. С. 14–20.
3. Патент 2076803 РФ. Фунгицидный состав // Л.М. Юсупова, Б.И. Бузыкин, Ж.В. Молодых, И.Ф. Фаляхов; опубл. 1998.
4. G. Tappi, P.V. Forni. Action of heterocyclic o-qionone derivatives against fungi // Chem. Abstr. 1951. V. 45. 9804 c. .
5. G. Tappi, P.V. Forni. Fungistatic and fungicidal action of heterocyclic derivatives of o-benzoquinone // Chem.Abstr. 1950. V. 44. 9103i.
6. G. Tappi, P.V. Forni. The bactericidal activity of hetorocyclic derivatives of o-quinone // Chem.Abstr. 1951. V. 45. 9804f.
7. А.Н. Миронов. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. 197 с.
8. М.Л. Беленький. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – М.: Медицина, 1963. 262 с.
9. Патент 2255935 РФ. 5,7-дизамещенный-4,6-динитробензофуроксан, обладающий акарицидной и бактерицидной активностью // Л.М. Юсупова, Л.В. Спатлова, И.Ф. Фаляхов, Т.В. Гарипов, М. Шиндала, Д.Р. Ишкаева. № 2003119046; заявл. 24.06.03; опубл. 2004 г. 4с.

Методика проведения рутинной поверки дозирующего устройства

Почему необходимо проводить рутинную поверку?

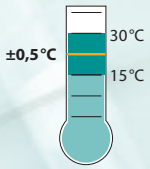
Для эффективной и корректной работы дозирующих устройств необходимо ежегодно проводить их калибровку. Помимо этого, в интервале между калибровками оборудования рекомендуется также производить рутинную поверку корректности работы дозирующих устройств, чтобы быть точно уверенными в достоверности получаемых данных. Мы разработали руководство для проведения данной процедуры.

Дозирующие устройства INTEGRA позволяют установить напоминание о необходимости проведения поверки.

1. Условия эксплуатации и материалы

Условия эксплуатации

Отсутствие сквозняков, постоянная температура между 15 °C и 30 °C, максимальное отклонение в период проведения измерений ±0,5 °C.

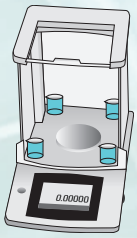


Материалы

Весы

Оборудованы специальным защитным стеклом от сквозняков и системой улавливания испарений

Дополнительные системы улавливания испарений: 4 контейнера, заполненных водой и расположенных в углах ветрозащитных стекол



Необходимое количество знаков определяется номинальным объемом вашей пипетки

Объем	*Количество знаков*
1 мкл ≤ V ≤ 10 мкл	*6 (0,001 мг)*
10 мкл < V ≤ 100 мкл	*5 (0,01 мг)*
< 100 мкл	*4 (0,1 мг)*

Контейнер для взвешивания

Предпочтительно использование металлического контейнера с целью минимизации накопления статического электричества

В качестве альтернативы можно использовать контейнер для центрифугирования объемом 1,5 мл

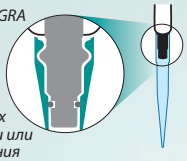
Жидкость для проведения тестирования

Дистиллированная вода

Наконечник

Для получения наилучших результатов используйте наконечники, рекомендованные производителем

Наконечники INTEGRA GripTip надежно крепятся к дозирующему устройству, что полностью исключает риск их потери, протечки или случайного спадания



2. Перед началом процедуры поверки



Поместите дозирующее устройство, наконечники и тестовую жидкость в помещение для проведения тестирования на 2 ч до начала процедуры с целью установления равновесия с условиями окружающей среды



Запишите дату, температуру и давление в помещении

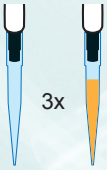
В случае, если помещение не оборудовано барометром, вы можете воспользоваться данными местной метеостанции.

При тестировании оборудования вы должны владеть техникой отбора проб. Просьба предварительно ознакомиться с руководством «Ручной отбор проб – методические рекомендации» («Handheld Pipetting – Best Practices») на официальном сайте INTEGRA

3. Проверка герметичности

Перед проведением гравиметрических измерений, пожалуйста, убедитесь, что дозирующее устройство герметично

1. Предварительно смочите наконечник(и) путем 3-х кратного отбора номинального объема
2. При отборе номинального объема необходимо использовать один и тот же наконечник(и)
3. После погружения наконечника(ов) в жидкость на 2 мм необходимо подержать дозирующее устройство вертикально в течение 30 с
4. В случае, если утечек жидкости не выявлено, можно продолжать процедуру валидации





Если уровень жидкости в пипетке уменьшается, это свидетельствует о наличии протечек

Пожалуйста, свяжитесь с производителем в данном случае

4. Гравиметрические измерения

Контейнер для взвешивания не должен быть сухим, с этой целью добавьте немного дистиллированной воды



Количество измерений

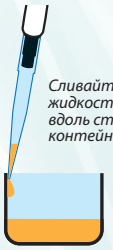
Проведите минимум по 4 измерения при 100% и 10% наполнении

Начните со 100%

В многоканальных пипетках необходимо провести валидацию первого и среднего каналов

Методика выполнения:

1. Взвесьте контейнер для измерения
2. Положите новый наконечник
3. Проведите процедуру смачивания контейнера (смотри раздел 3)
4. Слейте жидкость в контейнер для взвешивания
   Сливайте жидкость вдоль стенки контейнера для взвешивания
5. Занесите полученный результат в таблицу
6. Используя тот же самый наконечник, повторите шаги 4 и 5 минимум 4 раза. После съема данных скорректируйте массу контейнера для взвешивания
7. Удалите взвешенный наконечник и положите новый
8. Повторите шаги 1-7 для второго теста



Сливайте жидкость вдоль стенки контейнера

5. Анализ полученных данных

1. Переведите полученные данные (мг) в единицы объема (мкл), используя фактор Z

Данные для сравнения можно загрузить с официального сайта INTEGRA

$$V_i = m_i \times Z$$

V_i - объем в мкл
m_i - вес в мг
Z - Z-фактор

2. Рассчитайте средний объем одного исследуемого объема и одного канала

$$\overline{V} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^{n} V_i$$

$\overline{V}$ - средний объем
n - число взвешиваний

3. Рассчитайте точность (систематическую ошибку) в %:

$$e_s = \frac{100\,(\overline{V} - V_s)}{V_s}$$

e_s - систематическая ошибка в %
V_s - измеряемый объем

4. Посчитайте воспроизводимость (случайная ошибка) в %

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (V_i - \overline{V})^2}{n-1}} \qquad CV = 100\,\frac{s_r}{\overline{V}}$$

s_r - сходимость
CV - коэффициент отклонения %

Сравните рассчитанную точность и воспроизводимость со спецификацией производителя. Если полученные результаты не соответствуют указанным в спецификации, необходимо провести калибровку прибора. В противном случае можно продолжать пользоваться данным оборудованием в обычном режиме

Процедура калибровки электронных пипеток INTEGRA довольно проста. Достаточно задать целевой объем и объем, который обычно отбирается, и запустить процедуру калибровки

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

Тел.: +7 (495) 252-00-98
(центральный офис в Москве)
www.phct-group.com

8 (800) 333-69-11
(бесплатный звонок по России 24 часа)
E-mail: info@phct-group.com

INTEGRA
www.integra-biosciences.com

УДК 534.544.943; 581.192.2; 582.949.2

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ТРАВЕ КОТОВНИКА КОШАЧЬЕГО (*NEPETA CATARIA* L.)

И.И. Тернинко[1], Т.Х.И. Нгуен[1]*

Резюме. Проведено изучение качественного состава фенольных соединений травы котовника кошачьего (*Nepeta cataria* L.) флоры Северо-Западного региона России методами тонкослойной и бумажной хроматографии. Идентифицировано 11 соединений фенольной природы, из которых 6 веществ флавоноидного характера (рутин, лютеолин, цинарозид, гиперозид, кверцетин и апигенин), 3 гидроксикоричных кислоты (кофейная, хлорогеновая и розмариновая) и 2 фенолкарбоновых кислоты (галловая и ванилиновая). Результаты исследования создают предпосылки для дальнейшего изучения количественного содержания веществ фенольной природы, установления маркеров и последующей стандартизации лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: тонкослойная и бумажная хроматография, котовник кошачий, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, фенолкарбоновые кислоты.

IDENTIFICATION OF THE PHENOLIC COMPOUNDS OF CATNIP HERBS (*NEPETA CATARIA* L.)

I.I. Terninko[1], T.H.Y. Nguyen[1]*

Abstract. Investigation of the phenolic compounds of catnip herbs (*Nepeta cataria* L.) the flora of the North-West region of Russia by thin-layer and paper chromatography was carried out. Have been identified 11 compounds of the phenolic nature from which 6 substances of flavonoid nature (rutin, luteolin, cynaroside, hyperoside, quercetin and apigenin), 3 hydroxycinnamic acids (caffeic, chlorogenic and rosmarinic) and 2 phenolcarbolic acids (gallic and vanillic). The results of the study create the preconditions for further study of quantitative content of phenolic substances, establishing markers and subsequent standardization of medicinal plant raw materials.

Keywords: thin-layer and paper chromatography, catnip, flavonoids, hydroxycinnamic acids, phenol carbonic acids.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 19737, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Ministry of Healthcare, 14 A, Professor Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: nguyenhaiyen20190@gmail.com
Тел.: +7 (950) 006 31 23

ВВЕДЕНИЕ

Nepeta cataria L. (котовник кошачий) – травянистое многолетнее растение высотой 30–100 см из семейства яснотковых (*Lamiaceae*), широко распространенное в различных климатогеографических зонах, в том числе на территории РФ. Культивируется в странах Западной Европы, США, СНГ как эфиромасличное растение и имеет значительные сырьевые запасы. Растет как сорное растение вблизи жилья, на полях, в садах, встречается также по лесным опушкам и на лугах от среднего до субальпийского пояса [1].

Трава котовника в эксперименте оказывает спазмолитическое, антидепрессивное и седативное действие. Антимикробную активность по отношению к 11 видам бактерий и 12 видам грибов связывают с наличием эфирного масла [2]. Экстракт *Nepeta cataria* L. обладает высокими антиоксидантными свойствами [2, 3]. Гидроксикоричные кислоты (ГКК) (в частности, производные кофейной кислоты) в извлечениях из травы котовника проявляют выраженную иммуностимулирующую активность [4]. В народной медицине трава котовника кошачьего используется для лечения хронических бронхитов, катара желудка, заболеваний гепатобилиарной и женской репродуктивной системы.

Согласно данным зарубежной литературы [5] химический состав надземной части *Nepeta cataria* L. представлен танинами, флавоноидами, терпеноидами, в том числе сапонинами. Основной группой БАВ считают эфирное масло [6], содержание которого составляет 0,35%, а основными компонентами являются непеталактон, 1,8-цинеол, α-пинен, α-гумулен и другие терпены [7, 8]. Однако в РФ трава котовника не является официнальной, так как в связи с отсутствием комплексного изучения не выделены основные группы биологически активных веществ, не определены маркерные соединения и, как следствие, не представлены подходы к стандартизации данного лекарственного растительного сырья (ЛРС). Поэтому системное фитохимическое изучение травы котовника кошачьего с целью дальнейшей стандартизации является перспективной задачей, которая направлена на решение проблемы использования отечественных растительных ресурсов для целей фармацевтической промышленности.

Целью данной работы была идентификация фенольных соединений в траве котовника кошачьего (*Nepeta cataria* L.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом настоящего исследования служили образцы травы котовника кошачьего, заготовленные на территории питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФА (пос. Лемболово Всеволжского района Ленинградской области) в августе 2016 г. Заготовку надземной части (травы) проводили в сухую погоду на расстоянии 10 см от поверхности земли, избегая попадания грубых (одревесневших) частей растения. Сушку проводили воздушно-теневым способом.

Методика получения извлечений. Для приготовления водных экстрактов измельченное сырье (диаметр частиц около 7–10 мм) в количестве 10,0 г помещали в колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 40 мл воды очищенной. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение часа. Полученную вытяжку фильтровали через складчатый фильтр. Экстракцию проводили дважды новыми порциями воды очищенной. Объединенный экстракт концентрировали в вакууме до 10 мл. Водно-спиртовые экстракты получали аналогичным образом, в качестве экстрагента использовали 70% и 40% спирт этиловый.

Очистка полученного извлечения. Полученные извлечения подвергали очистке методом жидкость-жидкостной экстракции с использованием различных растворителей и получением отдельных фракций. Схема очистки представлена на рисунке 1 (серым цветом выделены конечные фракции, которые использовали для анализа).

Для анализа фенольных соединений использовали методы тонкослойной (ТСХ) и бумажной (БХ) хроматографии. В качестве сорбента в БХ использовали бумагу Filtrak №12, в ТСХ-анализе – пластинки Sorbfil UV_{254} (ПТСХ-П-В-УФ) (ЗАО «Сорбполимер», Россия) и Silufol UV_{254} (Kavalier, Чехия). Детектирование проводили путем оценки хроматограмм в видимом и УФ-свете (254 нм и 365 нм) до и после обработки их специфическими хромогенными реактивами в сравнении со значениями факторов удерживания (Rf) соответствующих референс-образцов (таблица 4). Сводные данные об условиях хроматографирования приведены ниже.

Системы растворителей: **А:** н-бутанол (ч.) – уксусная кислота ледяная (х.ч.) – вода (БУВ) (4:1:2); **Б:** БУВ (4:1:5); **В:** уксусная кислота 2%; **Г:** уксусная кислота 15%; **Д:** пропанол (х.ч.) – хлороформ (х.ч.) – муравьиная кислота (ч.) (10:4:1); **Ж:** бензол (ч.д.а.) – метанол (х.ч.) – уксусная кислота ледяная (х.ч.) (90:16:8). Все растворители производства ЗАО «Вектон», Россия.

Референс-образцы: 0,1% спиртовые растворы стандартных образцов (СО) (*USP* или *EP*) флавоноидов (рутин, цинарозид, лютеолин, кверцетин, апигенин, кемпферол, гиперозид); гидроксикоричных (кофейная, хлорогеновая, феруловая, п-кумаровая, синаповая и



Рисунок 1. Схема получения и очистки извлечений из травы котовника

розмариновая) и фенолкарбоновых (ФКК) (сиреневая, вератровая, салициловая, ванилиновая, протокатеховая, галловая) кислот.

Оптимальный объем наносимых проб для извлечений и СО: 1 мкл / 2 мкл (ТСХ) и 5 мкл / 10 мкл (БХ) при анализе флавоноидов и ФКК; 2 мкл / 5 мкл (ТСХ) и 5 мкл / 10 мкл (БХ) при анализе ГКК.

Детектирование: **1** – пары аммиака (ч.д.а., ООО «НеваРеактив», Россия); **2** – 2% раствор алюминия хлорида (ч.д.а., ЗАО «Вектон», Россия); **3** – 3% раствор железа (III) хлорида (ч., ООО «НеваРеактив», Россия); **4** – диазотированная сульфаниловая кислота (диазореактив). Растворы для детектирования приготовлены в соответствии с требованиями ГФ РФ XIII, ОФС 1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Флавоноиды. Идентификацию флавоноидов проводили в водно-спиртовом извлечении (экстрагент – 70% спирт этиловый). Развитие хроматограмм осуществляли в системах **А** и **Б**. Детектирование зон флавоноидов проводили как по собственной флюоресценции веществ в УФ-свете, так и после обработки реактивами **1** и **2**.

Результаты хроматографического изучения флавоноидов травы котовника кошачьего методом ТСХ и БХ представлены в таблице 1.

По данным ТСХ-анализа (таблица 1) в исследуемом извлечении из травы котовника установлено наличие 5 пятен. В УФ-свете большинство зон адсорбции имело коричневую окраску, которая приобретала жел-

Таблица 1.

Хроматографическая оценка флавоноидных соединений травы котовника кошачьего (Данные об используемых стандартных образцах приведены в талице № 4)

Исследуемый раствор / пятна	Окраска зон адсорбции								Значение Rf	
	Видимый свет		УФ-свет		Реактив 1		Реактив 2			
	ТСХ	БХ	ТСХ	БХ	ТСХ	БХ	ТСХ	БХ	ТСХ	БХ
Рутин	желтая		желто-коричневая	коричневая	темно-желтая	корич-невая	желтая	желто-зеленая	**0,62**	**0,61 А 0,50 Б**
Кверцетин	желтая		желто-коричневая	желтая	желто-зеленая	желтая	желто-зеленая	зеленая	**0,81**	**0,79 А 0,69 Б**
Лютеолин	бледно-желтая		коричневая		желто-коричневая	корич-невая	желто-зеленая		**0,78**	**0,89 А 0,80 Б**
Цинарозид	бледно-желтая		коричневая		желто-зеленая	коричневая	желто-зеленая		**0,73**	**0,41 А 0,40 Б**
Апигенин	желтая		коричневая		желто-коричневая	коричневая	желтая		0,83	**0,91 А 0,79 Б**
Кемпферол	бледно-желтая		голубая		голубая	фиолетовая	голубая	фиолетовая	0,85	0,74 А 0,65 Б
Гиперозид	желтая		желто-коричневая	коричневая	темно-желтая	коричневая	желтая	желто-зеленая	**0,68**	**0,71 А 0,59 Б**
Извлечение (по данным ТСХ-анализа)										
1 пятно	желтая		желто-коричневая		темно-желтая		желтая		0,62	
2 пятно	желтая		желто-коричневая		Темно-желтая		желтая		0,68	
3 пятно	бледно-желтая		коричневая		желто-зеленая		желто-зеленая		0,73	
4 пятно	бледно-желтая		коричневая		желто-коричневая		желто-зеленая		0,78	
5 пятно	желтая		желто-коричневая		желто-зеленая		желто-зеленая		0,81	
Извлечение (по данным БХ-анализа)										
Исследуемые пятна	**Видимый свет**		**УФ-свет**		**Реактив 1**		**Реактив 2**		**Значение Rf**	
1 пятно	бледно-желтая		коричневая		коричневая		желто-зеленая		0,41 А 0,40 Б	
2 пятно	желтая		коричневая		коричневая		желто-зеленая		0,61 А 0,50 Б	
3 пятно	желтая		коричневая		коричневая		желто-зеленая		0,71 А 0,59 Б	
4 пятно	желтая		желтая		желтая		зеленая		0,79 А 0,69 Б	
5 пятно	бледно-желтая		коричневая		коричневая		желто-зеленая		0,89 А 0,80 Б	
6 пятно	желто-коричневая		коричневая		коричневая		желтая		0,91 А 0,79 Б	

Примечание: исследование флавоноидов методом ТСХ в системе Б неинформативно, так как пластинка поглощала воду, что негативным образом сказывалось на значениях Rf.

тую или желто-коричневую флюоресценцию после обработки пластинки парами аммиака, что характерно для флавонов, флавононов, флавонол-3-О-гликозидов и халконов. Одно вещество имело желтую окраску, характерную для флавонолов и их 7-О-гликозидов [9].

Сопоставление данных величин Rf и характера флюоресценции пятен (по данным ТСХ-анализа) позволило идентифицировать в траве котовника кошачьего наличие рутина, кверцетина, лютеолина, цинарозида и гиперозида. БХ-анализ, кроме вышеназванных соединений, позволил также идентифицировать апигенин.

ГКК. Исследование проводили в водных, водно-спиртовых (экстрагент – 40% спирт этиловый) извлечениях (как нативных, так и очищенных) и в этилацетатной фракции.

В процессе анализа нами была подобрана оптимальная хроматографическая система для ТСХ-анализа. Так, при предварительном сравнительном изучении параметров ТСХ-идентификации (разделение пятен, значения Rf в диапазоне 0,2–0,8) в системах **А** и **В** лучшие характеристики продемонстрировала система **А**, поэтому в ТСХ-анализе она была выбрана для идентификации ГКК.

Результаты хроматографического изучения ГКК в извлечениях котовника представлены в таблице 2.

Установлено, что пятна ГКК лучше выражены (имеют определенную описываемую форму и более высокую степень флюоресценции) в водно-спиртовых извлечениях.

Таблица 2.

Хроматографическая оценка ГКК травы котовника кошачьего

Исследуемый раствор / пятна	Окраска зон адсорбции						Значение Rf	
	УФ-свет		Реактив 1		Реактив 3			
	ТСХ	БХ	ТСХ	БХ	ТСХ	БХ	ТСХ	БХ
Кофейная кислота	ярко-голубая		ярко-голубая		сине-зеленая		0,84	**0,82А; 0,24В**
Хлорогеновая кислота	коричневая	бледно-голубая	коричневая	бледно-зеленая	бледно-зеленая		**0,58**; 0,32	**0,62А; 0,49В**
Феруловая кислота	коричневая	голубая	коричневая	темно-голубая	коричневая	оранжевая	0,80	0,89А; 0,28В
п-Кумаровая кислота	бледно-коричневая	–	бледно-коричневая	–	бледно-коричневая		0,90	0,92А; 0,53В
Синаповая кислота	ярко-голубая		ярко-голубая		розовая		0,87	0,83А; 0,47В
Розмариновая кислота	коричневая	голубая	коричневая	голубовато-зеленая	серо-зеленая		**0,74**	**0,86А; 0,44**В
Извлечение (по данным ТСХ-анализа)								
1 пятно	коричневая		коричневая		бледно-зеленая		0,57	
2 пятно	коричневая		коричневая		серо-зеленая		0,74	
Извлечение (по данным БХ-анализа)								
1 пятно	бледно-голубая		ярко-голубая		сине-зеленая		0,81А; 0,24В	
2 пятно	голубая		голубовато-зеленая		серо-зеленая		0,86А; 0,43В	
3 пятно	бледно-голубая		бледно-зеленая		бледно-зеленая		0,63А; 0,48В	

По результатам БХ в извлечениях из травы котовника было установлено наличие трех контрастных зон адсорбции, которые по значениям параметров удерживания и окраске в сравнении со СО идентифицированы нами как кофейная, хлорогеновая и розмариновая кислоты. В результате ТСХ-анализа в извлечениях из травы котовника нами были идентифицированы хлорогеновая и розмариновая кислоты. Розмариновая кислота является маркерным соединением представителей семейства яснотковых, и ее идентификация является важным фактом для дальнейшей фитохимической оценки ЛРС котовника кошачьего.

Следует отметить, что при анализе методом ТСХ СО хлорогеновой кислоты имел 2 четкие зоны адсорбции, что свидетельствует о присутствии ее изомерной формы – неохлорогеновой кислоты. Учитывая, что, помимо пятен ГКК, в извлечениях из травы котовника было отмечено наличие еще 5 пятен фенольной природы, которые имели желтую флюоресценцию (предположительно флавоноиды) со значениями Rf 0,2–0,6, идентифицировать неохлорогеновую кислоту в данном диапазоне значений параметров удерживания невозможно.

ФКК. Исследование ФКК проводили в водно-спиртовых извлечениях (экстрагент – 70% спирт этиловый) с использованием метода ТСХ в системах **Д** [10] и **Ж** [11] и метода БХ в системах **А**, **Б** и **Г**. Однако лучшие результаты (интенсивность окраски и более четкие контуры зон абсорбции) были получены при использовании метода БХ. Результаты хроматографического изучения ФКК методом БХ представлены в таблице 3.

По результатам БХ-анализа в траве котовника кошачьего идентифицированы 2 пятна с показателями Rf и окраски, характерными для галловой и ванилиновой кислот.

Таблица 3.

Хроматографическая оценка ФКК травы котовника кошачьего

Исследуемый раствор	Окраска зон адсорбции		Значение Rf
	Реактив 3	Реактив 4	
Сиреневая кислота	светло-серая	малиново-красная	0,70А; 0,83Б; 0,80Г
Вератровая кислота	желто-оранжевая	–	0,86А; 0,90Б; 0,84Г
Салициловая кислота	фиолетовая	–	0,72А; 0,94Б; 0,90Г
Ванилиновая кислота	светло-коричневая	светло-оранжевая	**0,75А; 0,88Б; 0,82**Г
Протокатеховая кислота	изумрудно-зеленая	серо-коричневая	0,59А; 0,80Б; 0,78Г
Галловая кислота	темно-серая	серая	**0,50А; 0,57Б; 0,55**Г
Извлечение	светло-коричневая	светло-оранжевая	0,75А; 0,88Б; 0,82Г
	темно-серая	серая	0,50А; 0,57Б; 0,55Г

Примечание: «–» – окраска отсутствует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами бумажной и тонкослойной хроматографии в водных и водно-спиртовых извлечениях из травы котовника кошачьего (*Nepeta cataria* L.) установлено наличие флавоноидов (рутин, лютеолин, цинарозид, гиперозид, кверцетин и апигенин), гидроксико-

ричных (кофейная, хлорогеновая и розмариновая) и фенолкарбоновых (галловая и ванилиновая) кислот.

Таким образом, результаты изучения качественного состава фенольных соединений продемонстрировали перспективность дальнейших исследований и стандартизации котовника кошачьего в качестве нового ЛРС.

Таблица 4.

Стандартные образцы

Флавоноиды

рутин	Рутин, стандартный образец-порошок, содержание рутина 98,5%, ООО «Фитопанацея», Россия, CAS № 153-18-4, серия 061210, годен до 28/01/18
цинарозид	Цинарозид, стандартный образец-порошок, содержание цинарозида 98,5%, ООО «Фитопанацея», Россия, CAS № 5373-11-5, серия 250810, годен до 12/12/17
лютеолин	Лютеолин, стандартный образец-порошок, содержание лютеолина 98,5%, ООО «Фитопанацея», Россия, CAS № 491-70-3, серия 250810, годен до 28/01/18
кверцетин	Кверцетин, стандартный образец-порошок, содержание кверцетина 99,5%, ООО «Фитопанацея», Россия, CAS № 117-39-5, серия 250810, годен до 28/01/18
апигенин	Апигенин, стандартный образец-порошок, содержание апигенина 99%, Sigma Aldrich, США, CAS № 520-36-5, каталожный № 42251, годен до 18/12/17
кемпферол	Кемпферол, стандартный образец-порошок, содержание кемпферола 98%, Sigma Aldrich, США, CAS № 520-18-3, каталожный № 96353, годен до 23/02/18
гиперозид	Гиперозид, стандартный образец-порошок, содержание гиперозида 98,5%, ООО «Фитопанацея», Россия, CAS № 482-36-0, серия 061210, годен до 15/07/17

Гидроксикоричные кислоты

кофейная кислота	Кофейная кислота, стандартный образец-порошок, содержание кофейной кислоты 98%, Sigma Aldrich, США, CAS № 331-39-5, каталожный № C0625, годен до 22/12/17
хлорогеновая кислота	Хлорогеновая кислота, первичный фармацевтический стандартный образец-порошок, содержание хлорогеновой кислоты 100%, Sigma Aldrich, США, CAS № 327-97-9, каталожный № 00500590, годен до 09/01/18
феруловая кислота	Феруловая кислота, стандартный образец-порошок, содержание феруловой кислоты 98%, Sigma Aldrich, США, CAS № 537-98-4, каталожный № 52229, годен до 09/01/18
п-кумаровая кислота	п-кумаровая кислота, стандартный образец-порошок, содержание п-кумаровой кислоты 98%, Sigma Aldrich, США, CAS № 501-98-4, каталожный № 55823, годен до 27/11/17
синаповая кислота	Синаповая кислота, стандартный образец-порошок, содержание синаповой кислоты 99%, Sigma Aldrich, США, CAS № 7362-37-0, каталожный № 93878, годен до 13/06/18
розмариновая кислота	Розмариновая кислота, первичный фармацевтический стандартный образец-порошок, содержание розмариновой кислоты 100%, Sigma Aldrich, США, CAS № 20283-92-5, каталожный № 00390580, годен до 10/12/18

Фенолкарбоновые кислоты

сиреневая кислота	Сиреневая кислота, первичный фармацевтический стандартный образец-порошок, содержание сиреневой кислоты 100%, Sigma Aldrich, США, CAS № 20283-92-5, каталожный № 00390580, годен до 03/12/18
вератровая кислота	Вератровая кислота, субстанция-порошок, содержание вератровой кислоты 99%, Sigma Aldrich, США, CAS № 93-07-2, каталожный № D131806, годен до 18/11/18
салициловая кислота	Салициловая кислота, стандартный образец-порошок, содержание салициловой кислоты 99,5%, Sigma Aldrich, США, CAS № 69-72-7, каталожный № 27301, годен до 10/10/18
ванилиновая кислота	Ванилиновая кислота, натуральная субстанция-порошок, содержание ванилиновой кислоты 97%, Sigma Aldrich, США, CAS № 121-34-6, каталожный № W398802, годен до 03/12/18
протокатеховая кислота	Протокатеховая кислота, первичный фармацевтический стандартный образец-порошок, содержание протокатеховой кислоты 100%, Sigma Aldrich, США, CAS № 99-50-3, каталожный № 03930590, годен до 10/12/18
галловая кислота	Галловая кислота, субстанция-порошок, содержание галловой кислоты 97,5–102,5%, Sigma Aldrich, США, CAS № 149-91-7, каталожный № G7384, годен до 17/08/18

ЛИТЕРАТУРА

1. Р.К. Аскерова. Котовники (род Nepeta L.) Кавказа: автореф. дисс. … канд. биол. наук. – Ленинград, 1954. 18 с.
2. A. Adiguzel et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Nepeta cataria* // Polish Journal of Microbiology. 2009. V. 58(1). P. 69–76.
3. S.C. Duda et al. Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum, Lavandula angustifolia, Melissa officinalis and Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species // Industrial Crops and Products. 2015. V. 77. P. 499–507.
4. T.A.K. Prescott et al. Direct inhibition of calcineurin by caffeoyl phenylethanoid glycosides from Teucrium chamaedrys and *Nepeta cataria* // Journal of ethnopharmacology. 2011. V. 137(3). P. 1306–1310.
5. A.M.M. Naguib et al. Phytochemical screening of Nepeta cataria extracts and their in vitro inhibitory effects on free radicals and carbohydrate-metabolising enzymes // Natural product research. 2011. V. 26(23). P. 2196-2198.
6. Н.М. Кузнецова. Биоморфологические особенности и сырьевая продуктивность видов рода котовник (*Nepeta* L.) в условиях Ленинградской области // Известия. 2013. №. 30. С. 19–23.
7. A.H. Gilani et al. Chemical composition and mechanisms underlying the spasmolytic and bronchodilatory properties of the essential oil of *Nepeta cataria* L. // Journal of ethnopharmacology. 2009. V. 121(3). P. 405–411.
8. Z. Kamiar et al. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil of Nepeta cataria L. Against common causes of oral infections // Journal of dentistry (Tehran, Iran). 2013. V. 10(4). P. 329.
9. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. Химический анализ лекарственных растений. – М.: Высшая школа. 1983. 176 с.
10. О.А. Горошко и др. Сорбенты для тонкослойной хроматографии в фармацевтическом анализе // Химико-фармацевтический журнал. 2009. №. 9(44). С. 53–56.
11. М.А. Сысоева, В.Р. Хабибрахманова, В.С. Гамаюрова. Исследование золя водных извлечений чаги. XIII. Биологически активные вещества коллоидной системы, формируемой после удаления дисперсной фазы из водного извлечения чаги хлористоводородной кислотой // Химия растительного сырья. 2009. №. 3. С. 151–156.

Надежность и безопасность в лабораторном секторе

LIEBHERR
Качество, дизайн и инновации



- Электроника блока управления Comfort позволяет точно задать температуру хранения
- Наличие сигнализации: в случае отклонения температуры или незакрытой двери, при пропадании питания по сети (визуальная)
- Интегрированная регистрация и хранение данных omin/max температуре, о случаях срабатывания сигнализации и пропадания питания по сети
- RS 485 интерфейс и безпотенциальные контакты для дополнительной регистрации данных о температуре и сигнализации
- 1 точка калибровки обеспечивает точный контроль температуры хранения
- Имеются также модели со взрывобезопасным внутренним объемом, согласно требованиям ATEX 95

Pharmcontract group of companies

+7 (495) 252–00–88
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)

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

info@phct.ru
www.phct.ru

УДК 634.51; 615

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЮГЛОНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ОКОЛОПЛОДНИКА *JUGLANS NIGRA* L.

О.В. Тушканова[1]*, И.Е. Бойко[1]

Резюме. В статье представлены результаты экспериментов по выделению юглона из околоплодника ореха черного (*Juglans nigra* L.) и изучению его антибиотической активности в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* как наиболее характерных представителей грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Ключевые слова: фитоэкстракт, хроматография, юглон, тест-объекты, инокулят, ингибиция, антибактериальный эффект.

INVESTIGATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY JUGLONE ISOLATED FROM PERICARP *JUGLANS NIGRA* L.

O.V. Tushkanova[1]*, I.E. Boyko[1]

Abstract. The article presents the results of experiments in selection of juglone pericarp *Juglans nigra* L. and the study of its antibiotic activity against strains of *Staphulococcus aureus* and *Escherichia coli* as the most characteristic typical representatives of gram-positive and gram-negative bacteria.

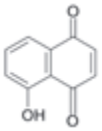
Keywords: phytoextract, chromatography, juglone, testobjects, inoculum, inhibition, anti-bacterial effect.

1 – ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», 385000, Россия, г. Майкоп, ул. Советская, д. 197/а

1 – FSBEU HE «Maikop State Tehnology University», 197/a, Sovetskaya str., Maikop, 385000, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: olia.tushkanova@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ



Юглон (5-гидрокси-1,4-нафтохинон) и его производные – природные соединения из группы нафтохинонов, содержащиеся в разных частях растений рода ореха *Juglans* L., обладают широким спектром биологического действия, включая антибиотическое, фитотоксическое, инсектицидное, фунгицидное и др. [2]. Хиноидная структура широко распространена в природе. Согласно данным из природных источников выделено около 1500 соединений с хиноидным ядром [6]. Хиноны являются важным классом природных и синтетических соединений с большим разнообразием функций. Хорошо известна их роль в биохимии живых клеток. Есть данные о том, что юглон угнетает активность такого фермента, как фосфатидилинозитол-3-киназа, с чем связывают его антиканцерогенные свойства, при этом не отмечается токсичность, свойственная другим цитостатикам [5]. Юглон получают в основном из различных частей грецкого ореха (чаще из околоплодника). Однако использовать грецкий орех, являющийся ценным пищевым растением, в качестве сырья для получения юглона нерационально. Поэтому изыскание новых источников получения юглона является актуальной задачей. Например, части ореха черного (*Juglans nigra* L.) также содержат юглон, причем в количествах, превышающих его содержание в грецком орехе [1]. Черный орех является широко распространенным растением, применяется в технических целях для лесозащитных полос, как источник ценной древесины и др. Плоды черного ореха не используются как пищевой продукт. Поэтому выделение юглона из частей черного ореха (околоплодника, плодов, цветков) экономически более целесообразно.

Многие хиноны, например 5-гидрокси-1,4-нафтохинон (юглон) и его 2-метилгомолог плюмбагин, выделенные из различных высших растений, ингибируют рост бактерий и грибов и используются растениями как защитные вещества [2]. Хиноидное ядро входит в структуру различных, практически важных противоопухолевых препаратов (антрациклиновых цитостатиков и гетероциклических хинонов). К настоящему времени принято считать, что цитотоксический эффект хинонов обусловлен: а) их способностью продуцировать кислородсодержащие свободные радикалы, б) электрофильностью хиноидного ядра, легко образующего аддукты с различными бионуклеофилами [6].

Целью данной работы явилось выделение юглона из околоплодника ореха черного и подтверждение его антибиотической активности в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Тест-объекты – музейные типичные представители ($Г^+$) и ($Г^-$) бактерий – *Staphylococcus aureus* (стафилококк золотистый) и *Escherichia coli* (кишечная палочка).

Реактивы:

- Стандарт Sigma-Aldrich (5-гидрокси-1,4-нафтохинон – юглон 97%, стандартный образец, № 481-39-0, производитель Acros).
- Диметилкетон (ацетон, 1 л, ч.д.а., ГОСТ 2603-79).
- Этоксиэтан (эфир диэтиловый, х.ч., ТУ 2600-001-45682126-13).
- Железа (III) хлорид, раствор с массовой долей 10% (ГОСТ 4517-87).
- Кислота хлористоводородная 8,3% (ГОСТ 4517-87).
- Натрия сульфат безводный, массовая доля сернокислого натрия Na_2SO_4 (%) – не менее 99,5%, ГОСТ 4166-76).
- Гидроксид калия (КОН), раствор с массовой долей 10% (ГОСТ 4517-87).
- Приготовление реактива Драгендорфа строго по ГФ XI, Т. 2, С. 125. Поставщик: ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург. Химреактивы и техническая химия.

Лабораторная посуда и оборудование

- Химическая посуда: флаконы, воронки, делительные воронки, мерные пипетки, химические стаканы, чашки Петри.
- Наборы для тонкослойной хроматографии (пластинки марки Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ, ТУ 26-11-17-89, Краснодар, Россия).
- Спектрофотометр СФ-2000, соответствует требованиям ГОСТ 15150-69, ЗАО «ОКБ Спектр», Санкт-Петербург, Россия.
- Инкубатор/термостат микробиологический BD 240 BINDER (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение фитоэкстракта из околоплодника ореха черного (*Juglans nigra* L.) проводили по ранее предложенной методике [3]. Выделение юглона проводили по разработанной нами методике: 5,0 г (точная навеска) помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл воды, 10 мл 10% водного раствора железа (III) хлорида, 40 мл кислоты хлористоводородной 8,3%, перемешивали, нагревали на водяной бане с обратным холодильником в



Инкубатор/термостат микробиологический BD 240 BINDER

течение 1 ч. Смесь охлаждали, количественно переносили в делительную воронку вместимостью 250 мл и проводили экстракцию хлороформом дважды по 40 мл в течение 2 мин. Хлороформную фазу отделяли, фильтровали через бумажный фильтр с 2 г безводного натрия сульфата, и полученный фильтрат упаривали при температуре 40 °С досуха. К сухому остатку добавляли 10 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия, тщательно перемешивали и фильтровали. Фильтрат (pH 11-12) экстрагировали равной порцией диэтилового эфира, водную фазу отделяли, подкисляли раствором хлористоводородной кислоты до pH 2-3 и проводили экстракцию хлороформом. Органическую фазу отделяли, фильтровали через сухой фильтр, содержащий безводный сульфат натрия, и упаривали досуха при 40 °С. Полученный сухой остаток с помощью нескольких капель хлороформа наносили в виде полосы на стартовую линию пластин Sorbfil, покрытых силикагелем, размером 10×10 см и хроматографировали параллельно с раствором государственного стандартного образца юглон (Sigma-Aldrich) в системе растворителей диэтиловый эфир – бензол – муравьиная кислота (50:50:1) до продвижения фронта растворителя на 5,74 см. В результате на хроматограмме (рисунок 1) наблюдали полосу (исследуемый объект) и пятно (стандартный образец юглона), окрашенные в желтый цвет и имеющие одинаковые значения R_f (0,82).

Окрашенную полосу счищали и юглон элюировали этанолом, доводя объём элюата до 15 мл. Половину полученного раствора разбавляли в 100 раз этиловым спиртом и спектрофотометрировали в диапазоне волн 200–400 нм спектральная кривая исследуемого раствора полностью совпадает со спектром этанольного раствора стандартного образца юглона и имеет максимум поглощения при 248,9 нм (рисунок 2).

Таким образом, из околоплодника ореха черного по описанной методике выделен и идентифицирован юглон.



Рисунок 1. Хроматограмма экстракта, полученного из околоплодника ореха черного (*Juglans nigra* L.): 1, 1` – пятно стандартного образца юглона, 2 – полоса нанесенного экстракта

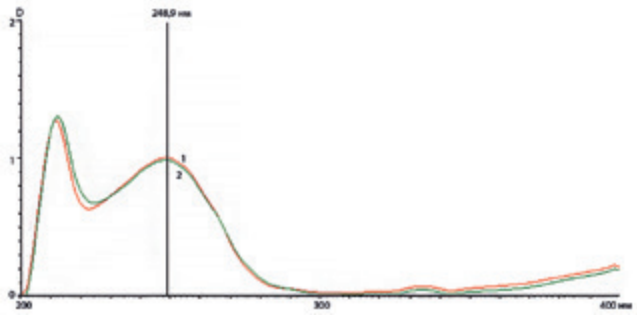


Рисунок 2. Спектры стандартного образца (1) и абсорбции юглона, выделенного из околоплодника ореха черного (*Juglans nigra* L.) (2)

Другую половину исследуемого раствора разбавляли очищенной водой в 100 раз и подвергали микробиологическому анализу. В качестве тест-объектов были выбраны музейные типичные представители ($Г^+$) и ($Г^-$) бактерий – *Staphylococcus aureus* (стафилококк золотистый) и *Escherichia coli* (кишечная палочка). Степень чувствительности тест-объектов к юглону определялась с помощью диффузного метода, основанного на логарифмической зависимости размеров зон угнетения роста тест-микроорганизмов от концентрации юглона.

Инокулят готовили из 18–20-часовой агаровой культуры в мясо-пептонном бульоне, доводя по мутности до 0,5 стандарта McFarland. Полученную бульонную культуру разводили ещё в 10 раз стерильным изотоническим раствором хлорида натрия, что соответствовало конечной концентрации (1–2) · 10^8 КОЕ/мл. Оптимальное количество посевной дозы было выбрано таким, чтобы диаметр зон угнетения для минимальной концентрации был не менее 14 мм.

Для нанесения инокулята на чашки Петри с плотной питательной средой использовали бактериологическую петлю. Петлю погружали в суспензию микроорганизмов и инокуляцию на поверхность агаровой среды проводили методом сплошного газона, периодически поворачивая чашку Петри на 60°. Культуры (*St. aureus* и *E. coli*) инкубировались в течение суток в термостате при 37 °С. Концентрация активной фракции колебалась в зависимости от эксперимента от 0,7 до 7,0%. В качестве объектов сравнения использовали среду без активной фракции (плацебо). После нанесения тест-культур чашки помещали в термостат и инкубировали 18–20 ч при 37 °С. По окончании инкубации проводили подсчет задержки зоны роста. При измерении зоны ориентировались на полную ингибицию видимого роста. Диаметры зон угнетения роста тест-микроорганизма при помощи соответствующих приборов измеряли с точностью до 0,1 мм.

Результаты микробиологической оценки свойств тестовых микроорганизмов показали, что исследуемые штаммы *St. aureus* и *E. coli*, обладая типичными для данных видов морфолого-культуральными и биохимическими свойствами, проявили выраженную чувствительность к юглону.

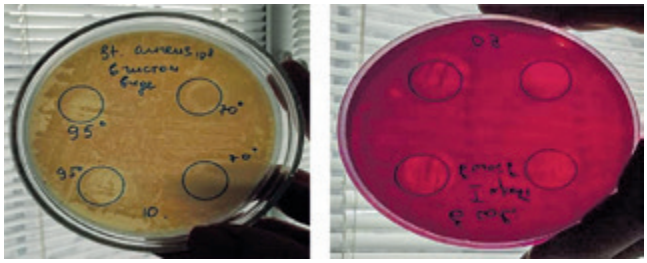


Рисунок 3. Исследуемые штаммы *St. aureus* и *E. coli*

Мы наблюдали зоны задержки роста золотистого стафилоккока и кишечной палочки вокруг участков, пропитанных исследуемым раствором определенных концентраций, причем размеры зон угнетения были больше по сравнению с контролем (различия были статистически значимыми). Следует отметить, что юглон проявил выраженный эффект в отношении обоих исследуемых видов микроорганизмов, однако кишечная палочка проявила большую чувствительность к юглону, чем золотистый стафилококк. Нами найдено, что между размерами зон угнетения роста микроорганизмов и концентрацией юглона имеется прямая зависимость. С этой целью использовали спиртовый раствор юглона после спектрофотометрического анализа, определенные объёмы которого (0,5–3,0 мл) разбавляли в 100 раз очищенной водой и определяли антибиотическую активность по описанной выше методике. Для

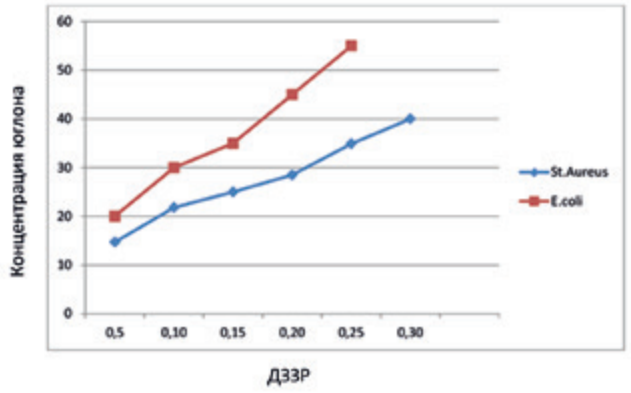


Рисунок 4. Зависимость ДЗЗР *St. aureus* и *E.coli* от концентрации юглона: V (мл) – объёмы основного раствора юглона, взятые для разведения

примера на рисунке 4 приведен график зависимости диаметра зон задержки роста (ДЗЗР) *St. aureus* от концентрации юглона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований из околоплодника ореха черного был выделен и идентифицирован юглон. Показано, что юглон проявляет выраженный бактериостатический эффект в отношении *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, что подтверждается литературными данными [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ж.В. Дайронас, И.Н. Зилфикаров. Природные нафтохиноны: перспективы медицинского применения. – Щелково. 2011. 252 с.
2. Г.И. Жунгиету, Л.А. Влад. Юглон и родственные1,4-нафтохиноны. – Кишинев: Штиинца, 1978. 94 с.
3. Ж.В. Дайронас, И.Н. Зилфикаров, А.В. Корочинский, В.В. Корочинская. Определение нафтохинонов в сырье и препарате ореха черного // Фармация. 2013. № 4. С. 12–14.
4. С.Г. Полоник. Противоопухолевая и иммуностимулирующая активность О- и S-ацетилгликозидов 5-гидрокси-1,4-нафтохинона (юглона) // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. № 8. С. 3–4.
5. С.М. Ходжибаева, О.Ф. Филатова, А.А. Тыщенко. Новые аспекты получения и контроля юглона // Химия природных соединений. 2000. № 3. С. 227–229.
6. C. Ashe. Antitumor quinones Mini Rev // Med. Chem. 2005. V. 5. № 5. P. 449–467.
7. R.H. Thomson. Naturally Occurring Quinones III. – London-New-York: Chapman & Hall. 1987.
8. J.S. Driscoll, G.F. Hazard, H.B. Wood, et all. Structure-Antitumor Activity Relationships Among Quinone Derivatives // Cancer Chemother. Repts. 1974. Part 2. V. 4. № 2. P. 1–35.
9. F. Pax. Grundzüge der Pflanzenverbreitung in den Karpaten // Die Vegetation der Erde. Bd.2. – Leipzig. 1908. 321 p.
10. J. Segura-Aguilar, K. Junsson, U. Tidifelt et al. The cytotoxic effects of 5-OH-l,4-naphthoquinone and 5,8-diOH-l,4-naphthoquinone on doxorubicin-resistant human leukemia cells (HK-60) // Leuk. Res. 1992. V. 16. № 6–7. P. 631–637.



УДК 615.07

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛИСТЬЯХ И ПЛОДАХ ПЛЮЩА КАВКАЗСКОГО

В.М. Баева[1]*, Н.М. Молодожникова[1], Р.М. Кузнецов[1]

Резюме. С помощью ГЖХ-МС проведено сравнительное исследование качественного состава биологически активных соединений спиртовых извлечений листьев и плодов плюща кавказского. Показано, что состав БАС листьев более богатый – установлено строение 22 следующих соединений: пинен, катехол, гермакрен, синаповый спирт, фитол, фалькаринол, пальмитиновая, олеиновая, линоленовая кислоты и их эфиры; стигмастерол, лупеол, ситостерол, панаксадиол и панаксинон. Три последних – панаксидол и панаскинон и ситостерол – не обнаружены в извлечении плодов.

Ключевые слова: плющ кавказский, листья, плоды, сравнительный анализ.

COMPARATIVE STUDY OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS COMPOSITION IN THE LEAVES AND FRUITS OF *HEDERA CAUCASICA*

V.M. Baeva[1]*, N.M. Molodozhnikova[1], R.M. Kuznetsov[1]

Abstract. A comparative study of the biologically active compounds (BAC) composition of alcoholic extracts of leaves and fruits was carried out by GLC-MS. It is shown that the BAC composition of leaves of *Hedera caucasica* is more extensive: the structure of 22 following compounds was determined: pinene, catechol, germacrene, sinapic alcohol, phytol, falkarinol, palmitic acid, oleic acid, linolenic acid and their esters; stigmasterol, lupeol, sitosterol, panaxadiol and panaxinon. The last three compounds – panaxidol, panaxinon and sitosterol – were not found in fruit extract.

Keywords: *Hedera caucasica*, leaves, fruits, comparative analysis.

1 – ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Б. Пироговская, д. 2, стр. 4

1 – Federal State Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 2/4, B. Pirogovskaya str., Moscow, 119991, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: verabaeva@mail.ru
Тел.: 8 (925) 802 68 20

ВВЕДЕНИЕ

В Европейскую Фармакопею включено два вида сырья плюща обыкновенного (*Hedera helix* L.): 1) цельные или резаные высушенные листья, собранные весной; 2) для гомеопатических препаратов – свежие молодые, неодревесневшие ветки, собранные в начале цветения.

Для сухого сырья даны характеристики подлинности: описаны внешние признаки, микроскопическое строение, приведены данные тонкослойной хроматографии (ТСХ), а также охарактеризованы показатели качества [1].

Современные флористы описывают несколько видов плюща. Так, во «Флоре Северо-Западного Кавказа» описываются два вида плюща *Hedera* L.: плющ колхидский (*H. colchica* C. Koch) и плющ обыкновенный (*H. helix* L.) [2].

Для первого **характерен пряный запах**, опушенность звёздчато-чешуевидными волосками с короткими лучами, покрывающими почки, молодые стебли и черешки молодых листьев. Листья вегетативных побегов цельные или неясно трёхлопастные. Верхняя сторона **листьев глянцевая, блестящая**.

Отличием плюща обыкновенного является **отсутствие пряного запаха**, звёздчатые волоски почек, молодых стеблей и черешков молодых листьев имеют длинные лучи. Листья у него 3–5-лопастные, с верхней стороны обычно **матовые**. Оба объекта являются деревянистыми лианами, фанерофитами [2].

Как видно из этого описания, недостаточно одних внешних признаков для точного определения вида, не выявлены диагностические признаки, позволяющие легко устанавливать видовую принадлежность и определять характеристики подлинности сырья.

В связи с таким широко распространённым явлением, как полиморфизм, для лекарственных растений необходимо тщательно описывать перспективные лекарственные виды (особенно их химический состав).

Препараты *Hedera* применяются в гомеопатии, в народной медицине как отхаркивающее,

противовоспалительное средство при кашле, рините, туберкулёзе, используются при ревматизме, подагре, ожогах, гнойных ранах и в качестве гипотензивного средства [3].

По литературным данным, плющ обыкновенный накапливает тритерпеновые сапонины, эфирные масла, камеди, флавоноиды, различные сахара, фенолкарбоновые кислоты и др. [3].

Химический состав плюща кавказского в литературе не рассматривается [3].

С появлением в арсенале исследователей химического состава лекарственных растений высокоэффективных методов жидкостной и газовой хроматографии, особенно в сочетании с масс-спектрометрией, появилась возможность тщательного изучения химического состава, выявления веществ, определяющих ту или иную фармакологическую активность препаратов из растительного сырья, и объяснения широты спектра их действия. Это также способствует расширению отечественной сырьевой базы и обоснованию перспективы введения в научную отечественную медицину новых видов растительного сырья [4, 5].

Цель исследования: провести изучение химического состава свежих листьев и плодов плюща кавказского в сравнении с использованием ГЖХ-МС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили спиртовые извлечения свежих листьев и плодов плюща кавказского, собранных в январе 2016 года на Черноморском побережье Краснодарского края.

Для сохранения нативных веществ готовили спиртовое извлечение из свежего сырья с 96% спиртом этиловым 1:10 настаиванием в темном месте в течение 5 дней.

Для анализа использовали ГЖХ-МС при следующих условиях: прибор фирмы Agilent Technologies, состоящий из газового хроматографа 7820A/5977 (колонка HP-5, 30 м х 0,25 мм х 0,25 мм) с квадрупольным масс-анализатором. Температурная программа хроматографирования: при 50 °С изотерма 2 мин, далее программируемый нагрев до 150 °С со скоростью 15 °С/мин и при 280 °С изотерма 10 мин. Объем введенного извлечения – 1 мкл. Инжектор с делением потока 1:20. Температура инжектора – 280 °С. Температура интерфейса – 280 °С. Газ-носитель – гелий; скорость потока – 0,8 мл/мин. Режим масс-детектирования – по полному ионному току. Программное обеспечение – ChemStation F.01.01.2317. Условия масс-спектрометрического анализа: энергия ионизирующих электронов – 70 эВ; регистрация масс-спектров в положительных ионах в диапазоне (m/z) от 20 до 450. Идентификацию компонентного состава (качественный анализ) проводили по библиотеке NIST-05 и соответствующим значениям хроматографических индексов Ковача [5].

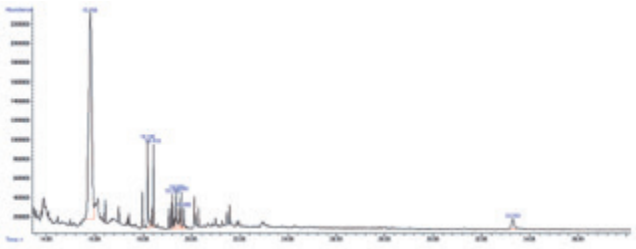


Рисунок 1. Хроматограмма спиртового извлечения листьев плюща кавказского



Газовый хроматограф Agilent Technologies 5977

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования спиртовых извлечений из листьев плюща кавказского показали, что в состав биологически активных соединений входят ароматические спирты, терпеноиды, обладающие противовоспалительным, тонизирующим, антибактериальным и антигрибковым действием. Также установлено наличие жирных кислот и их эфиров, как известно, также обладающих противовоспалительным действием. Эти данные представлены на хроматограмме (рисунок 1) и в таблице 1, из которых видно, что выделено 24 и установлено строение 22 следующих соединений: пинен, катехол, гермакрен, синаповый спирт, фитол, фалькаринол, пальмитиновая, олеиновая, линоленовая кислоты и их эфиры, панаксадиол, панаксинон, стигмастерол, ситостерол и лупеол. Для двух установлена их принадлежность к сесквитерпенам.

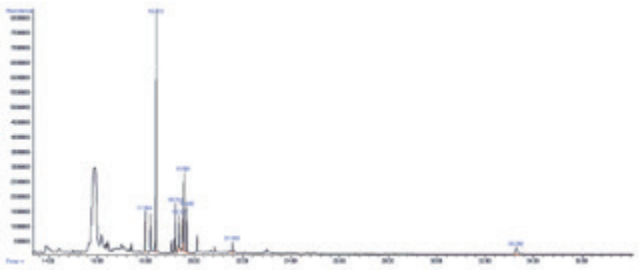


Рисунок 2. Хроматограмма спиртового извлечения плодов плюща кавказского

Ситостерол, панаксадиол и панаксинон характерны для листьев плюща и определяют их тонизирующую активность.

Результаты исследования извлечений из листьев и плодов плюща кавказского показали, что химический состав спиртового извлечения из свежих плодов несколько отличается от химического состава спиртового извлечения листьев. Данные представлены на хроматограмме (рисунок 2) и в таблице 1; выявлено 18 соединений и определено 16: гемакрен, синаповый спирт, фалькаринол, фитол, пальмитиновая, олеиновая и линоленовая кислоты и их эфиры, стигмастерол, лупеол. В отличие от листьев в плодах содержится 2,6-диметоксифенол, конифериловый спирт и токоферол.

Для трёх соединений установлена их принадлежность к сесквитерпенам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Методом ГЖХ-МС в сырье плюща кавказского выявлено 30 соединений, из них установлено строение 25. В листьях плюща выявлено 24 соединения, из них установлено химическое строение 22 соединений, два отнесены к сесквитерпенам.
2. В извлечениях листьев содержатся пинен, катехол, гермакрен, синаповый спирт, фитол, фалькаринол, пальмитиновая, олеиновая, линоленовая кислоты и их эфиры, панаксадиол, панаксинон, стигмастерол, ситостерол и лупеол.
3. В извлечениях плодов выявлено 18 соединений, из них определено 16, три также отнесены к сесквитерпенам. В извлечениях плодов содержатся также гемакрен, синаповый спирт, фалькаринол, фитол, пальмитиновая, олеиновая и линоленовая кислоты и их эфиры, стигмастерол, лупеол. В отличие от извлечений листьев в них содержится 2,6-диметоксифенол, конифериловый спирт и токоферол, но отсутствуют панаксадиол и панаксинон, пинен и катехол.
4. Полученные результаты могут быть использованы при разработке критериев подлинности этих перспективных видов сырья.

Таблица 1.

Качественный состав спиртовых извлечений листьев и плодов плюща кавказского

№ п/п	Время выхода	Биологически активные соединения листьев	Биологически активные соединения плодов
1	6,41	ά-Пинен	–
2	7,16	ß- Пинен	–
3	8,29	Фенилацетальдегид	–
4	10,64	Катехол	–
5	12,86	–	2,6-Диметоксифенол
6	13,37	–	$C_{15}H_{24}$
7	14,19	$C_{15}H_{24}$	–
8	14,46	Гермакрен D	Гермакрен D
9	14,62	$C_{15}H_{24}$	–
10	14,9	–	$C_{15}H_{24}$
11	16,36	–	$C_{15}H_{23}OH$
12	16,67	–	Конифериловый спирт
13	18,07	Пальмитолеиновая кислота	–
14	18,17	Пальмитиновая кислота	Пальмитиновая кислота
15	18,29	Этилпальмитолеат	–
16	18,42	Этилпальмитат	Этилпальмитат
17	18,5	Синаповый спирт	Синаповый спирт
18	18,72	Фалькаринол	Фалькаринол
19	19,22	Фитол	Фитол
20	19,33	Линоленовая кислота	Линолевая кислота
21	19,38	Олеиновая кислота	Олеиновая кислота
22	19,52	Этиллинолеат	Этиллинолеат
23	19,58	Этилолеат	Этилолеат
24	19,64	Панаксидол	
25	19,68	Этилстеарат	
26	19,72	Панаксинон	
27	31,77	Стигмастерол	Стигмастерол
28	33,33	Ситостерол	–
29	35,68	Лупеол	Лупеол
30	37	–	Токоферол

ЛИТЕРАТУРА

1. Европейская Фармакопея, 7 изд. на русском языке. Т. 1 и 2. – Страсбург. 2011. 1812 с.
2. А.С. Зернов. Флора Северо-Западного Кавказа. – М. 2006. С. 405–406.
3. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. – Л.: Наука, 1988. С. 62–63.
4. Д.А. Борисова, Д.М. Попов. Сравнительное исследование качественного состава флавоноидов в листьях, цветках и корневищах с корнями первоцвета лекарственного // Разработка и регистрация лекарственных средств. № 4(5). С. 102–106.
5. Т.А. Щеглова, Д.В. Курилов, А.В. Стреляева. Изучение химического состава и антиоксидантной активности матричной настойки из листьев шалфея лекарственного // Фармация. 2012. № 3. С. 27–30.

Agilent Technologies

Новое поколение систем ГХ

Agilent 9000 Intuvo

Intuvo - полностью интегрированное решение, которое включает оборудование, расходные материалы, программное обеспечение и услуги, предоставляет уникальные технологические возможности.



- Исключен трудоемкий процесс обрезания колонок
- Герметичное соединение происходит менее чем за 2 мин
- Максимальная производительность детектирования
- Гибкая система ввода проб
- Мгновенный доступ к информации об оборудовании
- Промежуточная оптимизация между циклами всего за несколько минут
- Сокращение расходов на энергосбережение и системы ОВКВ, экономия пространства в лаборатории

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 615.322

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ БЕРЕЗОВЫХ ПОЧЕК, ПОЛУЧЕННЫХ ЭКСТРАКЦИЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

О.Ю. Кузнецова[1]*, Е.Г. Горелова[1], Д.И. Фахрутдинова[1], Р.З. Гильманов[1]

Резюме. Изучено влияние длительности ультразвукового воздействия на общий выход биологически активных веществ при экстрагировании березовых почек экстрагентами разной полярности. В качестве экстрагентов использовали воду, 70% водный раствор этанола и смесь изопропанол – вода в соотношении 60:40. Экстракцию проводили методом мацерации. Анализ полученных извлечений проводился по степени извлечения экстрактивных веществ из сырья, содержанию аскорбиновой кислоты и углеводов. Интенсификация процесса экстрагирования ультразвуком происходит независимо от используемого экстрагента. Наблюдается увеличение общего выхода экстрактивных веществ, в том числе и углеводов, содержание же аскорбиновой кислоты в экстрактах уменьшается либо полностью отсутствует.

Ключевые слова: экстракты, почки березовые, этиловый и изопропиловый спирты.

THE TESTING EXTRACTIVES OF BIRCH BUDS, OBTAINED BY EXTRACTION USING ULTRASOUND

O.Yu. Kuznetsova[1]*, E.G. Gorelova[1], D.I. Fakhrutdinova[1], R.Z. Gilmanov[1]

Abstract. The study was carried out on the effect of the duration of ultrasonic influence on the total output of biologically active substances from the extraction of birch buds extractants of different polarity. The water, 70% aqueous solution of ethanol and mixture of isopropanol-water 60:40 were used as extractants. Extraction was conducted by maceration. Analysis of the obtained extracts was performed by the degree of extraction of extractive substances from raw materials, the content of ascorbic acid and carbohydrates. The intensification of the process of extracting the ultrasound is not depending on the extractant. There is an increase in overall yield of extractives, including carbohydrates, while the content of ascorbic acid in the extracts is reduced or completely absent.

Keywords: extracts of birch buds, ethyl and isopropyl alcohols.

1 – ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»), 420015, Россия, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 68

1 – Federal State Educational Institution of Higher Education Kazan National Research Technological University (VO «KNRTU»), 68, K. Marx str., Kazan, 420015, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: kuznetsovaolga@mail.ru
Тел.: 8 (843) 231 95 71

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственное растительное сырье – березы почки (Betulae gemmae) согласно Государственной фармакопее [1] собирают и высушивают с дикорастущих деревьев березы повислой (березы бородавчатой) *Betula pendula* Roth (*Betula verrucosa* Ehrh.) и березы пушистой *Betula pubescens* Ehrh. семейства березовых – Betulaceae. Березовые почки (БП) являются уникальным природным средством, помогающим избавиться от ряда заболеваний. Их применяют при отеках сердечно-сосудистого происхождения, в качестве мочегонного или желчегонного средства, используют при лечении заболеваний печени и желчных путей, при бронхитах, трахеитах, а также в качестве дезинфицирующего и отхаркивающего средства.

Химический состав березовых почек достаточно разнообразен. В серии работ Д.Н. Ведерникова и др. [3–7] были идентифицированы и исследованы экстрактивные вещества почек березы повислой *Betula pendula* Roth (Betulaceae). Анализ экстрактивных веществ проводился в углеводородных экстрактах (последовательное экстрагирование петролейным и диэтиловым эфирами) с помощью газохроматографических методов анализа. В углеводородных экстрактах последовательно идентифицированы жирные кислоты, углеводороды, сложные эфиры, карбонильные соединения и оксиды, тритерпеновые кислоты, флавоноиды, спирты и эфиры, сесквитерпеновые диолы, триолы, тритерпеновые секо-кислоты и др.

Нами в работе [8] были исследованы водные и изопропиловые извлечения березовых почек с применением ультразвукового воздействия. Показано, что использование ультразвука наиболее эффективно на начальной стадии экстракции. Ультразвуковое воздействие активизирует

экстракционный процесс, позволяя наиболее полно извлекать экстрактивные вещества из БП. Подобраны оптимальные режимы экстрагирования и экстрагенты. При этом полученные извлечения характеризуются высоким выходом экстрактивных веществ и содержанием аскорбиновой кислоты.

Содержание аскорбиновой кислоты (АК), или витамина С, в БП подробно не изучено. АК является важным компонентом в жизнедеятельности человеческого организма (сильный антиоксидант, кофактор многих ферментов и др.). Ее применяют в качестве эффективного средства при профилактике и лечении злокачественных новообразований и тяжелых травм [9].

Целью данной работы является изучение влияния ультразвукового воздействия на выход биологически активных веществ березовых почек при экстрагировании разными экстрагентами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сырье «Березы почки» (Betulae gemmae), состав: береза повислая, почки измельченные, закупалось в аптечной сети (ООО «Фарм-Продукт», серия 0715, годен до 01.07.2017). Сырье предварительно было измельчено до однородной массы в фарфоровой ступке.

Экстрагентами служили дистиллированная вода, 70% водный раствор этанола и смесь изопропанол – вода в соотношении 60:40.

Экстрагирование березовых почек проводилось методом мацерации, то есть настаиванием в одну стадию при комнатной температуре. Соотношение сырье : экстрагент составляло 1:10.

Использовались этиловый и изопропиловый спирты марки «х.ч.».

Сухой остаток определяли по [2], содержание АК – по [10], количественное определение углеводов с помощью фенолсернокислотного метода (ФСК) – по [11], качественное определение углеводов (моносахаридов) с помощью качественных реакций Фелинга и Молиша – по [12].

Ультразвуковое воздействие осуществлялось на приборе «Сапфир УЗВ-0,8 ТЦ» (Россия) с рабочей частотой 35 кГц, мощностью генератора 50 Вт, длительность обработки составляла от 0 до 30 мин, объем обрабатываемого образца 50 мл – по [8].

С помощью программы Statistica (ver. 6, StatSoft, Russia) были обработаны экспериментальные данные (доверительная вероятность P=0,95, объем выборки n=3).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментальных исследованиях проводился подбор оптимальных параметров проведения процесса экстрагирования, таких как время обработки ультразвуком и вид экстрагента (вода, этиловый и изопропиловый спирты в различных концентрациях).

Традиционно экстрагирование березовых почек проводится водой или этиловым спиртом, поэтому в качестве контрольных экспериментов были получены водные и этанольные извлечения из березовых почек (таблица 1).

Таблица 1.

Физико-химические свойства извлечений из березовых почек

Параметры проведения экстракции				Физико-химические характеристики	
№	Температура, °С	Обработка экстракта ультразвуком, мин	Время экстракции, ч	Сухой остаток, г	Содержание витамина С, мл/г
Экстракция водой					
1	20	–*	3	0,19±0,01	0,82±0,01
2	20	3	3	0,36±0,02	0,00
3	20	10	3	0,41±0,01	0,00
4	20	20	3	0,60±0,02	0,00
5	20	30	3	0,50±0,02	0,00
Экстракция этиловым спиртом					
6	20	-*	3	0,84±0,02	0,00
7	20	3	3	0,88±0,01	0,00
8	20	10	3	1,01±0,03	0,00
9	20	20	3	1,30±0,02	0,00
10	20	30	3	1,22±0,02	0,00

Примечание: *«–» – отсутствует обработка ультразвуком.

Сравнивая контрольные данные (без обработки ультразвуком), можно увидеть (таблица 1), что этиловым спиртом извлекается в 4,5 раза больше экстрактивных веществ, чем водой. Возможно, это связано со способностью этилового спирта извлекать липофильные биологически активные вещества.

Ультразвуковое воздействие основано на физических кавитационных эффектах, происходящих в озвучивающей системе при распространении волн. В результате действия явления кавитации клеточная структура некоторых поверхностных слоев частиц березовых почек разрушается, способствуя более полному извлечению экстрагируемых веществ за счет интенсивного их вымывания из разрушенных клеток. На выход экстрактивных веществ из сырья под действием ультразвука оказывает влияние длительность воздействия.

При экстракции березовых почек водой или этиловым спиртом в обоих случаях с увеличением длительности ультразвукового воздействия до 20 мин происходит увеличение выхода экстрактивных веществ и наблюдается спад при более длительном воздействии. Вероятно, происходит деструкция неустой-

чивых к ультразвуку соединений. При длительности озвучивания, приводящей к максимальному выходу экстрактивных веществ (20 мин), наблюдается интенсификация процесса в водных извлечениях в 3,16, а в этанольных – в 1,55 раза соответственно. При этом возрастает интенсивность окраски извлечений березовых почек, что связано с увеличением содержания пигментных соединений типа флавоноидов, меланинов и т.п.

В водных извлечениях в экстрактивных веществах присутствует АК, однако в извлечениях, получаемых с применением ультразвука, ее наличие не удается зафиксировать. Это, вероятно, связано с тем, что химическое воздействие ультразвука основано на ряде физико-химических процессов, протекающих в кавитационных полостях, при этом происходит ионизация молекул воды и образование активных радикальных частиц. АК же, являясь высокоактивным антиоксидантом, вступает во взаимодействие с радикальными частицами, возникающими под воздействием ультразвука, и инактивирует их, что приводит к снижению ее количества в водном извлечении до нуля.

В случае же этанольных извлечений АК отсутствует во всех извлечениях, как с обработкой ультразвуком, так и без обработки. В данном случае можно предположить, что выбранный экстрагент изначально не экстрагирует АК из сырья.

В работе [8] при исследовании водных и изопропиловых извлечений березовых почек с применением ультразвукового воздействия было установлено, что оптимальные показатели достигаются при использовании в качестве экстрагента смеси изопропанол – вода в соотношении 60:40 при комнатной температуре с длительностью экстрагирования 3 ч и с обработкой ультразвуком в течение 3 мин.

В данном исследовании также применен этот же экстрагент, однако длительность озвучивания перед экстрагированием увеличивается до 30 мин (таблица 2). При максимальном времени озвучивания достигается увеличение выхода экстрактивных веществ практически вдвое по сравнению с контрольным извлечением (без обработки ультразвуком), однако содержание АК падает в 3,5 раза.

Сравнивая показатели изопропиловых извлечений с водными (таблицы 1 и 2), можно сказать, что динамика изменений по сухому остатку в целом схожая, однако в изопропиловых извлечениях содержание АК достаточно высоко и не пропадает под действием ультразвука. Максимальное количество АК, извлекаемое из сырья данным экстрагентом, наблюдается в режиме без обработки ультразвуком. Увеличение длительности ультразвукового воздействия приводит к пропорциональной потере АК. В этом случае наблюдаются взаимообратные прямые зависимости между временем обработки ультразвуком и выходом экстрактивных веществ и содержанием АК. Возможно, это связано с природными особенностями экстрагента.

Таблица 2.

Физико-химические свойства изопропиловых извлечений из березовых почек

Параметры проведения экстракции				Физико-химические характеристики	
№	Температура, °С	Обработка экстракта ультразвуком, мин	Время экстракции, ч	Сухой остаток, г	Содержание витамина С, мл/г
экстракция смесью изопропанол : вода в соотношении 60:40					
1	20	–*	3	0,34±0,01	27,32±0,10
2	20	3	3	0,37±0,02	21,92±0,08
3	20	10	3	0,51±0,01	15,29±0,06
4	20	20	3	0,60±0,03	13,85±0,11
5	20	30	3	0,70±0,02	7,46±0,05

Примечание: *«–» – отсутствует обработка ультразвуком.

В таблице 3 приведены сводные данные оптимальных по физико-химическим свойствам извлечений из березовых почек, полученных экстрагентами разной полярности.

Таблица 3.

Физико-химические свойства оптимальных по составу извлечений из березовых почек

Параметры проведения экстракции				Физико-химические характеристики экстрактов березовых почек		
№	Температура, °С	Обработка экстракта ультразвуком, мин	Время экстракции, ч	Сухой остаток, г	Содержание	
					витамина С, мл/г	углеводов, мг/мл
Экстракция водой						
1	20	–*	3	0,18±0,01	0,07±0,01	0,32±0,02
2	20	20	3	0,42±0,01	1,37±0,01	0,56±0,02
Экстракция этиловым спиртом						
3	20	–*	3	0,84±0,01	–**	0,87±0,02
4	20	20	3	1,30±0,01	–	1,44±0,01
Экстракция смесью изопропанол – вода в соотношении 60:40						
5	20	–*	3	0,34±0,01	27,32±0,01	0,51±0,03
6	20	20	3	0,60±0,01	13,85±0,01	0,69±0,02

Примечание: * «–» – отсутствует обработка ультразвуком, ** «–» – не определяется.

Дополнительно в этих извлечениях было изучено количественное и качественное содержание углеводов. Количественное их определение проводилось с помощью широко применяемого фенол-сернокислотного метода (ФСК) [11], позволяющего определить общее содержание углеводных соединений без предварительного гидролиза полисахаридных компонентов в присутствии как гумусовых веществ, так и неорганических составляющих. Как видно из таблицы 3, во всех извлечениях под действием ультразвука происходит увеличение содержания углеводов. Для водных извлечений – в 1,75 раза, для этанольных – в 1,35 раза, для изопропиловых – в 1,65 раза соответственно.

Качественное определение углеводов, в частности моносахаридов, проводили с помощью качественных реакций Фелинга и Молиша [12]. Во всех образцах были получены положительные реакции.

Положительная реакция Фелинга во всех исследуемых извлечениях говорит о присутствии в них моно- и дисахаридов, обладающих восстанавливающими свойствами, то есть наличием в них свободного гликозидного гидроксила. Это косвенно говорит о присутствии редуцирующих сахаров в извлечениях. Положительная реакция Молиша подтверждает присутствие в извлечениях пентоз (рибозы, дезоксирибозы, ксилулозы и т.д.) и гексоз (глюкозы, фруктозы, маннозы, галактозы и т.д.).

Более точная идентификация этих соединений планируется в дальнейшем с применением более точных и чувствительных современных методов, например хроматографических.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Интенсификация процесса экстрагирования ультразвуком происходит независимо от используемого экстрагента. В любом случае наблюдается увеличение общего выхода экстрактивных веществ, однако их качественный состав отличается.
2. Анализ полученных данных показывает, что ультразвук по-разному действует на извлекаемые вещества, в частности содержание углеводов растет во всех случаях, а выход АК либо уменьшается, либо отсутствует, что связано со сложными физико-химическими процессами, происходящими при озвучивании и экстрагировании.
3. Для всех извлечений из березовых почек оптимальные результаты по выходу экстрактивных веществ достигаются при ультразвуковом воздействии в течение 20 мин.
4. Наиболее эффективным вариантом является способ получения извлечения из березовых почек с помощью смеси изопропанол – вода в соотношении 60:40 при комнатной температуре с предварительной обработкой ультразвуком в течение 20 мин. В данном случае при экстрагировании увеличивается выход экстрактивных веществ вдвое, происходит увеличение выхода углеводов на 35%, содержание АК хоть и снижается практически вдвое по сравнению с извлечением без озвучивания, но также находится на достаточном уровне. Данный способ достаточно прост в использовании, экономичен и не требует больших затрат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея XIII online (ГФ 13 online). URL: http://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/ (дата обращения 24.01.2017).
2. ФС.2.5.0006.15 Березы почки. URL: http://pharmacopoeia.ru/fs-2-5-0006-15-berezy-pochki/ (дата обращения 24.01.2017).
3. Д.Н. Ведерников, В.И. Рощин. Экстрактивные вещества почек березы повислой *Betula pendula* Roth (Betulaceae). 1. Состав жирных кислот, углеводородов и сложных эфиров // Химия растительного сырья. 2009. № 3. С. 69–73.
4. Д.Н. Ведерников, В.И. Рощин. Экстрактивные вещества почек березы повислой *Betula pendula* Roth (Betulaceae). 2. Состав жирных кислот, углеводородов и сложных эфиров // Химия растительного сырья. 2009. № 3. С. 75–83.
5. Д.Н. Ведерников, В.И. Рощин. Экстрактивные вещества почек березы повислой *Betula pendula* Roth (Betulaceae). 3. Состав тритерпеновых кислот, флавоноидов, спиртов и эфиров // Химия растительного сырья. 2010. № 4. С. 67–75.
6. Д.Н. Ведерников, В.И. Рощин. Экстрактивные вещества почек березы повислой *Betula pendula* Roth (Betulaceae). 4. Состав сесквитерпеновых диолов, триолов, флавонидов // Химия растительного сырья. 2011. № 1. С. 111–118.
7. Д.Н. Ведерников, В.И. Рощин. Экстрактивные вещества почек березы повислой *Betula pendula* Roth (Betulaceae). 5. Состав тритерпеновых секо-кислот // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 95–102.
8. Е.Г. Горелова, О.Ю. Кузнецова, Р.З. Гильманов. Разработка способа получения и исследование извлечений из березовых почек // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. Т. 17. № 1. С. 62–65.
9. В.Б. Загуменников, А.В. Молчанова, Е.Ю. Бабаева, А.Л. Петрова. Изучение накопления аскорбиновой кислоты в траве эхинацеи пурпурной свежей и в продуктах ее переработки // Химико-фармацевтический журнал. 2014. Т. 48. № 10. С. 39–42.
10. ГОСТ 24556-89. Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С. – М.: Издательство стандартов, 1989. 16 с.
11. M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and Fred Smith. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances // Analytical chemistry. 1956. V. 28. № 3. P. 350–356
12. О.Ю. Кузнецова. Биохимия. Лабораторный практикум. Учебно-методическое пособие. –Казань: КГТУ, 2010. 80 с.

УДК 543.635.9

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ ПРОСТЫХ САХАРОВ В ПЛОДАХ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

О.В. Тринеева[1]*, М.А. Казьмина[1], А.И. Сливкин[1]

Резюме. Разработана и валидирована методика определения суммы свободных и связанных сахаров пикриновым методом в плодах облепихи крушиновидной. Валидационная оценка методики по характеристикам: специфичность, линейность, предел обнаружения, внутри- и межлабораторная воспроизводимость и повторяемость – показала ее соответствие основным критериям приемлемости. Проведено определение суммы полисахаридов и простых сахаров в плодах облепихи крушиновидной фармакопейными методами (антроновым и орциновым). Установлено содержание свободных и связанных сахаров в плодах. Исследована стабильность полисахаридного комплекса в плодах облепихи крушиновидной при высушивании.

Ключевые слова: плоды облепихи крушиновидной, полисахариды, простые сахара, пикриновый метод, орциновый метод, антроновый метод.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR DETERMINING THE AMOUNT OF FREE AND RELATED SIMPLE SUGARS IN THE FRUIT OF SEA BUCKTHORN

O.V. Trineeva[1]*, M.A. Kazmina[1], A.I. Slivkin[1]

Abstract. Developed and validated method of determining the amount of free and bound sugars picric method in the fruit of sea buckthorn. Validation assessment methodology characteristics: specificity, linearity, limit of detection, intra- and inter-laboratory reproducibility and repeatability demonstrated its compliance with the basic eligibility criteria. A determination of the amount of simple sugars and polysaccharides in the fruit of sea buckthorn of pharmacopoeial methods (ortsine and anthrone methods). It established the content of free and bound sugars in the fruit. The stability of the complex polysaccharide in the fruit of sea buckthorn on drying.

Keywords: sea buckthorn fruit, polysaccharides, simple sugars, picric method, ortsine method, anthrone method.

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, Воронеж, Университетская пл., д. 1

1 – Voronezh State University, 1, University Square, Voronezh, 394006, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: trineevaov@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Определение сахаров с пикриновой кислотой описано в нормативной документации на лекарственное растительное сырье (ЛРС) «Мать-и-мачехи листья», а также фитопрепараты «Ламинарид», «Алтейного корня экстракт сухой», «Сок подорожника», «Арменикум». В основе метода лежит цветная реакция моноз с пикриновой кислотой с образованием аминопикриновой кислоты в результате восстановления альдозой группы NO_2 в NH_2. Полученные восстанавливающие моносахариды с пикриновой кислотой в щелочной среде имеют максимум поглощения в диапазоне 440–460 нм [1].

Кроме пикринового метода, в ОФС ГФ XIII изд. «Определение сахаров спектрофотометрическими методами» [2] включены и другие способы. Антроновый метод основан на расщеплении сложных углеводов до моносахаридов в сильнокислой среде с последующей их дегидратацией и образованием оксиметилфурфурола, образующего при реакции с антроном комплексное соединение синевато-зеленого цвета. Интенсивность образовавшейся окраски пропорциональна содержанию сахаров в реакционной среде [2]. При нагревании пентоз в орциновом методе (или их фосфорных производных) в присутствии кислот от них отщепляется вода и образуется фурфурол; в присутствии орцина и железа (III) хлорида при этом развивается зеленое окрашивание [2].

Плоды облепихи крушиновидной имеют сложный химический состав, представленный такими группами биологически активных веществ (БАВ), как флавоноиды, органические кислоты, дубильные вещества, водо- и жирорастворимые витамины, полисахариды. Биохимический состав зависит от сорта, места произрастания, времени сбора и других факторов. Согласно литературным данным в плодах содержатся легкоусвояемые сахара. Из углеводов в облепихе найдены глюкоза, фруктоза, сахароза [3, 4].

Цель работы – разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения суммы поли- и моносахаридов в плодах облепихи крушиновидной различных способов консервации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись свежие и высушенные плоды облепихи крушиновидной, собранные в Воронежской области в период полного созревания, согласно правилам заготовки данного вида ЛРС. Сушку плодов производили при t=60 °С до остаточной влажности не более 14%.

Для количественного определения простых сахаров, как свободных, так и связанных, в сырье облепихи крушиновидной использованы методики, изложенные в ОФС ГФ XIII изд. «Определение сахаров спектрофотометрическими методами» [2]. Определение сахаров спектрофотометрическим методом проводят по измерению оптической плотности окрашенных растворов, образуемых при взаимодействии сахаров с антроновым или орциновым реактивами и пикриновой кислотой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Максимум поглощения в диапазоне длин волн 443–445 нм отмечен для стандартных образцов моноз (глюкоза, фруктоза, ксилоза, рамноза, ЗАО «Вектон», Россия) с пикриновой кислотой в щелочной среде, использованных при разработке методики (рисунок 1).

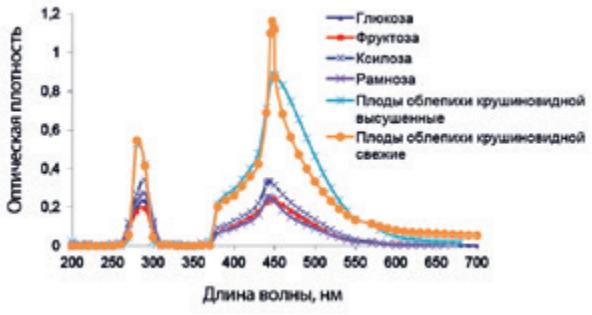


Рисунок 1. Пикриновый метод. Спектры поглощения продуктов реакции стандартных образцов моноз и извлечений из изучаемого ЛРС, полученных с применением кислотного гидролиза, с пикриновой кислотой

Выделение простых сахаров из полисахаридного комплекса осуществляли путем экстракции ЛРС водой очищенной, подкисленной концентрированной кислотой хлористоводородной, для гидролиза сложных углеводов. Для установления полноты экстракции моноз из плодов облепихи крушиновидной изучали влияние соотношения сырья и экстрагента, кратности экстракции и оптимального времени экстракции (рисунок 2).

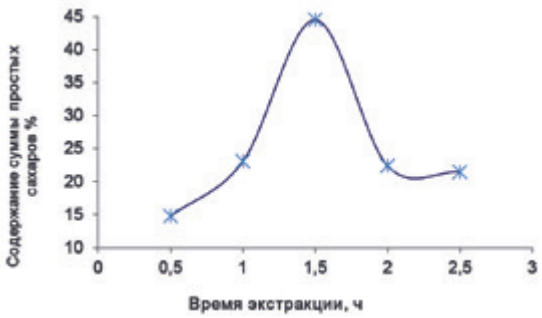


Рисунок 2. Влияние времени экстракции на содержание суммы простых сахаров в извлечении

Оптимальным для выделения моносахаридов является соотношение сырья и экстрагента 1,5:80 при добавлении концентрированной кислоты хлороводородной к экстрагенту в соотношении 10:1 (таблица 1). Наилучшее время экстракции согласно экспериментальным данным составило 1,5 ч (рисунок 2). Увеличение кратности экстракции способствует повышению выхода восстанавливающих моносахаридов из полисахаридного комплекса плодов (рисунок 3).

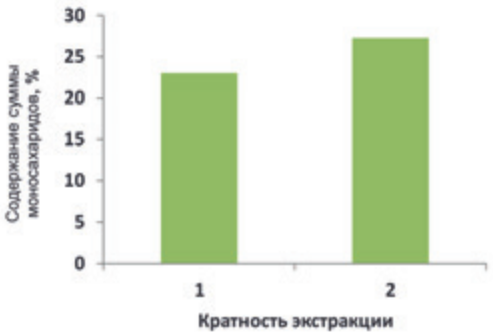


Рисунок 3. Влияние кратности экстракции на выход суммы поли- и моносахаридов в извлечение

С целью выбора оптимальных условий хранения плодов облепихи и исследования стабильности полисахаридного комплекса проводили количественное определение в свежих и высушенных плодах. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 1.

Влияние соотношения сырья и экстрагента на извлечение моносахаридов из плодов облепихи крушиновидной

№ п/п	Соотношение сырья, экстрагента и конц. HCl	Содержание простых сахаров, %
1	0,5:80:8	27,8599±4,0731
2	1,0:80:8	19,2501±2,8144
3	1,5:80:8	36,6507±5,3583
4	2,0:80:8	29,6289±4,3317
5	2,5:80:8	23,0406±3,3685

Полученные данные (таблица 2) свидетельствуют о том, что способ консервации практически не оказы-

вает влияния (в пределах ошибки определения) на стабильность полисахаридного комплекса плодов облепихи крушиновидной при высушивании.

Таблица 2.

Результаты определения содержания суммы полисахаридов и восстанавливающих моносахаридов в плодах облепихи крушиновидной (в пересчете на абсолютно сухое сырье)

№ п/п	Анализируемое сырье	Сумма полисахаридов и восстанавливающих моносахаридов, %
1	Плоды облепихи крушиновидной свежие	31,0080±4,5333
2	Плоды облепихи крушиновидной высушенные	27,2482±3,9837

Согласно литературным данным мякоть плодов богата свободными монозами (фруктоза и глюкоза). Косточка плодов содержит комплекс углеводов в качестве запасного питательного вещества [3, 4]. Содержание суммы свободных восстанавливающих моносахаридов в полисахаридном комплексе плодов облепихи крушиновидной, высушенных и свежих, в пересчёте на глюкозу и абсолютно сухое сырье определяли в извлечениях, не подвергавшихся кислотному гидролизу. Результаты представлены в таблице 3. Согласно принципам сквозной стандартизации, основанным на установлении содержания одной и той же группы БАВ в ЛРС и фитопрепаратах с использованием одного и того же метода, содержание суммы свободных восстанавливающих моносахаридов определяли в отварах плодов облепихи крушиновидной высушенных (таблица 3), приготовленных в соответствии с ОФС ГФ XIII изд. «Настои и отвары» [2].

Таблица 3.

Результаты определения содержания суммы свободных восстанавливающих моносахаридов в плодах облепихи крушиновидной

№ п/п	Объект исследования	Сумма свободных восстанавливающих моносахаридов, %
1	Плоды облепихи крушиновидной свежие	13,6205±1,9913
2	Плоды облепихи крушиновидной высушенные	18,2200±2,6638
3	Отвар плодов облепихи крушиновидной высушенных	0,6944±0,1012

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что свободные моносахариды содержатся как в мякоти плодов (около 15% в пересчете на абсолютно сухое сырье), так и в эндосперме семени (до 5% в пересчете на абсолютно сухое сырье). При анализе свежего сырья выделение сахаров из цельной косточки плодов простой экстракцией водой очищенной практически не осуществляется. Поэтому считаем, что полученное значение количественного содержания суммы свободных моносахаридов локализовано в мякоти плодов облепихи крушиновидной. В то же время при измельчении высушенного сырья с косточкой часть свободных сахаров, содержащихся в ней, также извлекается водой в процессе экстракции.

В ФС ГФ XIII изд. «Мать-и-мачехи листья» приведена методика количественного определения суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу. Расчет рекомендуется проводить с использованием величины удельного показателя поглощения комплекса глюкозы с пикриновой кислотой при длине волны 470 нм. Максимум поглощения на спектрах полученных после взаимодействия извлечений из плодов облепихи крушиновидной с пикриновой кислотой в предлагаемых методикой условиях находился в диапазоне 445–448 нм (аналогичные максимумы давали и стандартные образцы), что не позволяло рассчитывать количественное содержание предложенным способом. Однако при увеличении времени кислотного гидролиза ЛРС происходило незначительное батохромное смещение аналитического максимума (таблица 4), что может быть связано с большим выходом глюкозы из полисахаридного комплекса при увеличении времени, а следовательно, и полноты гидролиза.

Таблица 4.

Влияние времени извлечения сахаров из плодов облепихи крушиновидной на положение аналитического максимума поглощения

№ п/п	Время кислотного гидролиза ЛРС, ч	Положение максимума, нм
1	0,5	445
2	1,0	446
3	1,5	448
4	2,0	457
5	2,5	470

Таким образом, при варьировании времени гидролиза ЛРС можно предложить различные методики определения суммы полисахаридов и простых сахаров с использованием как величины удельного показателя поглощения, так и оптической плотности продуктов реакции глюкозы с пикриновой кислотой (таблица 5).

Таблица 5.

Результаты определения содержания суммы полисахаридов и свободных восстанавливающих моносахаридов в плодах облепихи крушиновидной с применением различных расчетных способов

№ п/п	Способ расчета	Сумма полисахаридов и свободных восстанавливающих моносахаридов, %
1	С использованием величины удельного показателя поглощения комплекса глюкозы с пикриновой кислотой	21,5967±3,1013
2	С использованием оптической плотности продуктов реакции стандартного образца глюкозы с пикриновой кислотой	29,6289±4,2547

При разработке методик определения различных групп БАВ с применением дифференциальной спектрофотометрии, в основе которых лежит цветная реакция, необходимым условием, обеспечивающим проведение точных измерений и получение воспроизводимых результатов, является установление оптимального времени протекания реакции для стабилизации величины оптической плотности. Для установления стабильности окраски продуктов реакции выделенной суммы полисахаридов и простых сахаров извлечения из плодов и раствора стандартного образца глюкозы с пикриновой кислотой в щелочной среде были проанализированы растворы после проведения реакции в течение 1 ч. Установлено, что оптическая плотность достаточно стабильна и сохраняется в течение наблюдаемого периода, незначительно снижаясь после 35 мин наблюдения (рисунок 4).

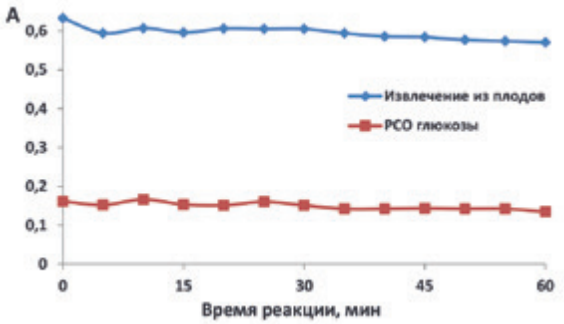


Рисунок 4. Зависимость оптической плотности продуктов реакции выделенной суммы полисахаридов и простых сахаров извлечения из плодов и раствора стандартного образца глюкозы с пикриновой кислотой в щелочной среде от времени проведения измерений

Количественное определение в ЛРС. Аналитическую пробу высушенного сырья измельчают (свежие плоды разминают стеклянной палочкой) до размера частиц, проходящих через сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,5 г (точная навеска) измельченного высушенного сырья или около 10,0 г (точная навеска) измельченного свежего сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл воды и 4 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и процеживают через 5 слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл. Остатки сырья в колбе промывают 10 мл воды. Марлю с остатками сырья помещают в ту же колбу с сырьем и экстракцию повторяют еще один раз указанным выше способом. Полученное извлечение процеживают через 5 слоев марли в ту же мерную колбу, марлю промывают, доводят объем извлечения водой до метки и перемешивают (раствор А). В коническую колбу вместимостью 50 мл помещают 10,0 мл раствора А, прибавляют по каплям натрия гидроксида раствор 40% до получения раствора с pH 4,0–4,5. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр (раствор Б), отбрасывая первые 10–15 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,5 мл 1% спиртового раствора пикриновой кислоты и 7,5 мл 20% раствора натрия карбоната, перемешивают. В эту же мерную колбу помещают 5,0 мл раствора Б. Колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, затем охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор В). В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,5 мл 1% спиртового раствора пикриновой кислоты, 7,5 мл 20% раствора натрия карбоната и 5 мл воды, помещенных в мерную колбу вместимостью 100 мл и обработанных аналогичным образом. Оптическую плотность раствора В измеряют относительно раствора сравнения на спектрофотометре Hitachi U-1900 (Япония) в максимуме поглощения в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного образца глюкозы, обработанного аналогично испытуемому раствору. Содержание суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X, %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 100 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 3}{A_{ст} \cdot a \cdot 25 \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

где A_x – оптическая плотность раствора В; $A_{ст}$ – оптическая плотность раствора стандартного образца глюкозы, обработанного аналогично испытуемому раствору; a – навеска сырья, г; a_0 – навеска глюкозы, г; W – влажность сырья, %.

Количественное определение в отваре плодов. Отвар плодов облепихи, приготовленный в соответствии с требованиями ОФС ГФ XIII изд. «Настои и отвары» [2], в количестве 10,0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор А). Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10–15 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2,5 мл 1% спиртового раствора пикриновой кислоты и 7,5 мл 20% раствора натрия карбоната, перемешивают. В эту же мерную колбу помещают 5,0 мл раствора А. Колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, затем охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор Б). В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,5 мл 1% спиртового раствора пикриновой кислоты, 7,5 мл 20% раствора натрия карбоната и 5 мл воды, помещенных в мерную колбу вместимостью 100 мл и обработанных аналогичных образом. Оптическую плотность раствора Б измеряют относитель-

но раствора сравнения на спектрофотометре Hitachi U-1900 (Япония) в максимуме поглощения в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного образца глюкозы, обработанного аналогично испытуемому раствору. Содержание суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (*X*, %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 100 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 3}{A_{ст} \cdot 25 \cdot 5},$$

где A_x – оптическая плотность раствора Б; $A_{ст}$ – оптическая плотность раствора стандартного образца глюкозы, обработанного аналогично испытуемому раствору; г; a_0 – навеска глюкозы, г.

Приготовление раствора стандартного образца глюкозы. Около 0,05 г (точная навеска) глюкозы (ЗАО «Вектон», Россия), предварительно высушенной при температуре 100–105 °С до постоянной массы, растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают. 10 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят водой до метки, перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Приготовление антронового и орцинового реактивов, раствора пикриновой кислоты, а также других вспомогательных реактивов осуществляли по ОФС ГФ XIII изд. «Определение сахаров спектрофотометрическими методами» и ФС «Мать-и-мачехи листья» [2].

Метрологическая оценка результатов количественного определения приведена в таблице 6.

Валидационную оценку методики осуществляли по следующим характеристикам: специфичность, линейность, предел обнаружения (ПО), внутри- и межлабораторная воспроизводимость, повторяемость.

Специфичность считается доказанной, если ни растворитель, используемый при пробоподготовке, ни реактивы, ни компоненты плацебо не искажают результат. В данном случае методика специфична (рисунок 5).

Линейность определяли на восьми уровнях концентраций. Растворы готовили путем увеличения аликвоты по следующей схеме: аликвота раствора Б – от 1,0 до 8,0 мл, объем раствора В – 100,0 мл (20,0–160,0%). По полученным данным строили график зависимости оптической плотности раствора В от концентрации в

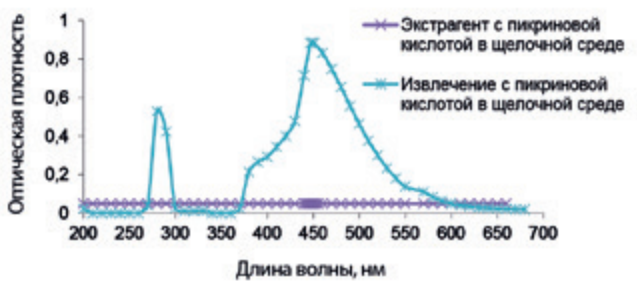


Рисунок 5. Определение специфичности СФ-методики количественного определения суммы полисахаридов и простых сахаров в пересчете на глюкозу в плодах облепихи крушиновидной

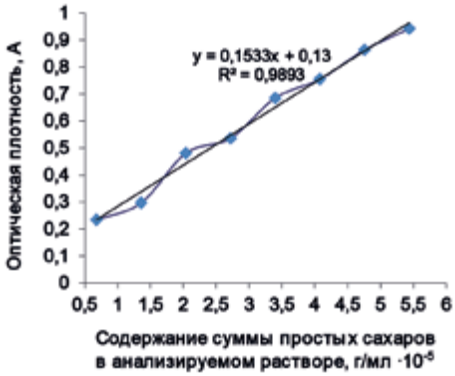


Рисунок 6. Вид зависимости оптической плотности раствора от суммарной концентрации простых сахаров в анализируемом растворе

нем простых сахаров и рассчитывали уравнение регрессии (рисунок 6). Другие характеристики линейности (наклон прямой, отрезок на оси ординат) приведены в таблице 7.

Внутрилабораторную воспроизводимость методики определяли в условиях, при которых шесть независимых результатов измерений получали одним и тем же методом в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Межлабораторную воспроизводимость методики определяли в разных лабораториях, разными операторами с использованием различного оборудования. Критерий приемлемости при определении внутрилабораторной и межлабораторной воспроизводимости выражается величиной относительного стандартного отклонения (RSD, %), который составил около 5%, что свидетельствует о соответствии разработанной методики по параметру сходимости.

Таблица 6.

Метрологическая характеристика метода анализа (P=95%; n=5)

f	$x_{ср}$	S^2	S	$Sx_{ср}$	t(P,t)	Δx	$Δx_{ср}$	$ε_{ср}$, %
4	20,90062	6,066202	2,463	1,09955	2,78	6,847	3,0567	14,62

Количественное определение суммы свободных восстанавливающих моносахаридов полисахаридного комплекса в извлечениях из ЛРС, полученных с применением кислотного гидролиза было проведено также другими спектрофотометрическими методами, рекомендованными ОФС ГФ XIII [2]. Были использованы антроновый и орциновый методы (рисунки 7 и 8). Результаты определения представлены в таблице 8.

Таблица 7.

Валидационные характеристики методики определения суммы полисахаридов и простых сахаров в пересчете на глюкозу в плодах облепихи

Характеристика	Статистические характеристики			Результаты	
Линейность	Уравнение прямой			y=0,1533x+0,13	
	Наклон (a)			0,1533	
	Отрезок на оси ординат b			0,13	
	Коэффициент корреляции			0,9893	
	Диапазон линейности (мкг в 1 мл извлечения)			6,80–54,40	
ПО, мкг/мл	Количество мкг простых сахаров в 1 мл извлечения			1,50	
Повторяемость	проба	Hitachi U-1900 (Япония)		СФ-2000 (Россия)	
		Оптическая плотность	Содержание БАВ, %	Оптическая плотность	Содержание БАВ, %
	1	0,211	8,9183	0,2382	10,0680
	2	0,252	10,6513	0,2283	9,6495
	3	0,233	9,8482	0,2492	10,5329
	4	0,211	8,9183	0,2592	10,9556
	5	0,273	11,5389	0,2167	9,1592
	6	0,236	9,9750	0,2178	9,2057
	Наименьшее значение, %				
	8,9183			9,1592	
	Наибольшее значение, %				
	11,5389			10,9556	
	Среднее значение, %				
	9,9750			9,9285	
	Доверительный интервал (P=95%), %				
	9,9750±0,4340			9,9285±0,3106	
	Средняя ошибка определения, %				
	4,35			3,13	
	Коффициент вариации, %				
	4,15			7,31	

Таблица 8.

Результаты определения суммы полисахаридов и простых сахаров в полисахаридном комплексе плодов облепихи крушиновидной, высушенных фармакопейными спектрофотометрическими методиками (в пересчете на абсолютно сухое сырье)

№ п/п	Метод определения	Сумма полисахаридов и простых сахаров,%
1	Пикриновый метод	27,2482±2,7248
2	Антроновый метод	10,5191±1,0519
3	Орциновый метод	1,7184±0,1718

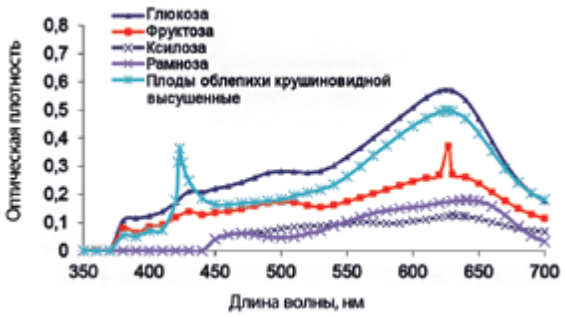


Рисунок 7. Антроновый метод. Спектры поглощения продуктов реакции стандартных образцов простых сахаров и извлечений из изучаемого ЛРС, полученных с применением кислотного гидролиза, с антроном)

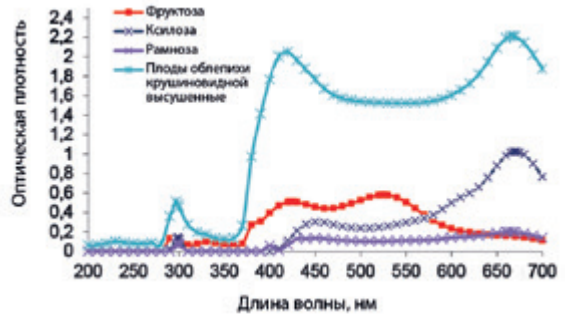


Рисунок 8. Орциновый метод. Спектры поглощения продуктов реакции стандартных образцов простых сахаров и извлечений из изучаемого ЛРС, полученных с применением кислотного гидролиза, с орцином и хлоридом железа (III)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработана и валидирована методика определения суммы свободных и связанных сахаров пикриновым методом в плодах облепихи крушиновидной. Проведено определение суммы полисахаридов и простых сахаров в плодах облепихи крушиновидной антроновым и орциновым методами. Определено содержание суммы свободных простых сахаров в извлечениях из плодов различных способов консервации. Исследована стабильность полисахаридного комплекса в плодах облепихи крушиновидной при высушивании.

ЛИТЕРАТУРА

1. И.А. Самылина, И.П. Рудакова, Ж.И. Аладышева, С.В. Ковалева. Определение сахаров спектрофотометрическими методами // Фармация. 2009. № 4. С. 3–5.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд.: в 3 т. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. URL: http://www.femb.ru/feml (дата обращения 15.11.2016).
3. О.В. Тринеева, М.А. Казьмина, А.И. Сливкин. Определение суммы полисахаридов и восстанавливающих моносахаридов в плодах облепихи крушиновидной различных способов консервации // Материалы 6-ой Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2016». Воронеж, 21-23 апреля 2016. С. 547–551.
4. А.Д. Букштынов, Т.Т. Трофимов, Б.С. Ермаков и др. Облепиха. – М.: Лесная промышленность, 1978. 192 с.

УДК 615.322; 615.453.2.07

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАКРО- И МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ СБОРА-ПОРОШКА «ЛОРПОЛИФИТ»

У.Н. Буханова[1]*, О.Г. Потанина[2]

Резюме. С помощью морфологического и микроскопического анализа определены диагностические признаки сбора-порошка «Лорполифит», состоящего из цветков ноготков, травы хвоща полевого, листьев подорожника большого, травы зверобоя, цветков ромашки аптечной, травы тысячелистника, корневищ и корней девясила. Дано описание, микрофотографии внешних и анатомо-диагностических признаков. Полученные данные будут использованы для подготовки нормативной документации на лекарственный сбор-порошок.

Ключевые слова: морфологические признаки, микроскопические признаки, микропрепарат, лекарственный растительный сбор-порошок «Лорполифит».

MACRO- AND MICROSCOPIC FEATURES DETERMINATION OF THE COMBINATION PLANT MEDICINAL PRODUCT «LORPOLIPHYT» POWDER

U.N. Bukhanova[1]*, O.G. Potanina[2]

Abstract. The diagnostic features of the combination plant medicinal product powder «Lorpoliphyt», consisting of the flowers of calendula, horsetail, plantain leaves, grass St. John's wort, chamomile flowers, yarrow herb, rhizomes and roots of elecampane were determined by microscopic analysis. The description and photomicrographs of the morphological and anatomic diagnostic features were given. The obtained information will be used for the preparation of the normative documentation to combination plant medicinal product powder.

Keywords: morphological features, microscopic features, micropreparation, combination plant medicinal product powder «Lorpoliphyt».

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

2 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

1 – Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Ministry of Healthcare, 9, Visocovoltnaya str., 390026, Ryazan, Russia

2 – Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklaya str.,Moscow, 117198, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: montis-74@mail.ru
Тел.: 8 (920) 639 12 22

ВВЕДЕНИЕ

В Российской Федерации в структуре заболеваемости болезнями органов дыхания у детей в возрасте 0-14 лет первое ранговое место занимают хронические болезни миндалин и аденоидов (3612,9 на 100000 детского населения) [1]. По итогам XIX съезда оториноларингологов России комбинированные препараты на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС), обладающего противовоспалительным, противовирусным, антимикробным и иммуномодулирующим действием, считаются одними из важных компонентов комплексного лечения острой и хронической воспалительной ЛОР-патологии [2]. Растительные сборы имеют широкий спектр фармакологической активности, обладают низкой токсичностью, мягкостью действия, не имеют отрицательных побочных эффектов при длительном применении.

Для разработки проекта фармакопейной статьи на сбор должны быть установлены морфологические и анатомо-диагностические признаки сбора, позволяющие определить подлинность видов ЛРС, входящих в состав сбора, дифференцировать его компоненты [3–6]. Согласно ОФС 1.4.1.0020.15 необходимо проводить определение внешних признаков и микроскопических признаков как для сборов измельченных, так и для сборов-порошков [7].

Микроскопический анализ при стандартизации и контроле качества растительных сборов-порошков позволяет проводить определение подлинности ЛРС, включая количественные характеристики – величину и количество различных объектов (клеток, устьиц, волосков и т.д.). Анатомо-диагностические признаки сбора характеризуют признаки его отдельных компонентов, учитывая их влияние при совмест-

ном присутствии, а также влияние технологических приемов, используемых в процессе производства сбора [8].

Сбор-порошок обеспечивает возможность выпуска сбора в форме фильтр-пакетов, удобство применения которых обусловлено точностью дозирования, легкостью и быстротой приготовления водных извлечений. Для производства сбора в форме фильтр-пакетов ЛРС должно быть измельчено до размера частиц 2 мм (крупный порошок) [9]. Нами предлагается сбор «Лорполифит» для лечения заболеваний верхних дыхательных путей (ВДП). Для его внедрения в медицинскую практику необходимо провести стандартизацию порошка сбора и разработку нормативной документации, включающую определение подлинности, в том числе по внешним признакам и с помощью микроскопии. В связи с этим макро- и микроскопическое исследование признаков сбора-порошка «Лорполифит» является актуальным.

Цель данной работы – установить морфолого- и анатомо-диагностические признаки сбора-порошка «Лорполифит».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор «Лорполифит» состоит из цветков ноготков (*Calendula officinalis* L.), травы хвоща (*Equisetum arvense* L.), листьев подорожника (*Plantago major* L.), цветков ромашки (*Chamomilla recutita* L.), травы тысячелистника (*Achillea millefolium* L.), травы зверобоя (*Hypericum perforatum* L.), корневищ и корней девясила (*Inula helenium* L.). Отбор проб для проведения анализа сбора проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII (ОФС.1.1.0005.15). Из средней пробы измельченного сбора брали аналитическую пробу массой 10,0 г. Часть аналитической пробы помещали на чистую гладкую поверхность и по внешним признакам выделяли компоненты сбора, рассматривая их невооруженным глазом, с помощью лупы (10×) и с помощью стереомикроскопа (8×; 16×). Для каждого компонента выбирали достаточное количество (не менее 5) однородных по внешнему виду кусочков. Отсеивали фракцию крупного порошка через сито с отверстиями диаметром 2 мм. Готовили микропрепараты по методике приготовления микропрепаратов из измельченного ЛРС в соответствии с требованиями ГФ XIII (ОФС 1.5.3.0003.15). Микропрепараты изучали под микроскопом МБИ-3 (при увеличении x105; x140; x200; x210; x225; x300; x450). Результаты фиксировали в виде фотографий фотоаппаратом Canon DS6041. Фотоснимки обрабатывали при помощи программы Adobe Photoshop CS6 (ver. 13.0), Adobe, США.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования сбора-порошка изучены и установлены следующие внешние признаки: смесь неоднородных частиц растительного сырья серовато-зеленого цвета с желтовато-зелеными, зеленовато-коричневыми, желтыми, красновато-коричневыми, желтовато-оранжевыми, желтовато-коричневыми вкраплениями, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Установлены признаки при просмотре сбора под лупой и стереомикроскопом. При рассмотрении микропрепаратов сбора под микроскопом видны:

– обрывки: язычковых цветков с клетками эпидермиса ромбовидной, прямоугольной и узковеретеновидной формы с прямыми стенками, с оранжевыми округлыми хроматопластами (рисунок 1А), с продольно-морщинистой кутикулой, с сосочками (и без них), с устьицами (и без них); трубки венчика и завязи с тупоконусовидными простыми (до 1133 мкм) и железистыми одно- и двухрядными волосками (до 416 мкм); трубчатых цветков (рисунок 1Б, В) с вытянутыми клетками эпидермиса ромбовидной, прямоугольной и узковеретеновидной формы с прямыми или слабоволнистыми стенками, округлыми хроматопластами, с продольно-морщинистой кутикулой, с сосочками (и без них); листочков обвертки с удлиненными клетками эпидермиса многоугольной, прямоугольной и ромбовидно-веретеновидной формы, с прямыми и извилистыми стенками, с устьицами (и без них), с одно- и двухрядными тупоконусовидными простыми (до 1133 мкм) и/или двухрядными железистыми (до 125 мкм) и ветвистыми волосками и без волосков (рисунок 2); эпидермиса цветоножки с вытянутыми клетками прямоугольной формы, с прямыми стенками, с устьицами и без них, с тупоконусовидными простыми и головчатыми волосками, такими же как на других частях цветка, и без волосков; пыльца округлая и округло-трех-, округло-четырехгранная шиповатая трех-, четырехпоровая (29–42 мкм) (*цветки ноготков*);

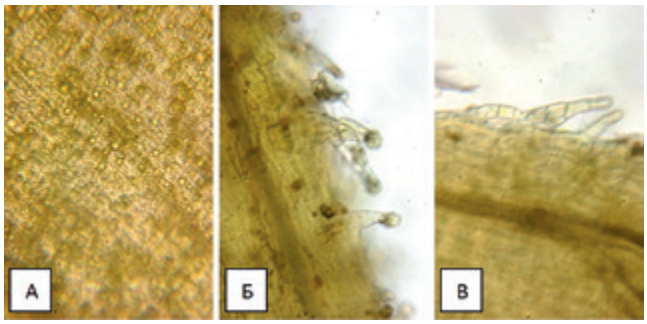


Рисунок 1. Сбор-порошок «Лорполифит». Цветки ноготков.

А – обрывок язычкового цветка: хроматопласты (ув. x125), Б – обрывок трубчатого цветка: простые и головчатые волоски (ув. x100), В – обрывок трубчатого цветка: простые и головчатые волоски (ув. x125)

– обрывки: эпидермиса стеблей и ветвей с сильно удлиненными клетками с утолщенными прямыми или слегка извилистыми пористыми стенками, без

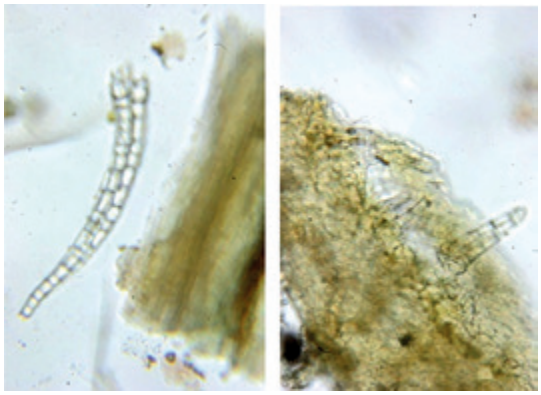


Рисунок 2. **Сбор-порошок «Лорполифит». Цветки ноготков. Простые многорядные волоски (ув. х125)**

устьиц; эпидермиса стеблей и ветвей со слегка удлиненными клетками с более извилистыми пористыми стенками, с устьицами (рисунок 3); эпидермиса ребер и бороздок с клетками с характерными выростами на стенках концов (стыков), с поверхностями имеющими вид спаренных кружочков; эпидермиса с некоторыми клетками, имеющими сосочковидные выросты; эпидермиса с устьицами, слегка погруженными, с характерной лучистой складчатостью кутикулы; стебля в поперечном сечении (очень редко) с колленхимой под эпидермисом в ребрах и в бороздках; паренхимы с большими воздухоносными полостями (*трава хвоща полевого*);

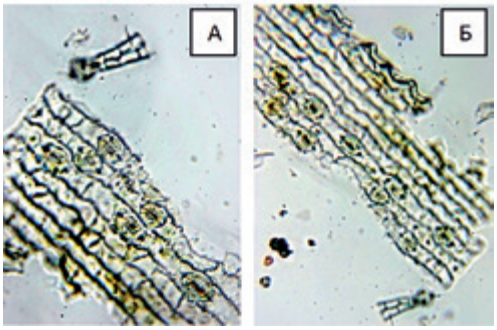


Рисунок 3. **Сбор-порошок «Лорполифит». Трава хвоща полевого.**

А – обрывок эпидермиса ребер с зубчатыми выростами и обрывок головчатого волоска с многорядной ножкой цветков ноготков (ув. х125), Б – обрывок эпидермиса ребер с зубчатыми выростами (ув. х100)

– обрывки: эпидермиса с многоугольными клетками с прямыми, слабо извилистыми или извилистыми стенками, устьицами аномоцитного типа, местами прикрепления волосков, с простыми (длиной до 793 мкм) и головчатыми (длиной 41–63 мкм) волосками; черешка с эпидермисом из вытянутых клеток с прямыми стенками с устьицами и/или головчатыми волосками (длиной до 142 мкм) (рисунок 4) (*листья подорожника*);

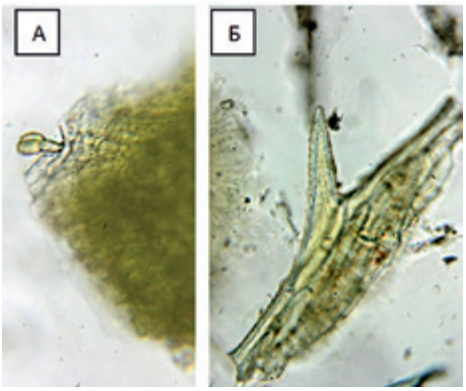


Рисунок 4. **Сбор-порошок «Лорполифит». Листья подорожника большого, (ув. х125).**

А – обрывок эпидермиса листа с головчатым волоском, Б – обрывок черешка с простым волоском

– обрывки: язычковых цветков с сосочковидными выростами (рисунок 5), с железками (длиной 18–63 мкм, шириной 8–30 мкм), состоящими из 6–8 клеток, расположенных в два ряда и в 3–4 яруса, или без железок; язычковых цветков с удлиненными клетками эпидермиса с сильно извилистыми стенками, продольно-морщинистой кутикулой, иногда с сосочками и/или с железками;

– обрывки: трубчатого цветка (рисунок 5В) с вытянутыми клетками эпидермиса, имеющими волнистые, слабоволнистые или слабо извилистые стенки, с железками (длиной 18–63 мкм, шириной 8–30 мкм) и без них, просвечивающими друзами и призматическими кристаллами в мезофилле; листочков обвертки с удлиненными клетками эпидермиса с утолщенными слабо извилистыми стенками, ровной кутикулой, с железками и без них; листочков обвертки с удлиненными клетками с извилистыми стенками, морщинистой кутикулой, с устьицами и/или железками и без них; листочков обвертки указанной структуры с просвечивающей центральной жилкой и секреторным ходом с маслянистым желтоватым содержимым; эпидермиса цветоножки с вытянутыми клетками прямоугольной, прямо-

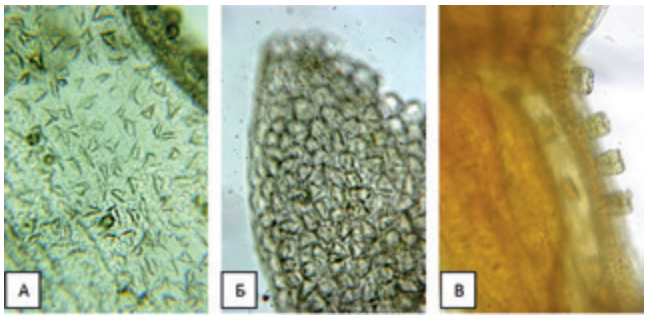


Рисунок 5. **Сбор-порошок «Лорполифит». Цветки ромашки.**

А – обрывок нижнего эпидермиса язычкового цветка (ув. х250), Б – обрывок нижнего эпидермиса язычкового цветка (ув. х200), В – обрывок трубчатого цветка с железками (ув. х125)

угольно-веретеновидной, веретеновидной формы с ровными стенками, иногда с устьицами, с головчатыми волосками (длиной до 58–125 мкм) с многоклеточной ножкой и одноклеточной удлиненной головкой и/или железками и без них; цветоножки с эпидермисом указанной структуры и с просвечивающими кристаллами оксалата кальция в паренхиме; пыльца округлая шиповатая трехпоровая (диаметром 18–29 мкм) (*цветки ромашки*);

– обрывки: эпидермиса листа (рисунок 6) с клетками с извилистыми четковидно-утолщенными стенками; с устьицами (кусочки нижнего эпидермиса) аномоцитного типа и без них; с вместилищами двух типов и без них (50–208 мкм в диаметре); эпидермиса стебля и цветоножек с вытянутыми по длине стебля (цветоножки) клетками с прямыми четковидно-утолщенными стенками, с устьицами и/или вместилищами и без них; лепестка с эпидермальными клетками со слабоволнистыми четковидно-утолщенными стенками и с вместилищами округлой формы и в виде тяжей (и без них); чашелистика с клетками эпидермиса со слабо извилистыми или прямыми, четковидно-утолщенными стенками и с вместилищами округлой формы и в виде тяжей (и без них); пыльца округлая гладкая трехбороздная (диаметром 21–29 мкм); обрывки листа, стебля, цветоножек, лепестков и чашелистиков с каким-либо одним признаком или комбинацией признаков (устьица, вместилища различной структуры), но почти всегда с четковидно-утолщенными стенками клеток (*трава зверобоя*);

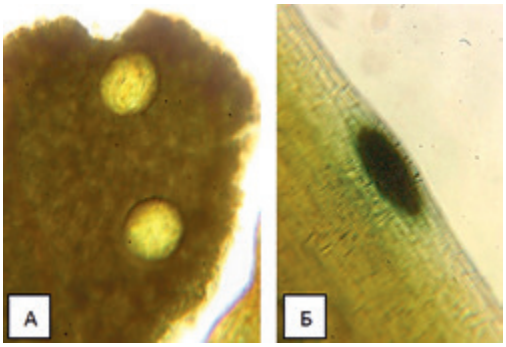


Рисунок 6. Сбор-порошок «Лорполифит». Трава зверобоя (ув. х125).

А – обрывок листа с вместилищами, Б – обрывок стебля с вместилищем

– обрывки: листа (рисунок 7) с клетками эпидермиса со слабо извилистыми, извилистыми или сильно извилистыми стенками, местами морщинистой кутикулой, с устьицами с 3–5 околоустьичными клетками (аномоцитный тип) и без них, с простыми многоклеточными бичевидными волосками (до 1133 мкм) и без них, часто обломанными, с железками (длиной 75–

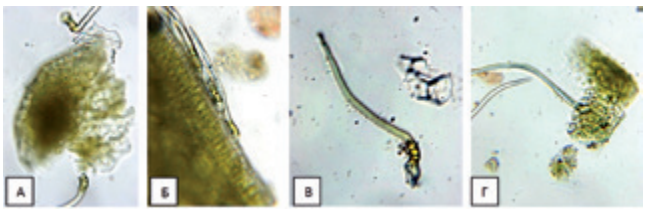


Рисунок 7. Сбор-порошок «Лорполифит». Трава тысячелистника.

А – обрывок листа с обломками бичевидных волосков (ув. х125), Б – обрывок листа с бичевидными волосками (ув. х125), В – отломанный бичевидный волосок (ув. х125), Г – обрывок листа в поперечном сечении с бичевидным волоском (ув. х100)

83 мкм, шириной 37–46 мкм) и без них, с просвечивающими вдоль жилок секреторными ходами; стеблей с вытянутыми прямоугольными клетками эпидермиса с ровными стенками, морщинистой кутикулой, бичевидными волосками (длиной до 1700 мкм) и/или их местами прикрепления и без них, с железками и без них; листочков обвертки с веретеновидными клетками эпидермиса со слабо извилистыми, извилистыми или сильно извилистыми стенками, местами морщинистой кутикулой, с простыми многоклеточными бичевидными волосками (длиной до 793 мкм) и без них, часто обломанными, железками (длиной 75–79 мкм, шириной 33–37 мкм) и без них; язычкового цветка с вытянутыми клетками с прямыми, слабо или сильно извилистыми стенками, с сосочковидными выростами и без них, с бичевидными волосками (их обломками) и/или железками (длиной 12–25 мкм, шириной 12–17 мкм) и без них, с просвечивающими в паренхиме друзами; трубчатого цветка с вытянутыми клетками с прямыми, слабо или сильно извилистыми стенками, с бичевидными волосками (их обломками) и/или железками и без них, с просвечивающими в паренхиме друзами (диаметром 4–10 мкм); отдельные бичевидные волоски; пыльца округлой шиповатой трехпоровой (диаметром 21–25 мкм); указанные обрывки листьев, стеблей, листочков обвертки, цветков с одним каким-либо признаком или комбинацией признаков (устьица, простые волоски, железки и проч.) (*трава тысячелистника*).

Дальнейшее исследование исследуемого сбора-порошка позволило обнаружить обрывки: многорядной пробки; крупных паренхимных клеток, наполненных инулином (рисунок 8); паренхимы с эфиромасличными вместилищами; разорванные эфиромасличные вместилища; обрывки сосудов по одному и группами (точечные и лестничные); обрывки с сосудами имеют древесные волокна и либриформ; редко встречаются обрывки в поперечном сечении; отдельные капли эфирного масла и глыбки инулина (*корневища и корни девясила высокого*).

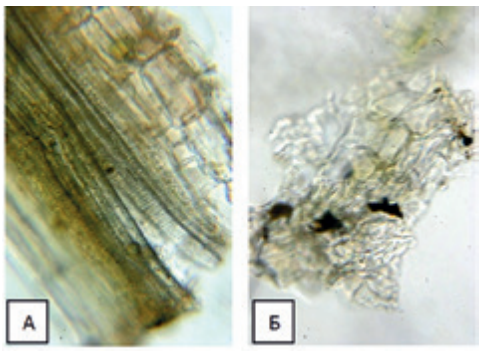


Рисунок 8. Сбор-порошок «Лорполифит». Корневище и корни девясила высокого (ув. х125).

А – обрывок с лестничными сосудами, Б – обрывки паренхимы с инулином

В процессе изучения микропрепаратов порошка наблюдали: *очень часто* обрывки травы зверобоя и цветков ромашки аптечной; часто обрывки цветков ноготков, травы тысячелистника, корневищ и корней девясила; *редко* обрывки травы хвоща полевого; *очень редко* обрывки листьев подорожника большого. Данные факты свидетельствует о том, что в исследуемом порошке сбора «Лорполифит» наиболее часто встречаются обрывки более хрупких морфологических групп и видов ЛРС, особенно видов, включающих цветки: травы зверобоя, цветков ромашки аптечной, цветков ноготков, травы тысячелистника, а также корневищ и корней девясила; реже обнаруживаются более грубая и жесткая трава хвоща полевого и более плотные листья подорожника. То есть количество частиц вида ЛРС в сборе не зависит от его количества в составе сбора (количество частиц сырья непропорционально количеству сырья в сборе), а зависит от хрупкости сырья: более хрупкое образует большее количество частиц, более грубое формирует меньшее количество частиц, как правило, более крупных.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены морфолого- и анатомо-диагностические признаки порошка сбора, приведены микрофотографии этих признаков, что обеспечит в дальнейшем возможность подготовки нормативной документации для сбора и проведение стандартизации и контроля качества исследуемого сбора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Идентифицированы и описаны морфологические диагностические признаки порошка сбора «Лорполифит».
2. Установлены и охарактеризованы анатомические диагностические признаки порошка сбора «Лорполифит». Найденные признаки зафиксированы на микрофотографиях.
3. Полученные данные будут использованы при подготовке нормативной документации на лекарственный сбор-порошок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.А. Афонина. Заболеваемость детского населения болезнями органов дыхания как медико-социальная проблема (обзор литературы) // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2010. № 4. С.157–162.
2. Лекарственные растительные препараты в комплексной терапии воспалительных заболеваний ЛОР-органов // Эффективная фармакотерапия. 2016. № 20. С. 16–27.
3. М.А. Королева, Е.В. Акульшина. К микродиагностическим признакам травы репешка обыкновенного (*Agrimonia eupatoria* L.) // Наука молодых. 2015. № 3. С. 103–110.
4. Н.Г. Селезенев, О.Г. Потанина, Г.Н. Селезенев. Морфолого-анатомическое изучение урологического сбора // Фармация. 2016. № 5. С. 30–33.
5. Г.Е. Пронченко, Т.Д. Рендюк. Исследования для разработки проекта фармакопейной статьи на сбор для лечения пиелонефрита // Фармация. 2015. № 8. С. 6–10.
6. С.П. Лукашук, Г.Г. Немашкалова, Ю.Н. Малышева. Определение подлинности и доброкачественности сборов фирмы NL INTERNATIONAL ENERWOOD EVERY // Фармация и фармакология. 2015. № 6(13). С. 20–23.
7. ГФ XIII: в 3-х томах. – М. 2016. URL: http://femb.ru/ (дата обращения 20.01.2017).
8. О.Г. Потанина, И.А. Самылина. Фармакопейные требования к микроскопическому анализу лекарственного растительного сырья // Фармация. 2015. № 4. С. 47–48.
9. В.А. Ермакова, Н.В. Бобкова, М.А. Майнскова, М.А. Смирнова. О стандартизации порошка ветрогонного сбора // Актуальные направления научных исследований XXI века: теория и практика. Сборник научных трудов по материалам международной заочной научно-практической конференции. – Воронеж. 2013. № 2(2). С. 54–59.

СИСТЕМЫ ДЛЯ НАПОЛНЕНИЯ, ИЗОЛЯЦИИ, УПАКОВКИ И ТРАНСПОРТИРОВКИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ **ОТ Ezi-Dock**



Фармацевтические сменные пакеты – максимальное удобство при работе в лаборатории и на производстве по привлекательной цене



- Жесткая и гибкая одноразовая тара объемом 2-40 л
- Полиэтилен низкого давления LDPE с антистатическими добавками
- 2-слойная конструкция
- Индивидуальные лейблы для маркировки



Система для непрерывного наполнения сыпучим материалом или изолирования продуктов-отходов Ezi-Strap™ Liner Tensioning System

- Двойной замок-перетяжка обеспечивает высокий уровень герметичности и предотвращает случайное или неосторожное высыпание продукта
- Предотвращение несанкционированного вскрытия пакета
- Максимальная производительность при непрерывном пакетировании

Одноразовая система блокировки Ezi-Flow™ CSV4 All Plastic для транспортировки сыпучих материалов



- Высокая производительность
- Быстрота транспортировки
- Газостойкость

Заданный уровень чистоты производимого продукта и безопасность персонала!

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 615.2; 532.73

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ РАСТВОРИМОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ ДИФРАКЦИИ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ С РАЗЛИЧНЫМ ИЗОТОПНЫМ СОСТАВОМ ПО ВОДОРОДУ

Е.В. Анфимова[1]*, Е.В. Успенская[1], Т.В. Плетенева[1], А.В. Сыроешкин[1]

Резюме. Проведена кинетическая оценка растворимости лекарственных субстанций разных химических и фармакологических групп – бендазола гидрохлорида, лактозы моногидрата и таурина – в водных растворах с различным изотопным составом по водороду. Выбор растворителя обусловлен тем, что замена воды очищенной с содержанием 141,0±0,9 ppm тяжелого изотопа $^{2}_{1}H(D)$ на воду с пониженным содержанием $^{2}_{1}H(D)$ способствует ускорению процесса растворимости активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) примерно в 1,5 раза. Исследование растворимости проводили методом лазерной дифракции света, который лежит в основе ОФС.1.2.1.0008.15 ГФ РФ XIII «Определение распределения частиц по размеру». В отличие от существующей фармакопейной методики метод лазерной дифракции позволяет дать объективную оценку растворимости АФИ на основании изменения интегральных характеристик дисперсности во времени.

Ключевые слова: растворимость, лазерная дифракция, кинетический изотопный эффект.

SOLUBILITY KINETICS OF DRUGS STUDIED BY LALLS METHOD IN WATER SOLUTIONS WITH VARIOUS HYDROGEN ISOTOPE CONTENT

E.V. Anfimova[1]*, E.V. Uspenskaya[1], T.V. Pleteneva[1], A.V. Syroeshkin[1]

Abstract. The kinetic evaluation of solubility of drug substances of different chemical and pharmacological groups (bendazol hydrochloride, lactose monohydrate and taurine) was conducted in aqueous solutions with different isotopic composition of hydrogen. The choice of solvent was made due to the fact that the replacement of purified water, containing 141,0 ± 0,9 ppm $^{2}_{1}H(D)$ heavy isotope of hydrogen, to water with low content of $^{2}_{1}H(D)$ can accelerate the solubility of the active process pharmaceutical ingredients (APIs), approximately in 1,5 times. The study was carried out by the laser light diffraction method, which is the basis of the Monograph.1.2.1.0008.15 SF RF XIII «Particle size distribution». In contrast to the existing methods of the pharmacopoeial analysis governing the visual assessment of the completeness of the solubility of the API, the laser diffraction method allows to get an objective assessment of the solubility of the API based on the change of the integral characteristics of dispersion over time.

Keywords: solubility, laser diffraction, kinetic isotope effect.

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», кафедра фармацевтической и токсикологической химии, 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8

1 – People Friendship University of Russia, 8, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117556, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: evanfimova@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Изучение растворимости является одной из важнейших процедур контроля качества АФИ при оценке их чистоты и подлинности. Растворимость отражает не только физико-химические свойства АФИ, но и стабильность технологического процесса производства фармацевтических субстанций. Растворимость характеризует чистоту АФИ, и ввиду этого её оценка является первичным анализом при контроле качества субстанций и лекарственных средств (ЛС) на их основе. На растворимость влияют гидрофильность или гидрофобность поверхности частиц, размер и полиморфизм кристаллов АФИ [1, 2]. При существовании различных кристаллических форм АФИ тест «Растворение» может быть выбран в качестве метода определения полиморфизма лекарственных веществ [3]. Скорости высвобождения АФИ из лекарственных форм посвящены многочисленные исследования [4–6]. Однако растворимость, предшествующая высвобождению АФИ, является одним из ключевых факторов, влияющих на эффективность и безопасность лекарственных средств. Поэтому направленная разработка новых лекарственных препаратов с заранее заданными свойствами (drug design) должна основываться в том числе на данных по растворимости веществ-кандидатов [5].

Растворение, растворимость и проницаемость АФИ в ЖКТ являются фундаментальными параметрами, которые контролируют скорость абсорбции ЛС и, как следствие, их биологическую активность. Вот почему описываемая физико-химическая характеристика АФИ чрезвычайно важ-

на при оценке биоэквивалентности дженериковых препаратов брендовым, в том числе при выявлении корреляции *in vitro – in vivo* [7–9].

Однако до сих пор оценка растворимости АФИ при фармакопейном анализе проводится визуально, термины растворимости – описательные, а значения – приблизительные [3] (таблица 1).

Таблица 1.

Описательные термины растворимости АФИ

Термин	Примерное количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г вещества
Очень легко растворим	до 1 включительно
Легко растворим	от 1 до 10 включительно
Растворим	от 10 до 30 включительно
Умеренно растворим	от 30 до100 включительно
Мало растворим	от 100 до 1000 включительно
Очень мало растворим	от 1000 до 10000 включительно
Практически нерастворим	более 10000

Растворение – гетерогенный процесс, который зависит как от свойств твердого тела, так и от природы растворителя. Известно, что вода представляет собой смесь молекул с различной изотопной массой, в том числе H_2O, HDO и D_2O. Воды с разным соотношением D/H обладают разными физико-химическими и спектральными свойствами [10]. Термодинамическая неравноценность изотопологов воды приводит к различиям в кинетике химических и биохимических реакций вследствие кинетического изотопного эффекта [11]. Ранее было доказано, что вода, обеднённая по дейтерию (лёгкая вода, deuterium-depleted water, DDW), проявляет антидотные свойства при индивидуальном и комбинированном воздействии фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, снижает опасность γ-излучения [12].

В настоящей работе для исследования кинетики растворимости АФИ в водах с различным содержанием изотопа водорода применен метод лазерной дифракции (low-angle laser light scattering, LALLS), впервые введенный в фармакопею США (USP) в 2000 году. Данный метод предназначен для контроля качества АФИ и готовых лекарственных средств по показателю «Размер частиц и их распределение» [13]. Методика исследования кинетики растворимости АФИ на основании анализа изменения интегрального параметра дисперсности образца *laser obscuration* во времени LALLS-методом была разработана сотрудниками кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института РУДН. Использование метода, предназначенного для контроля размера частиц АФИ, в качестве инструмента изучения растворимости субстанций имеет значительные преимущества по сравнению с фармакопейным тестом «Растворимость». Во-первых, метод даёт возможность объективной оценки растворимости АФИ на основании изменения интегральных характеристик дисперсности во времени; во-вторых, позволяет осуществить количественную оценку растворимости, то есть расчёт константы скорости k (c^{-1}).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Были использованы субстанции различных химических и фармакологических классов: бендазола гидрохлорид (серия P111106, Second Pharma Co., Ltd., China), лактозы моногидрат различных серий (DMV-Fonterra Exipients GmbH &Co. KG, Norten Hardenberg, Germany), таурин (ОАО «Фармстандарт-Лексредства»), относящиеся к классам вазодилататоров, углеводов и метаболиков соответственно (таблица 2). Сроки годности всех препаратов были действительны.

Таблица 2.

Структурные формулы и некоторые физико-химические свойства лекарственных субстанций

бендазола гидрохлорид	*лактозы моногидрат*	*таурин*
2-бензил-1*H*-бензимидазола гидрохлорид	*O*-β-D-галактопиранозил-(→)-α-D-глюкопиранозы моногидрат	2-аминоэтансульфоновая кислота
Белый или белый со слегка сероватым или желтоватым оттенком кристаллический порошок	Белый или почти белый кристаллический порошок	Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы
Умеренно растворим в воде [3]	Легко растворим в воде [11]	Растворим в воде [11]

Данные АФИ были выбраны для исследования кинетики растворимости ввиду их различной растворимости в воде (таблицы 1 и 2).

Размеры частиц испытуемых субстанций контролировали методом оптической микроскопии с помощью микроскопа «Альтами» БИО-2 с увеличением объектива 4х (рисунок 1).

Лактоза используется в фармацевтических рецептурах в качестве наполнителя и вспомогательного вещества, в частности, при изготовлении ЛФ высокого и сверхвысокого разведения. Это объясняется её высокой стабильностью, низкой гигроскопичностью и экономической доступностью [14, 15]. Дибазол относится к вазодилататорам, миотропным спазмолитикам и

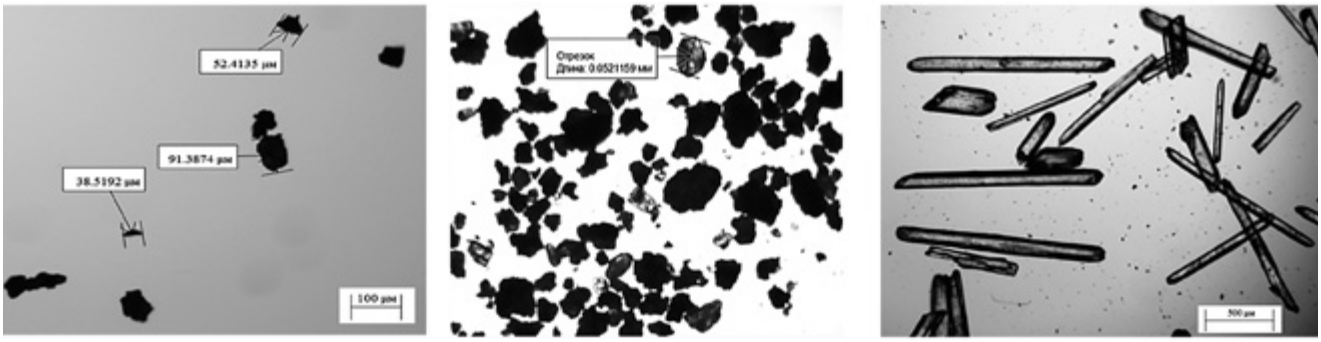


Рисунок 1. Внешний вид и кристаллы исследуемых субстанций

а) внешний вид и размеры кристаллов субстанции бендазола гидрохлорида; б) внешний вид и размеры кристаллов субстанции лактозы моногидрата; в) внешний вид и размеры кристаллов субстанции таурина

средствам, влияющим на нервно-мышечную передачу [16]. Таурин играет большую роль в липидном обмене, способствует нормализации функции клеточных мембран, оптимизации энергетических и обменных процессов, сохранению электролитного состава цитоплазмы [17].

Вода для исследований. Вода деионизованная высокоомная (удельная электропроводность не более 5 мкСм при 25 °С) получена путем очистки пирогенной дистиллированной воды на системе Milli-Q (Merck, Великобритания).

Вода, обедненная по содержанию дейтерия (ЗАО «Лёгкая вода», Москва), получена путем низкотемпературной вакуумной ректификации жидкого водорода [18]. Для определения концентрации дейтерия на производстве применяется изотопный анализатор воды 912-0050 (Los Gatos Research, Россия) [19].



Система высокой очистки воды I типа качества Milli-Q (Merck, Великобритания)

Независимо от производителя содержание дейтерия в анализируемых водах определяли методом масс-спектрометрии, согласно которому в протиевой воде соотношение D/H составляет 4 ppm по сравнению со 141,0±0,9 ppm для деионизованной высокоомной воды.

Метод лазерной дифракции света основан на измерении интенсивности углового рассеяния плоской монохроматической электромагнитной волны на частицах аэрозоля или взвеси. Индикатриса рассеяния изменяется в зависимости от отношения $\frac{\pi d}{\lambda}$, где λ – длина волны электромагнитного излучения, *d* – размер частицы. Для определения содержания образца в исследуемой дисперсной системе используют параметр *laser obscuration,* который характеризует потерю интенсивности света при введении образца в измерительную ячейку в результате процессов отражения, поглощения, дифракции и т.д. Математически *laser obscuration* выражается формулой:

$$Obscuration = 1 - \frac{I}{I_0} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где *I* – интенсивность света, измеренная детектором в присутствии образца в ячейке, I_0 – интенсивность света, измеренная детектором при отсутствии образца.

Приборное оборудование. В работе использовали дифракционный измеритель размеров частиц (particle sizer) Malvern 3600 Ec для определения размеров частиц в диапазоне от 1 до 180 мкм. Схема прибора для лазерной дифракции представлена на рисунке 2.

Условия проведения испытаний

В работе использовали емкостную ячейку, изготовленную из кварцевого стекла; объем кюветы – 3,5 мл, необходимое количество образца для измере-

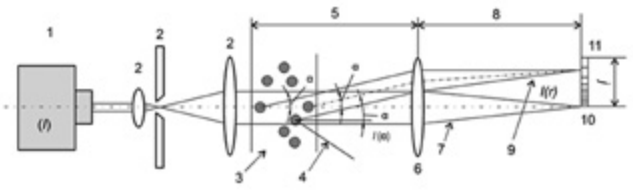


Рисунок 2. Схема прибора для лазерной дифракции

1 – источник лазерного излучения; 2 – модуль обработки лазерного излучения; 3 – частицы; 4 – рассеянный свет, не собранный линзой (6); 5 – рабочее расстояние линзы (6); 6 – линза Фурье; 7 – прямой луч; 8 – фокусное расстояние линзы (6); 9 – рассеянный луч; 10 – детектор затемнения; 11 – многоэлементный детектор

ния – 3 мл. Емкостная ячейка, снабженная мешалкой, помогала поддерживать частицы во взвешенном состоянии во время измерения и избегать их агрегации; скорость мешалки регулировалась вручную.

Навеску субстанции подбирали, исходя из фармакопейных данных о её растворимости. Для измерений были взяты точные навески субстанций: m=0,2000 г лактозы моногидрата, m=0,0300 г бендазола гидрохлорида и m=0,2000 г таурина в объеме раствора 3 мл. Навеску субстанции помещали в емкостную кювету с магнитной мешалкой, добавляли объем растворителя 3 мл, отмеренный с помощью автоматической пипетки емкостью 500–5000 мкл. Измерение величины *laser obscuration* начинали в момент добавления воды в кювету и продолжали с интервалом 20 с до полного растворения субстанции, что фиксировалось нами по прекращению изменения во времени измеряемого параметра. Проводили повторные измерения, анализируя три репрезентативных образца одной серии. Предварительно производили измерение затемнения фонового раствора, в качестве которого использовалась среда растворения (вода дистиллированная или вода, обеднённая по дейтерию). Температура, при которой проводили измерения, составляла T=21±1 °C. Образцы воды использовались из только что вскрытых флаконов и не хранились более 1 суток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Кинетика растворимости бендазола гидрохлорида в воде с разным содержанием тяжелого изотопа ${}^{2}_{1}H(D)$.

При исследовании растворимости бендазола гидрохлорида серии P111106 обнаружена экспоненциальная зависимость величины *laser obscuration* от времени в водных средах с разным содержанием тяжелого изотопа ${}^{2}_{1}H(D)$, соответствующим 140 ppm и 4 ppm (рисунок 3).

Как видно из рисунка 3, кинетика растворения бендазола гидрохлорида в воде представляет собой двустадийный процесс: резкое изменение регистрируемого параметра растворимости субстанции бендазола гидрохлорида в воде с соотношением D/H=140 ppm (рисунок 3a) в первые 80 с от начала растворения сменяется на постепенное снижение величины *laser obscuration* до выхода на плато через 90–100 с, что фиксировалось нами как полное растворение субстанции.

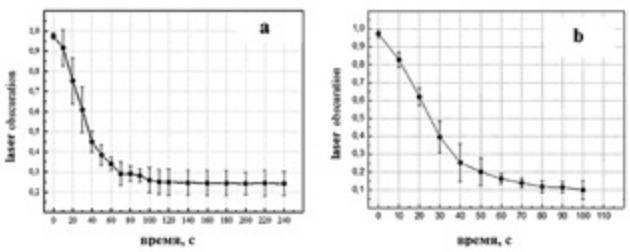


Рисунок 3. Зависимость величин *laser obscuration* от времени при растворении лекарственной субстанции бендазола гидрохлорида: a) в воде с соотношением D/H=140 ppm; b) в воде с соотношением D/H=4 ppm (n≥3, P=0,95)

Гетеролитический процесс растворения частиц бендазола гидрохлорида в воде сопровождается образованием активированного комплекса, схему которого можно представить так, как показано на рисунке 4.

Рассматриваемая схема позволяет интерпретировать растворимость кристаллов АФИ в воде с позиции кинетики псевдопервого порядка, поскольку изменением концентрации молекул воды в условиях ее избытка можно пренебречь. При протекании гетеролитических процессов существенную перестройку претерпевают сольватные оболочки исходного состояния частиц дисперсной фазы и оболочки активированного комплекса, следовательно, можно оценить влияние природы растворителя на скорость растворения (рисунок 3b). Видно, что величина *laser obscuration* уменьшалась в 10 раз при растворении кристаллов бендазола гидрохлорида в воде, обедненной по дейтерию, в то время как в воде с соотношением D/H=140 ppm уменьшение величины измеряемого параметра составило 3 раза (рисунок 3a).

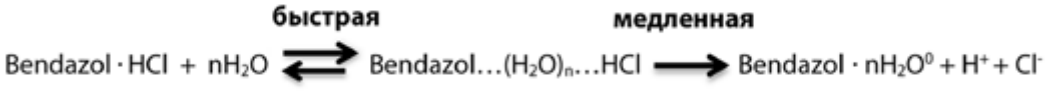


Рисунок 4. Гетеролитический процесс растворения частиц бендазола гидрохлорида в воде

Для количественной оценки растворимости субстанций АФИ в воде с разным соотношением D/H результаты экспоненциальных кривых (рисунок 5) были представлены в координатах: **x=ln laser obscuration, y=t** (рисунок 5, таблица 3).

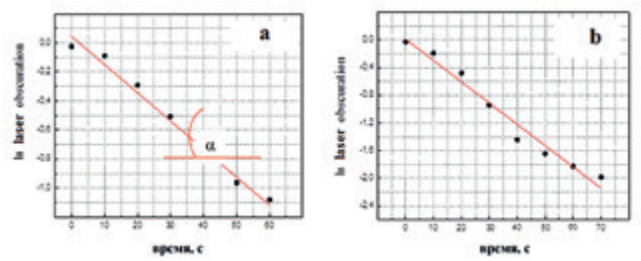


Рисунок 5. Полулогарифмические координаты процесса растворения лекарственной субстанции бендазола гидрохлорида: a) в воде с содержанием тяжелого изотопа $^{2}_{1}H(D)$ 140 ppm; b) в воде с содержанием тяжелого изотопа $^{2}_{1}H(D)$ 4 ppm (n≥3, P=0,95)

Получено уравнение вида:

$$y=a+bx. \quad (2)$$

Константу скорости реакции определяли по коэффициенту b уравнения прямой, как тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс:

$$k=-tg\alpha \quad (3a)$$

$$tg\alpha=-(d\,laser\ obscuration)/dt \quad (3b)$$

Таблица 3.

Константы скорости растворения бендазола гидрохлорида в воде с разным содержанием тяжелого изотопа водорода (n=3, P=0,95)

Номер серии P111106	(k±Sr), c^{-1}	
	Вода с содержанием тяжелого изотопа $^{2}_{1}H(D)$ 140 ppm	Вода с содержанием тяжелого изотопа $^{2}_{1}H(D)$ 4 ppm
	$(1,94\pm0,001)\cdot10^{-2}$	$(3,10\pm0,002)\cdot10^{-2}$

Итак, обнаружены достоверные различия в скорости растворимости субстанции бендазола гидрохлорида в воде, обедненной по содержанию дейтерия (D/H=4 ppm) по сравнению с деионизованной высокоомной водой природного изотопного состава (D/H=140 ppm): скорость увеличилась в 1,6 раза. Полученный результат свидетельствует о важной роли вариаций изотопного состава растворителя (воды) в ускорении процесса растворения АФИ.

2. Кинетика растворимости таурина в воде с разным содержанием тяжелого изотопа $^{2}_{1}H(D)$.

Кинетика растворимости таурина также демонстрирует зависимость от содержания в воде тяжелого изотопа водорода (рисунок 6, таблица 4).

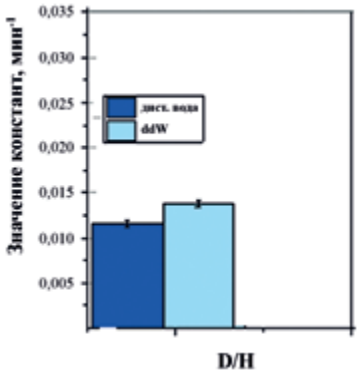


Рисунок 6. Зависимость константы скорости растворимости таурина от содержания тяжелого изотопа водорода

3. Кинетика растворимости лактозы моногидрата в средах с разным содержанием тяжелого изотопа $^{2}_{1}H(D)$.

Результаты исследования растворимости образцов лактозы моногидрата шести различных серий показали, что процесс растворения АФИ в обездейтерированной воде также протекает с большей скоростью, чем в воде с содержанием $^{2}_{1}H(D)$ 140 ppm. Статистически достоверные различия в значениях констант скорости растворимости лактозы моногидрата в воде с разным содержанием были выявлены для всех проанализированных серий (таблица 5).

Таблица 4.

Константы скорости растворения таурина в воде с разным содержанием тяжелого изотопа водорода

(k±Sr), c^{-1}	
Вода с содержанием тяжелого изотопа $^{2}_{1}H(D)$ 140 ppm	Вода с содержанием тяжелого изотопа $^{2}_{1}H(D)$ 4 ppm
$(1,16\pm0,0004)\cdot10^{-2}$	$(1,38\pm0,0004)\cdot10^{-2}$

Таблица 5.

Константы скорости растворения лактозы моногидрата в воде с разным содержанием изотопа водорода (n=3, P=0,95)

Номер серии	Вода с соотношением D/H=140 ppm		Вода с соотношением D/H=4 ppm		$\frac{k_H}{k_D}$
	(k±Sr), c^{-1}	ε, %	(k±Sr), c^{-1}	ε, %	
MM25711	$(9,7\pm0,35)\cdot10^{-3}$	3,67	$(12,6\pm0,51)\cdot10^{-3}$	4,07	1,3
MM25712	$(7,9\pm0,2)\cdot10^{-3}$	9,67	$(13,4\pm0,42)\cdot10^{-3}$	3,17	1,7
MM25713	$(7,5\pm0,06)\cdot10^{-3}$	0,77	$(13,03\pm0,47)\cdot10^{-3}$	3,65	1,7
MM25714	$(7,8\pm0,44)\cdot10^{-3}$	5,66	$(12,2\pm0,38)\cdot10^{-3}$	3,15	1,6
MM25715	$(9,3\pm0,44)\cdot10^{-3}$	4,51	$(15,1\pm0,49)\cdot10^{-3}$	3,28	1,6
MM25716	$(10,1\pm0,66)\cdot10^{-3}$	6,5	$(11,2\pm0,64)\cdot10^{-3}$	5,7	1,1

Статистическая обработка результатов, в ходе которой была рассчитана относительная ошибка среднего результата при определении константы скорости растворимости методом лазерной дифракции, указывает на исключение грубых ошибок.

Наблюдаемые нами изменения констант скорости растворимости АФИ, как результат изотопной замены дейтерия на протий в молекуле воды, свидетельствуют о реализации кинетического изотопного эффекта по растворителю. Количественной мерой кинетического изотопного эффекта является отношение константы скорости растворимости АФИ в воде с пониженным содержанием дейтерия к константе скорости растворимости в воде, содержащей тяжелый изотоп, $\frac{k_H}{k_D}$ (таблица 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе проведена оценка растворимости лекарственных субстанций с применением физико-химического метода анализа, что позволяет охарактеризовать данное свойство АФИ не с позиции условных терминов растворимости, а с помощью достоверных численных результатов. Впервые оценена количественная мера кинетического изотопного эффекта, связанного с изотопной природой растворителя – воды. Показано, что независимо от фармакологических и химических свойств лекарственных субстанций скорость растворимости в воде, обедненной по дейтерию, превышает скорость растворимости в деионизованной высокоомной воде примерно в 1,5 раза. Данное свойство позволит повысить фармакологическую доступность малорастворимых в воде лекарственных веществ, обеспечивая лучшее высвобождение из лекарственной формы за счет увеличения скорости растворения лекарственных веществ. На примере лактозы моногидрата шести серий продемонстрирована возможность проведения межсерийного производственного контроля качества лекарственных субстанций на основании исследования их растворимости в воде с помощью метода лазерной дифракции света. При сохранении стабильности технологического процесса производства АФИ не будет наблюдаться достоверных различий в полученных константах скорости их растворимости.

Методика кинетической оценки растворимости лактозы моногидрата для фармацевтических целей методом лазерной дифракции света позволяет сравнить константы растворимости АФИ в растворах с разным изотопным составом. Возможность получения количественных характеристик растворимости делает эту методику пригодной для контроля качества и стандартизации и других лекарственных субстанций и позволяет использовать её в дополнение к уже существующему фармакопейному тесту «Растворимость».

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Sun, F. Wang, Y. Sui et al. Effect of particle size on solubility, dissolution rate, and oral bioavailability: evaluation using coenzyme Q10 as naked nanocrystals // International Journal of Nanomedicine. 2012. V. 7. P. 5733–5744.
2. J. Bauer, S. Spanton, R. Henry et al. Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism // Pharmaceutical Research. 2001. V. 18(6). P. 859–866.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. (ГФ РФ XIII).
4. Н.Е. Уварова, У.И. Борисова, Е.В. Успенская. Исследование растворимости субстанции бендазола гидрохлорида методом лазерной дифракции // Сборник материалов V Юбилейной Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». 2015. С. 510–513.
5. A.M. Sinn, M. Kurian, D. Losic. Non-eroding drug-releasing implants with ordered nanoporous and nanotubular structures: concepts for controlling drug release // Biomaterials Science. 2014. V. 2(10). P. 10–34.
6. H. Geng, Y. Zhao, J. Liu. Hollow mesoporous silica as a high drug loading carrier for regulation insoluble drug release // International Journal of Pharmaceutics. 2016. V. 510(1). P. 184–194.
7. Ю.И. Кулинич. Применение процедуры «Биовейвер» для оценки эквивалентности *in vitro* воспроизведенных нестероидных противовоспалительных лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 3(4). С. 68–74.
8. G.F. Vasilenko, I.E. Shohin, J.I. Kulinich, G.V. Ramenskaya. Interchangeability evaluation of multisource ibuprofen drug products using Biowaiver procedure // Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011. V. 73. № 4. P. 443–446.
9. I.E. Shohin, G.V. Ramenskaya, E.A. Malashenko, G.F. Vasilenko. *In vitro* dissolution kinetics of amlodipine tablets marketed in Russia under Biowaiver conditions // Dissolution Technologies. 2010. V. 17. № 3. P. 20–22.
10. Т.И. Шишелова, Н.Л. Корзун, М.Ю. Толстой. Перспективы и направления в исследовании воды. – М.: Академия Естествознания. 2014.
11. О.Ю. Зрелов, А.В. Сыроешкин, Е.В. Успенская и др. Влияние изотопного состава воды на кинетику мутаротации галактозы // Химико-фармацевтический журнал. 2015. № 49(6). С. 51–54.
12. А.В. Сыроешкин, О.В. Титорович, Т.В. Плетенева и др. Вода, обедненная по дейтерию, как адъювантное средство при лечении онкологических заболеваний (обзор) // Микроэлементы в медицине. 2015. № 16(3). С. 29–37.
13. European Pharmacopeia 7.0. 2011.
14. A. Sarkar, B. Sinh. Solution properties and taste behavior of lactose monohydrate in aqueous ascorbic acid solutions at different temperatures: Volumetric and rheological approach // Food Chemistry. 2016. V. 211. P. 590-597.
15. R.C. Hwang, G.R. Peck. A systematic evaluation of the compression and tablet characteristics of various types of lactose and dibasic calcium phosphate // Pharmaceutical Technology. 2001. V. 25(6). P. 54–68.
16. Бендазол (Bendazol): инструкция, применение и формула // Справочник лекарств ЛРС. URL: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_42.htm (дата обращения 07.06.2016).
17. Toxnet. National Library of Medicine. Taurine. URL: https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/107-35-7 (дата обращения 07.06.2016).
18. I. Alekseev, E. Arkhipov, S. Bondarenko et al. Experimental Results of Hydrogen Distillation at the Deuterium Removal Unit of the MuCAP Experiment. Preprint PNPI 2682. Gatchina. 2006.
19. V.V. Goncharuk, V.B. Lapshin, T.N. Burdeinaya et al. Physicochemical Properties and Biological Activity of the Water Depleted of Heavy Isotopes // Journal of Water Chemistry and Technology. 2011. V. 33. № 1. P. 8–13.

УДК 615.03

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ПРЕДИКТИВНОГО ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» (ОБЗОР)

Р.И. Мустафин[1]*, А.В. Ситенкова (Буховец)[1], Н. Фотаки[2]

Резюме. Тест «Растворение» играет важную роль на различных уровнях разработки и производства лекарственных препаратов, как один из основных инструментов контроля качества серий выпускаемой фармацевтическими предприятиями продукции и как неотъемлемая часть испытаний *in vitro* при изучении механизма высвобождения активного фармацевтического ингредиента из разрабатываемых лекарственных форм. В статье описаны основные параметры, которые необходимо учитывать при проведении предиктивного теста «Растворение», а именно: критерии выбора и состав биорелевантных сред растворения, моделирующих как «голодное», так и «сытое» состояние различных отделов желудочно-кишечного тракта, гидродинамика, объем и трансфер сред растворения.

Ключевые слова: тест «Растворение», биорелевантные среды, проточная ячейка, поршневой цилиндр, вращающаяся корзинка, вращающаяся лопасть.

THE FEATURES OF THE PREDICTIVE DISSOLUTION TESTING (REVIEW)

R.I. Moustafine[1]*, A.V. Sitenkova (Bukhovets)[1], N. Fotaki[2]

Abstract. Dissolution test plays an important role at different levels of the development and manufacturing drugs as one of the major quality control tools and an integral part of In vitro tests in the study of drug release from the developed dosage forms. Article describes the basic parameters that should be considered in predictive dissolution tests, such as the selection criteria and the composition of biorelevant dissolution media, fluid dynamics, volume and transfer of the dissolution media.

Keywords: dissolution test, biorelevant media, flow-through cell, reciprocating cylinder, rotating basket, rotating paddle.

1 – ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 420012, Россия, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49

2 – Университет Бата, Великобритания, Бат, Клэвертон-Даун, BA2 7AY

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

2 – University of Bath, BA2 7AY, Claverton Down, Bath, UK

*** адресат для переписки:**
E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com
Тел.: 8 (917) 399 90 48

ВВЕДЕНИЕ

Тест «Растворение» является важным инструментом разработки и производства лекарственных препаратов (ЛП), используемым как для контроля качества серий выпускаемой продукции, так и как неотъемлемая часть испытаний *in vitro* при изучении механизма высвобождения активного фармацевтического ингредиента (АФИ) из разрабатываемых лекарственных форм (ЛФ).

На результаты теста «Растворение» могут влиять разнообразные факторы, такие как характеристики АФИ (растворимость и проницаемость), лекарственной формы (особенности технологического процесса), а также особенности метода, используемого для оценки растворения (метод, используемые аппарат и среда растворения).

В некоторых случаях (особенно в случае оценки препаратов с низкой биофармацевтической растворимостью) проведение теста «Растворение» в классических условиях с использованием фармакопейных буферных сред не может обеспечить моделирование условий *in vivo* с достаточной степенью достоверности [1]. Поэтому всё чаще предлагается проведение теста «Растворение» в биорелевантных условиях. При разработке биорелевантного теста «Растворение» для пероральных систем, помимо свойств АФИ и ЛФ, необходимо учитывать физиологичные условия желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (таблица 1).

Данные условия включают в себя свойства жидкостей ЖКТ (состав, объем, pH), желудочного содержимого (особенно для недезинтегрирующихся систем), сокращения ЖКТ и гидродинамику, желудочно-кишечные ферменты и наличие или отсутствие пищи [2].

ВЫБОР СРЕДЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ»

Исходя из известных в литературе данных о фактическом физиологичном составе жидкостей ЖКТ [3, 4], можно задаться вопросом: насколько буферные растворы и фармакопейные среды, успешно используемые в контроле качества лекарственных средств, могут быть использованы

для предиктивного теста «Растворение», задачей которого является получение данных, сопоставимых с данными растворения *in vivo*, с целью успешной разработки и внедрения новых ЛП? В отличие от буферных растворов и фармакопейных сред растворения биорелевантные среды имитируют среды желудочного и кишечного содержимого в «сытом» и «голодном» состоянии. В данных средах учитываются такие физиологичные параметры, как значение pH, буферная емкость, поверхностное натяжение, присутствие солей желчных кислот. Соли желчных кислот и фосфолипиды играют важную роль в растворении и транспорте в тонком кишечнике плохо растворимых АФИ [2].

Таблица 1.

Параметры растворения in vitro и in vivo

Параметр	Растворение *in vitro*	Растворение *in vivo*
Среда	Буферные растворы Фармакопейные среды Биорелевантные среды	Жидкости ЖКТ
Объем	Различный в зависимости от используемого метода и воспроизводимых условий («сытое» или «голодное» состояние)	Различный в зависимости от условий («сытое» или «голодное» состояние)
Длительность	Различная в зависимости от используемого метода, ЛФ и воспроизводимых условий («сытое» или «голодное» состояние)	Различная в зависимости от условий и ЛФ («сытое» или «голодное» состояние)
Гидродинамика	Методы USP 1, 2, 3, 4	Динамика ЖКТ
Количество АФИ	Постоянно в закрытых системах Уменьшается в открытых системах	Уменьшается за счет абсорбции АФИ

На сегодняшний день известен ионный состав и осмолярность жидкостей ЖКТ (рисунок 1).

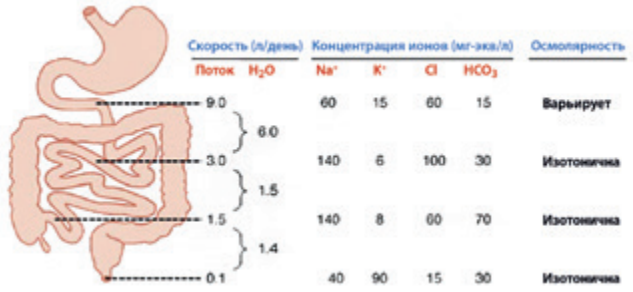


Рисунок 1. Ионный состав жидкостей желудочно-кишечного тракта [5]

В отличие от высокорастворимых АФИ, при проведении теста «Растворение» плохо растворимых соединений большую роль играет выбор среды растворения. На высвобождение таких АФИ может влиять большое количество факторов: значение pH среды, ионная сила, буферная емкость, эффект солюбилизации за счет присутствия сурфактантов, отсутствие/наличие пищи. В состоянии «натощак» растворение плохо растворимых неионизируемых соединений довольно медленное в желудке и в большинстве случаев не бывает полным до момента достижения тонкого кишечника. Для плохо растворимых слабых кислот растворение в желудке мало способствует общему растворению, в то время как в тонком кишечнике за счет более высокого значения pH во многих случаях происходит быстрое и полное растворение. В отличие от слабых кислот плохо растворимые слабые основания в первую очередь растворяются в желудке в состоянии «натощак», так как ожидаемо, что их растворимость в «голодном» желудке выше, чем в других отделах ЖКТ. В «сытом» состоянии, как известно, время пребывания ЛФ в желудке значительно увеличивается. Компоненты пищи замедляют растворение АФИ ввиду замедления распадаемости ЛФ. Тонкий кишечник в «сытом» состоянии производит среду растворения с высокой способностью солюбилизировать плохо растворимые соединения, что может способствовать повышению биодоступности данных АФИ по сравнению с биодоступностью в состоянии «натощак» [6].

Исходя из вышеизложенного, буферные и фармакопейные среды, с успехом используемые для контроля качества серий фармацевтической продукции, не могут быть успешно применены для предиктивного теста «Растворение», особенно для плохо растворимых АФИ, а также для ЛФ с модифицируемым высвобождением, так как при разработке данных сред не принимались во внимание физиологичные условия и компоненты сред ЖКТ. Для данных целей разрабатываются и внедряются биорелевантные среды.

СРЕДЫ, МОДЕЛИРУЮЩИЕ УСЛОВИЯ ЖЕЛУДКА

«Голодное» состояние

Существует целый ряд сред, имитирующих «голодное» состояние желудочного содержимого. Наиболее простым примером такой среды растворения является среда SGF (Simulated Gastric Fluid), состоящая из хлористоводородной кислоты со значением pH 1,2, содержащая пепсин (3,2 мг/мл) и имеющая поверхностное натяжение, приблизительно равное поверхностному натяжению воды (~68 мН/м). Однако известно, что поверхностное натяжение содержимого желудка понижается при рефлюксе содержимого двенадцатиперстной кишки, содержащего соли желчных кислот. Для того чтобы понизить значение поверхностного натяжения до физиологичного уровня, было предложено добавление синтетических сурфактантов, таких как натрия лаурилсульфат или Тритон X [7] (таблица 2).

Однако среды SGF содержат в своем составе нефизиологичные поверхностно-активные соединения, имеют более низкое значение pH, чем в физиологичных условиях. Более того, натрия лаурилсульфат подвергается гидролизу в растворах, имеющих значение pH ниже 4, что, в свою очередь, приводит к непосто-

янству состава среды. Также натрия лаурилсульфат взаимодействует с желатином при pH ниже 5, что делает проблематичным использование данной среды при исследовании, например, желатиновых капсул [6].

Таблица 2.

Составы сред, имитирующих «голодное» состояние желудка

	SGF_{SLS}	SGF_{Triton}	FaSSGF
Натрия лаурилсульфат (% m/v)	0,25/0,05	–	–
Тритон X-100 (% m/v)	–	0,1	–
Пепсин (мг/мл)	–	–	0,1
Натрия таурохолат (мкМ)	–	–	80
Лецитин (мкМ)	–	–	20
Натрия хлорид (мкМ)	34,2	34,2	34,2
pH	1,2	1,2	1,6
Поверхностное натяжение (мН/м)	33,7	32,0	42,6
Осмолярность (мОсм/кг)	180,5±3,6	157,7±2,9	120,7±2,5

Vertzoni с соавторами [8] разработал FaSSGF как среду растворения, имеющую характеристики в соответствии с опубликованными физиологичными характеристиками желудка. Данная среда характеризуется значением pH 1,6 и содержит физиологически эквивалентные количества пепсина, солей желчных кислот и лецитина для достижения значения поверхностного натяжения среды, близкого к значению *in vivo*.

«Сытое» состояние

Содержимое «сытого» желудка является комплексным, гетерогенным и имеет физико-химические характеристики, которые изменяются во времени. Гомогенизированное молоко (3,5% жира) было предложено в качестве среды, моделирующей «сытое» состояние желудка, еще более 20 лет назад. Жидкая пища также может быть использована для исследований *in vitro*. Но молоко / жидкая пища могут быть использованы для моделирования лишь начальных стадий «сытого» состояния желудка, так как состав содержимого желудка в «сытом» состоянии изменяется во времени за счет секреторной функции и продолжения пищеварения. Обычно значение pH содержимого желудка повышается за счет буферного эффекта содержимого пищи и может достигать значения 7 в зависимости от состава пищи, но секреторная функция желудка, как правило, затем понижает значение pH содержимого за счет секреции хлористоводородной кислоты вплоть до базового уровня.

Составы сред растворения были разработаны в соответствии с меняющимся значением pH, буферной емкости и осмолярности желудочного содержимого в течение первых 75 мин (ранняя), от 75 до 165 мин (средняя) и после 165 мин (поздняя) продолжительности пищеварения. В таблице 3 приведены характеристики всех трех сред растворения.

Данные среды растворения могут быть использованы как последовательность сред в течение одного теста «Растворение» (с использованием методов 3 и 4 согласно USP). Средняя среда (FeSSGF) предполагается как среда растворения для оценки влияния пищи на растворение ЛФ и используется в сравнении с FaSSGF [6].

Таблица 3.

Составы сред, моделирующих «сытое» состояние желудка

	Ранняя	Средняя (FeSSGF)	Поздняя
Натрия хлорид (мМ)	148	237,02	122,6
Уксусная кислота (мМ)	–	17,12	–
Натрия ацетат (мМ)	–	29,75	–
Ортофосфорная кислота (мМ)	–	–	5,5
Натрия дигидрофосфат (мМ)	–	–	32
Молоко:буфер	1:0	1:1	1:3
Хлористоводородная кислота / натрия гидроксид	qs до pH 6,4	qs до pH 5	qs до pH 3
pH	6,4	5	3
Осмолярность (мОсм/кг)	559±10	400±10	300±10
Буферная емкость (ммоль/л/ΔpH)	21,33	25	25

СРЕДЫ, МОДЕЛИРУЮЩИЕ УСЛОВИЯ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА

«Голодное» состояние

Простейшей средой, моделирующей условия «голодного» тонкого кишечника, является SIF (Simulated Intestinal Fluid), характеризующаяся значением pH 6,8 и содержащая панкреатин. Данная среда позиционируется скорее для операций контроля качества и не подходит в качестве предиктивной при проведении исследований по корреляции *in vitro* / *in vivo*.

Dressman и др. [9] впервые разработали среду FaSSIF (Fasted State Simulated Intestinal Fluid), предназначенную для моделирования содержимого тонкого кишечника в состоянии «натощак» в соответствии с физиологичными характеристиками. Помимо значения pH, осмолярности и буферной емкости, среда FaSSIF моделирует солюбилизирующую способность содержимого тонкого кишечника (таблица 4).

Среда FaSSIF характеризуется значением pH 6,5 и содержит натрия таурохолат и фосфолипиды в соотношении 4:1.

Jantrated и др. [10] несколько модифицировали состав среды FaSSIF, внеся некоторые изменения. Количество лецитина уменьшили с 0,75 мМ в FaSSIF до 0,2 в FaSSIF-V2, также понизили осмолярность и использовали малеатный буфер вместо фосфатного. Следует отметить, что принципиально важными буферными компонентами содержимого «голодного» тонкого кишечника являются бикарбонаты. Одна-

ко известно, что среды, содержащие бикарбонаты, непросты в использовании, так как образующийся при использовании диоксид углерода приводит к изменению pH, буферной емкости, ионной силы и осмолярности. К настоящему времени в Университете Грайфсвальда (Германия) Garbacz и др. [11] проводят интенсивные исследования по разработке различных способов и устройств, предотвращающих данные негативные стороны использования бикарбонатов.

Таблица 4.

Составы сред растворения, моделирующих условия тонкого кишечника в состоянии «натощак»

	FaSSIF	FaSSIF-V2
Натрия таурохолат (мМ)	3	3
Лецитин (мМ)	0,75	0,2
Двуосновный натрия фосфат (мМ)	28,65	–
Малеиновая кислота	–	19,12
Натрия гидроксид (мМ)	8,7	34,8
Натрия хлорид (мМ)	105,85	68,62
pH	6,5	6,5
Осмолярность (мОсм/кг)	270±10	180±10
Буферная емкость (ммоль/л/ΔpH)	12	10

«Сытое» состояние

Среда FeSSIF (Fed State Simulated Intestinal Fluid) была введена вместе с FaSSIF для оценки условий тонкого кишечника в состоянии после приема пищи. FeSSIF характеризуется значением pH 5,0 и имеет значения буферной емкости и осмолярности, близкие к физиологичным (таблица 5).

Таблица 5.

Составы сред растворения, моделирующих «сытое» состояние тонкого кишечника

	FeSSIF	Ранняя	Средняя	Поздняя	FeSSIF-V2
Натрия таурохолат (мМ)	15	10	7,5	4,5	10
Лецитин (мМ)	3,75	3	2	0,5	2
Глицерила моноолеат (мМ)	–	6,5	5	1	5
Натрия олеат (мМ)	–	40	30	0,8	0,8
Уксусная кислота	144	–	–	–	–
Малеиновая кислота (мМ)	–	28,6	44	58,09	55,02
Натрия гидроксид (мМ)	101	52,5	65,3	72	81,65
Натрия хлорид (мМ)	173	145,2	122,8	51	125,5
pH	5,0	6,5	5,8	5,4	5,8
Осмолярность (мОсм/кг)	635±10	400±10	390±10	240±10	390±10
Буферная емкость (ммоль/л/ΔpH)	76	25	25	15	25

Среда FeSSIF содержит более высокие концентрации натрия таурохолата и фосфолипидов по сравнению со средой FaSSIF, но соотношение их сохраняется – 4:1.

Jantrated и др. модифицировали и состав среды FeSSIF, внеся некоторые изменения. Так, ими было показано, что значение pH среды в значительной степени уменьшается после приема пищи. Влияние приема пищи было учтено, как и в случае среды, имитирующей состояние «сытого» желудка. В этой связи могут использоваться варианты как ранней и средней, так и поздней сред растворения.

СРЕДЫ, МОДЕЛИРУЮЩИЕ УСЛОВИЯ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА

Fotaki и др. была разработана и введена среда растворения SCoF (Simulated Colonic Fluid), характеризующаяся физиологичным значением pH и содержанием жирных кислот, соответствующим среде толстой кишки (colon) [6]. Данная среда имеет pH 5,8, для достижения которого используется ацетатный буфер (таблица 6).

Таблица 6.

Состав среды, моделирующей содержимое толстого кишечника (SCoF)

	SCoF
Уксусная кислота (мМ)	170
Натрия гидроксид (мМ)	157
pH	5,8
Осмолярность (мОсм/кг)	295
Буферная емкость (ммоль/л/ΔpH)	29,1
Ионная сила	0,16

Следует отметить, что информация о действительном составе среды нижних отделов кишечника в литературе появилась сравнительно недавно, что и объясняет отсутствие различных вариантов биорелевантных сред, имитирующих как «голодное», так и «сытое» состояние толстого кишечника.

Vertzoni и др. [12] разработали составы сред, имитирующих различные состояния толстого кишечника, – FaSSCoF (Fasted State Simulated Colonic Fluid) и FeSSCoF (Fed State Simulated Colonic Fluid). Физико-химические характеристики и состав FaSSCoF и FeSSCoF приведены в таблице 7.

В данных средах для достижения необходимого физиологичного уровня буферной емкости использования только биорелевантных буферных компонентов (короткоцепочечные жирные кислоты) недостаточно, поэтому было предложено использовать трис/малеатный буфер. В качестве белковой составляющей был предложен бычий сывороточный альбумин в концентрации 3 мг/мл, как наиболее доступный из биорелевантных белковых компонентов. Глюкоза исполь-

зовалась для обеспечения должного уровня общих углеводов. В качестве компонента, обеспечивающего общее количество желчных кислот, был предложен экстракт солей желчных кислот. Пальмитиновая кислота – представитель жирных кислот, участвующих в образовании бислоя мембраны клеток, – была выбрана, так как, согласно данным литературы, она является физиологичным компонентом содержимого толстого кишечника и характеризуется наиболее удобным введением ее в состав сред по сравнению с другими жирными кислотами.

Таблица 7.

Состав и физико-химические характеристики сред, имитирующих условия толстого кишечника

	FaSSCoF	FeSSCoF
pH	7,8	6,0
Компоненты буферного раствора	Tris/малеат	Tris/малеат
Буферная емкость (ммоль/л/ΔpH)	16/26	15/14
Осмолярность (мОсм/кг)	196	207
Поверхностное натяжение (мН/м)	51,4	50,4
Белки/пептиды (мг/мл)	3	3
Общие углеводы	0	14
Желчные кислоты (мкМ)	150	600
Жирные кислоты (мкМ)	100	200
Фосфатидилхолин (мкМ)	300	500

Гидродинамика

Не менее важным, чем состав среды, являются гидродинамические условия проведения предиктивного теста «Растворение». Гидродинамика эксперимента зависит от типа оборудования (тип аппарата USP), объема и вязкости среды растворения и некоторых практических вопросов, таких как положение ЛФ во время эксперимента. Выбор перечисленных факторов является крайне важным при разработке методики теста «Растворение» в биорелевантных условиях.

Для проведения теста «Растворение» в настоящее время используются следующие основные фармакопейные методы (согласно Фармакопее США – USP), различающиеся аппаратурным оформлением [13, 14]:

1. Вращающаяся корзинка (метод USP-1);
2. Вращающаяся лопасть (метод USP-2);
3. Поршневой цилиндр Био-Дис (метод USP-3);
4. Проточная ячейка в открытом и закрытом цикле (метод USP-4);
5. Лопасть над диском (метод USP-5);
6. Цилиндр (метод USP-6);
7. Поршневой держатель (метод USP-7).

Методы USP-1 и USP-2 (позиционируются как закрытые системы) являются самыми часто используемыми, так как наиболее просты, робастны и стандартизованы. Данные методы являются методами первого выбора при исследовании систем с немедленным и замедленным высвобождением, но они не подходят для всех ЛФ и используемых АФИ. Безусловно, данные методы являются методами выбора при контроле качества уже существующих ЛФ, но абсолютно не подходят для оценки биофармацевтических свойств ЛФ, исследования систем с контролируемым высвобождением АФИ, а также не могут быть использованы в качестве предиктивных методов при оценке корреляции *in vitro – in vivo*.

Нерешенными являются возникающие при использовании метода USP-1 и USP-2 проблемы, связанные с гомогенностью в сосуде растворения, с появлением дисперсий в областях высоких концентраций АФИ, появлением агломератов. Так, Aoki и др. [15, 16] была предложена довольно простая модификация метода USP-2. В среду растворения помещают полистирольные шарики (диаметр 6,35 мм, плотность 1,05 г/см^3) и проводят тест «Растворение» при различных скоростях вращения лопасти. Воздействие шариков на таблетированную форму моделировало механические воздействия в естественных условиях, приводя к эрозии гидрогелевого слоя таблетки. Показательным явилось то, что профили растворения *in vitro* (при использовании 2500 шариков, объеме среды растворения 250 мл и скорости вращения лопасти 25 об/мин) коррелировали с данными *in vivo*, полученными на собаках породы бигль.

При проведении так называемого биорелевантного теста «Растворение» учитывается: моделирование продвижения ЛФ по ЖКТ с учетом параметров высвобождения АФИ *in vivo*, а также прогнозирование всасывания АФИ *in vivo* на основе данных, полученных в результате теста «Растворение» *in vitro* [5].

Методы USP-3 и USP-4 предназначены для исследований высвобождения АФИ из ЛФ, для которых необходима смена нескольких сред с различными значениями pH в рамках одного эксперимента, что, как правило, характерно для ЛФ с модифицируемым высвобождением АФИ.

Уже практически 20 лет аппарат «поршневой цилиндр» введен в Фармакопею США (метод USP-3, Bio-Dis) в качестве альтернативы закрытым методам (методы USP-1 и USP-2). Также данный метод включен в Европейскую Фармакопею, но пока отсутствует в Японской Фармакопее, а также в Фармакопее РФ (XIII издание). При использовании метода USP-3 скорость движения цилиндра 10–15 качаний в мин (dpm) является приемлемой для моделирования условий состояния «натощак». Особенностями данного метода являются:

- возможность использования серии сред растворения с различным значением pH и прочими параметрами, что, соответственно, помогает наиболее правильно моделировать продвижение ЛФ по ЖКТ;
- возможность задавать (программировать) различное время пребывания ЛФ в средах, моделирующих различные отделы ЖКТ;
- возможность задавать определенные параметры моторики ЖКТ.

Метод USP-4 предполагает:

- возможность использования нескольких типов проточных ячеек и/или адаптеров к ним, включая специальные ЛФ (нано- и микрочастицы, суспензии, липосомы, контакные линзы, гидрогели и др.);
- возможность использования метода как в открытом, так и в закрытом режиме, что важно при исследовании ЛФ, в состав которых включены труднорастворимые АФИ;
- выбор скорости потока (4 или 8 мл/мин) является биорелевантным условием при моделировании «сытого» и «голодного» состояния;
- возможность избежать появления агломератов благодаря помещению при дизайне эксперимента специальных стеклянных шариков (диаметром 1–5 мм) внутрь ячейки, что позволяет менять турбулентный поток жидкости на ламинарный [2].

Для исследования ЛФ немедленного высвобождения, содержащих АФИ класса I и III биофармацевтической классификационной системы (БКС), можно использовать тест «Растворение» в упрощенной форме. В исследовании Fotaki и др. [17] была проведена сравнительная оценка высвобождения АФИ классов I и II БКС методами USP-1, USP-2 и USP-3. Согласно приведенным в работе результатам данные, полученные всеми тремя методами, коррелируют с результатами экспериментов *in vivo*. Для ЛФ немедленного высвобождения, содержащих АФИ классов II и IV БКС, солюбилизация и свойства ЛФ могут оказывать существенный эффект на процесс растворения и высвобождения АФИ из ЛФ в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Различные модификации данных методов, а также новые методы могут быть использованы в особых случаях, например, в приборе стресс-теста «Растворение», разработанного Garbacz и др. [18] в Университете Грайфсвальда (Германия) для ЛФ, чувствительных к механическим воздействиям во время продвижения по ЖКТ. Данный прибор, опытный образец которого был выпущен компанией Erweka (Германия), позволяет проводить тест «Растворение» ЛФ во время ее вращения, погружения и сжимания при помощи специального надувного шарика, помещенного внутрь специальной сферической корзинки, что и приводит к моделированию давления кусочков пищи и моторики ЖКТ на ЛФ.

Объем среды растворения

Еще одним важным вопросом, который возникает при проведении теста «Растворение», является объем среды, необходимый для проведения исследования. Обычно при проведении теста «Растворение» методами USP-1 и USP-2 предполагается использование объема среды в пределах 500–1000 мл. Но такой объем среды скорее сопоставим с объемом жидкостей ЖКТ в «сытом» состоянии, тогда как, по данным проводимых исследований, для состояния «натощак» наиболее физиологичными были бы объемы среды растворения в пределах 80–100 мл. Используемый объем 250 мл может привести к завышению растворения в желудке для плохо растворимых соединений [19].

Наиболее изменяющимся, но в то же время важным параметром является объем среды для изучения высвобождения в желудке, который в состоянии «натощак» колеблется в пределах 25–50 мл. Но, принимая во внимание, что многие пероральные ЛФ необходимо запивать водой, в данном случае объем среды растворения может быть увеличен до 200–250 мл [20].

Трансфер сред

Согласно многим исследованиям важным при проведении предиктивного теста «Растворение» является не стационарное использование одной среды, а использование нескольких биорелевантных сред, причем с последовательной их заменой, моделирующей передвижение ЛФ по всем отделам ЖКТ. Этот факт является особенно важным для систем с замедленным, модифицированным высвобождением, но не теряет своей актуальности и при исследовании систем с немедленным высвобождением АФИ. Как ранее было показано, задача смены сред растворения с успехом решается с помощью аппаратов для проведении теста «Растворение» методами USP-3 и USP-4. Klein и др. [21, 22] предложена система трансфера сред при проведении теста «Растворение» для плохо растворимых АФИ методом USP-2, позволяющая предотвратить осаждение растворенных слабых оснований при попадании в среду тонкого кишечника. Данная система была разработана для моделирования перемещения ЛФ из желудка в тонкий кишечник. В данном случае 100 мг труднорастворимого АФИ (итраконазол, тамксифен, кетоконазол) полностью растворили в 40 мл среды SGF (pH 1,8). Далее данная донорная фаза перемещалась в акцепторную фазу, представляющую собой среды с несколько измененным значением pH, а именно FaSSIF с pH 6,8 или FeSSIF с pH 5,0. Значение pH в слу-

чае среды FaSSIF было выбрано именно с целью достижения результирующего физиологичного значения (pH 6,5) при смешивании со средой SGF (pH 1,8). Продолжительная подача донорной фазы в фазу-акцептор обеспечивалась использованием перистальтического насоса, поддерживающего постоянную скорость наполнения резервуара 2 мл/мин. Скорость вращения лопастей составляла при этом 75 об/мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предиктивный тест «Растворение» должен опираться на определенные аспекты, влияющие на высвобождение АФИ из ЛФ, а именно: при дизайне эксперимента необходимо учитывать физиологичный уровень pH, объем и биорелевантный состав сред ЖКТ, а также влияние пищи, гидродинамические условия и механическое воздействие на ЛФ во время её продвижения по ЖКТ. Но несмотря на довольно большое количество накопившихся знаний и подходов в области разработки предиктивного теста «Растворение», исследования в этой области активно продолжаются: исследуются все новые особенности физиологии ЖКТ, а также изучается возможность дальнейшей адаптации экспериментов *in vitro* к особенностям пациента [5].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку, оказанную в рамках научного проекта № 16-04-01692.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. И.Е. Шохина – М.: Перо, 2015. 320 с.
2. Q. Wang, N. Fotaki, Y. Mao. Biorelevant Dissolution: Methodology and Application in Drug Development // Dissolution Technologyes. 2009. V. 16(3). P. 6–12.
3. D.S. Evans, G. Pye, R. Bramley, A.G. Clark, T.J. Dyson, J.D. Hardcastle. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects // Gut. 1988. V.29. № 8. P. 1035–1041.
4. J. Faallingborg, L.A. Christensen, M. Ingeman-Nielsen, B.A. Jacobsen, K. Abildgaard, H.H. Rasmussen. pH-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device // Aliment Pharmacology & Therapeutics. 1989. V. 3(6). P. 605–613.
5. Klein. In vitro release testing of controlled release formulations – from pharmacopeia to patient-specific methods // Evonik 10th International Controlled Release Workshop. 2015.
6. N. Fotaki, M. Vertzoni. Biorelevant Dissolution Methods and Their Applications in In Vitro-In Vivo Correlations for Oral Formulations // The Open Drug Delivery Journal. 2010. 4. P. 2–13.
7. M. Koziolek, G. Garbacz, M. Neumann, W. Weitschies. Simulating the Postprandial Stomach: Biorelevant Test Methods for the Estimation of Intragastric Drug Dissolution // Molecular Pharmaceutics. 2013. V. 10(6). P. 2211–2221.
8. M. Vertzoni, J. Dressman, J. Butler, J. Hempenstall, Ch. Reppas. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2005. V. 60. P. 413–417.
9. E. Galia, E. Nicolaides, D. Horter, R. Lobenberg, Ch. Reppas, J. Dressman. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs // Pharmaceutical Research. 1998. V. 15(5). P. 698–705.
10. E. Jantratid, N. Janssen, Ch. Reppas, J. Dressman. Dissolution Media Simulating Conditions in the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update // Pharmaceutical Research. 2008. V. 25(7). P. 1663–1676.
11. G. Garbacz, B. Kolodziej, M. Koziolek, W. Weitschies, S. Klein. An Automated System for Monitoring and Regulating the pH of Bicarbonate Buffers // AAPS PharmSciTech. 2013. V. 14(20). P. 517–522.
12. M. Vertzoni, A. Diakidou, M. Chatzilias, E. Soderlind, B. Abrahamsson, J. Dressman, Ch. Reppas. Biorelevant Media to Simulate Fluids in the Ascending Colon of Humans and Their Usefulness in Predicting Intracolonic Drug Solubility // Pharmaceutical Research. 2010. V. 27(10). P. 2187–2196.
13. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 33 – NF 28). United States Pharmacopeial Convention, Inc. – Rockville, MD. USA. 2009 98.
14. Государственная фармакопея РФ, XIII изд. Т. 2. – М. 2015.
15. S. Aoki, K. Uesugi, K. Tatsuishi, H. Ozava, M. Kayano. Evaluation of the correlation between in vivo and in vitro release of phenylpropanolamine HCl from controlled-release tablets // International Journal of Pharmaceutics. 1992. V. 85. P. 65–73.
16. S. Aoki, H. Ando, K. Tatsuishi, K. Uesugi, H. Ozava. Determination of the mechanical impact force in the in vitro dissolution test and evaluation of the correlation between in vivo and in vitro release // International Journal of Pharmaceutics. 1993. V. 95. P. 67–75.
17. N. Fotaki, A. Aivaliotis, J. Butler, J. Dressman, M. Fischbach, J. Hempenstall, S. Klein, Ch. Reppas. A comparative study of different release apparatus in generating *in vitro – in vivo* correlations for extended release formulations // European Journal of Pharmaceutics and Bioharmaceutics. 2009. V. 73(1). P. 115–120.
18. G. Garbacz, S. Klein, W. Weitschies. A biorelevant dissolution stress test device – background and experience // Expert Opinion Drug Delivery. 2010. V. 7(11). P. 1251–1261.
19. I. Gonzalez-Garcia, V. Mangas-Sanjuan, M. Merina-Sanjuan, M. Bermejo. In vitro – in vivo correlations: general concepts, methodologies and regulatory applications // Drug Development and Industrial Pharmacy. 2015. V. 41(12). P. 1935–1947.
20. G. Garbacz, S. Klein. Dissolution testing of oral modified-release dosage forms // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2012. V. 64(7). P. 944–968.
21. S. Klein, N. Buchanan, Ch. Buchanan. Miniaturized Transfer Models to Predict the Precipitation of Poorly Soluble Weak Bases upon Entry into the Small Intestine // AAPS PharmSciTech. 2012. V. 13(4). P. 1230–1235.
22. T. Taupitz, J. Dressman, S. Klein. In Vitro Tools for Evaluating Novel Dosage Forms of Poorly Soluble, Weakly Basic Drugs: Case Example Ketoconazole // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013. P. 3645–3652.

sotax
Solutions for Pharmaceutical Testing

Стр. 234

ЛУЧШИЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА "РАСТВОРЕНИЕ" ПО МЕТОДАМ **USP 1, 2, 5, 6** НА БАЗЕ SOTAX



Ручная система растворения AT

- Простой ручной отбор образцов с использованием стеклянной пипетки.
- Стационарный автоматический пробоотборник
- Отдельно стоящий модуль отбора проб с направляющими для пипеток.
- Стационарный или ручные канюли
- Автоматический отбор проб с помощью уникальной технологии HollowShaft™ через полый вал мешалки



Полуавтоматическая версия (один инструмент)

- Оффлайн конфигурация с коллектором фракций
- UV-Vis Online конфигурация системы со спектрофотометром
- UV-Vis On/Offline системы
- HPLC Online системы с интеграцией хроматографа в систему растворения
- HPLC On/Offline системы с интеграцией хроматографа и коллектором фракций для сбора и хранения образцов



Двойная полуавтоматическая версия (два тестера растворения)

- Double Offline конфигурация двойной системы растворения с коллектором фракций
- Double UV-Vis Online конфигурация двойной системы со спектрофотометром
- Double UV-Vis On/Offline системы



Полностью автоматическая система растворения

- Offline конфигурация с коллектором образцов
- UV-Vis Online конфигурация с подключением к спектрофотометру и получением результатов в режиме реального времени
- UV-Vis On/Offline конфигурация с подключением к спектрофотометру и коллектору фракций



Полуавтоматическая система CE7

Проведение испытаний на растворение по методу «проточная ячейка» (USP 4)

- Возможность работы с объемами среды растворения от 15 до 4000 мл
- Возможность автоматической смены среды для изменения pH в ходе испытания
- Различные типы ячеек для таблеток, капсул, порошков, гранул, имплантов и суппозиториев

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

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ПОЛИКОМПЛЕКСНЫХ МАТРИЦ В СТАНДАРТНЫХ И БИОРЕЛЕВАНТНЫХ СРЕДАХ МЕТОДАМИ USP III И USP IV

А.В. Ситенкова (Буховец)[1], Н. Фотаки[2], Р.И. Мустафин[1]*

Резюме. В статье приводятся результаты исследования высвобождения лекарственного вещества – индометацина из пероральных систем доставки на основе интерполимерных комплексов с участием химически комплементарных сополимеров Eudragit®. Оценку высвобождения проводили двумя методами: «проточная ячейка» (метод USP IV) и «качающийся цилиндр» (метод USP III) в буферных растворах и биорелевантных средах. Исследования показали, что высвобождение индометацина можно охарактеризовать как «кишечный тип». При оценке методом USP III высвобождается большее количество индометацина за единицу времени, что может быть связано с механическим воздействием на матрицы эродирующего типа при проведении теста «Растворение» по методу USP III.

Ключевые слова: тест «Растворение», биорелевантные среды, индометацин, интерполимерные комплексы, пероральные системы доставки лекарственных веществ, Eudragit®.

A COMPARATIVE STUDY OF DRUG RELEASE FROM POLYCOMPLEX MATRICES IN STANDARD AND BIORELEVANT MEDIA USING USP III AND USP IV APPARATUS

A.V. Sitenkova (Bukhovets)[1], N. Fotaki[2], R.I. Moustafin[1]*

Abstract. The results of Indomethacin release from the oral drug delivery systems based on interpolymer complexes with Eudragit® copolymers are presented. The release assessment was performed by two methods – flow-through cell (USP IV Apparatus) and the reciprocating cylinder (USP III Apparatus) in standard buffer solutions and biorelevant media. The release of indomethacin can be described as «intestinal» type. According to the results Indomethacin was released faster using USP III Apparatus due to stress-effect on the erosion type matrices.

Keywords: dissolution test, biorelevant media, Indomethacin, interpolymer complexes, oral drug delivery systems, Eudragit®.

1 – ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 420012, Россия, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49

2 – Университет Бата, Великобритания, Бат, Клэвертон-Даун, BA2 7AY

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

2 – University of Bath, Claverton Down, BA2 7AY, Bath, UK

* **адресат для переписки:**
E-mail: rouslan.moustafine@gmail.com
Тел.: 8 (917) 399 90 48

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее востребованных областей направленной доставки лекарственных веществ (ЛВ) является толстый отдел кишечника. Использование такого рода систем позволяет достичь успехов как в терапии заболеваний толстого кишечника (язвенный колит, болезнь Крона, колоректальный рак, хронический панкреатит, синдром раздраженного кишечника), так и в терапии системных заболеваний путем повышения биодоступности ЛВ, оптимальной зоной абсорбции которых является данная область желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1–4].

Индометацин (pKa=4,5) как классический представитель нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) является удачной моделью при создании систем доставки ЛВ в область толстого кишечника ввиду того, что применение НПВС является доказанным способом успешного лечения воспалительных заболеваний толстого кишечника и одним из путей профилактики колоректального рака [5].

Целью данной работы явилось исследование высвобождения индометацина из систем с контролируемой доставкой на основе интерполимерных комплексов с участием химически комплементарных сополимеров Eudragit® различными методами теста «Растворение» с использованием как простых буферных сред, так и специальных биорелевантных сред.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве носителей в системах контролируемой доставки индометацина были выбраны три образца интерполимерных комплексов (IPC) на основе сополимеров Eudragit®EPO и Eudragit®S100 с условными наименованиями IPC-1, IPC-2 и IPC-3 соответственно [6]. В качестве модельного труднорастворимого НПВС (растворимость в воде составляет 0,002–0,007 мг/мл) использовали индометацин (Sigma Aldrich, Милан, Италия). Синтез IPC и получение таблетированных полимерных матриц проводили по методикам, описанным ранее [6]. Тест «Растворение» методом USP III («качающийся цилиндр») проводили на приборе BIO-DIS (Agilent Technologies, США), методом USP IV («проточная ячейка») – на приборе CE 7 Smart (Sotax, Швейцария). Тест «Растворение» проводили в стандартных буферных средах с различным значением pH: 0,1 М хлористоводородная кислота (pH 1,2) и фосфатные буферные растворы со значениями pH 5,8, 6,8 и 7,4, – а также в биорелевантных средах FaSSGF, FaSSIF-V2, FaSSCoF, полученных по известным методикам [7–9]. Скорость опускания цилиндра при проведении теста «Растворение» методом USP III составила 5 качаний в мин (dpm), скорость потока при проведении оценки методом USP IV – 16 мл/мин для буферных систем и 4 и 8 мл/мин для биорелевантных сред. Концентрацию индометацина в отбираемых пробах определяли УФ-спектрофотометрически при длине волны 270 нм с использованием прибора Lambda 25 (Perkin Elmer, США). Отбираемый в количестве 3 мл объем немедленно восполнялся чистым буферным раствором. Математическое моделирование кривых высвобождения проводили с использованием программы Origin® (Scientific Graphing & Analysis software, Version 7.5; OriginLab Corporation, США).



Прибор CE 7 Smart Sotax

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования высвобождения индометацина из трех образцов поликомплексных матриц в буферных средах методами USP III и USP IV представлены на рисунках 1 и 2, в биорелевантных средах – на рисунках 3 и 4 соответственно.

Как видно из полученных результатов, высвобождение индометацина из поликомплексных матриц, полученное в результате сравнительной оценки двумя фармакопейными методами, можно охарактеризовать понятием «кишечный тип». В случае буферных систем высвобождение ЛВ происходит только в средах со значением pH 6,8 и 7,4, моделирующих нижние отделы ЖКТ, а в случае биорелевантных сред – только в средах кишечника FaSSIF-V2 и FaSSCoF. Следует отметить, что таким образом достигается эффект предотвращения выхода ЛВ на этапе, соответствующем верхнему отделу ЖКТ.

В случае всех поликомплексных систем методом USP III удалось получить более высокие значения высвобождения индометацина, что можно объяснить гидродинамическими условиями данного метода, а именно известным механическим стресс-

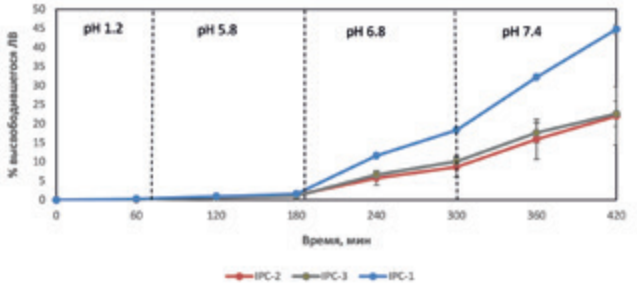


Рисунок 1. Профили высвобождения индометацина из поликомплексных матриц в буферных средах методом USP III («качающийся цилиндр»)

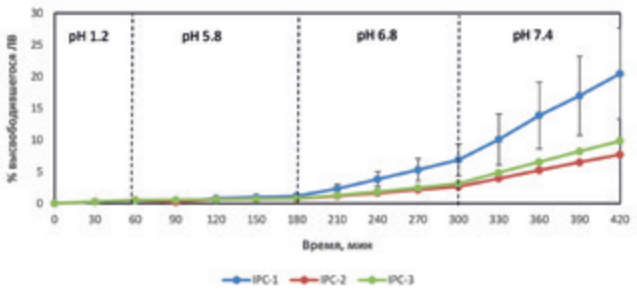


Рисунок 2. Профили высвобождения индометацина из поликомплексных матриц в буферных средах методом USP IV («проточная ячейка»)

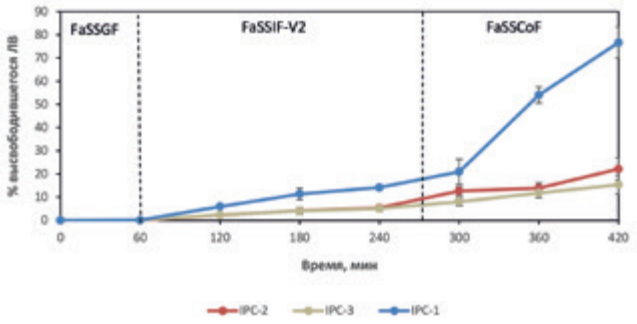


Рисунок 3. Профили высвобождения индометацина из поликомплексных матриц в биорелевантных средах методом USP III («качающийся цилиндр»)

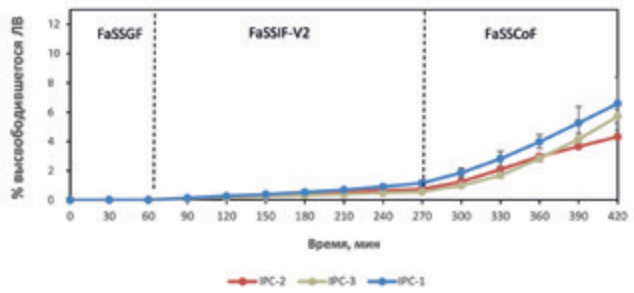


Рисунок 4. Профили высвобождения индометацина из поликомплексных матриц в биорелевантных средах методом USP IV («проточная ячейка»)

воздействием на таблетируемую матрицу. Исходя из чего было выдвинуто предположение, что поликомплексные матрицы с индометацином относятся к так называемому эродирующему, ненабухающему типу. Для подтверждения данного предположения было проведено математическое моделирование высвобождения индометацина из исследуемых поликомплексов методом «качающийся цилиндр» с использованием уравнения Korsmeyer – Peppas [10]. Результаты представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1.

Математическое моделирование высвобождения индометацина из поликомплексных матриц, проведенного методом USP III в буферных средах

	Характеристики матриц		
	IPC-1	IPC-2	IPC-3
Экспонента высвобождения (*n*)	2,67±0,20	2,65±0,18	2,45±0,24
Константа высвобождения (*k*)	4,51354E-6± 5,45152E-6	2,43791E-6± 2,55662E-6	8,67824E-6± 1,21687E-5
Коэффициент корреляции (R^2)	0,9906	0,9927	0,9846
Механизм транспорта	транспорт SuperCase-II	транспорт SuperCase-II	транспорт SuperCase-II

Таблица 2.

Математическое моделирование высвобождения индометацина из поликомплексных матриц, проведенного методом USP III в биорелевантных средах

	Характеристики матриц		
	IPC-1	IPC-2	IPC-3
Экспонента высвобождения (*n*)	2,98±0,37	2,08±0,25	1,76±0,12
Константа высвобождения (*k*)	1,13794E-6± 2,53815E-6	7,71587E-5± 1,1267E-4	3,69859E-4± 2,54783E-4
Коэффициент корреляции (R^2)	0,9736	0,9737	0,9910
Механизм транспорта	транспорт SuperCase-II	транспорт SuperCase-II	транспорт SuperCase-II

Как видно из приведенных результатов математического моделирования, высвобождение индометацина происходит в соответствии с транспортным механизмом SuperCase-II, характерным, как известно, для ненабухающих эродирующих систем. В этом случае высвобождение ЛВ происходит за счет поверхностной эрозии матрицы, что подтверждает наше ранее выдвинутое предположение о механизме транспорта из поликомплексных систем, а также объясняет тот факт, что как в буферных, так и в биорелевантных средах скорость высвобождения ЛВ при проведении теста «Растворение» методом «качающийся цилиндр» выше, чем при проведении теста методом «проточная ячейка».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, матричные системы на основе интерполимерных комплексов Eudragit® EPO/S100 с индометацином относятся к эродирующим матрицам, обеспечивающим высвобождение модельного ЛВ по так называемому кишечному типу, что позволяет рекомендовать данные системы для создания пероральных лекарственных форм с контролируемым высвобождением в толстом кишечнике.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку, оказанную в рамках научного проекта № 16-04-01692.

ЛИТЕРАТУРА

1. A.K. Philip, B. Philip. Colon Targeted Drug Delivery Systems: A Review on Primary and Novel Approaches // Oman Medical Journal. 2010. V. 25. № 2. P. 79–87.
2. C.A. Schoener, N.A. Peppas. Oral delivery of chemotherapeutic agents: background and potential of drug delivery systems for colon delivery // Journal of Drug Delivery and Science Technology. 2012. V. 22. № 6. P. 459–468.
3. F. Talaie, F. Atyabi, M. Azjdarzadeh, R. Dinarvand, A. Saadatzadeh. Overcoming therapeutic obstacles in inflammatory bowel diseases: A comprehensive review on novel drug delivery strategies // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013. V. 1–11.
4. Th.F. Vandamme, A. Lenourry, C. Charrueau, J.-C. Chaumeil. The use of polysaccharides to target drugs to the colon // Carbohydrate Polymers. 2002. V. 48. P. 219–231.
5. E.D.J. Courtney, D.M. Melville, R.J. Leicester. Review article: chemoprevention of colorectal cancer // Aliment Pharmacology & Therapeutics. 2004. № 19. P. 1–24.
6. A.V. Bukhovets, R.I. Moustafine, N. Fotaki. Biorelevant Dissolution Testing for the Evaluation of the Release Properties of Interpolymer Complexes Based on Eudragit® EPO and Eudragit® S100 Copolymers // AAPS Journal. 2015. Abstr. W1052.
7. M. Vertzoni, J. Dressman, J. Butler, J. Hempenstall, Ch. Reppas. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2005. V. 60. P. 413–417.
8. E. Jantratid, N. Janssen, Ch. Reppas, J. Dressman. Dissolution Media Simulating Conditions in the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update // Pharmaceutical Research. 2008. V. 25. Art. 1663.
9. M. Vertzoni, A. Diakidou, M. Chatzilias, E. Soderlind, B. Abrahamsson, J. Dressman, Ch. Reppas. Biorelevant Media to Simulate Fluids in the Ascending Colon of Humans and Their Usefulness in Predicting Intracolonic Drug Solubility // Pharmaceutical Research. 2010. V. 27(10). P. 2187–2196.
10. R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Docler, P. Buri, N.A. Peppas. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers // International Journal of Pharmaceutics. 1983. V. 15. P. 25–35.



Автоматический тестер **Pharmatron AutoTest 4**

- Тестирование гораздо большего числа таблеток различной формы: до 12 серий образцов
- Система SmartRake™ в комбинации с ленточным устройством подачи образцов – гарантия правильной ориентации каждого образца на протяжении всего теста
- Предельная точность результатов: твердость, масса, длина/диаметр, ширина и толщина
- Беспримерная гибкость моделирования процесса

Тестер Auto Test 4 внесен в Государственный реестр средств измерения Свидетельство СН.С.28.072.А № 58664 от 19.05.2015 г.

КАЧЕСТВО
ИМЕЕТ ЗНАЧЕНИЕ!

pharmatron
Dr. Schleuniger®

Полуавтоматический тестер прочности таблеток **Pharmatron SmartTest 50**



- Полуавтоматический анализ 5 параметров таблеток любой формы: масса, толщина, ширина, диаметр/длина и твердость
- Технология измерения твердости Dr. Schleuniger® обеспечивает стабильно точные результаты
- Система SmartAlignTM – гарантия точной ориентации образцов и автоматический поворот таблеток
- Тестирование до 23 образцов за 1 исследование
- Соответствует USP и EP, CE и EMC

Pharmatron ST50 внесен в Государственный реестр средств измерения Свидетельство СН.С.28.072.А № 58664 от 19.05.2015 г.

Pharmaceutical® Solutions

ООО «Фармацевтические решения» — эксклюзивный представитель Sotax и Pharmatron на территории Российской Федерации

115114, Россия, г. Москва, Дербеневская наб., 7/2, оф. 429

+7 (495) 648-32-60,
8 (800) 333-70-32

www.pharmsolutions.ru
info@pharmsolutions.ru

УДК 616.5-089-74

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕМОСОВМЕСТИМОСТИ ИМПЛАНТИРУЕМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ РАЗРАБОТОК

М.Д. Боярский[1]*, Ю.В. Тарасов[1], Ю.И. Филиппов[1], Н.П. Сачивкина[2], Я.М. Станишевкий[2]

Резюме. Активное использование медицинских изделий, контактирующих с кровеносным руслом, создало потребность в четко сформулированных требованиях к тестированию таких изделий, созданию различных способов моделирования и оценки потенциальных осложнений. Одним из важнейших аспектов тестирования таких изделий является оценка их непосредственного влияния на кровь. Для получения объективных результатов исследования любое моделирование должно быть максимально приближено к ситуации клинического применения и воспроизводить характеристики кровотока. Помимо этого необходимо учитывать возможность применения антикоагулянтов и введения в модель дополнительных фармакологических препаратов, если они могут оказывать влияния на биохимические и физические характеристики крови, а их применение неразрывно связано с использованием изделия. Настоящая статья содержит результаты проведенных научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по созданию прибора для имитации условий кровотока с целью доклинического тестирования экспериментальных образцов материалов и устройств, предназначенных для имплантации в тело человека для постоянного или длительного контакта с кровью.

Ключевые слова: доклинические исследования; кровь; имплантация; *ex vivo*; симуляция; биосовместимость.

PRECLINICAL HEMOCOMPATIBILITY STUDIES FOR IMPLANTABLE MEDICAL DEVICES: REVIEW AND EXPERIMENTAL RESEARCH RESULTS

M.D. Boyarskiy[1]*, Y.V. Tarasov[1], Y.I. Philippov[1], N.P. Sachivkina[2], Ya.M. Stanishevkiy[2]

Abstract. Active use of medical devices in contact with the blood stream has created the need to articulate the testing requirements of such products [1], various methods of modelling and assessment of potential complications. One of the most important aspects of testing such products is to evaluate their direct impact on blood. To obtain objective results of the study any modeling should be as close as possible to the situation of clinical use and reproduce the characteristics of blood flow. And also take into account the possibility of the use of anticoagulants and introducing in the model additional pharmacological preparations if they can influence the biochemical and physical characteristics of blood and their use is inextricably linked to the use of the product. The present article contains the results of the conducted scientific-research and experimental-design works on creation of the device to simulate the conditions of the blood flow to the preclinical testing of experimental samples of materials and devices intended for implantation in the human body for permanent or prolonged contact with blood.

Keywords: preclinical study; *ex vivo*; blood; biocomparability; simulation; implantation.

1 – ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117036, Россия, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11

2 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

1 – Endocrinology research center, 11, St. Dmitry Ulyanov, Moscow, 117036, Russia

2 – Peoples Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklay str., Moscow, 117198, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: mia.letum@gmail.com
Тел.: +7 (968) 537 91 91

ВВЕДЕНИЕ

Контактирующие с кровью медицинские изделия можно разделить на 3 основные категории:

1) изделия, не контактирующие с организмом человека;
2) изделия, присоединяемые извне:
   - не имеющие контакта с кровеносным руслом;
   - имеющие контакт с кровеносным руслом;
3) имплантируемые изделия.

Активное использование медицинских изделий, контактирующих с кровеносным руслом, создало потребность в четко сформулированных требованиях к тестированию таких изделий [1]. Одним из важнейших аспектов тестирования таких изделий является оценка их непосредственного влияния на кровь. Для получения объективных результатов исследования любое моделирование должно быть максимально приближено к ситуации клинического применения и воспроизводить характеристики кровотока, а также учи-

тывать возможность применения антикоагулянтов и введение в модель дополнительных фармакологических препаратов, если они могут оказывать влияния на биохимические и физические характеристики крови, а их применение неразрывно связано с использованием изделия.

В случае изделий с изменяемой геометрией, таких как сосудистые протезы, стенты, шунты, катетеры, внутрисосудистые эндоскопы, это означает не только моделирование влияния его антикоагулянтного покрытия с учетом вводимых пациенту препаратов, но также моделирование самого кровотока и возможных внешних воздействий, так как изменение геометрии потока крови при взаимодействии с изделием может повлиять на гемосовместимость.

Для изделий, содержащих в своей структуре мембраны (аппараты искусственного кровообращения, экстракорпоральные мембранные оксигенаторы, оборудование для гемодиализа), помимо вышеперечисленных, важными являются характеристики самих мембран, их пор, а также отсутствие обратного тока фильтрата через мембраны.

С точки зрения биомедицинской этики желательно избегать тестирования на животных, если его можно равноценно заменить моделированием *in vitro*. Кроме того, у животных и человека свёртываемость крови и реакции тромбоцитов существенно отличаются.

СПОСОБЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КРОВЬЮ

Существуют несколько тестовых *in vitro* моделей, оптимальных и широко применяемых в контакте с кровью человека:

1) моделирование в пробирке;
2) модифицированная петля Чандлера (Chandler) [2];
3) модель Hemobile [3];
4) замкнутый контур с перистальтическим насосом.

Самым простым, стандартным и распространенным способом моделирования взаимодействия с кровью изделий медицинского назначения является **моделирование в пробирке**. Для этого объект исследования (образец – часть изделия медицинского назначения, имеющую непосредственный контакт с кровью) помещают в пробирку, после чего ее заполняют цельной кровью донора с введенным в ее состав антикоагулянтом. Пробирки размещают в штативе программируемого ротатора, после чего ротатор устанавливают в воздушном термостате.

Правильные настройки программируемого ротатора позволяют создавать пульсацию порядка 60 уд/мин и скорость потока порядка 50 мл/мин для пробирок объемом 10 мл с размещенным в них 0,83 мл крови. К сожалению, такая схема не позволяет полноценно моделировать поведение потока крови в сосуде или трубке. А присутствие большого количества воздуха провоцирует активную агрегацию лейкоцитов с тромбоцитами и денатурацию белка.

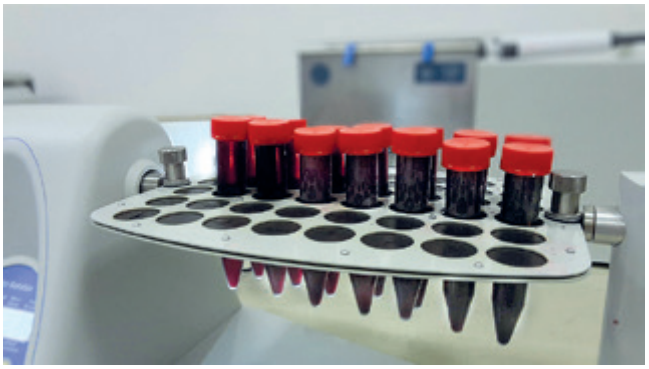


Рисунок 1. Моделирование взаимодействия с кровью в пробирке – программируемый ротатор с установленными в него пробирками с кровью

Такое моделирование применяется для первичных скрининг-тестов и позволяет быстро, эффективно и относительно точно оценивать ряд параметров воздействия на кровь, таких как:

1. гемолитический потенциал;
2. влияние на время свертываемости крови;
3. влияние на форменные элементы крови;
4. степень адсорбции элементов крови на поверхности образца.

Модифицированная петля Чандлера состоит из замкнутой трубки, частично заполненной воздухом, располагаемой в плоскости, перпендикулярной оси вращения основания, соединенного с ротором (рисунки 2, 3). При вращении основания трубка также совершает круговое движение, в результате чего при невысокой частоте оборотов происходит циркуляция крови в трубке вдоль границы раздела воздух – жидкость. Скорость потока в петле Чандлера при использовании трубок диаметром 3 мм ограничена 25 мл/мин (при более высоких оборотах пузырек воздуха начинает вращаться вместе с трубкой), что позволяет достигать величины напряжения сдвига до 6 дин/см^2. Чаще всего петлю Чандлера используют в условиях воздушного термостата с воспроизведением температуры, близкой к физиологической.

Некоторые исследователи для повышения точности воспроизведения температурного режима используют жидкостный термостат (водяную баню с принудительным перемешиванием жидкости) [4].

Несомненным достоинством петли Чандлера можно считать простоту конструкции. Её можно сделать практически в любой лаборатории из подручных средств. С помощью данного метода можно получить не самые достоверные, но достаточные для



Рисунок 2. Модифицированная петля Чандлера:

1 – трехпросветный шаровой кран с коннектором типа Luer-Lock для наполнения петли шприцем; 2 – пузырек воздуха в трубке; 3 – вращающееся основание

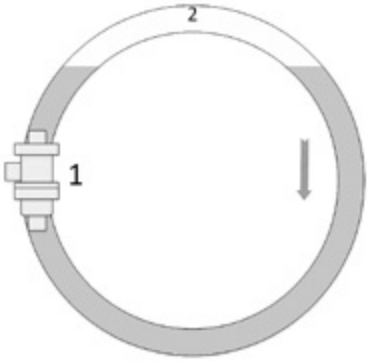


Рисунок 3. Модифицированная петля Чандлера (схема):

1 – трехпросветный шаровой кран с коннектором типа Luer-Lock для наполнения петли шприцем; 2 – пузырек воздуха в трубке; стрелкой показано направление движения жидкости

первичного скрининга результаты, а также избежать механического воздействия на форменные элементы крови.

Основные недостатки:

- низкая скорость потока порядка 25 мл/мин для трубки с диаметром 3 мм, что соответствует примерно ½ от скорости потока в артериальной коронарной системе (более высокие скорости недостижимы, так как при вращении с большей частотой пузырек воздуха начнет вращаться вместе с трубкой);
- само по себе наличие пузырька воздуха в системе вызывает активную агрегацию лейкоцитов и тромбоцитов, денатурацию белка [7].

Устройство **модели Hemobile** схоже с устройством модифицированной петли Чандлера с той разницей, что в модели Hemobile используется шариковый клапан и отсутствует пузырек воздуха (рисунок 4). В результате поступательного кругового движения основания и вязкостного течения крови в петле шаровой клапан создает пульсацию потока. Такая конструкция обеспечивает направленный поток до 40 мл/мин через 3 мм трубки с частотой пульсации 60 уд/мин, создавая тем самым напряжение сдвига от 12 дин/см^2.

Для эффективного поддержания температурного режима предпочтительно использовать жидкостный термостат с принудительной конвекцией жидкости.

Такие параметры потока крови и его пульсации выглядят наиболее близкими к физиологическим и схожими с параметрами артериального коронарного тока крови. Модель Hemobile также относительно проста в изготовлении.

Замкнутый контур с перистальтическим насосом. Система в наиболее простом ее варианте представляет собой замкнутую петлю из полимерной трубки, часть которой размещается в головке перистальтического насоса (роликового насоса, не имеющего непосредственного контакта с жидкостью), а другая часть проходит через жидкостный термостат (рисунок 5).

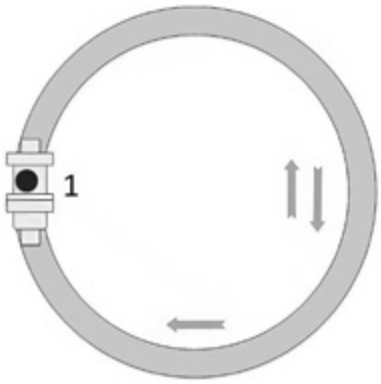


Рисунок 4. Устройство модели Hemobile:

1 – шариковый клапан; стрелками показано направление движения жидкости, двойная стрелка означает возникновение волны, имитирующей пульсацию

В отличие от описанных выше систем в такой модели существует механическое влияние на форменные элементы крови, циркулирующие в контуре. Однако при таком подходе возможно значительно более точное контролирование параметров моделируемого кровотока, таких как скорость потока и частота пульсации.

Главным достоинством такой модели является возможность встраивания в контур неограниченного количества дополнительных элементов и, как следствие, решение с помощью данной системы расширенного спектра задач в отличие от простой оценки взаимодействия крови с материалом покрытия.

Так, например, модель Heart-Lung-Machine в исследованиях эффективности мембранных оксигена-

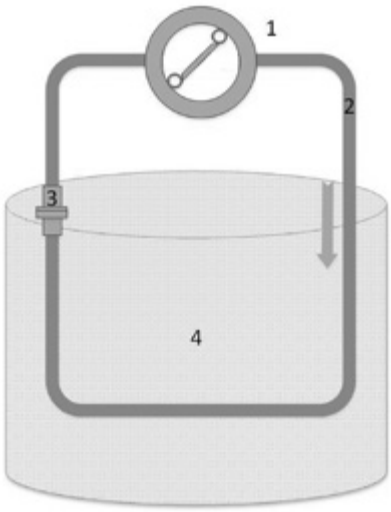


Рисунок 5. Устройство замкнутого контура с перистальтическим насосом:

1 – перистальтический насос; 2 – трубка замкнутого контура; 3 – соединитель трубки типа Luer-Lock, возможно использование трехпросветного шарового крана с коннектором типа Luer-Lock для наполнения петли шприцем; 4 – водяной термостат с принудительной конвекцией жидкости; стрелкой показано направление движения жидкости

торов крови (аппараты типа «искусственное сердце» и «искусственное легкое») является по сути все тем же замкнутым контуром с перистальтическим насосом.

Тестирование взаимодействия мембранных оксигенаторов крови с кровью осуществляется комплексно, непосредственно всей системы оксигенатора [5], так как оценивается целый ряд параметров:

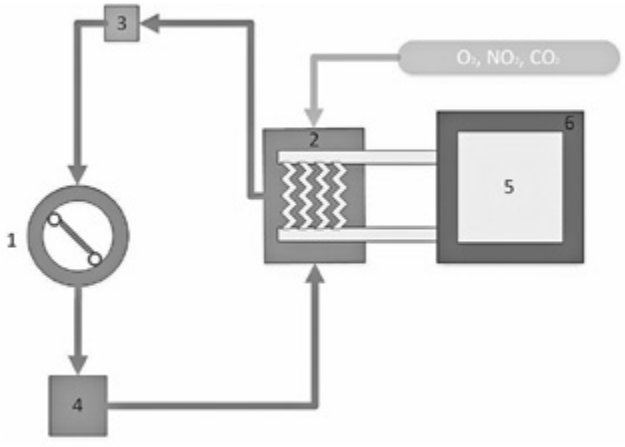


Рисунок 6. Принципиальная схема мембранного оксигенатора:

1 – перистальтический насос; 2 – блок оксигенатора или исследовательская ячейка для размещения мембран (мембраны отделяют кровь от газовой или газо-жидкостной смеси) оксигенатора с встроенным жидкостным терморегулятором и эмболо-сепаратором; 3 – термодатчик; 4 – блок анализатора; 5 – емкость с теплоносителем (как правило, вода); 6 – внешний терморегулятор; O_2,NO_2, CO_2 – резервуар с газовой или газо-жидкостной смесью

1) процессы мембранного обмена газо-жидкостной смеси с кровью;

2) гемосовместимость всей модели в комплексе:
   - влияние мембран на активацию иммунного ответа;
   - эффективность системы теплообмена ячейки;
   - эффективность противоэмболического микрофильтра.

Замкнутый контур с перистальтическим насосом также применяется для оценки эффективности и биосовместимости таких изделий медицинского назначения, как диализные мембраны [6].

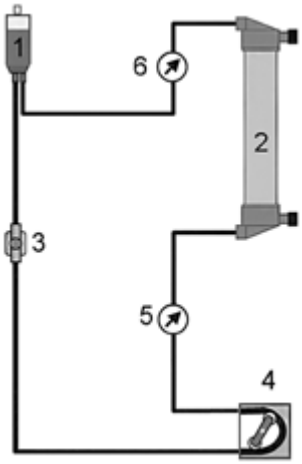


Рисунок 7. Схема тестового стенда для оценки взаимодействия диализных мембран с кровью:

1 – резервуар; 2 – колба диализного фильтра; 3 – ячейка отбора проб; 5 – датчик давления вводного потока; 6 – датчик давления выходного потока [6]

Занимаясь исследованием гемосовместимых мембранных материалов, в процессе работы мы столкнулись с потребностью комплексной оценки мембранных материалов в модели *in vitro*.

Целью данной разработки было обеспечить техническую возможность имитации комплекса параметров кровотока. В число поставленных задач входило следующее.

1. Воспроизведение условий системного кровотока, а именно:
   - температуры;
   - давления;
   - эффектов динамического изменения давления;
   - частоты пульсации;
   - скорости потока.

2. Имитация влияния системного кровотока на образцы исследуемых материалов с целью их последующей оценки:
   - физическая или химическая деградация образцов исследуемых материалов;
   - изменение структуры и свойств поверхности образцов исследуемых материалов;
   - физическое (адгезия) и химическое взаимодействие с компонентами крови (форменные элементы, система гемостаза и фибринолиза, компоненты неспецифического иммунитета (система комплемента, активные формы кислорода и др.).
3. Анализ влияния образцов исследуемого материала на кровь в условиях системного кровотока [с целью их последующей оценки, в том числе оценки влияния на гемолиз (относительно влияния на кровь самой системы стенда), иммунного ответа, состояния форменных элементов и макромолекул].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выполнения поставленных задач нами была разработана модель для комплексного анализа гемосовместимых мембранных материалов.

Модель представляет собой аппаратно-программный комплекс, состоящий из замкнутого контура, размещенного в термостате или климатической камере, с возможностью встраивания в рабочий жидкостный контур различных измерительных модулей.

Гемодинамический стенд реализован по схеме, представленной на рисунке 8.

Принцип работы

Перед запуском из системы посредством вакуумного насоса (далее по тексту объект 1 на рисунке 8 будет обозначен как [рисунок 8(1)], остальные – по аналогии) откачивается воздух. После создания разряжения в резервуар [рисунок 8(2)] закачивается рабочая жидкость. При работе системы перистальтический насос [рисунок 8(3)] под управлением вычислительного блока [рисунок 8(0)] прокачивает жидкость по замкнутому контуру. Электромагнитный клапан [рисунок 8(5)] создает на участке [рисунок 8(3–5)] избыточное (относительно рабочего) давление. Коэффициент избыточности давления зависит от протяженности участка [рисунок 8(5–8)], текущего рабочего давления, скорости потока и рассчитывается вычислительным блоком. Избыток жидкости сбрасывается посредством трехпозиционного клапана [рисунок 8(4)] в резервуар [рисунок 8(2)]. На участке [рисунок 8(5–8)] с помощью обратного клапана [рисунок 8(8)] устанавливается рабочее давление, и происходит процесс измерений состояния системы с использованием модульного аналитического блока [рисунок 8(6–11)].

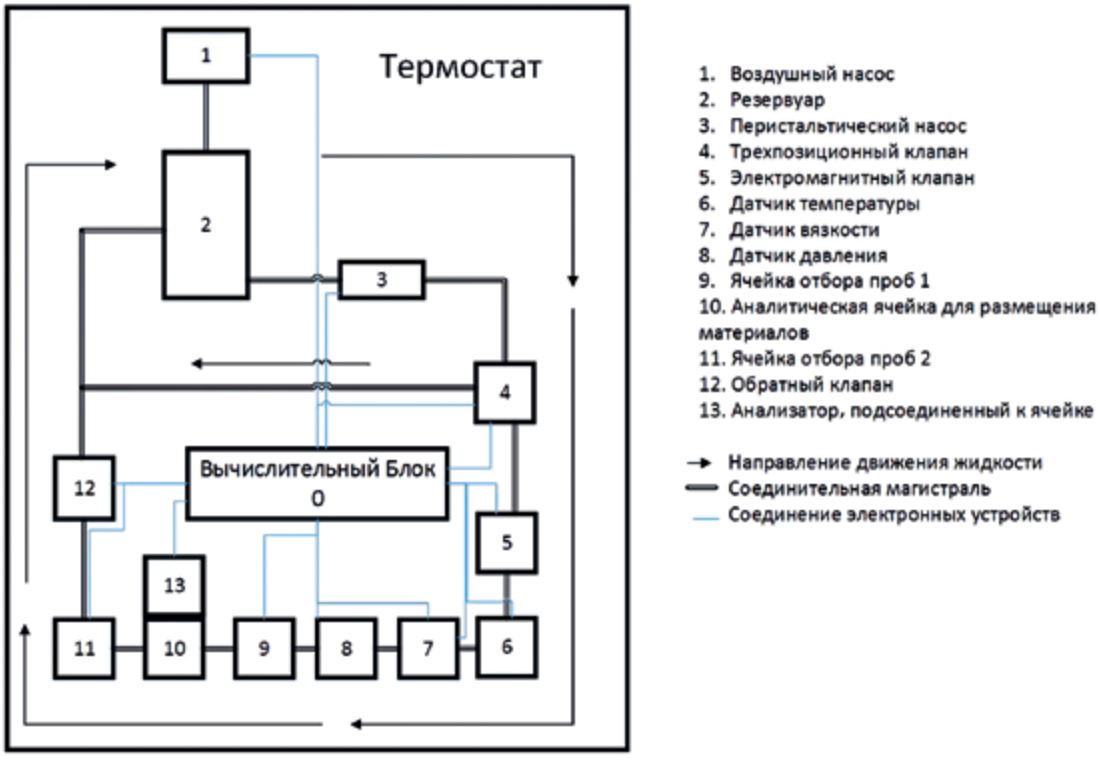


Рисунок 8. Блок-схема гемодинамического стенда

Аналитическая ячейка представляет собой самозажимной механизм из двух частей – верхней чашки [рисунок 9(1)] и нижней базы [рисунок 9(2)]. В каждой части имеется полость для жидкости [рисунок 9(3)]. К полости проведены каналы [рисунок 9(4–7)] (на иллюстрациях в каналы уже установлены фитинги), оканчивающиеся резьбой под фитинги (или других оптимальных для данной системы размеров) для подвода/отвода жидкости. В плоскости соприкосновения двух частей аналитической ячейки на уплотнительное кольцо [рисунок 9(8)] помещается образец исследуемого материала и обжимается верхней и нижней частью путем перемещения рычага [рисунок 9(9)] – закрытие/открытие ячейки. Каналы чашки [рисунок 10(4, 5)] могут быть использованы при оценке диффузионных свойств материала: через них может осуществляться отбор проб фильтрата получаемого через образец.

Для потокового измерения концентрации веществ в получаемом фильтрате применяется анализатор [рисунок 8(13)] с подключением проточной кюветы к каналам чашки [рисунок 10(4,5)].

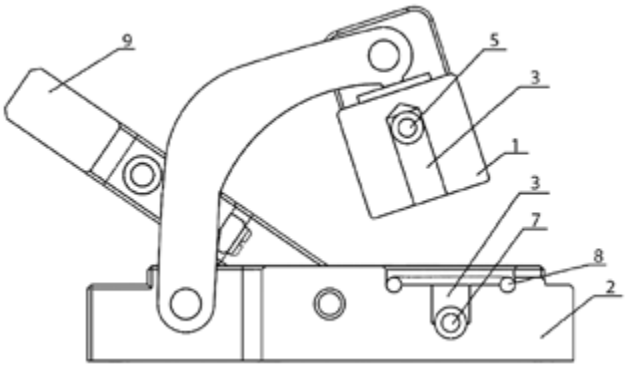


Рисунок 9. Продольный разрез открытой аналитической ячейки

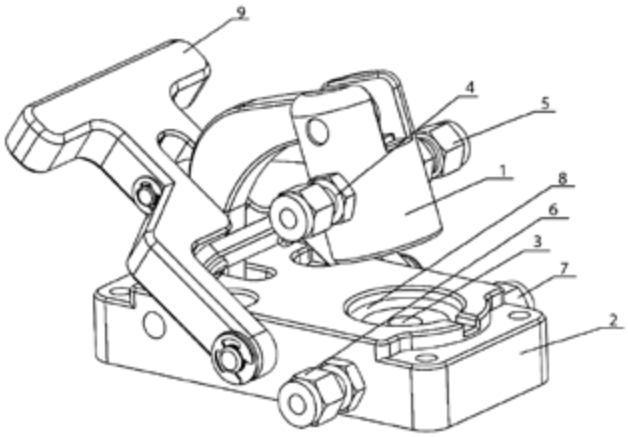


Рисунок 10. Аналитическая ячейка – открытая

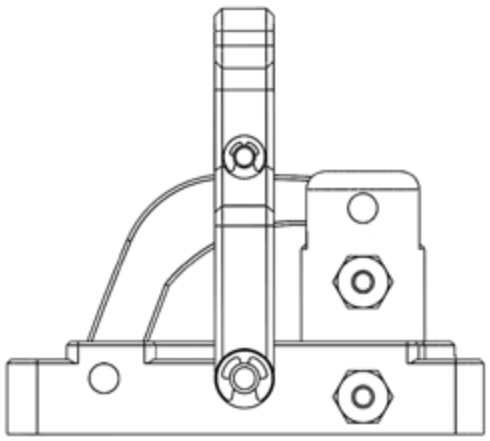


Рисунок 11. Аналитическая ячейка – закрытая – профиль

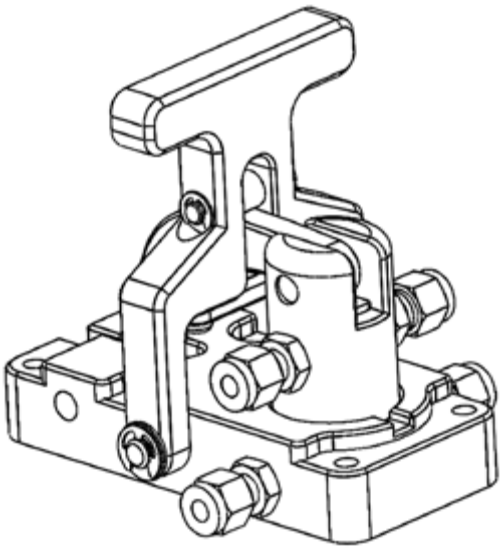


Рисунок 12. Аналитическая ячейка – закрытая

В качестве анализатора был использован сканирующий однолучевой спектрофотометр с диапазоном длин волн 190–1100 нм (СФ-104, «Аквилон», Россия).

Таблица 1.

Характеристики системы

№	Наименование характеристики	Значение
1	Вязкость рабочей жидкости [рабочей жидкостью может быть кровь], мПа·с	0,5531
2	Относительное давление, мм рт.ст.	90
3	Давление, Атм	1,122355
4	Скорость потока, мл/мин	50
5	Объем системы [объем системы включает в себя резервуар], л	0,3
6	Протяженность системы, м	1,2
7	Диаметр трубок, мм	3
8	Температура, °С	37
9	Частота биения, Гц	0,7

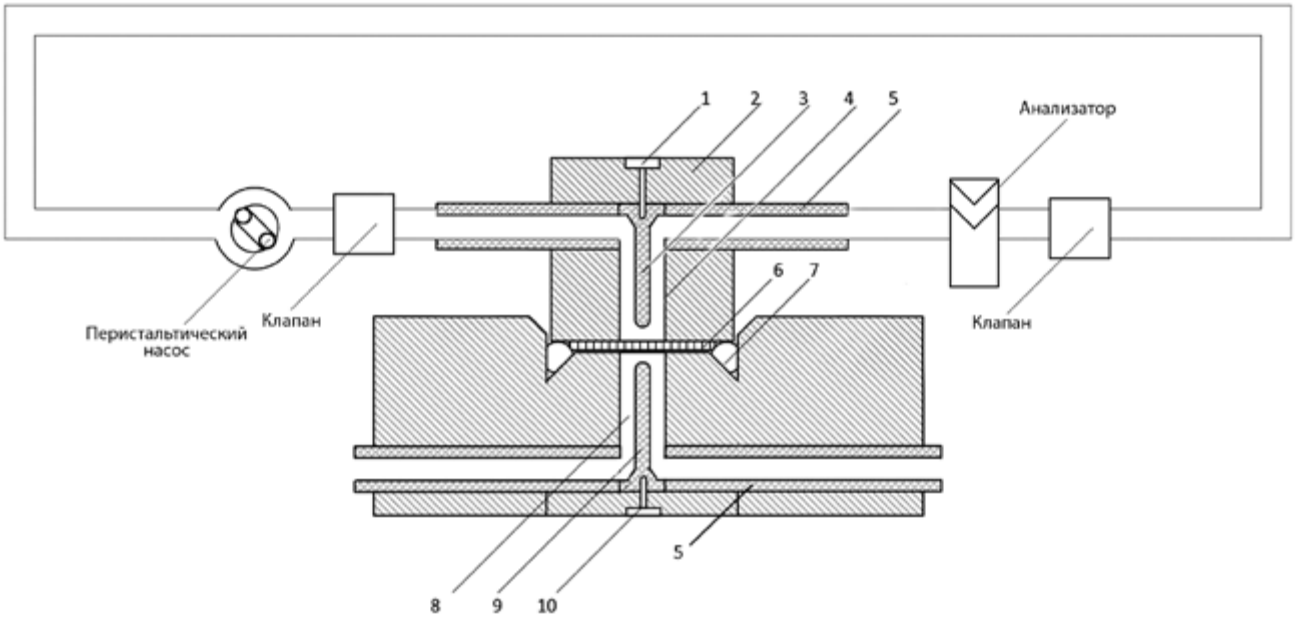


Рисунок 13. Схема подключения анализатора к аналитической ячейке:

1 – крепежный винт пластинки, корректирующей течение потока; 2 – корпус чашки ячейки; 3 – пластинка, корректирующая течение потока; 4 – полость чашки ячейки; 5 – каналы аналитической ячейки; 6 – мембрана, размещенная в аналитической ячейке; 7 – уплотнительное кольцо; 8 – просвет основания ячейки; 9 – пластинка, корректирующая течение потока; 10 – крепежный винт пластинки, корректирующей течение потока

Предпусковая калибровка стенда

1. Калибровка измерительных модулей.
2. Если в качестве рабочей жидкости будет использоваться кровь:
   - перед загрузкой крови в резервуар [рисунок 1.2] стенда производится оценка степени гемолиза;
   - перед запуском стенда в аналитическую ячейку [рисунок 10.10] устанавливается заглушка из интактного материала типа политетрафторэтилена (с заведомо известным влиянием на гемолиз);
   - через 10 мин после запуска стенда производится отбор проб крови через ячейки отбора проб [рисунок 1.9,11] и оценка гемолиза (в течение часа все характеристики системы изменяются от минимальных значений к максимальным).

Методика оценки

Проведение оценки влияния эффектов системного кровотока на образцы материала, контактирующие с кровью (или рабочей жидкостью), закрепленные в аналитической ячейке стенда, реализуется по следующей схеме:

1. Образец исследуемого материала (далее по тексту Образец) высушивают в вакуумной сушке (если это не ведет к деградации материала) при температурах, оптимальных для этого материала, до состояния его минимальной гидратации. После чего на высокоточных аналитических весах (Shimadzu AUW-220D, Япония) измеряется масса дегидратированного Образца. С помощью просвечивающего микроскопа оценивается состояние дегидратированного Образца.
2. Далее Образец помещается в стерильную чашу Петри (или аналогичную емкость) и экспонируется в стандартном растворе Рингера (или аналогичном физиологическом растворе) в течение 6 ч при температуре 37–38 °C (условия и время экспозиции могут изменяться с учетом конкретного материала). После чего на высокоточных аналитических весах измеряется масса гидратированного Образца. С помощью просвечивающего микроскопа оценивается состояние (делается ряд снимков образца) гидратированного Образца.
3. В аналитическую ячейку [рисунок 8(10)], размещенную в измерительном блоке, устанавливается гидратированный Образец. Далее на стенде воспроизводятся характеристики: температура, давление, скорость потока. Образец экспонируется в стенде в течение 100 мин.
4. В процессе экспонирования образца в стенде каждые 10 мин производится отбор проб рабочей жидкости из ячеек отбора проб 1 и 2 [рисунок 8(9, 11)] в объеме 1 мл.

5. После окончания экспонирования образец исследуют:
   - на высокоточных аналитических весах, оценивая изменение массы образца;
   - на просвечивающем микроскопе, оценивая изменение структуры поверхности, отмечая степень покрытия образца белковыми и другими органическими соединениями.

Материалы для оценки

Для исследования были использованы мембраны:

1. Из регенерированной целлюлозы, стерильные, с диаметром пор 0,45 мкм, пористостью 50%, толщиной 25 мкм производства Merk Milipore.
2. Из регенерированной целлюлозы, стерильные, с диаметром пор 0,45 мкм, пористостью 50%, толщиной 25 мкм производства Merk Milipore, модифицированные покрытием, состоящим из комплекса надрапорина, связанного с переэтерефицированными полиэтиленгликолем и γ-аминопропилтриэтоксисиланом.

В качестве магистралей стенда использовались силиконовые трубки Tygon 3350 с внутренним диаметром 3 мм.

В качестве рабочей жидкости использовалась свежая гепаринизированая кровь доноров в стандартных пакетах (KAWASUMI BLOOD BAG, Япония) объемом 450 мл.

Очистку магистралей от остатков крови осуществляли путем промывки системы фосфатным буфером с pH=5, слабым раствором неионогенных ПАВ и повторно фосфатным буфером с pH=7,4, контролируя степень очистки спектрофотометрическим анализом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Автоматизированный процесс работы стенда гемодинамического делится на 3 этапа:

1. Подготовка системы: на этом этапе программа управления производит опрос подключенных модулей и проверяет их работоспособность. Также все регулируемые модули устанавливаются в «нулевое» состояние.
2. Достижение рабочего состояния: на данном этапе начинается прокачка рабочей жидкости через систему с установкой необходимого давления и заданной температуры. При достижении рабочего давления управляющее ПО начинает отрабатывать алгоритм контроля пульсации для определения необходимости корректировок.
3. Рабочий режим: по достижении рабочей температуры и стабилизации пульсации система переходит в состояние рабочего цикла.

Для примера рассмотрим данные мониторинга системы. Для автоматического режима имитации кровотока установлены следующие параметры:

- Температура: 36,6 °C.
- Верхнее давление: 120 мм рт.ст.
- Нижнее давление: 80 мм рт.ст.
- Пульс: 60 уд/мин.

Рисунок 14 отображает процесс работы системы. По графику можно судить о повторяемости пульсовой волны во всём рабочем цикле и в результате о достижении поставленной задачи. Для более точного анализа можно рассмотреть график рабочего давления одного такта работы системы (рисунок 15).

Из графика видно, что полученная динамика давления схожа с поведением пульсовой волны в живом организме.

По тестовым данным, полученным в процессе разработки и использования стенда гемодинамического, можно судить о том, что результат работ полностью удовлетворяет поставленной задаче. Использование данного конструктивного решения в процессе анали-

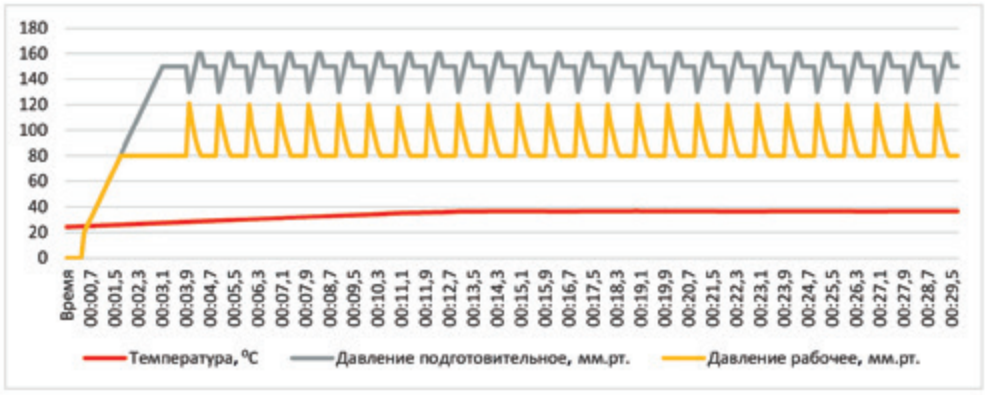


Рисунок 14. **Результаты мониторинга давления и температуры при работе стенда гемодинамического**

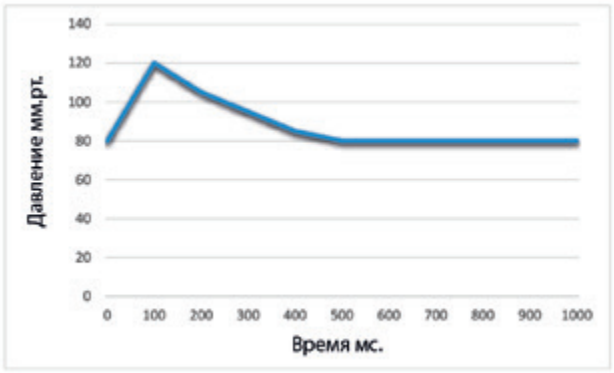


Рисунок 15. Изменение давления анализируемой жидкости (крови/кровезаменителя) в системе стенда гемодинамического за 1 такт работы

за различных материалов, внедряемых в кровоток, позволяет учесть скрытые для более простых методов недостатки и избежать множества проблем при последующем тестировании *in vivo*.

В будущем для повышения качества тестирования возможно проведение доработок системы по нескольким направлениям:

- замена перистальтического насоса позволит избежать механического воздействия на элементы крови;
- замена пережимных клапанов на задвижке увеличит скорость и точность реакции системы автоматического контроля давления рабочей жидкости.

Основной проблемой развития системы в данном направлении является отсутствие коммерчески доступных механических элементов, пригодных для работы с кровью, так как практически вся продукция изготовлена из алюминия или латуни.

Ещё одним вариантом развития системы может быть переход с электромагнитных приводов на пневматические. Пневматическое исполнение в том же размере даёт многократно большее усилие на сдавливание и соизмеримо большую скорость работы. Также пневматика позволит реализовать возможность дозирования усилия на различные механические компоненты стенда гемодинамического.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье был описан результат проведения сравнительного анализа разных методов имитации кровотока в лабораторных условиях, а также сформирован перечень требований для создания конечного устройства, удовлетворяющего поставленным задачам тестирования гемосовместимых материалов. По итогам НИОКР по направлению «Имитации взаимодействия с кровью изделий медицинского назначения» был разработан программно-аппаратный комплекс, позволяющий проводить исследования различных образцов материалов в условиях имитации естественного кровотока в организме человека.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Информация о финансировании. Настоящая работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (#14-25-00181).

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

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ ISO 10993-4-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследования изделий, взаимодействующих с кровью.
2. M. Jordan, M. Mueller, R. Kortlepel, B. Glasmacher. Modified Chandler Loop system for dynamic hemocompatibility testing of vascular implants // 48th DGBMT Annual Conference Biomedizinische Technik; 2014. P. 28–30.
3. V. Oeveren, I. Tielliu, J. de Hart. Comparison of Modified Chandler, Roller Pump, and Ball Valve Circulation Models for In Vitro Testing in High Blood Flow Conditions: Application in Thrombogenicity Testing of Different Materials for Vascular Applications // International Journal of Biomaterials. 2012. № 1. P. 1–7.
4. J. Slee, I. Alferiev, R. Levy, S. Stachelek. The Use of the *Ex Vivo* Chandler Loop Apparatus to Assess the Biocompatibility of Modified Polymeric Blood Conduits // Journal of Visualized Experiments. 2014. V. 90.
5. S. Boodram, E. Evans. Use of Leukocyte-Depleting Filters During Cardiac Surgery With Cardiopulmonary Bypass: A Review // The Journal of Extra-corporeal Technology. 2008. V. 40(1). P. 27–42.
6. A. Erlenkötter, P. Endres, B. Nederlof et al. Score Model for the Evaluation of Dialysis Membrane Hemocompatibility // Artif Organs. 2008. № 32(12). P. 962–969.
7. S. Ritz-Timme, N. Eckelt, E. Schmidtke, H. Thomsen. Genesis and diagnostic value of leukocyte and platelet accumulations around «air bubbles» in blood after venous air embolism // Int J Legal Med. 1998. V. 111(1). P. 22–26.

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 547.398; 547.583

АНТИГЕЛЬМИНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕТЕРИЛАМИДОВ 1,4-ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Н.В. Колотова[1]*, А.В. Старкова[1]

Резюме. Исследована антигельминтная активность 10 гетериламидов 1,4-дикарбоновых кислот. В чашку Петри помещали 5 мл 0,5% водного раствора исследуемых соединений и погружали 5 особей дождевых червей. Время наступления смерти каждой особи фиксировали по прекращению двигательной активности в ответ на механическое раздражение. В качестве эталонов применяли противогельминтные препараты пирантел и левамизол. Установлено, что три соединения оказывают антигельминтное действие, превышающее активность пирантела, одно из них в 2 раза активнее левомизола.

Ключевые слова: гетериламиды 1,4-дикарбоновых кислот, антигельминтная активность.

ANTIHELMINTHIC ACTIVITY OF GETIRYAMIDES 1,4-DECARBOXYLIC ACIDS

N.V. Kolotova[1]*, A.V. Starkova[1]

Abstract. Antihelminthic potency 10-getiryamides 1,4-decarboxylic acids was analyzed. 5 mL of 0.5% aqueous solution of investigated substances was placed in the Petrie dish and earthworms were immersed in a solution. Time of death of each species was determined according to the cessation of motion activity in response to mechanical irritation. Antihelminthic products Pirantel and Levomizol were used as references. Three substances have an antihelminthic effect exceeding the activity of Pirantel, one of them is twice as active as Levomizol.

Keywords: getiryamides 1,4-decarboxylic acids, antihelminthic activity.

1 – ФГБУ «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

1 – Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Healthcare, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: kolotova.nina49@mail.ru
Тел.: 8 (342) 282 58 56, 8 919 48 98 914

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая активность монозамещенных гетериламидов 1,4-дикарбоновых кислот достаточно хорошо изучена. Для них исследованы гипо- и гипергликемическое, гипертензивное, инсектицидное, антикоагулянтное, гемостатическое действия, а также другие виды фармакологической активности [1–7]. Антигельминтная активность гетериламидов 1,4-дикарбоновых кислот не изучалась.

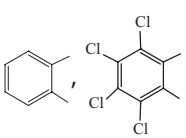
По официальным данным, заболеваемость гельминтозами в России составляет около 1% [8, 9]. Для лечения гельминтозов используются антигельминтные препараты, многие из которых высокотоксичны или обладают тяжелыми побочными эффектами. Наиболее частые побочные эффекты: аллергические реакции, тошнота, головокружение, головная боль, повышение температуры тела, нарушение функции печени, снижение числа лейкоцитов крови [10, 11]. Поэтому актуальным является поиск новых соединений, обладающих антигельминтной активностью.

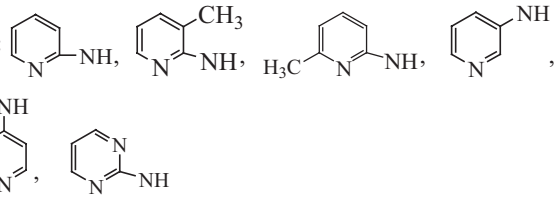
Цель и задачи исследования – изучение антигельминтной активности гетериламидов 1,4-дикарбоновых кислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были 2-, 3- и 4-пиридил- и пиримидиламиды янтарной, малеиновой, фталевой и тетрахлорфталевой кислот общей формулы:

RCO**X**–**Y**COOH,

где **X–Y**: $-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-$, 

R: 

Исследование антигельминтной активности соединений проводили на дождевых червях по методике М.П. Николаева [12]. В чашку Петри помещали 5 мл 0,5% водного раствора исследуемых соединений и погружали 5 особей червей длиной 5–8 см и диаметром 3–5 мм (приобретены в зоомагазине г. Пермь). Далее фиксировали время наступления смерти каждой особи по прекращению двигательной активности в ответ на механическое раздражение. Продолжительность жизни червей в контроле в очищенной воде составляет сутки. В качестве эталонов применяли антигельминтные препараты, приобретенные в аптечной сети и соответствующие требованиям ФС. Эталонами сравнения служили суспензия пирантела (50 мг в 1 мл производства ООО «Атолл») и раствор левамизола для инъекций (раствор для инъекций 10%, ООО «Асконт»).

Результаты обработаны способом вариационной статистики по методу Фишера – Стьюдента [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что из десяти гетериламидов 1,4-дикарбоновых кислот три соединения (3, 9, 10) проявили антигельминтную активность, которая превышает действие противогельминтного препарата пирантел.

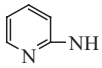
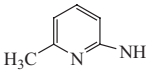
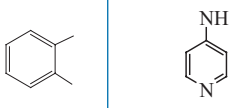
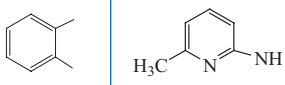
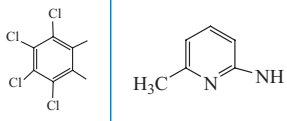
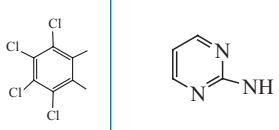
5-Метил-2-пиридиламид янтарной кислоты (соединение 3) в два раза активнее левамизола; 2-пиридиламид (соединение 1) и 3-метил-2-пиридиламид (соединение 2) янтарной кислоты не оказывают антигельминтного действия; 3- и 4-пиридиламиды янтарной кислоты (соединения 4 и 5) также неактивны. Замена кислотного фрагмента в соединении 3 на остаток фталевой кислоты (соединение 8) приводит к потере активности. Введение четырех атомов хлора во фталевый фрагмент (соединение 9) приводит к появлению антигельминтной активности, почти в 2 раза превышающей действие пирантела. 2-пиримидиламид тетрахлорфталевой кислоты (соединение 10) в 1,5 раза уступает антигельминтному действию левамизола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена антигельминтная активность 2-, 3-, 4-пиридиламидов и пиримидиламида 1,4-дикарбоновых кислот, среди которых обнаружены соединения с эффектом, превышающим действие препаратов, применяемых в терапии гельминтозов. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности поиска среди гетериламидов дикарбоновых кислот соединений с данным видом биологического действия. Более широкие исследования антигельминтного действия различных гетериламидов 1,4-дикарбоновых кислот позволят установить зависимость активности от структуры гетероцикла и кислотного фрагмента соединений.

Таблица 1.

Антигельминтная активность гетериламидов 1,4-дикарбоновых кислот

n/n	X–Y	R	Продолжительность жизни червей (опыт), мин	Продолжительность жизни червей (контроль), сут
1	$-CH_2-CH_2-$		Более 200	1
2	$-CH_2-CH_2-$		Более 200	1
3	$-CH_2-CH_2-$		10,8±1,39	1
4	$-CH_2-CH_2-$		Более 200	1
5	$-CH_2-CH_2-$		Более 200	1
6	–CH=CH–		Более 200	1
7			Более 200	1
8			Более 200	1
9			113,5±4,20	1
10			30,3±2,25	1
Эталоны	Пирантел		215,0±0,37	1
	Левамизол		20,2±2,08	1

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.В. Колотова, В.О. Козьминых, А.В. Долженко и др. Замещенные амиды и гидразиды дикарбоновых кислот. Сообщение 9. Фармакологическая активность продуктов взаимодействия 2-аминопиридинов и 2-аминопиримидина с ангидридами дикарбоновых кислот // Хим.-фарм. журнал. 2001. Т. 35. № 3. С. 26–30.
2. А.В. Долженко, Н.В. Колотова, В.О. Козьминых и др. Замещенные амиды и гидразиды дикарбоновых кислот. Сообщение 11. Синтез и фармакологическая активность ряда пиридиламидов дикарбоновых кислот // Хим.-фарм. журнал. 2002. Т. 36. № 3. С. 17–19.
3. А.В. Долженко, Н.В. Колотова, В.О. Козьминых и др. Замещенные амиды и гидразиды дикарбоновых кислот. Сообщение 14. Синтез, противомикробная и противовоспалительная активность 4-антипириламидов, 2-тиазолиламидов некоторых дикарбоновых кислот // Хим.-фарм. журнал. 2003. Т. 37. № 3. С. 42–44.
4. Б.Я. Сыропятов, Н.В. Колотова, А.В. Долженко. Влияние на гемостаз производных янтарной и малеиновой кислот // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012. № 5. С. 31–36.
5. Б.Я. Сыропятов, Н.В. Колотова. Влияние на гемостаз производных цитраконовой кислоты // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2015. № 6. С. 54–56.
6. Б.Я. Сыропятов, Н.В. Колотова, А.В. Жованик и др. Инсектицидная активность производных янтарной и фталевых кислот // Вопросы медицинской, биологической и фармацевтической химии. 2014. № 11. С. 52–55.
7. Б.Я. Сыропятов, Н.В. Колотова, Е.А. Машкина и др. Инсектицидная активность производных бутендиовых кислот // Вопросы медицинской, биологической и фармацевтической химии. 2015. № 8. С. 19–22.
8. Т.И. Авдюхина, Т.Н. Константинова, М.Н. Прокошева. Современный взгляд на проблему гельминтозов у детей и эффективные пути ее решения // Современная педиатрия. 2011. № 1(35). С. 73–77.
9. А.К. Токмалаев. Гельминтозы человека // РМЖ. 2001. № 16. С. 690.
10. Е.И. Змушко, Е.С. Белозеров. Медикаментозные осложнения. – СПб.: Питер, 2001. 414 с.
11. Е.Ю. Бабаева, Е.С. Чернышева, С.А. Николаева. Комплексное использование синтетических антигельминтиков и растительных препаратов при глистных инвазиях // Вестник Российского университета дружбы народов. 2015. № 2. С. 93–99.
12. М.П. Николаев. Экспериментальные основы фармакологии и токсикологии. Практическое руководство. – М.-Л.: Медгиз, 1941. 195 с.
13. В.В. Прозоровский. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований // Психофармакология и биологическая наркология. 2007. Т. 7. Вып. 3–4. С. 2090–2120.

ZIRBUS technology

ZIRBUS Sublimator 25

ПОЛУПРОМЫШЛЕННЫЕ СУБЛИМАЦИОННЫЕ СУШИЛКИ

Двухкамерная система с разделением сушильной и конденсорной камер

Функция автоматической стерилизации на месте

Функция автоматической очистки на месте CIP

Проведение IQ/OQ валидационных работ



Конденсор:

- Температура конденсора: ≥ -80 °C
- Объём конденсора: 95 л
- Максимальная производительность до 25 кг/24 ч
- Скорость охлаждения: от +20 до -40 °C за 30 мин
- Встроенный датчик измерения Т в конденсоре

Сушильная камера:

- Объем прямоугольной сушильной камеры: 211 л
- Специальный порт для проведения валидации DN25
- Управление: с помощью цифрового сенсорного дисплея 7,0''
- Датчик вакуума Пирани
- Оттаивание с помощью горячего газа
- Воздушное охлаждение за счет каскадной системы из 2 компрессоров

СУБЛИМАЦИОННЫЕ СУШКИ ОТ ZIRBUS – НЕМЕЦКОЕ КАЧЕСТВО И 25-ЛЕТНИЙ ОПЫТ ТЕХНОЛОГИЙ!

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

STANSTED

ГОМОГЕНИЗАТОРЫ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ И КЛЕТОЧНЫЕ ДЕЗИНТЕГРАТОРЫ

- Давление до 4,000 бар
- Простота использования
- Образцы малого объема
- Возможность стерилизации ячейки и выпускного клапана
- Контроль температуры
- Воспроизводимые результаты
- Управляется микропроцессором
- **Новинка!** Возможность работы с противоточной напорной ячейкой

Простота Френч-пресса®* –
функциональность STANSTED
Повышенная производительность, универсальность и безопасность «классического» прибора

Конструкция полностью соответствует требованиям ЕС и другим международным стандартам безопасности.

10 мл **4000** бар ячейка

20 мл **2100** бар ячейка

1 мл **2750** бар ячейка сверхмалого объема

Разрушение клеточных мембран **(кишечная палочка, дрожжевые грибки, стафилококки…)**

Получение ферментов, получение клеточных экстрактов, разрушение бактерий и растительных тканей, извлечение межклеточных протеинов и нуклеиновых кислот. Получение вирусных антигенов, обработка мембран клубеньковых бактерий и псевдомонад и др.)

- Наночастицы
- Липосомы
- Микроэмульсии
- Дисперсии
- Суспензии



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 615.45.032; 547.789

БРОНХОЛИТИЧЕСКИЕ И ТОКОЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ β_2-АГОНИСТОВ

С.Я. Скачилова[1]*, Е.В. Шилова[1], В.М. Павлов[2], Т.Н. Молостова[3]

Резюме. Рассмотрены вопросы (аспекты) бронхолитического и токолитического действия β_2-агонистов. Представлены данные как по β_2-агонистам короткого действия, так и по новым β_2-агонистам длительного действия. Обращается внимание на необходимость применения β_2-агонистов длительного действия совместно с глюкокортикостероидами. Приведены примеры клинической эффективности отечественного β_2-агониста сальбутамола гемисукцината в различных лекарственных формах в качестве бронхолитического средства при лечении бронхолегочных заболеваний, а также в качестве токолитического лекарственного препарата при невынашивании беременности.

Ключевые слова: бронхолитические, токолитические особенности β_2-агонистов, препараты короткого и длительного действия, глюкокортикостероиды, клиническая эффективность.

BRONCHODILATOR AND TOCOLYTIC FEATURES OF β_2-ADRENOCEPTOR AGONISTS

S.Ya. Skachilova[1]*, E.V. Shilova[1], V.M. Pavlov[2], T.N. Molostova[3]

Abstract. The issues (aspects) of bronchodilator and tocolytic actions of β_2-adrenoceptor agonists are reviewed. The data on short-acting and new long-acting β_2-agonists are presented. It is marked that it is necessary to use long-acting β_2-agonists and glucocorticosteroids concomitantly. Examples of clinical efficacy of locally produced β_2-adrenoceptor agonist salbutamol hemisuccinate in various dosage forms used as a bronchodilator for treatment of bronchopulmonary diseases, and also as a tocolytic for habitual noncarrying of pregnancy are given.

Keywords: bronchodilator and tocolytic features of β_2-adrenoceptor agonists, short-acting and long-acting medicines, glucocorticosteroids, clinical efficacy.

1 – АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ», 142450, Россия, Московская область, г. Старая Купавна, ул. Кирова, д. 23

2 – ООО «Натива», 143402, Россия, Московская область, г. Красногорск, ул. Октябрьская, д. 13

3 – Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, 105077, Россия, г. Москва, 11 Парковая ул., д. 32

1 – JSC «National Research Center on Biologically Active Compounds», 23, Kirov str., Staraya Kupavna Moscow region, 142450, Russia

2 – «Nativa» Ltd, 13, Oktyabrskaya str., Krasnogorsk, Moscow region, 143402, Russia

3 – Scientific research Institute of Pulmonology by FMBA, 32, 11th Parkovaya str., Moscow, 105077, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: vnc@pc-club.ru
Тел.: 8 (495) 702 95 86

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для симптоматического лечения бронхиальной астмы (БА) и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) практическая медицина располагает бронхолитическими средствами с различным механизмом действия. Наиболее выраженным бронхолитическим действием обладают селективные стимуляторы β_2-адренергических рецепторов (β_2-агонисты), которые относят к «золотому стандарту» для купирования острого бронхоспазма [1–5].

В последнее 20-летие ведётся поиск противоастматических средств, обладающих новыми механизмами действия, в том числе комбинированными [6]. Созданы оригинальные структуры β_2-агонистов из химического класса фениламиноэтанолов (катехоламинов), обладающие пролонгированным (длительным) действием: сальметерол, формотерол, вилантерол, а также некатехоламиновой структуры с введением хинолиновых фрагментов в молекулу; индакатерол, кармотерол [7]. По этим препаратам проведены как доклинические исследования, так и обширные многоцентровые клинические исследования, обосновано их применение в клинической практике.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРОРАЛЬНЫХ АНТАГОНИСТОВ

Формотеролу и сальметеролу посвящены многочисленные обзорные публикации [8-12], эти препараты применяются при лечении БА и ХОБЛ во многих странах мира, в том числе и в России [13]. Длительность действия вилантерола, индакатерола и кармотерола составляет 24 ч.

В рекомендациях ВОЗ [14] и рекомендациях международных экспертов по глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы отмечается, что «пероральные β_2-агонисты

длительного действия применяются в редких случаях при потребности в дополнительном бронхорасширяющем действии.

Пероральные β_2-агонисты длительного действия чаще, чем ингаляционные, вызывают нежелательные эффекты, которые включают стимуляцию сердечно-сосудистой системы (тахикардию), тревогу и тремор скелетных мышц». В связи с этим в международном руководстве GINA по лечению астмы таблетированные формы β_2-агонистов длительного действия исключены [15].

Однако, несмотря на эти рекомендации, в европейских странах пероральные β_2-агонисты (сальбутамол, вольмакс, вентолин, тербуталин) применяют наряду с ингаляционными β_2-агонистами короткого действия [16]. В США на основе сальбутамола сульфата разработаны и применяются пероральные таблетки Vospire ER пролонгированного действия с контролируемым высвобождением [17]. В Федеральном руководстве по использованию лекарственных средств показано пероральное применение сальбутамола в виде таблеток пролонгированного действия взрослым и детям старше 12 лет по 4–8 мг каждые 12 ч [18].

Следует обратить внимание, что нежелательные эффекты вызывают не только пероральные β_2-агонисты длительного действия (БАДД), но и ингаляционные β_2-агонисты длительного действия. Так, в базе данных ВОЗ [19, 20] и при анализе клинических исследований появились сведения о побочных эффектах сальметерола [21, 22].

Имеются данные, указывающие на возможность повышения риска смерти, связанного с БА, на фоне применения сальметерола [15]; в результате этого были выработаны рекомендации Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) [23] и организации «Здоровье Канады» [24], согласно которым β_2-агонисты длительного действия не могут служить заменой ингаляционным или пероральным глюкокортикостероидам (ГКС) и должны применяться только в комбинации с адекватными дозами ингаляционных глюкокортикостероидов (ИГКС), назначенными врачом. Поэтому при терапии БА их следует применять только в дополнение к комплексному лечению. В ряде клинических исследований было показано, что у людей с редким генотипом β_2-адренорецептора (замена аргинина на глицин в положении B-16) течение БА может ухудшаться при регулярном приеме сальметерола вне зависимости от того, вводится ли он вместе с ИГКС или без ИГКС [24–26].

Анализ данных лечения БА сальметеролом в течение 20 лет свидетельствует, что смертность на фоне применения этого препарата составляет 0,32% [25–28].

Широко применяется для лечения БА селективный β_2-агонист длительного действия формотерол, обладающий в отличие от сальметерола способностью быстро купировать острый бронхоспазм [29–33].

По данным сравнительных исследований, у больных астмой формотерол и сальбутамол в стандартных дозах показали сопоставимый максимальный бронхорасширяющий эффект, однако по длительности действия формотерол превосходит сальбутамол [34, 35].

В публикациях по клиническому применению формотерола приводятся противоречивые данные по поводу использования повышенных доз этого препарата: в одном из исследований показано [36], что при применении формотерола по 24 мкг два раза в сутки не наблюдается статистически значимых обострений БА. В то время как в других исследованиях показано, что при тех же дозах у пациентов наблюдаются обострения БА [37, 38].

В последние годы проведены обстоятельные исследования по лечению бронхиальной астмы комбинированными препаратами. По заключению международного и российского совета экспертов [15, 39] отмечается, что терапия фиксированной комбинацией будесонид/формотерол в режиме единого ингалятора (SMART) позволяет достичь лучших показателей контроля бронхиальной астмы при меньшей нагрузке глюкокортикостероида, что положительно влияет на снижение нежелательных побочных реакций от глюкокортикостероида.

Побочное действие препарата или отсутствие его положительного эффекта может зависеть не только от полиморфизма β_2-адренорецепторов, но и быть связано с различным полиморфизмом цитохрома P450 или отсутствием у некоторых пациентов тех или иных его модификаций либо различного проявления ферментативной активности [40, 41]. Нарушение ферментативной активности оказывает существенное влияние на направленность метаболизма лекарственного препарата, образование тех или иных токсичных метаболитов или накопление токсичных доз препарата в организме, что может приводить не только к нежелательным реакциям, но и к летальным исходам [42, 43].

В обзоре S.E. Wenzel, R. Covar [44] обращают внимание, что при таком гетерогенном и сложном многофакторном заболевании, как БА, необходимо учитывать особенности фенотипа и генотипа пациента, для успешной терапии нужно применять препараты с различным механизмом действия, в том числе и β_2-агонисты в различных лекарственных формах. Этим, в частности, объясняется комплаентность к препаратам с различными механизмами действия, в том числе и к β_2-агонистам в различных лекарственных формах. Клинико-фармакологическая эффективность ингаляционных и пероральных форм БАДД должна оцениваться с позиций генетической индивидуальности β_2-адренорецепторов.

Обращается также особое внимание на применение β_2-агонистов при сочетанном заболевании сердечно-сосудистой и бронхолёгочной систем. При кардиореспираторной патологии усугубляются побочные

эффекты β_2-агонистов короткого и длительного действия: влияние на частоту сердечных сокращений, изменение интервала QT, повышение артериального давления, гипокалиемия, гипомагниемия. Предлагается с учётом принципов доказательной медицины проведение крупномасштабных исследований по оценке безопасности β_2-агонистов и снижения риска развития сердечно-сосудистых осложнений при бронхолитической терапии пациентов с сочетанной кардиореспираторной патологией [45].

Важным показателем значимости лекарственного средства является сочетание его эффективности и безопасности, широта его терапевтического индекса.

В практических рекомендациях по ведению пациентов с бронхиальной астмой отмечается, что на всех ступенях терапии БА применяются в качестве неотложной облегчающей терапии ингаляционные β_2-агонисты короткого действия [46].

Эталонным представителем группы препаратов, относящихся к селективным β_2-агонистам короткого действия, является сальбутамол, который высоко оценен мировой медициной и включен экспертами ВОЗ в перечень важнейших лекарственных средств. Этот препарат вот уже в течение 40 лет до настоящего времени выпускается ведущими фармацевтическими производителями мира [5]. Все новые β_2-агонисты по эффективности и безопасности сравнивают с сальбутамолом [47, 48]. Так, при разработке препарата формотерола его сравнивали с сальбутамолом. Было показано, что в сопоставимых дозах эти препараты демонстрировали примерно одинаковый уровень эффективности и безопасности [49, 50].

В ряде исследований показано, что сальбутамол как при курсовом применении, так и по потребности в отличие от других β_2-агонистов практически не вызывает нежелательных побочных реакций у больных бронхиальной астмой с полиморфными β_2-адренорецепторами: β_2-Arg16 и β_2-Gly16-Glu27 [51, 52]. В эксперименте показано, что сальбутамол улучшает функцию диафрагмы и дыхания при инфекционном поражении респираторной системы [53].

Методом ингаляционной бронхосцинтиграфии с изотопом ^{99m}Tc показано, что при ингаляции 0,1% раствора сальбутамола гемисукцината происходит регуляция бронхокинетической активности трахеобронхиального дерева вследствие бронхорасширяющего действия препарата [54].

На фармацевтическом рынке России уже более 10 лет имеются разработанные отечественными учёными препараты на основе сальбутамола гемисукцината. Это вещество является оригинальным, представляет собой комплексно связанный аддукт сальбутамола с янтарной кислотой, относящейся к естественным метаболитам организма, обеспечивающей энергетический обмен, улучшающей дыхание на клеточном уровне [55], и исключает побочные эффекты, связанные с метаболическим ацидозом [56].

На основе янтарной кислоты в качестве аниона создан целый ряд лекарственных препаратов, которые благодаря сукцинат-аниону обладают антигипоксическим, пролонгированным и другими положительными эффектами [57].

Изучение фармакокинетики и биодоступности сальбутамола гемисукцината, проведённое в сравнении с сальбутамола сульфатом в эксперименте, свидетельствовало о более высокой (в 6 раз) биодоступности сальбутамола гемисукцината [55, 56].

Преимущество сальбутамола гемисукцината перед сульфатом заключается также в том, что комплекс гемисукцината благодаря «каркасной» структуре в отличие от сульфата не образует неактивных метаболитов [55, 58].

На основе сальбутамола гемисукцината разработаны различные лекарственные формы: пероральные (таблетки обычные 4 мг и пролонгированного действия с контролируемым высвобождением), растворы для инъекций и для ингаляций [59–61]. Безопасность и эффективность применения лекарственных форм на основе сальбутамола гемисукцината подтверждена применением их в различных областях медицины.

Как известно, β_2-агонисты являются не только эффективными бронходилятаторами, но и обладают токолитическими свойствами и применяются для профилактики и лечения невынашивания беременности. Однако β_2-агонисты, обладая побочным действием на сердечно-сосудистую систему, могут оказывать нежелательные эффекты не только на беременную женщину, но и на плод. Экспериментальные исследования сальбутамола гемисукцината в виде 0,1% раствора для инъекций и таблеток 4 мг свидетельствовали о менее выраженных побочных реакциях по сравнению с аналогами, при этом были установлены положительные антигипоксические свойства препарата [62–65].

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ β_2-АГОНИСТА

Клинические исследования сальбутамола гемисукцината в виде 0,1% раствора для инъекций и таблеток 4 мг проведены на 380 беременных женщинах в Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии, в отделении патологии беременных родильного дома № 17 (г. Москва) и на кафедре акушерства РГМУ. По результатам клинических исследований отмечено, что раствор для внутривенного введения и таблетки 4 мг являются средством неотложной помощи для пролонгации беременности и предупреждения угрозы преждевременных родов. Таблетки 4 мг являются эффективным препаратом для лечения угрозы прерывания беременности, не имеют выраженных побочных эффектов, хорошо переносятся беременными женщинами, удобны в индивидуальном подборе дозы. Высокая клиническая эффективность и хорошая пере-

носимость сальбутамола гемисукцината в виде 0,1% раствора для инъекций и таблеток 4 мг позволяют использовать эти препараты при угрозе преждевременных родов, а также для улучшения фетоплацентарного кровотока при плацентарной недостаточности. Своевременное назначение токолитической терапии позволяет пролонгировать беременность до срока родов, как показали исследования, с рождением жизнеспособных детей без перинатальной патологии [66–68]. Рекомендации по использованию сальбутамола для пролонгации беременности отражены в формулярной системе [69].

Также нет противопоказаний для назначения β_2-агонистов, особенно сальбутамола гемисукцината, для лечения БА у беременных женщин без сопутствующей патологии сердечно-сосудистой системы [66–68].

Под руководством академика РАН А.Г. Чучалина отечественные препараты на основе сальбутамола гемисукцината (таблетки с контролируемым высвобождением, раствор для ингаляций, раствор для инъекций) прошли клинические испытания и внедрены в практику лечения больных ХОБЛ среднетяжелого течения и бронхиальной астмы.

Проведено также исследование эффективности раствора для ингаляций, содержащего в 1 мл 1 мг сальбутамола гемисукцината, при тяжелом обострении хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Показано, что сальбутамола гемисукцинат в виде раствора для ингаляций, применяемый с помощью небулайзера, обладает высокой терапевтической эффективностью при лечении обострений ХОБЛ. Клиницисты установили, что препарат в виде раствора хорошо переносится пациентами, не вызывает выраженных побочных реакций и является практически безопасным препаратом [70].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, имеющиеся в настоящее время данные по применению β_2-агонистов в пульмонологии требуют от практических врачей повышенной осторожности при назначении этих препаратов, предупреждая их бесконтрольное применение у больных БА с целью избежать вероятности ухудшения течения заболевания [71]. Необходимо назначение β_2-агонистов с учетом индивидуальных особенностей рецепторной и ферментативной системы бронхов у пациентов. Применение ингаляционных β_2-агонистов длительного действия у больных с тяжелым течением БА и ХОБЛ необходимо в комбинации с ингаляционными или системными ГКС [15, 72, 73].

ЛИТЕРАТУРА

1. С.Н. Авдеев, О.Н. Бродская. Стери-Небы – новые возможности небулайзерной терапии обструктивных заболеваний легких // Научное обозрение респираторной медицины. 2011. № 3. С. 18–23.
2. M.R. Sears, J. Lötvall. Past, present and future beta2-adrenoceptor agonists in asthma management // Respir. Med. 2005. V. 99(2). P. 152–170.
3. А.Г. Чучалин. Актуальные проблемы пульмонологии. – М. 2000. С. 763.
4. А.Н. Цой, В.В. Архипов. Бронхиальная астма. Новые решения. – М. 2007. 625 с.
5. Л.А. Горячкина. 40-летняя история терапии бронхиальной астмы. Доклад на XXII национальном Конгрессе по болезням органов дыхания. – М. 2012.
6. Е.В. Шилова, Л.В. Корольченко, Л.Н. Сернов, С.Я. Скачилова, А.Г. Чучалин. Перспективные направления исследований по созданию противоастматических лекарственных средств // Ж. Пульмонология. 2005. № 3. С. 67–73.
7. С.Я. Скачилова, Е.В. Шилова, А.Г.Чучалин. Перспективы создания бронхолитических лекарственных средств // Известия Академии Наук. Серия химическая. 2015. № 9. С. 1–14.
8. P. Steiropoulos, A. Tzouvelekis, D. Bouros. Formoterol in the management of chronic obstructive pulmonary disease // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. 2008. V. 3(2). P. 205–15.
9. F. de Vries, S. Pouwels, M. Bracke, et al. Use of beta(2) agonists and risk of acute myocardial infarction in patients with hypertension // Br. J. Clin. Pharmacol. 2008. № 65(4). P. 580–586.
10. J.A. van Noord, J.J. Smeets, J.A. Raaijmakers, et al. Salmeterol versus formoterol in patients with moderately severe asthma: onset and duration of action // Eur. Respir. J. 1996. № 9(8). P. 1684–1688.
11. R.A. Bartow, R.N. Brogden. Formoterol. An update of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the management of asthma // Drugs. 1998. № 55(2). P. 303–322.
12. B.J. Lipworth. Long-acting beta(2)-adrenoceptor agonists: a smart choice for asthma? // Trends Pharmacol. Sci. 2007. № 28(6). P. 257–262.
13. Стандарты по диагностике и лечению больных хронической обструктивной болезнью легких / Под ред. А.Г. Чучалина. – М. 2005. 95 с.
14. Рекомендации ВОЗ. URL: http://www.who.int (дата обращения 07.02. 2013).
15. Global Initiative for Asthma. Global strategy for Asthma. Management and Prevention. Updated 2016. URL: http://www.ginasthma.org/ (дата обращения 31.10. 2016).
16. Rational use of Medicines // WHO Drugs Information. 2006. V. 20(4). P. 261–264.
17. VoSpire ER Extended-Release Tablets. URL: http://www.rxlist.com/vospire-er-drug.htm (дата обращения 14.02. 2013).
18. Формулярная система. Федеральное руководство. Вып. XVII. – М.: Видокс, 2016. С. 238–239.
19. Безопасность лекарств. 1999. № 3. С. 9, AR Newsletters. 1998. № 2. С. 8.
20. Безопасность лекарственных средств. Т. 1. – М. 2005. С. 24.
21. C. Williams Cause of death in the SMART Trial // Chest. 2006. № 130(3). P. 929–930.
22. H.R. Anderson, J.G. Ayres, P.M. Sturdy, et al. Bronchodilator treatment and deaths from asthma: case-control study // BMJ. 2005. V. 330(7483). P. 117–124.
23. Рекомендации FDA. URL: http://www.fda.gov/Drugs/default.htm (дата обращения 14.02.2013).
24. Health Canada. URL: http://www.hc-sc.gc.ca/index-eng.php (дата обращения 14.02.2013).
25. M. Gazzola, M.G. Matera. Review: Safety of long-acting b_2-agonists in the treatment of asthma // Therap. Advances in Respir. Disease. 2007. № 1(1). P. 35–46.
26. H.S. Nelson, S.T. Weiss, E.R. Bleecker, et al. The Salmeterol Multicenter Asthma Research Trial: a comparison of usual pharmacotherapy for asthma or usual pharmacotherapy plus salmeterol // Chest. 2006. № 129(1). P. 15–26.
27. E. Wooltorton. Long-acting beta2-agonists in asthma: safety concerns // CMAJ. 2005. V. 173(9). P. 1030–1033.
28. S.R. Salpeter, N.S. Buckley, T.M. Ormiston, E.E. Salpeter. Meta-analysis: effect of long-acting beta-agonists on severe asthma exa-

cerbations and asthma-related deaths // Ann. Intern. Med. 2006. № 144(12). P. 904–912.

29. M.R. Sears, A. Ottosson, F. Radner, S. Suissa. Long-acting – agonists: A review of formoterol safety data from asthma clinical trials // Eur. Respir. J. 2008. № 3(9). P. 936–949.

30. M. Palmqvist, T. Ibsen, A. Mellén, J. Lötvall. Comparison of the relative efficacy of formoterol and salmeterol in asthmatic patients // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999. № 160(1). P. 244–249.

31. A.M. Clauzel, M. Molimard, V. Le Gros, et al. Use of formoterol dry powder administered for three months via a single-dose inhaler in 1,380 asthmatic patients // J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 1998. № 8(5). P. 265–270.

32. J.M. Fitzgerald, K.R. Chapman, G. Della Cioppa, et al. Sustained bronchoprotection, bronchodilatation, and symptom control during regular formoterol use in asthma of moderate or greater severity. The Canadian FO/OD1 Study Group // J. Allergy Clin. Immunol. 1999. V. 103(3 Pt. 1). P. 427–435.

33. R.A. Pauwels, M.R. Sears, M. Campbell, et al. Formoterol as relief medication in asthma: a worldwide safety and effectiveness trial. Eur. Respir // J. 2003. № 22(5). P. 787–794.

34. N.C. Thomson, R. Angus, E. Quebe-Fehling, R. Brambilla. Efficacy and tolerability of formoterol in elderly patients with reversible obstructive airways disease // Respir. Med. 1998. № 92(3) P. 562–567.

35. P. Daugbjerg, K.G. Nielsen, M. Skov, H. Bisgaard. Duration of action of formoterol and salbutamol dry-powder inhalation in prevention of exercise-induced asthma in children // Acta Paediatr. 1996. № 85(6). P. 684–687.

36. J. Wolfe, C. Laforce, B. Friedman, et al. Formoterol, 24 microg bid, and serious asthma exacerbations: similar rates compared with formoterol, 12 microg bid, with and without extra doses taken on demand, and placebo // Chest. 2006. № 129(1). P. 27–38.

37. M. Mann, B. Chowdhury, E. Sullivan, et al. Serious asthma exacerbations in asthmatics treated with high-dose formoterol // Chest. 2003. № 124(1). P. 70–74.

38. T. van der Molen. Formoterol and asthma exacerbations // Chest. 2004. № 125(4). P. 1591.

39. С.Н. Авдеев, З.Р. Айсанов, В.В. Архипов, А.С. Белевский, Г.Л.Игнатова, Н.И. Ильина, А.В. Емельянов, Н.П. Княжеская, О.М.Курбачева, И.В. Лешенко, Н.М. Ненашева, Р.С. Фассахов. Согласованные рекомендации по применению режима единого ингалятора фиксированной комбинацией будесонид/формотерол (SMART) в терапии пациентов с бронхиальной астмой // Ж. Практическая пульмонология. 2016. № 1. С. 2–15.

40. D.J. Belle. Genetic Factors in Drug Metabolism // Am. Fam. Physician. 2008. № 77 (11). P. 1553–1560.

41. В.Г. Кукес. Метаболизм лекарственных средств. – М. 2004. С.53–67.

42. W. Kalow (Ed). Pharmacogenetics of Drug Metabolism. – N.Y. Oxford: Pergamon Press, 1992. 387 p.

43. L. Licino, M.L. Wong. Pharmacogenomics. The Search for Individualized Therapies. – Weinheim: WILEY-VCH Verlag Gmbh, 2002. 269 p.

44. S.E. Wenzel, R. Covar. Update in asthma 2005 // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006. № 173(7). P. 698–706.

45. Ю.А. Долгушева, К.А. Зыков, И.Е. Чазова. β-Агонисты различной длительности действия у пациентов с сочетанием сердечно-сосудистой патологии и бронхообструктивных заболеваний // Ж. Практическая пульмонология. 2015. № 2. С. 41–47.

46. А.С. Белевского. Практические рекомендации по ведению пациентов с бронхиальной астмой // Ж. Практическая пульмонология. 2015. № 2. С. 32–36.

47. J.R. Beach, C.L. Bromly, A.J. Avery, et al. Speeds of action of single doses of formoterol and salbutamol compared with placebo in reversing methacholine-induced bronchoconstriction // Pulm. Pharmacol. 1996. № 9(4). P. 245–249.

48. G. Bensch, R.J. Lapidus, B.E. Levine, et al. A randomized, 12-week, double-blind, placebo-controlled study comparing formoterol dry powder inhaler with albuterol metered-dose inhaler // Ann. Allergy Asthma Immunol. 2001. № 86(1). P. 19–27.

49. W. Boonsawat, S. Charoenratanakul, C. Pothirat, et al. Formoterol (OXIS) Turbuhaler as a rescue therapy compared with salbutamol pMDI plus spacer in patients with acute severe asthma // Respir. Med. 2003. № 97(9). P. 1067–1074.

50. A. Rubinfeld, R. Scicchitano, A. Hunt, et al. Formoterol turbuhaler is effective and safe compared with salbutamol by pMDI and spacer as reliever therapy in patients with acute severe asthma // Eur. Respir. J. 2002. № 20(38). P. 1–41.

51. E. Israel, J.M. Drazen, S.B. Liggett, et al. The effect of polymorphisms of the beta(2)-adrenergic receptor on the response to regular use of albuterol in asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000. № 162(1). P. 75–80.

52. D.K. Lee, C.E. Bates, B.J. Lipworth. Acute systemic effects of inhaled salbutamol in asthmatic subjects expressing common homozygous beta2-adrenoceptor haplotypes at positions 16 and 27 // Br. J. Clin. Pharmacol. 2004. № 57(1). P. 100–104.

53. H. Piriz, N. Nin, J. Boggia, et al. Salbutamol improves diaphragm force generation in experimental sepsis // Arch. Bronconeumol. 2008. № 44(3). P. 135–139.

54. Д.Б. Утешев, А.А. Карабиненко, В.И. Светлаков, А.С. Соколов. Эффективность сальгима при стационарном лечении бронхиальной астмы // Пульмонология. 2002. № 3. 92–95.

55. С.Я. Скачилова, А.Г. Чучалин, Э.Ф. Зуева и др. Фениламиноэтанолы – эффективные противоастматические средства // Лекарственные средства, экономика, технология и перспективы получения. – М. 1990. № 9. С. 1–43.

56. А.Г. Чучалин, Л.В. Дюкарева, С.А. Булгаков и др. Бронхолитическая активность и фармакокинетика нового пролонгированного бета2-агониста у больных бронхиальной астмой // Пульмонология. 1992. № 3. С. 59–62.

57. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2013. С. 273, 723.

58. Drug Information for the Health Care Professional // USP DG. 15th Ed. 1995. № 1. P. 549–562.

59. С.Я. Скачилова, Э.Ф. Зуева, А.Г. Чучалин. Тенденции в создании лекарственных форм b_2-агонистов // Бюллетень Всероссийского научного центра (ВНЦ БАВ). 1994. № 1. С. 52–71.

60. А.Г. Чучалин, С.Я. Скачилова, Э.Ф. Зуева. Поиск и создание селективных стимуляторов b_2-адренергических рецепторов. Сальбутамол / Под ред. А.Г. Чучалина, И. Хамида. – М.: Фармединфо, 1992. С. 66–76.

61. А.С. Соколов, С.Я. Скачилова, Е.В. Бабарсков, В.М. Павлов. Некоторые особенности отечественных лекарственных форм b_2-агонистов // Пульмонология. 1996. № 3. С. 34–41.

62. И.В. Березовская. Побочное действие стимуляторов b-адренергических рецепторов, применяемых в пульмонологии и акушерстве. Сальбутамол / Под ред. А.Г. Чучалина, И. Хамида. – М.: Фарммединфо, 1992. С. 137–145.

63. Г.А. Шевелева. Экспериментально-клиническое исследование β-адренергических средств в системе мать–плод.: дисс. ... д.б.н. – Купавна. 1998.

64. Г.В. Зайченко. Фармакологическое изучение токолитика венттокола: дисс. ... к.м.н. – Киев. 1997. 102 с.

65. Л.И. Волкова. Изучение общетоксического действия новых отечественных селективных β_2-адреномиметиков: дисс. ... к.м.н. – Купавна. 2000. 89 с.

66. А.А. Агаджанова, И.А. Стадник. Применение нового отечественного b-миметика в терапии угрозы прерывания беременности // Акушерство и гинекология. 1996. № 4. С. 47–49.

67. В.М. Сидельникова, А.А. Агаджанова. Новый отечественный токолитик сальгим в терапии преждевременных родов // Акушерство и гинекология. 1994. № 4 . С. 14–20.

68. М.В. Федорова. Отечественный токолитик венттокол в лечении и профилактике невынашивания беременности // Акушерство и гинекология. 1997. № 5. С. 40–43.

69. Формулярная система. Федеральное руководство. Вып. XVII. – М. 2016. С. 513–514.

70. С.Н. Авдеев, А.С. Соколов, А.Г. Чучалин. Применение отечественного симпатомиметика венттокола при тяжёлом обострении хронической обструктивной болезни лёгких // Пульмонология. 1999. № 2. Р. 24–30.

71. J. Hasford, J.C. Virchow. Excess mortality in patients with asthma on long-acting beta2-agonists // Eur Respir J. 2006. № 28(5). P. 900–902.

72. American Academy of Allergy // Asthma & Immunology. URL: www.aaaai.org. (дата обращения 06.02.2013).

73. B.L. Laube, H.M. Janssens, F.H. De Jongh, et al. What the pulmonary specialist shonld know about the new inhalation therapies // Eur. Respir. J. 2011. V. 37. P. 1308–1331.

SCHMIZO
TECHNISCHE GLASBLÄSEREI

20-ЛИТРОВЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕАКТОР SCHMIZO (ШВЕЙЦАРИЯ)



РАБОЧИЕ УСЛОВИЯ:
ТЕМПЕРАТУРА –30…+200 °С
ДАВЛЕНИЕ –1…+0,3 БАР

МАТЕРИАЛЫ В КОНТАКТЕ СО СРЕДОЙ:
БОРОСИЛИКАТНОЕ СТЕКЛО 3.3, ПТФЭ

КОМПЛЕКТАЦИЯ:

- напольный штатив из нержавеющей стали AISI 304
- цилиндрический сосуд с эллиптическим днищем, рубашкой для нагрева (охлаждения) и вентилем донного слива (ПТФЭ, Ду16) без мертвого объема
- крышка с набором стандартных конических шлифов ISO NS (45/40; 29/32x3; 14/23)
- термосопротивление Pt100 (4-х проводное с разъемом LEMO)
- обжимное уплотнение вала типа FLUKA
- вал мешалки из нержавеющей стали с ПТФЭ покрытием и 2-х уровневыми лопастными перемешивающими элементами из ПТФЭ
- типовая обвязка: 2 л капельная воронка с трубкой выравнивания давления, обратный холодильник типа Димрота
- высокооборотистая верхнеприводная мешалка IKA
- циркуляционный термостат Julabo: –25…+150 °С

ВОЗМОЖНЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ:
растворение, смешение, экстракция, химический синтез.

ГАБАРИТЫ
ШхГхВ = 700x600x1800 мм

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 615.038

АКТИВАТОРЫ СИНТЕЗА ЭНДОГЕННЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ (ОБЗОР)

В.В. Полосков[1]*, Ф.И. Ершов[1]

Резюме. Обзор посвящен описанию индукторов интерферонов – лекарственных препаратов нового поколения, созданных отечественными учеными в результате многолетнего скрининга тысячи высоко- и низкомолекулярных синтетических и природных соединений. Отобранные для клинического применения препараты обладают общей способностью к индукции в организме синтеза собственных (эндогенных) интерферонов (ИФН). Основным достоинством индукторов ИФН является универсально широкий спектр противовирусной активности, в основе которого лежат этиотропный и иммуномодулирующий эффекты, свойственные данной группе препаратов. Особое внимание уделено итогам клинического применения индукторов ИФН и перспективности поиска новых препаратов этого типа.

Ключевые слова: противовирусные препараты, интерфероны, индукторы интерферонов, результаты клинических испытаний.

ACTIVATION OF SYNTHESIS OF ENDOGENOUS INTERFERON (REVIEW)

V.V. Poloskov[1]*, F.I. Ershov[1]

Abstract. The review is dedicated to the description of interferon inducers – new generation drugs created by Russian scientists as a result of the screening of thousands of high- and low-molecular synthetic and natural compounds. The drugs selected for clinical applications have a common ability to induce synthesis of endogenous interferons (IFN) after introduction into the organism. The main advantage of interferon inducers is a wide spectrum of antiviral activity, which is based on etiotropic and immunomodulatory effects of this group of drugs. Special attention is paid to the results of clinical application of interferon inducers.

Keywords: antiviral drugs, interferons, interferon inducers, the results of clinical trials.

1 – Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

1 – N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 18, Gamaleya str., Moscow, 123098, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: en-vladislav@yandex.ru
Тел.: 8 (495) 702 95 86

ВВЕДЕНИЕ

Идея «включения» собственного (эндогенного) ИФН для защиты организма от вирусов возникла вскоре после того, как было доказано присутствие генов ИФН практически во всех клетках [1–3]. Известно, что синтез собственного ИФН является одной из самых ранних реакций естественного (врожденного) иммунитета в ответ на попадание вирусов. В результате организм быстро реагирует путем образования ИФН, который препятствует последующему развитию инфекции.

Возможность использования искусственно полученных индукторов интерферона (ИИ) для «включения» собственной (эндогенной) системы интерферонов стала рассматривается вскоре после открытия интерферонов (ИФН) [4]. Однако первые ИИ оказались токсичными и малодоступными из-за высокой стоимости, и поэтому они ещё долго находились в тени собственно ИФН и рассматривались лишь как удобный инструмент производства ИФН и изучения механизмов их действия [2, 5].

Первоначально задача включения эндогенной системы ИФН решалась путем создания препаратов, имитирующих вирусные нуклеиновые кислоты. Классическими препаратами этого типа стали синтетические полинуклеотиды, представляющие собой двуспиральные РНК (дсРНК) [2, 6].

В дальнейшем было доказано, что способностью индуцировать ИФН обладают тысячи высоко- и низкомолекулярных природных и синтетических соединений, имеющих различную химическую структуру. В первую очередь такой способностью обладают практически все известные вирусы, многие микроорганизмы (бактерии, риккетсии, микоплазмы, хламидии), продукты из них, природные полифенолы и широкий круг синтетических соединений. Однако низкая интерфероноиндуцирующая активность большинства этих веществ делала их непригодными для медицинского использования. Кроме того, большинство из них оказались токсичны-

ми, обладали антигенностью, инфекционностью, мутагенностью, аллергизирующими, канцерогенными свойствами и рядом других серьезных недостатков.

Тем не менее внутри этих групп соединений были найдены единичные, весьма перспективные вещества, индуцирующие синтез ИФН, циркулирующих в кровотоке в течение длительного времени. Они были лишены перечисленных выше недостатков, имели достаточно высокий химиотерапевтический индекс и оказались пригодны для профилактики и лечения вирусных инфекций [7] и ряда заболеваний невирусной этиологии.

Широкое системное использование ИИ различной природы показало, что их активность совпадает с ранее выявленной активностью экзогенных ИФН. Изучение эффективности ИИ при различных экспериментальных вирусных инфекциях выявило спектр активности этих препаратов и позволило наметить основные пути их дальнейшего клинического применения [8, 9]. Важно отметить, что полученные результаты установили бифункциональность ИИ: они обладают широким диапазоном антивирусной активности (этиотропный эффект) и выраженными иммуномодулирующими свойствами.

При введении в организм ИИ вызывают ряд эффектов, которые связаны с ингибированием роста клеток, модуляцией их дифференцировки и синтезом мембранных рецепторов, а также действием на различные звенья системы иммунитета. Как и при действии ИФН, это выражается в активации макрофагов, цитотоксических Т-клеток, антителобразующих В-клеток, естественных киллеров и др. [2].

Как оказалось, интерферониндуцирующими и противовирусными свойствами как в культуре клеток, так и в организме экспериментальных животных обладают многочисленные низкомолекулярные вещества, относящиеся к алифатическим аминам, хинолинам, акридинам, тиахинам, антибиотикам, биогенным аминам, природным полифенолам, комплексам металлов, меркаптоалкиламинам, тиофосфатам, а также производным поликонденсированных ароматических соединений и другим группам.

Однако низкая интерферониндуцирующая активность большинства названных веществ делала их непригодными для медицинского использования.

В результате многолетнего целенаправленного скрининга сотен высоко- и низкомолекулярных соединений природного и синтетического происхождения отечественным вирусологам удалось выявить группу клинически пригодных ИИ, имеющих высокий химиотерапевтический индекс и пригодных для профилактики и лечения вирусных инфекций и ряда других заболеваний [3, 10–24]. Отобранные для клинического применения ИИ представляют собой весьма пеструю группу высокомолекулярных и низкомолекулярных природных и синтетических соединений (таблица 1).

Таблица 1.

Клинически пригодные индукторы ИФН

Химическая природа	Препарат (коммерческое название)
Синтетические соединения	
Низкомолекулярные: флуореноны и акриданоны	Амиксин®, Циклоферон®, Неовир®
Полимеры (дсРНК): поли(А)-поли(У); поли(И)-поли(Ц)	Полудан®, Амплиген
Природные соединения	
Полифенолы	Мегосин, Кагоцел®, Саврац
Полимеры (дсРНК)	Ларифан, Ридостин

ДВУСПИРАЛЬНЫЕ РНК (дсРНК)

Экспериментально было показано, что эффективными индукторами являются только двуцепочечные комплексы полирибонуклеотидов. Одноцепочечные и трехцепочечные комплексы активности не проявляют.

Поли(И)-поли(Ц) обладает значительно более выраженной противовирусной активностью по сравнению с поли(А)-поли(Ц). Полагают, что это обусловлено легкостью превращения поли(А)-поли(Ц) в неактивный трехцепочечный комплекс поли(А)-2-поли(Ц). Одноцепочечные полирибонуклеотиды быстро инактивируются в организме благодаря воздействию фермента рибонуклеотидазы [25].

Вначале в медицинской практике были применены синтетические дсРНК, которые в известной степени имитировали вирусы, но, не неся гентической информации, не вызывали заболеваний. **Синтетические дсРНК** (полиИЦ, полиАУ, полиГЦ) являются высокомолекулярными полинуклеотидами с регулярной структурой цепей. **Природные дсРНК** (Ларифан, Ридостин) представляют собой репликативные формы РНК, выделенные из фагов и дрожжей [8, 10].

Механизм индукции ИФН дсРНК как природного происхождения, так и с синтетическими полинуклеотидами в целом совпадает с процессами, происходящими при индукции ИФН вирусами. Вслед за адсорбцией ИИ на рецепторах чувствительных к данному индуктору клеток инициируется проникновение индуктора в клетки и его распознавание, результатом чего является экспрессия генов ИФН, их транскрипция, синтез иРНК-ИФН, трансляция и собственно продукция ИФН [8].

Накопленные к настоящему времени данные показывают, что двуспиральные ИИ являются поликлональными стимуляторами интерферонов для широкого круга клеточных популяций, включая клетки мононуклеарно-фагоцитарной системы, гранулоциты, нейтрофилы, клетки эндотелия и фибробласты. Т-клетки синтезируют ИФН в ответ на дсРНК только в присутствии макрофагов как вспомогательных клеток, а В-лимфоциты практически не принимают участие в синтезе ИФН. ДсРНК являются активными индуктора-

ми ИФН-α и ИФН-γ, причем в культурах лимфобластов они индуцируют синтез преимущественно ИФН-γ, а в культурах фибробластов они являются активными индукторами ИФН α-типа [8]. Вместе с тем синтетические полирибонуклеотиды оказались малоэффективными на приматах ввиду того, что они быстро разрушаются рибонуклеазами, высокая активность которых присуща приматам.

К недостаткам двуспиральных индукторов ИФН относится невозможность преодоления ими гематоэнцефалического барьера, а также неспособность индуцировать ИФН при пероральном введении, что объясняется разрушением этих препаратов ферментами желудочно-кишечного тракта.

Так как большинство полимеров не удовлетворяет этим требованиям, в последнее время исследователи уделяют все больше внимания поиску ИИ среди низкомолекулярных соединений.

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИИ

Интерфероиндуцирующими и противовирусными свойствами как в культуре клеток, так и в организме экспериментальных животных обладают многочисленные низкомолекулярные вещества, относящиеся к алифатическим аминам, хинолинам, акридинам, тиахинам, антибиотикам, биогенным аминам, природным полифенолам, комплексам металлов, меркаптоалкиламинам, тиофосфатам, а также производным поликонденсированных ароматических соединений и другим группам. Биологическая активность низкомолекулярных ИИ суммирована в ряде обзоров [4, 24, 26–29].

Преимущество этих препаратов перед высокомолекулярными соединениями заключается в том, что, вызывая у животных продукцию ИФН, оказывая противовирусное, противовоспалительное и противоопухолевое действие, они в то же время обладают лучшей растворимостью в биологических жидкостях и большей подвижностью, легко выводятся из организма и по сравнению с полимерами не обладают антигенностью [2]. Кроме того, большинство препаратов этого класса не требуют подбора специальных чувствительных клеточных систем для индукции ИФН [2].

Производные флуорена

Многочисленной группой ИИ являются **ароматические углеводороды**, которые отличаются сравнительной простотой строения и отсутствием антигенных свойств. Различные группы препаратов, относящихся к ароматическим углеводородам, обладают разнообразной химической структурой и, как следствие, разными биологическими эффектами. Количество их возможных модификаций практически неисчерпаемо благодаря возможности присоединения различных радикалов.

Среди синтетических ароматических соединений обнаружены группы веществ, в которых активные ИИ встречаются наиболее часто. К ним относятся **флуорены и акридононы**, сополимеры малеинового ангидрида, хинолины, диамины и другие.

Флуореноны

Отобранный препарат этой группы – Амиксин® (тилорон) – обладает высокой интерфероиндуцирующей активностью, о чем свидетельствуют высокие титры ИФН в органах, богатых лимфоидной тканью. Синтез ИФН Т-клетками осуществляется без посредства макрофагов как вспомогательных клеток. Универсальной широтой действия характеризуется и противовирусная активность Амиксина® [2, 10].

Недостатком этого препарата является образование устойчивых молекулярных комплексов с ДНК, что в определенной степени представляет опасность при длительном введении.

Акриданоны

К достоинствам ИИ из группы акридононов (Циклоферон®, Неовир®) следует отнести их низкую токсичность, широкий спектр биологической активности и иммуномодулирующие эффекты, а также хорошую растворимость в биологических жидкостях и способность легко выводиться из организма. Циклоферон® обладает как прямым, так и опосредованным действием на различные звенья иммунитета. Иммуномодулирующий эффект циклоферона выражается в стимуляции стволовых клеток костного мозга, активации макрофагов и их миграции в ткани, активации и завершению фагоцитоза [24]. Воздействие циклоферона на Т-клеточный иммунитет, выражающееся в нормализации субпопуляций Т-лимфоцитов, повышении активности ЕК и цитотоксических Т-лимфоцитов, осуществляется, скорее всего, не непосредственно препаратом, а индуцированным им эндогенным ИФН. Циклоферон стимулирует также и гуморальный иммунитет, что заключается в увеличении концентрации высокоавидных антител [10, 23]. Кроме того, циклоферон способствует также повышению чувствительности нейтрофилов к другим иммунокорректорам и экспрессии антигенов [21]. Эндогенный интерферон, индуцированный циклофероном, угнетает развитие анафилактического шока, воспаления, гиперчувствительности замедленного типа, реакцию связывания комплемента. Продукция ИФН в ответ на введение в организм циклоферона осуществляется в основном В-клетками. Т-лимфоциты не принимают участия в продукции ИФН, индуцированного циклофероном. Кроме В-клеток, в синтезе ИФН принимают участие нейтрофилы и макрофаги. Препарат является индуктором смешанного (Th1/Th2) типа иммунного ответа [24].

Кагоцел® вызывает образование в организме человека так называемого позднего (пик активности достигается через 18-24 ч после ведения индуктора) ИФН, являющегося смесью ИФН-альфа и -бета. Помимо продукции ИФН, Кагоцел® индуцирует выработку различными клетками других цитокинов [2, 10].

Полифенолы

Многие **полифенолы**, содержащие альдегидные группы, способны активно ингибировать репликацию вирусов. Механизм действия этих препаратов связывают с их способностью реагировать с аминогруппами пуриновых и пиримидиновых соединений нуклеиновых кислот вирусов. Среди этого класса индукторов ИФН выделяется группа производных госсипола – Кагоцел®, Мегасин, Саврац, которые отличаются высокой интерферониндуцирующей способностью [2, 10]. Характерной особенностью данной группы является стимуляция функциональной активности широкого спектра клеточных популяций. Отобранные для медицинского применения полифенолы индуцируют синтез смеси α-/β-ИФН в разных пропорциях.

В целом, как оказалось, изучение эффективности отобранных ИИ при различных вирусных инфекциях показало, что спектр их действия, по сути дела, совпадает с активностью интерферонов.

Применение ИИ касается широкого круга вирусных инфекций: гриппа и других ОРВИ, герпеса, вирусных гепатитов, ВИЧ-инфекции, энцефалитов, бешенства, медленных и смешанных инфекций [10–21, 25]. Ниже сведены воедино основные заболевания, при которых достоверно показан эффект различных ИИ (таблица 2).

Таблица 2.

Название препарата	Клинические показания
Амиксин®	Герпес, вирусные гепатиты, энтеровирусные инфекции, грипп и другие ОРВИ, бактериальные заболевания
Кагоцел®	Грипп и другие ОРВИ, генитальный герпес
Ларифан	Грипп и другие ОРВИ, различные формы герпеса (генитальный, офтальмогерпес, опоясывающий), гепатит В
Мегосин	Герпес 1 и 2 типа, опоясывающий лишай
Неовир®	Герпесвирусные инфекции, острый вирусный гепатит А, хронические вирусные гепатиты В и С, грипп и другие ОРВИ
Полудан®	Герпетический кератит и кератоконьюктивит
Ридостин	Арбовирусные инфекции, герпес, хламидиоз
Циклоферон®	Грипп, ОРВИ, гепатит, герпес, ВИЧ-инфекция, хламидиоз

При введении в организм ИИ вызывают ряд эффектов, которые связаны с ингибированием роста клеток, модуляцией их дифференцировки и синтезом мембранных рецепторов, а также с действием на различные звенья системы иммунитета [2]. Как и при действии ИФН, это выражается в активации макрофагов, цитотоксических Т-клеток, антителообразующих В-клеток, естественных киллеров и др. Действие ИИ осуществляется в комплексе с другими медиаторами воспалительных и иммунных ответов (цитокинов), а также совместно с гормонами и нейромедиаторами. ИИ, обладая теми же иммуномодулирующими свойствами, что и собственно ИФН, стимулируют пролиферацию и дифференцировку клеток костного мозга, используя механизмы врожденного и адаптивного иммунитета [30].

В отличие от экзогенных ИФН все ИИ стимулируют гуморальный иммунитет. Одним из возможных механизмов адъювантного действия ИИ может быть усиление под их влиянием антигенпрезентирующей функции клеток системы мононуклеарных фагоцитов, а также индукции секреции интерлейкина-1, который необходим для активации иммунного ответа. Другим возможным механизмом адъювантного действия ИИ является их способность поликлонально активировать В-лимфоциты [30].

Следует особо подчеркнуть, что действие ИИ выходит за рамки только индукции интерферонов, и собственно индукция интерферонов является лишь одним из свойств. Применение ИИ-препаратов может предотвратить и/или восстановить вызываемые вирусами нарушения в цитокиновой сети.

Проведенные нами исследования ИИ, таких как Циклоферон® и Кагоцел®, выявили их способность регулировать цитокиновый профиль [31] клеток различного происхождения, а также изменять синтез цитокинов при инфицировании клеток вирусами.

Циклоферон® индуцирует синтез цитокинов ИЛ-1бета, γ-ИФН, ИЛ-2, ИЛ-6, ингибирует продукцию противовоспалительных цитокинов (ИЛ-8 и ФНОα) и стимулирует синтез провоспалительного цитокина ИЛ-10 [2].

Кагоцел® при исследовании линии клеток МТ-4, которые конститутивно экспрессируют мРНК ИФН-альфа, ИФН-бета, ИЛ-1бета, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО-альфа ингибирует экспрессию мРНК, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10. При инфицировании этой клеточной культуры вирусом гепатита С кагоцел восстанавливал подавленную вирусом экспрессию мРНК цитокинов ИФН-альфа, ИФН-бета, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ингибировал экспрессию мРНК цитокинов ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12 [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время ИИ как противовирусные препараты и корректоры иммунитета заняли достойное место в терапии вирусных инфекций [7, 32].

Индукторы интерферона, обладая выраженными противовирусными и иммуномодулирующими свойствами, используются в настоящее время как эффективные средства предупреждения и лечения ряда инфекционных (таблица 2) и неинфекционных заболеваний.

Тот факт, что отличающиеся по своей химической природе ИИ действуют на разные этапы репродукции вирусов и различные звенья врожденного и приобретенного иммунитета, объясняет все расширяющиеся масштабы применения этой группы препаратов в медицинской практике.

Все изложенные выше данные указывают на целесообразность дальнейшего поиска новых индукторов интерферона.

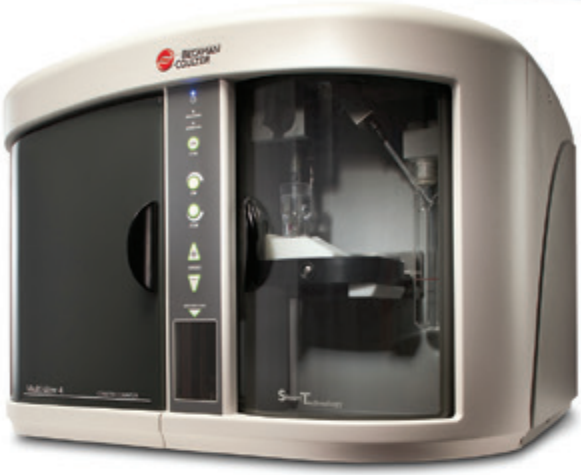
ЛИТЕРАТУРА

1. R.E. Randall, S. Goodbourn. Interferons and viruses: an interplay between induction, signaling, antiviral responses and viral countermeasures // J. Gen. Virol. 2008. № 89(pt 1). P. 1–47.
2. Ф.И. Ершов, О.И. Киселев. Интерфероны и их индукторы. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005. 356 с.
3. Ф.С. Харламова, В.Ф. Учайкин, О.В. Кладова, Э.М. Сергеева, В.Г. Нестеренко Клиническая и профилактическая эффективность индуктора интерферона при ОРВИ у детей младшего дошкольного возраста // Педиатрическая фармакология. 2012. № 1. С. 81-–88.
4. Ф.И. Ершов, А.Н. Наровлянский. Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях. // Вопросы вирусологии. 2015. № 2. С. 5–10.
5. Ф.И. Ершов, А.Н. Наровлянский. Интерфероны и индукторы интерферонов / Р.М. Хаитов, Р.И. Атауллаханов. Иммунотерапия: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. С. 80–98.
6. Т.М. Соколова. Иммунное узнавание вирусных нуклеиновых кислот приводит к индукции интерферонов и воспалительных цитокинов // Интерферон-2011: сборник научных статей. – М. 2012. С. 52.
7. Ф.И. Ершов, В.В. Полосков. Современные отечественные этиотропные противогриппозные препараты // Антибиотики и химиотерапия. 2014. № 11–12. С. 40–44.
8. Т.М. Соколова, Т.П. Оспельникова, Л.В. Колодяжная, А.Н. Шувалов. Эффекты индукторов интерферона на экспрессию генов-регуляторов апоптоза в лимфоцитах человека // Цитокины и воспаление. 2011. № 2. С. 75–81.
9. Т.М. Соколова, А.Н. Шувалов, В.В. Полосков, Ф.И. Ершов. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами «ридостин», «циклоферон» и «ингавирин» // Цитокины и воспаление. 2015. № 2. С. 26–34.
10. Ф.И. Ершов. Антивирусные препараты: справочник. 2-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 312с.
11. Ф.И. Ершов, М.Г. Романцов. Антивирусные средства в педиатрии. – М.: Русский врач, 2005. 243с.
12. Ф.И. Ершов, М.Г. Романцов. Лекарственные средства, применяемые при вирусных заболеваниях: Руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 363 с.
13. О.И. Киселев, Ф.И. Ершов, А.Т. Быков, В.И. Покровский. Пандемия гриппа 2009/2010: противовирусная терапия и тактика лечения. – Санкт-Петербург-Москва-Сочи: А-Принт, 2010. 326 с.
14. В.А. Исаков, М.Г. Романцов, И.В. Каболова, М.К. Ерофеева, Л.П. Водейко, А.Н. Смагина. Эффективность Циклоферона в терапии и профилактике гриппа и ОРЗ // РМЖ. Болезни дыхательных путей. 2011. № 23. С. 14–20.
15. В.Л. Максакова, И.А. Васильева, М.К. Ерофеева. Применение препарата Кагоцел для лечения и профилактики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций // Медлайн-экспресс. 2009. № 1. С. 42–45.
16. А.Е. Шульженко, И.Н. Зуйкова. Иммунотерапия герпес-вирусных инфекций / Р.М. Хаитов, Р.И. Атауллаханов. Иммунотерапия: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 672 с.
17. Л.А. Марченко. Генитальный герпес: патогенез, диагностика, лечение / Р.М. Хаитов, Р.И. Атауллаханов. Иммунотерапия: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 672 с.
18. Л.В. Силина, Т.В. Бабичева. Рецидивирующий герпес гениталий / Р.М. Хаитов, Р.И. Атауллаханов. Иммунотерапия: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 672 с.
19. М.Г. Романцов, Т.В. Сологуб, Н.Н. Гуренкова, С.Н. Коваленко, А.А. Шульдяков, А.Л. Коваленко. «Тройная терапия» хронического вирусного гепатита С у пациентов с генотипом Ib. Available at. URL: http://www.cycloferon.ru/vrachi/terapiya/razdelitel3/v-18// (дата обращения 01.02.2017).
20. В.В. Покровский, Т.Н. Ермак, В.В. Беляева, О.Г. Юрин. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение. – М.: Медицина, 2000. 286 с.
21. М.Г. Романцов, А.Л. Коваленко. Индуктор интерферона -Циклоферон: итоги и перспективы клинического применения. - Санкт-Петербург. 2007. 218 с.
22. И.Н. Зуйкова, А.Е. Шульженко, Р.В. Щубелко. Индуктор интерферона кагоцел в комплексной терапии герпесвирусных заболеваний. // Фарматека. 2014. № 3. С. 23–29.
23. Е.Л. Лазуткина, Л.Л. Лазаренко, Ю.С. Ландышев, Д.Д. Цырендоржиев, С.Ю. Ландышев. Эффективность применения индуктора интерферона в период обострения бронхиальной астмы на фоне острой респираторной вирусной инфекции // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2012. № 43. С. 23–27.
24. М.Г. Романцов, Ф.И. Ершов, А.Л. Коваленко, О.Г. Белова. Терапевтическая эффективность циклоферона и фармакологическая активность индукторов интерферона // Терапевтический архив. 2014. № 1. С. 83–88.
25. Применение ридостина для лечения вирусных и бактериальных инфекций и перспективы использования при заболеваниях неинфекционной природы – Сборник материалов «Круглого стола» научной конференции. – Бердск. 1998. С. 82.
26. Ф.И. Ершов, М.Г. Романцов. Индукторы интерферона: особенности индукции, регуляция продукции и фармакологическая активность // Основные проблемы в современной медицине. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. – М. 2015. С. 236–239.
27. Ф.И. Ершов, А.А. Шульдяков, М.Г. Романцов, Е.П. Ляпина, Л.А. Соболева. Результаты и перспективы использования индукторов интерферона в лечении инфекционных болезней // Вестник Российской академии медицинских наук. 2013. № 10. С. 46–52.
28. М.Г. Романцов, Ф.И. Ершов, А.Л. Коваленко, Д.С. Суханов. Лечение вирусных инфекций посредством применения в комплексной терапии индукторов интерферона // Антибиотики и химиотерапия. 2013. № 5–6. С. 49.
29. М.Г. Романцов, Ф.И. Ершов, А.Л. Коваленко. Противовирусные препараты для лечения ОРВИ и гриппа у детей (клинический обзор) // Фундаментальные исследования. 2010. № 9. С. 76–87.
30. А.Н. Наровлянский, Ф.И. Ершов, А.Л. Гинцбург. Интерфероны: перспективные направления исследований // Иммунология. 2013. № 3. С. 168–172
31. Т.П. Оспельникова, Т.В. Миронова, В.В. Полосков, Ф.Ю. Гариб, Ф.И. Ершов. Влияние индукторов интерферона на цитокиновый профиль // Цитокины и воспаление. 2014. № 1. С. 37–40.
32. Применение циклоферона при социально значимых заболеваниях у детей и подростков. Новейший справочник практикующего врача-педиатра / Под ред. М.Г. Романцова, Л.Г. Горячевой, А.А. Шульдякова, А.Л. Коваленко. – СПб. 2010. 160 с.

Анализаторы Beckman Coulter Life Sciences для подсчета и характеризации частиц и клеток

Анализатор размера и количества частиц и клеток методом Культера

Multisizer 4e



Расширенные возможности анализа:

- диапазон размеров частиц: 0,2 – 1 600 мкм
- диапазон измерения: 2 – 80% от размера апертуры
- динамический диапазон: 1 : 40 (диаметр), 1 : 64 000 (объем)

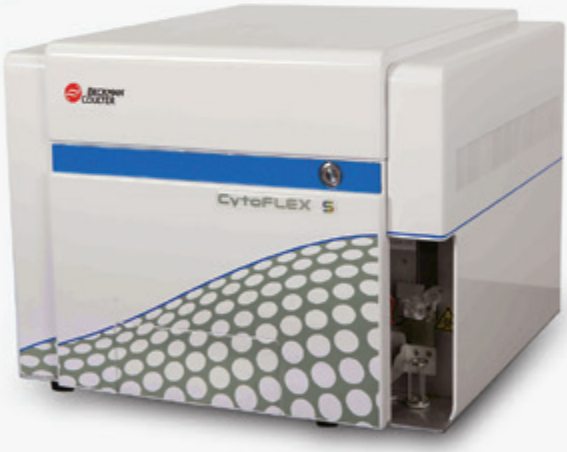


Анализатор размеров частиц методом лазерной дифракции

LS 13 320

- диапазон размера частиц 0,4 мкм – 2 мм
- 126 точек измерения для диапазона от 400 нм до 2 000 мкм
- 42 точки измерения для диапазона 17 – 400 нм





Анализатор жизнеспособности клеток

Vi-CELL XR

Подсчет количества концентрации, скорости роста и времени удвоения биомассы

- Диапазон концентрации 5 x 10^4 – 1 x 10^7 клеток/мл
- Размер анализируемых клеток 2 – 70 мкм

Проточный цитометр CytoFLEX

Гидродинамическая фокусировка

Скорость сбора данных 30 000 событий в секунду:

- Регистрация частиц диаметром от 200 нм
- Чувствительность каналов регистрации флуоресценции: FITC < 30 MESF и PE < 10 MESF

АНАЛИЗАТОРЫ BECKMAN COULTER LIFE SCIENCES – ОПТИМАЛЬНОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЗАДАЧ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ!

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

www.phct-group.com

info@phct-group.com

УДК 54.062; 615.074

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ ПРЕПАРАТА ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2А

Е.В. Митюшова[1], Н.М. Фаустова[2]*, О.Н. Пожарицкая[3], В.Г. Макаров[3], А.Н. Шиков[3]*

Резюме. Интерфероны (IFN) – одна из первых групп цитокинов, которые были клонированы и экспрессированы в микроорганизмах. Применение интерферонов в клинической практике может приводить к широкому спектру побочных эффектов, в том числе к возникновению нежелательных последствий для иммунной системы, что и обуславливает необходимость проведения исследований их иммуногенности. Для определения концентрации антител к человеческому рекомбинантному IFN-α-2a в плазме крови лабораторных животных использован и валидирован метод непрямого иммуноферментного анализа. Методика специфична для определения концентрации антител в плазме крови мышей. Линейный диапазон методики составил 3,75–60,00 нг/мл, предел обнаружения 2,19 нг/мл. Точность, межденевная и внутридневная прецизионности не превышают 15% на всех уровнях концентраций, что удовлетворяет всем валидационным требованиям.

Ключевые слова: иммуноглобулины, антитела, альфа-интерферон, плазма, ИФА, валидация.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF IMMUNOASSAY FOR IMMUNOGENICITY OF INTERFERON-ALPHA 2A DRUGS

E.V. Mityushova[1], N.M. Faustova[2], O.N. Pozharitskaya[3], V.G. Makarov[3], A.N. Shikov[3]*,

Abstract. Interferons were one of the first groups of cytokines to be cloned and produced in bacteria. Interferon-based drugs are widely used for treatment of various infections, inflammatory and autoimmune diseases and malignant tumors. Clinical use of interferons can result in wide range of side effects, including unwanted influence on immune system of patients. Therefore it is important to study immunogenicity of interferones. The method of indirect ELISA was adopted and validated for analysis of antibodies to human recombinant interferon in mice blood plasma. The specificity was confirmed for mice antibodies. The linearity was 3.75–60.00 ng/ml, the detection limit was 2.19 ng/ml. Accuracy, interday and intraday precision did not exceed 15% at all concentration levels, that satisfies all validation requirements.

Keywords: immunoglobulins, antibody, alpha-interferon, blood plasma, ELISA, validation.

1 – ЗАО «Институт экспериментальной фармакологии», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, д. 3, корп. 245

2 – ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, д. 3, корп. 245

3 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, Кузьмоловский п., ул. Заводская, д. 3, корп. 245

1 – JSC «Institute of Experimental Pharmacology», 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky village, Vsevolozhsk district, Leningrad region., 188663, Russia

2 – JSC «SRA «House of Pharmacy», 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky village, Vsevolozhsk district, Leningrad region., 188663, Russia

3 – JSC «St.-Petersburg Institute of Pharmacy», 3/245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky village, Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: spbpharm@mail.ru, info@doclinika.ru
Тел.: 8 (812) 603 24 32

ВВЕДЕНИЕ

Интерфероны (IFN) – это одна из групп цитокинов, секретируемых белков, играющих важную роль в функционировании иммунной системы организма. Известны несколько подгрупп интерферонов, которые отличаются по свойствам молекулярной структуры, своей функциональной роли и особенностям иммунотропного действия [1].

Основную роль в защите организма от чужеродных агентов играют интерфероны I типа (α и β). Именно эти белки активируют экспрессию генов, отвечающих за механизмы противодействия проникновению вируса в клетку и трансляции вирусных белков, а также запускают апоптоз инфицированных клеток. Кроме того, IFN I типа отвечают за регуляцию цитокиновых реакций и индуцируют выработку противовоспалительных факторов. В результате IFN оказывают мощное иммуномодулирующее действие *in vivo*, а также показывают выраженное противовирусное и противовоспалительное действие *in vitro*, препятствуя репродукции инфекционного агента [2].

Основная функция интерферона α (IFN-α) – запуск и поддержание активности Т-хелперов, а также активация экспрессии интерферонов II типа (в частности, IFN-γ) и запуск различных сигнальных каскадов иммунной системы. Была отмечена корреляция между экспрессией IFN-α и развитием аутоиммунных заболеваний у человека и экспериментальных животных [3].

Применение интерферонов в клинической практике сопровождается широким спектром

побочных эффектов, в том числе нежелательными последствиям для иммунной системы, что обуславливает необходимость проведения исследований их иммуногенности [4].

Основная задача доклинического изучения иммуногенности лекарственных средств состоит в том, чтобы в эксперименте на животных оценить потенциальный риск фармакологического средства для иммунной системы человека.

Основным методом выявления иммуногенности препарата является контроль иммунного ответа через характеристику экспрессии антител к действующему веществу в крови пациента (либо экспериментального животного). Для препаратов на основе IFN-α-2a иммунный ответ характеризуется содержанием аутоиммунных антител к IFN-α-2a в сыворотке или плазме крови [5]. Дополнительным показателем для анализа иммуногенности препаратов может служить определение изменения концентрации общего содержания иммуноглобулинов G (IgG) в плазме животных.

Известны различные методы определения концентрации антител, такие как радиоиммунный анализ [6], методы иммунодиффузии [7, 8] и метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [9]. Наиболее простым, достаточно чувствительным и доступным способом является метод ИФА. Кроме того, существуют различные способы обработки данных, полученных при проведении ИФА например определение титра антител при анализе ряда разведений исследуемого образца [5] либо определение концентрации антител в образце.

В настоящее время выпускаются ИФА-наборы для определения в плазме или сыворотке лабораторных животных общей концентрации IgG, но для количества антител, специфичных к тому или иному виду интерферонов, таковые отсутствуют. Поэтому возникла необходимость разработки методики количественного определения концентрации антител к IFN-α-2a в плазме крови лабораторных животных. Для этих целей был выбран метод непрямого ИФА с использованием человеческого рекомбинантного IFN-α-2a в качестве субстрата и вторичных моноклональных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, для детектирования антител к человеческому рекомбинантному IFN-α-2a в исследуемых образцах.

Цель данной работы – разработать и валидировать методику определения содержания антител к человеческому рекомбинантному IFN-α-2a в плазме крови подопытных животных с помощью ИФА-анализа для её дальнейшего использования при проведении исследований по сравнительной иммуногенности препаратов интерферона.

Согласно литературным данным, выраженность иммунного ответа зависит от множества факторов: характеристик действующего вещества (структура, посттрансляционные модификации и др.), влияния вспомогательных веществ, способа введения и дозировки, а также генетических особенностей главного комплекса гистосовместимости [10]. Для проведения данной работы были выбраны мыши линии Balb/C, продемонстрировавшие наиболее четко выраженный иммунный ответ при введении IFN-α [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выполнения валидационных испытаний использованы следующие образцы свежеприготовленной и замороженной плазмы лабораторных животных: мышей линии Balb/C (возраст 8–12 недель), мышей аутбредных (возраст 8–12 недель), кроликов породы калифорнийская (возраст 2,5–3 мес) и крыс аутбредных (возраст 8-12 недель) (ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»).

Исследование иммуногенности проводили на половозрелых животных (кроликах калифорнийских и мышах аутбредных) при многократном курсовом введении препаратов по схеме 2 инъекции в неделю в течение 30 дней. Использовали подкожный путь введения, как аналог применяемого в клинике. Исследуемые препараты вводили в терапевтической дозе 6 мкг/кг. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях [12], на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам надлежащей лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33044-2014) и одобрены на совещании биоэтической комиссии ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Замороженные образцы плазмы хранили при температуре –20 °С до 60 суток [13].

Объектом исследования являлся препарат Пегасис®, раствор для подкожного введения, 180 мкг/0,5мл [пэгинтерферон альфа-2a (40 кДа), «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцария, серия B1354, срок годности 11.2016].

Определение концентрации антител, специфичных к человеческому рекомбинантному IFN-α, методом ИФА проводилось с использованием человеческого рекомбинантного IFN-α-2a (GenScript, США), козьих антител к иммуноглобулинам мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma Aldrich, США) и мышиных антител к человеческому IFN-α-2a для составления стандартных образцов (Antibodies Online, США).

Анализ проводили согласно протоколу Indirect ELISA Protocol (Abcam) [9] с оптимизацией условий про-

цедуры для достижения наилучшего результата. Концентрацию IgG, специфичных к IFN-α, в образцах определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на планшетном спектрофотометре xMark (BioRad, США).

В протоколе непрямого ИФА [9] для ряда параметров отсутствует строгая регламентация: времени и условий инкубаций с субстратом в иммобилизующем буферном растворе и с буферным раствором для блокировки неспецифического связывания (допустимы варианты инкубаций в течение 1–2 ч при комнатной температуре либо при температуре +4 °С overnight), время и условий инкубаций с тестируемыми образцами и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (при температуре +4 °С overnight, при комнатной температуре в течение 1–4 ч, при температуре +37 °С в течение 40–60 мин), а также продолжительности инкубации с тетраметилбензидином (от 5 до 30 мин). Таким образом, условия испытания методики с определенным набором реактивов должны быть определены экспериментально.

Человеческий рекомбинантный IFN-α-2a в концентрации 20 мкг/мл иммобилизовали на полистироловых планшетах, затем проводили инкубацию с блокирующим буферным раствором для предотвращения неспецифического связывания.

Схема анализа предусматривает разведение исследуемых образцов плазмы в случае необходимости. Подготовленные образцы вносились в лунки планшета с иммобилизованным интерфероном в соответствии с заранее составленной схемой.

Планшет заклеивали пленкой и инкубировали при температуре 37 °С в течение 60 мин в термостатируемом шейкере ST-3L (Elmi, Латвия). По окончании инкубации содержимое лунок удаляли и тщательно промывали лунки фосфатно-солевым буферным раствором. После промывки во все лунки вносили раствор вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, заклеивали пленкой и инкубировали при температуре 37 °С в течение 60 мин. По окончании инкубации защитную пленку снимали, удаляли содержимое лунок и тщательно промывали лунки фосфатно-солевым буферным раствором. Затем во все лунки вносили раствор тетраметилбензидина, заклеивали планшет пленкой и инкубировали при температуре 37 °С в течение 5 мин в термостатируемом шейкере. После окончания инкубации останавливали реакцию с помощью стоп-реагента (2М серной кислоты).

Оптическую плотность растворов в лунках измеряли на планшетном спектрофотометре в двухволновом режиме: при длине волны 450 нм (основной фильтр) и 640 нм (референсная длина волны) через 2–3 мин после остановки реакции. Для построения калибровочного графика и расчетов концентрации антител, специфичных к человеческому рекомбинантному IFN-α, в образцах использовали приведенную оптическую плотность $D=D_{450}-D_{640}$, о.е.

Для приготовления модельных смесей и разведений образцов плазмы крови использовали рабочий буферный раствор: 1% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4).

Статистическая обработка результатов выполнена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007. Графики построены на основании средних арифметических значений ($\bar{X}$) и соответствующих им стандартных отклонений (SD). В таблицах приведены средние арифметические значения ($\bar{X}$), соответствующие им стандартные отклонения (SD), относительное стандартное отклонение (RSD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интерфероны – одна из первых групп цитокинов, которые были клонированы и экспрессированы в микроорганизмах. Именно эта группа наиболее изучена как с точки зрения молекулярной структуры, так и с точки зрения клинического применения. Препараты на основе интерферонов (и в частности, IFN-α) используются в терапии инфекционно-воспалительных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, к примеру хронических вирусных гепатитов и злокачественных опухолей [4, 14, 15]. Аминокислотные последовательности человеческих рекомбинантных интерферонов совпадают с последовательностями их эндогенных аналогов, однако они могут различаться по степени гликозилирования, посттрансляционному процессингу и вариациям третичной структуры. Известно, что пэгилирование (присоединение полиэтиленгликоля) не влияет на функциональные свойства препарата, однако увеличивает период полураспада интерферона в сравнении с его оригинальной формулой [3]. Все эти факторы могут оказывать влияние на иммуногенность препаратов на основе рекомбинантных интерферонов, а также на их эффективность [7].

Возможность применения данной методики была экспериментально проверена нами на примере препарата Пегасис®. По результатам предварительных экспериментов процедура анализа была адаптирована и оптимизирована для конкретного объекта: IgG мыши, специфичных к человеческому рекомбинантному IFN-α.

Для получения достоверных данных при анализе методика должна быть валидирована [13, 16, 17]. Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемой задачи.

В качестве параметров валидации согласно рекомендациям [13, 16, 17] были выбраны: специфичность, линейность, точность и прецизионность.

Специфичность (реже селективность) – способность однозначно оценивать анализируемое вещест-

во в присутствии других компонентов, которые могут находиться в образце (примеси, вспомогательные вещества). Специфичность методики ИФА определяется специфичностью используемых в работе антител, которая подтверждается паспортом реактива.

В работе были использованы два вида антител: моноклональные антитела мыши к IFN-α (Antibodies Online, США), специфичные к IFN-α-2a и IFN-α-2b, и антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США).

Для подтверждения специфичности использованных антител был выполнен анализ образцов плазмы животных, полученных от разных видов лабораторных животных: мышей, крыс и кроликов (таблица 1).

Таблица 1.

Результаты анализа плазмы крови животных различных видов ($\bar{X}$±SD)

Вид животных (n=4)	D, о.е.
Крыса аутбредная (интактная)	0,169±0,008
Кролик (интактный)	0,031±0,008
Кролик (после введения IFN-α)	0,054±0,010
Мышь линии Balb/C (интактная) (разведение 1:1000*)	0,289±0,005
Мышь линии Balb/C (после введения IFN-α)	1,312±0,007
Мышь аутбредная (интактная, разведение 1:1000*)	0,355±0,006
Мышь аутбредная (после введения IFN-α, разведение 1:1000*)	1,042±0,008

Примечание: * Интенсивность сигнала при анализе неразведенной плазмы мышей выходила за пределы диапазона линейности, поэтому в дальнейшем использовались образцы плазмы крови мышей, разведенные в фосфатно-солевом буферном растворе.

Традиционно для оценки специфичности анализу подвергают пробу, не содержащую анализируемые вещества (бланк или плацебо), пробу с добавкой стандартного образца аналита и испытуемую пробу препарата. По результатам анализа ожидают отсутствие аналитического сигнала для пробы плацебо и наличие сходных аналитических сигналов для проб со стандартом и с испытуемым объектом.

На основании данных, представленных в таблице 1, необходимо отметить, что интенсивность сигнала для образцов плазмы других видов животных значительно ниже, чем для образцов плазмы мышей. Проведение иммунизации у кроликов, приводившей к появлению специфических антител к IFN-α, не приводило к значительному усилению сигнала, что подтверждает отсутствие кросс-реактивности к IgG кролика. Разработанная методика специфична для определения концентрации антител в плазме крови мышей, однако имеет частичную кросс-реактивность к антителам к IFN-α-2a, вырабатываемым в организме крыс, что может быть обусловлено близким родством данных видов животных.

Для проверки специфичности детектирования окрашенного продукта ферментной реакции были записаны УФ-спектры испытуемого раствора и раствора стандартного образца в диапазоне длин волн 350–640 нм. В качестве плацебо использовали буфер для разведения стандартных образцов, не содержащий мышиных IgG, специфичных к IFN-α, пробы с добавками аналита – лунки с внесением мышиных IgG, специфичных к IFN-α в двух концентрациях. Типичный УФ-спектр растворов представлен на рисунке 1.

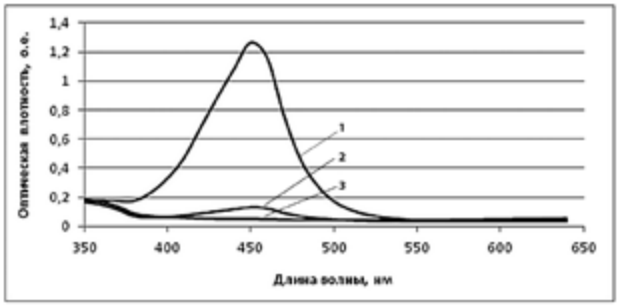


Рисунок 1. Типичный УФ-спектр продуктов реакции стандартного раствора IgG к IFN-α: 1 – с концентрацией 100 нг/мл; 2 –стандартного раствора IgG к IFN-α с концентрацией 3,7 нг/мл; 3 – стандартного раствора с концентрацией IgG к IFN-α 0 нг/мл

Для детектируемой области характерно наличие четкого максимума при 450±2 нм. Аналогичные спектры имеют продукты реакции всех исследуемых образцов.

Линейность – способность показать, что аналитические сигналы пропорциональны концентрации анализируемого вещества в образце в пределах диапазона применения методики. Линейность проверяют непосредственно на активной субстанции или на модельных смесях. На основании полученных данных методом наименьших квадратов проводят расчет уравнения регрессии и дополнительных статистических показателей. Линейность методики была проверена и подтверждена в диапазоне концентраций 3,75–60,00 нг/мл.

При расчете и построении калибровочной кривой была использована методика Logit-log, которая также часто применяется для обработки результатов ИФА [18]. Зависимость этого параметра от концентрации IgG, специфичных к альфа-интерферону, описывается линейной функцией. По результатам серии экспериментов, выполненных в разные дни, получены значения коэффициента корреляции от 0,992 до 0,999. На рисунке 2 приведен пример линейной зависимости значений logit (D/D_0) от логарифма концентрации IgG, специфичных к IFN-α.

Предел обнаружения (ПО) (или чувствительность) – наименьшее количество анализируемого ве-

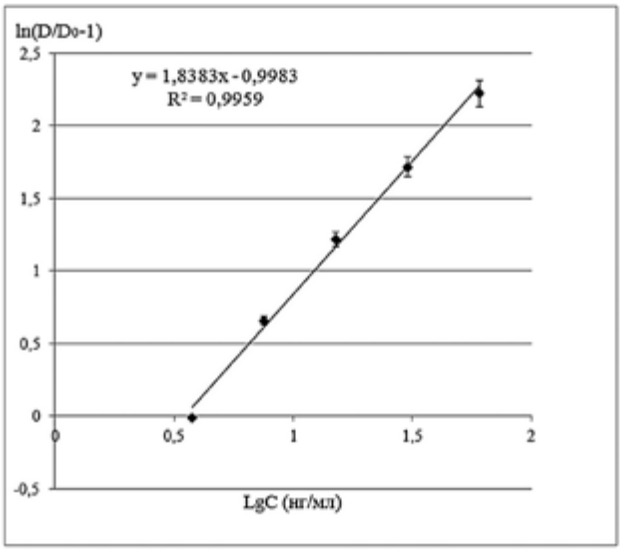


Рисунок 2. Типичный график зависимости аналитического сигнала от концентрации IgG, специфичных к IFN-α, в координатах Logit-log

щества, которое может быть обнаружено, но не оценено точно количественно. ПО разработанной методики составил 2,19 нг/мл.

Точность характеризует близость результатов испытаний, полученных с помощью данной методики, к истинному значению. Показателем точности метода является систематическая погрешность (δ), выражаемая как разность между ожидаемым значением (истинным) и результатом измерений. Оценка точности выполнена по результатам анализа модельных смесей аналита на четырех уровнях концентраций: нижнем пределе количественного определения (НПКО) и верхнем пределе количественного определения (ВПКО) (3,75 и 60,00 нг/мл соответственно), середине (50%) линейного диапазона [30,00 нг/мл, средний контроль качества (КК)] и для концентрации, не превышающей 3-кратное значение предела количественного определения (ПКО) [7,50 нг/мл, низкий контроль качества (КК)] (таблица 2). Точность оценивали по принципу «внесено – найдено» как относительную систематическую погрешность (δ) в процентах от внесенного количества.

Относительные погрешности (δ) при оценке точности в общем случае должны быть не более 15%, для предела количественного определения – не более 20% [16, 17]. Полученные результаты (0,81–14,40%) для всего диапазона концентраций соответствуют этому требованию (таблица 2).

В соответствие с рекомендациями по валидации методов контроля химических и физико-химических показателей качества медицинских иммунопрепаратов [16, 17] оценка правильности проведена также на основании графика зависимости измеренного количества от ожидаемого количества анализируемого соединения. При отсутствии систематической ошибки график должен представлять собой прямую, проходящую через начало координат и имеющую наклон 1. Для данных, представленных в таблице 2, полученное уравнение регрессии y=1,0034x (r=0,996) (x – внесенное количество IgG к IFN-α, нг/мл; y – экспериментально полученные значений количества IgG к IFN-α в плазме, нг/мл) свидетельствует об отсутствии систематической ошибки [16, 17].

Таблица 2.

Данные по проверке точности методики определения концентрации IgG к IFN-α

Внесено IgG к α-интерферону, нг/мл	Найдено[1], нг/мл	Погрешность абсолютная[2], нг/мл	Погрешность относительная, %	Средняя относительная погрешность, %
60 (ВПКО)	65,19 56,95 59,83 55,31 63,20	+5,19 –3,05 –0,17 –4,68 +4,30	+8,7 –5,1 –0,28 –7,8 +7,0	5,4
30 (Средний КК)	29,17 32,41 28,98 31,09 29,11	–0,83 +2,41 –1,02 +1,09 –0,89	–2,77 +8,03 –3,40 +3,63 –2,97	4,2
7,5 (Низкий КК)	8,47 7,12 8,54 8,13 8,54	0,97 –0,38 1,04 0,63 1,04	+12,93 –5,07 +13,87 +8,40 +13,87	10,8
3,75 (НПКО)	4,24 3,21 3,72 3,85 4,19	+0,49 –0,54 –0,03 +0,10 +0,44	+13,1 –14,4 –0,81 +2,60 +11,73	8,5

Примечание: 1 – результаты фактических анализов (в 5-кратной повторности);
2 – соответствующая каждому определению фактическая «Погрешность абсолютная, нг/мл», что и свидетельствует об отклонениях фактических концентраций от рассчитанных.

Прецизионность аналитической методики выражает степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же однородного образца. Прецизионность определяли на двух уровнях: в течение одного рабочего дня (внутридневная) и в течение нескольких (не менее 2) рабочих дней (междневная) [13, 16, 17]. Прецизионность зависит только от случайных факторов и не связана с истинным значением определяемой величины. Мерой внутридневной и междневной прецизионностей является величина коэффициента вариации (CV, %), полученная при усреднении результатов измерений [16].

Оценка прецизионности была выполнена по результатам анализа модельных смесей с добавлением известных количеств IgG к IFN-α на четырех уровнях

концентраций в необходимом количестве повторностей (не менее пяти). Экспериментальные данные, полученные при оценке прецизионности, представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Данные по оценке прецизионности методики

Концентрация IgG к α-интерферону в калибровочном растворе, нг/мл	Внутридневная прецизионность, RSD, %	Междневная прецизионность, RSD, %	Требования [4, 5], не более %
Модельная смесь в рабочем буферном растворе			
60 (ВПКО)	0,65 – 2,15	1,20	15
30 (Средний КК)	0,98 – 2,40	1,30	15
7,5 (Низкий КК)	0,78 – 2,56	1,60	15
3,75 (НПКО)	1,67 – 3,23	2,30	20
Модельная смесь с плазмой интактных мышей			
4,2 (НПКО) 30 (Средний КК) 60 (ВПКО)	2,40 – 10,80 1,10 – 2,20 0,72 – 6,40	16,70 7,00 6,80	20 15 15

Прецизионность должна составлять не более 15%, для НПКО – не более 20%. Полученные значения на четырех уровнях концентраций удовлетворяют этим требованиям.

При проведении пилотного эксперимента в плазме крови интактных животных (мышей линии Balb/C) было обнаружено присутствие IgG, специфичных к IFN-α. Для минимизации фонового сигнала плазма крови мышей разводилась в фосфатно-солевом буферном растворе. Результаты эксперимента по подбору оптимального разведения приведены в таблице 4.

Таблица 4.

Подбор разведений плазмы крови ($\bar{X}$±SD)

Разведение	Оптическая плотность растворов $D_{ст}=D_{450}-D_{650}$
1:200	0,541±0,012
1:500	0,296±0,007
1:1000	0,244±0,016
1:2000	0,167±0,027*

Примечание: * Данное значение оптической плотности соответствует НПКО, поэтому использование бóльших разведений плазмы крови нецелесообразно.

В дальнейшем для создания модельных смесей использовали разведение плазмы крови интактных животных 1:2000. При анализе образцов плазмы крови от экспериментальных животных после иммунизации разведение подбирали таким образом, чтобы оптическая плотность реакционной смеси находилась в пределах 0,3–0,5 о.е.

Наличие гемолиза в образцах плазмы крови вносит погрешность в определение различных биохимических параметров [8, 9, 19]. Поэтому в ходе эксперимента было оценено влияние гемолиза на концентрацию антител с помощью данной методики (таблица 5).

Таблица 5.

Содержания IgG, специфичных к IFN-α, в плазме крови интактных мышей Balb/c с гемолизом и без гемолиза ($\bar{X}$±SD)

Пол и № животного		Концентрация IgG к IFN-α, мкг/мл	
		плазма крови без гемолиза	плазма крови с гемолизом
Самцы	1	17,4±1,1	43,6±2,6
	2	21,6±1,3	32,8±1,9
	3	17,1±1,0	28,1±1,7
Самки	4	31,8±1,9	40,2±2,4
	5	29,6±1,8	59,1±3,5
	6	34,3±2,1	48,3±1,1

На основании результатов, представленных в таблице 5, можно сделать заключение, что при анализе гемолизированной плазмы разработанная методика показывает значительное завышение концентрации антител к IFN-α. Вероятность возникновения подобных ошибок при анализе гемолизированных проб также подтверждается литературными данными [9].

Таким образом, по всем критериям валидации получены результаты, свидетельствующие о специфичности, линейности, точности, прецизионности и достаточно высокой чувствительности методики определения концентрации IgG к IFN-α методом ИФА.

На данном этапе исследования методика количественного определения IgG к IFN-α в плазме мышей валидирована в соответствии с современными требованиями, удовлетворяет им по всем показателям и может быть использована при проведении исследований по иммуногенности различных препаратов IFN-α.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы разработана и валидирована методика определения содержания IgG (антител) к IFN-α в плазме крови подопытных животных (мышей) с помощью ИФА-анализа.

Экспериментально подтверждена пригодность данной методики для определения концентрации IgG к IFN-α в плазме крови лабораторных животных (мышей). Линейность методики составила, 3,75–60,00 нг/мл IgG к IFN-α, предел обнаружения (чувствительность) – 2,19 нг/мл. Показатели точности, междневная и внутридневная прецизионность не превышают 15% на всех уровнях концентраций (для НПКО – 20%) и удовлетворяют требованиям нормативных документов, что позволяет в дальнейшем использовать разработанную методику для проведения исследований по иммуногенности различных препаратов IFN-α. Образцы плазмы крови с гемолизом непригодны для анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. S.A. Stifter, C.G. Feng. Interfering with immunity: detrimental role of type I IFNs during infection // Journal of Immunology. 2015. V. 194. P. 2455–2465.
2. L. Grine, L. Dejager, C. Libert, R.E. Vandenbroucke. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17 // Cytokine & Growth Factor Reviews. 2015. V. 26. P. 25–33.
3. Ю.А. Вавиленкова. Современные представления о системе интерферона // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2012. Т. 11(2). С. 74–82.
4. И.Г. Никитин. Пегилированные интерфероны-альфа: новые возможности лечения хронического гепатита С // Фарматека. 2002. Т. 9. С. 4.
5. I. Garcia, P.A. Prats, M. Cervantes et al. Factors that influence the immunogenicity of human recombinant interferon alpha-2b in mice // Biotechnologia Applicada. 2002. V. 19. P. 15–18.
6. R.S. Yalow, S.A. Berson. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man // Journal of Clinical Investigation. 1960. V.39. P. 1157–1175.
7. М. Тертон, Д.Р. Бангхем, К.А. Колкотт. Новые методы иммуноанализа. – М.: Мир, 1991. 280 с.
8. Иммунологические методы / Под ред. Г.Фримеля. – М.: Медицина, 1987. 472 с.
9. ELISA Instruction Manual (Cloud Clone Corp). URL: http://www.cloud-clone.us/manual/ELISA-Kit-for-Immunoglobulin-G-(IgG)-E90544Mu.pdf (дата обращения 24.11.2015).
10. М.В. Шестакова, О.К. Викулова. Биосимиляры: презумпция «виновности» // Сахарный диабет. 2011. № 4. С. 91–99.
11. P. Tagliaferri, P. Tassone, S. Blotta et al. Antitumor therapeutic strategies based on the targeting of epidermal growth factor-induced survival pathways // Cancer Immunology, Immunotherapy. 2005. V. 54. P. 1–10.
12. 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.
13. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. – М.: Министерство здравоохранения и социального развития РФ, 2007. 49 с.
14. M. Deutsch, S.J. Hadziyannis. Old and emerging therapies in chronic hepatitis C: an update // Journal of Viral Hepatitis. 2008. V. 15. P. 2–11.
15. G.V. Papatheodoridis, S. Manolakopoulos, A.J. Archimandritis. Current treatment indications and strategies in chronic hepatitis B virus infection // World Journal of Gastroenterology. 2008. V. 14. P. 6902–6910.
16. 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). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001.
17. Валидация методов контроля химических и физико-химических показателей качества МИБП: порядок проведения и представления результатов. Методические указания. МУ 3.3.2.1886-04. 2004.
18. Н.В. Свежова, Д.Б. Шаркова, В.А. Громов и др. Методы математической обработки данных в иммуноферментном анализе // Клиническая лабораторная диагностика. 2008. № 1. С. 3–9
19. А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: Высшая школа, 1991. 288 с.

CRYSTE Laboratory & Biomedical Technology

ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОЕ ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ



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.



Универсальная центрифуга VARISPIN 4 с угловым ротором или ротором крестовиной

171 000 руб.

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

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

Оборудование для мягких желатиновых капсул, блистерных машин и счетно–фасовочных линий от Sky Softgel Co. LTD

Качественные продукты с высочайшим уровнем сервиса и новейшими запатентованными технологиями – все это Sky Softgel!



Мягкие желатиновые капсулы:

полный цикл производства от приготовления до фасовки в любой тип упаковки

Счетно–фасовочные линии:

технология подачи, подсчета, фасовки, укупорки не требует форматных частей при переходе на другой продукт, другую емкость! При этом Вы можете использовать как пластиковую, так и стеклянную емкости!





Блистерные машины:

- технология моментальной модульной системы замены форматных частей;
- машины балконного типа, со всеми современными системами инспекции, протяжки на основе сервоприводов, с питателями под различные типы продуктов!

Посетите наш стенд 230 на выставке IPhEB & CPhIrussia

75 павильон ВДНХ, зал А
28-30 марта 2017 г.

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 615.11

УЧАСТНИКИ «ХОЛОДОВОЙ ЦЕПИ»: АНАЛИЗ СООТВЕТСТВИЯ ТРЕБОВАНИЯМ ПРАВИЛ GDP

И.А. Наркевич[1], В.А. Маркова[1], Д.А. Демидёнок[1]*

Резюме. Предприятием-изготовителем отечественных медицинских иммунобиологических препаратов проведен аудит трех транспортных компаний на степень их соответствия требованиям правил GDP, предложены мероприятия по устранению выявленных нарушений.

Ключевые слова: правила GDP, аудит, транспортная компания, предприятие-изготовитель.

PARTICIPANTS OF THE «COLD CHAIN»: ANALYSIS OF COMPLIANCE WITH THE RULES OF THE GDP

I.A. Narkevich[1], V.A. Markova[1], D.A. Demidyonok[1]*

Abstract. Manufacturer of domestic medical immunobiological preparations audited three transport companies on their degree of compliance with the rules of the GDP. Required measures were offered to eliminate detected violations.

Keywords: GDP rules, auditing, transport company, the manufacturer.

1 – ФГБО ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

1 – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 14, Lit. A, Professora Popova str., St. Petersburg, 197376, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: Daria.demidenok@pharminnotech.com
Тел.: 8 (911) 981 84 14

ВВЕДЕНИЕ

Поставка лекарственных препаратов от производителей в розничный сегмент, как правило, осуществляется транспортными компаниями. В Российской Федерации в данном сегменте рынка функционируют как национальные, так и региональные компании, предоставляющие услуги дистрибьюции лекарственных препаратов. Это могут быть дистрибьюторы как полного цикла (обеспечивающие все этапы поставки лекарственных средств), так и укороченного цикла (предоставляющие отдельные логистические услуги) [1].

Целью исследования явился анализ соответствия услуг транспортных компаний требованиям правил надлежащей дистрибьюторской практики (GDP).

Оценка и последующий выбор поставщиков транспортных услуг является крайне сложной задачей, т.к. перед предприятием-изготовителем стоит задача *поддержания заданного уровня качества*, который был достигнут при производстве лекарственных препаратов посредством соблюдения принципов надлежащей производственной практики (GMP). Это позволяет обеспечить доставку лекарственных препаратов конечному потребителю без изменений их свойств [2]. Особенно актуальной эта проблема является для производителей термолабильных лекарственных препаратов, т.к. данная группа препаратов нуждается в особом температурном режиме во время транспортировки, хранения и обращения с ними. В процессе хранения и транспортировки термолабильных препаратов необходимо соблюдать интервал температур от +2 до +8 °С, поскольку от влияния внешней среды зависит как эффективность, так и безопасность продукта для конечного потребителя, т.е. для пациента. Термолабильные свойства этой группы препаратов обуславливают необходимость специфической организации логистической системы – «холодовой цепи», которая позволяет обеспечить безопасные условия транспортировки и хранения термолабильных лекарственных препаратов на всем пути от производителя до конечного потребителя.

Для обеспечения требуемых условий «холодовой цепи» мировые расходы на биофар-

мацевтическую логистику составят в 2016 году 12,6 млрд долларов, а в 2020 году – 16,7 млрд долларов. Средний темп прироста затрат составит 8–9%, что примерно вдвое больше, чем затраты на логистику лекарственных препаратов в целом [3]. Поэтому для уменьшения рисков и оптимизации расходов на транспортировку и хранение термолабильных препаратов необходима разработка регламентов и четкое их выполнение. Соблюдение требований «холодовой цепи» необходимо также и потому, что высокая стоимость современных лекарственных препаратов, относящихся к группе термолабильных, в геометрической прогрессии увеличивает коммерческие риски для предприятия-изготовителя.

Согласно результатам опроса ключевых экспертов, проводимого в рамках 14-го ежегодного форума по «холодовой цепи» в Канаде (14th Annual CoolChain Temperature Controlled Logistics Europe), основной проблемой при транспортировке и хранении термолабильной продукции является *поиск надежных поставщиков транспортных услуг*, отвечающих предъявляемым нормативным требованиям (рисунок 1).



Рисунок 1. Основные проблемы при транспортировке и хранении термолабильной продукции

Источник: Материалы 14-го ежегодного форума по «холодовой цепи» в Канаде [4]

Одной из основных проблем, выявленных в результате опроса экспертов, является выбор новой логистической компании как будущего потенциального поставщика транспортных услуг; по мнению анкетируемых, это обусловлено отсутствием достаточного контроля цепи поставок (рисунок 2).

Еще один неоднозначный вопрос организации «холодовой цепи»: в настоящее время в России требования по хранению и транспортировке термолабильных лекарственных препаратов затрагивают только иммунобиологические лекарственные препараты. Данные требования нашли свое отражение в санитарных правилах СП 3.3.2.3332-16 «Условия



Рисунок 2. Основные проблемы при создании нового логистического партнерства

Источник: Материалы 14-го ежегодного форума по «холодовой цепи» в Канаде [4]

транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов». Мировая практика хранения и дистрибьюции лекарственных препаратов основывается на стандартах GDP (Good Distribution Practice of medicinal products for human use 2013 года), которые в России официально утверждены Советом Евразийской экономической комиссии в виде правил надлежащей дистрибьюторской практики Евразийского экономического союза. Вступление данных правил в силу намечено на 1 января 2017 года. Введение правил GDP позволяет получить необходимый контроль и прослеживаемость цепи поставок от предприятия-изготовителя до конечного потребителя.

Пункт 1.3 правил GDP [«Управление деятельностью, передаваемой для выполнения другому лицу (аутсорсинг)»] предписывает «контроль и анализ любой деятельности, переданной для выполнения другому лицу (далее – переданной на аутсорсинг) и относящейся к приобретению, хранению, транспортировке, поставке или экспорту. Деятельность по аутсорсингу должна учитывать возможные риски для качества и содержать: оценку пригодности и компетентности исполнителя выполнить обязательства по договору должным образом, а также проверку наличия у исполнителя необходимых разрешительных документов в соответствии с национальным законодательством государств-членов Союза...» [5].

В рамках выполнения данного требования отечественной компанией-изготовителем иммунобиологических препаратов были проведены аудиторские проверки трех отечественных транспортных компаний, расположенных в Москве и Санкт-Петербурге, на степень их соответствия правилам GDP. В качестве критериев оценки выступили основные положения утвержденных правил GDP, которые вступают в силу с 2017 года (таблица 1).

Таблица 1.

Результаты аудиторской проверки транспортных компаний

№ п/п	Вопрос	Критерии	Соответствие		
			Транспортная компания № 1	Транспортная компания № 2	Транспортная компания № 3
1	Проведена ли квалификация оборудования (кузов авторефрижератора)?	Правила GDP, п. 3.3.2, 9.4	Квалификация/валидация авторефрижератора не проводится	Валидацию кузова авторефрижератора проводят 1 раз в квартал, что обусловлено сменой сезонов. Порядок проведения валидационных испытаний не отвечает предъявляемым требованиям	Квалификация/валидация авторефрижератора не проводится
2	Проведена ли валидация маршрутов движения?	Правила GDP, п. 3.3.2	Квалификация/валидация маршрутов движения не проводится	Квалификация / валидация маршрутов движения не проводится	Квалификация/валидация маршрутов движения не проводится
3	Используются ли терморегистраторы для непрерывного мониторинга температурного режима?	Правила GDP, п. 9.2	Для мониторинга температурного режима используется один терморегистратор	Для мониторинга температурного режима используется один терморегистратор	Для мониторинга температурного режима используется один терморегистратор
4	Имеются ли свидетельства о поверке или калибровке терморегистраторов и термометров, используемых в рефрижераторном транспорте?	Правила GDP, п. 3.3	Свидетельств о поверке или калибровке используемых терморегистраторов нет	Имеются протоколы калибровки средств регистрации температурного режима	Имеется протокол калибровки средств регистрации температурного режима
5	Имеются ли документы, подтверждающие регулярную санитарную обработку кузова авторефрижератора?	Правила GDP, п. 9.2	Предоставлен договор с фирмой о проведении регулярной санобработки с периодичностью один раз в месяц	Предоставлен договор с фирмой о проведении регулярной санобработки с периодичностью один раз в месяц	Предоставлен договор с фирмой о проведении регулярной санобработки с периодичностью один раз в месяц
6	Имеется ли план действий в чрезвычайных ситуациях (в случае поломки или аварии в пути, выхода из строя холодильного оборудования)?	Правила GDP, п. 9.2	План действий в чрезвычайных ситуациях отсутствует. Инструктаж водителей проводится устно, свидетельства об обучении отсутствуют	План действий в чрезвычайных ситуациях отсутствует	План действий в чрезвычайных ситуациях отсутствует
7	Имеются ли документы, подтверждающие, что водители автотранспорта, используемого для транспортирования термолабильной лекарственной продукции (ТЛП), и/или экспедиторы прошли обучение мерам и способам сохранения ТЛП при погрузочно-разгрузочных работах, в случае возникновения чрезвычайной ситуации?	Правила GDP, п. 2.4	Документы отсутствуют	Предоставлена инструкция по перевозке грузов для водителей. Водители ознакомлены, лист ознакомления заполнен	Документы отсутствуют
8	Расположение терморегистраторов в кузове авторефрижератора (находятся ли терморегистраторы в местах, обеспечивающих получение достоверных данных о температурном режиме)?	Правила GDP, п. 9.2	Нет. В кузове авторефрижератора находится один терморегистратор, расположенный в центре кузова	Нет. В кузове авторефрижератора находится один терморегистратор, расположенный в центре кузова	Нет. В кузове авторефрижератора находится один терморегистратор, расположенный в непосредственной близости от холодильной установки
9	Наличие системы оповещения при выходе температурного режима за установленные границы (звуковая, визуальная)?	Правила GDP, п. 3.3	При выходе температуры за установленные пределы срабатывает система звукового и визуального оповещения	При выходе температуры за установленные пределы срабатывает система визуального оповещения	При выходе температуры за установленные пределы срабатывает система визуального оповещения

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов исследования использованы данные аудиторских проверок трех транспортных компаний Санкт-Петербурга и Москвы. Проверки проводились предприятием-изготовителем отечественных медицинских иммунобиологических препаратов в рамках оценки соответствия систем управления транспортных компаний правилам GDP. В процессе исследования использовались методы документального и статистического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных проверок показали, что ни одна из проверяемых компаний не соответствует требованию правил GDP в части, касающейся квалификации/валидации оборудования/процессов, а именно:

1. не проводится квалификация оборудования; в качестве оборудования, требующего проведения квалификационных испытаний, в данном случае выступает кузов авторефрижератора;
2. не проводится валидация маршрутов движения, по которым осуществляется транспортировка термолабильной продукции.

Кроме этого, ни одна транспортная компания не имеет утвержденного плана действий в чрезвычайных ситуациях. Две транспортные компании из трех не имеют документального подтверждения проведения обучения водителей, экспедиторов правилам работы с термолабильной лекарственной продукцией.

Проведение валидационных и квалификационных испытаний оборудования необходимо для более детального понимания процессов хранения, транспортировки, что хоть и косвенно, но все же позволит уменьшить вероятность возникновения чрезвычайной ситуации. Так, например, вероятность возникновения нарушения температурного режима в кузове авторефрижератора вследствие его неравномерного охлаждения можно минимизировать, проводя квалификационные испытания авторефрижератора.

Таким образом, несмотря на то, что в настоящее время действующее законодательство в области «холодовой цепи» не затрагивает вопросы необходимости квалификации и валидации оборудования и процессов, выполнение данных требований крайне важно для увеличения надежности цепи поставок. А увеличение надежности цепи поставок минимизирует риски возникновения нарушения требований «холодовой цепи» и, следовательно, риски порчи лекарственных препаратов.

В качестве требований, которые выполняются всеми исследуемыми транспортными компаниями, следует отметить:

1. наличие терморегистратора(ов) для непрерывного мониторинга температурного режима;
2. наличие документов, подтверждающих регулярную санитарную обработку кузова авторефрижератора;
3. наличие системы визуального оповещения при выходе температурного режима за установленные границы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод о неполной готовности транспортных компаний к введению правил надлежащей дистрибьюторской практики.

Для устранения несоответствий требованиям правил надлежащей дистрибьюторской практики предприятием-изготовителем был разработан пакет рекомендаций, включающий следующие мероприятия:

- проведение квалификационных испытаний авторефрижераторов;
- проведение валидации маршрутов движения;
- размещение терморегистраторов в местах наибольшего колебания температур;
- регулярная поверка/калибровка терморегистраторов (рекомендуемая частота проведения поверок – не реже 1 раза в год);
- проведение обучения персонала мерам и способам сохранения термолабильной продукции в процессе транспортировки, осуществления погрузочно-разгрузочных работ;
- разработка плана действий при возникновении чрезвычайных ситуаций в процессе транспортировки термолабильной продукции.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Руководство по GDP. Кому и почему выгодно препятствовать гармонизации? 2014. URL: http://www.apteka.ua/article/288857 (дата обращения 01.07.2016).
2. Н.С. Карташова. Инфраструктура промышленного сегмента фармацевтического рынка Санкт-Петербурга и Ленинградской области // Фармация. 2014. № 6. С. 28-31.
3. Pharmaceutical cold chain logistics is a $12.6-billion global industry. 2016. URL: http://pharmaceuticalcommerce.com/supply-chain-logistics/pharmaceutical-cold-chain-logistics-is-a-12-6-billion-global-industry/ (дата обращения 15.07.2016).
4. Industry Report. Global Controlled Room Temperature Logistics 2015. P. 3–4;
5. Надлежащая дистрибьюторская практика Евразийского экономического союза, версия 3.0 от 20.02.2015.

УДК 615.012; 339.138

РОЛЬ МАЛЫХ ИННОВАЦИОННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ В РАЗРАБОТКЕ ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ВЫВОДЕ ИХ НА РЫНОК

А.А. Семин[1]*, И.А. Наркевич[1]

Резюме. Возможности малых инновационных предприятий по выводу на рынок новой продукции заслуживают тщательного изучения в свете проблем, стоящих в настоящее время перед Россией: необходимости реиндустриализации и диверсификации экономики, импортозамещения при обеспечении конкурентоспособности отечественных производителей, повышения реальной занятости, снижения утечки квалифицированных кадров. Особенно актуально это для фармацевтической промышленности, как одной из самых наукоемких отраслей. В решении этих задач большую роль могут сыграть инновационные малые и средние предприятия, способные инициировать новшества, вести (самостоятельно или в партнерстве с более крупными компаниями) исследования и высокотехнологичные разработки, содействовать коммерциализации инноваций.

Ключевые слова: коммерциализация, лекарственное средство, малое инновационное предприятие, результат интеллектуальной деятельности.

THE ROLE OF SMALL INNOVATIVE ENTERPRISES IN THE DEVELOPMENT AND MARKET LAUNCH OF INNOVATIVE DRUGS

A.A. Semin[1]*, I.A. Narkevich[1]

Abstract. The features of new products market launch by small innovative enterprises are the theme for careful study. The reason is the problems that Russia has nowadays – the need for reindustrialization, the economic diversification and the import substitution for improving the competitiveness of domestic producers, the necessity for increase of real employment, the reduction of qualified personnel's leak. It acquires special relevance in the pharmaceutical industry as it is one of the most high-technology industries. The innovative small and medium-sized enterprises (SME) could play a big role in solving these problems, as they could initiate innovations, lead (alone or in a partnership with larger companies) high-technology research and development, promote the commercialization of innovations.

Keywords: commercialization, drugs, small innovative enterprises, the result of intellectual activity.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А

1 – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 14, Lit. A, Professora Popova str., St. Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: semin-aa@mon.gov.ru

ВВЕДЕНИЕ

Выполнение НИР и НИОКР требует определения верной стратегии и выбора соответствующей тактики в отношении интеллектуальной собственности, направленных на то, чтобы исключительные права на результаты интеллектуальной деятельности (РИД) стали источником дохода, в том числе при осуществлении экспортных поставок, при реализации новой продукции фармацевтической промышленности на внутреннем и внешнем рынках.

Доход от интеллектуальной собственности может быть получен в зависимости от вида, целей разработки и перспектив экономического использования за счет:

- использования РИД в собственном производстве;
- передачи прав на РИД в полном объеме, то есть на основе договора об отчуждении исключительных прав на РИД, уступки другому лицу права получения патента на РИД;
- передачи прав на РИД на основе лицензионного договора, залога исключительного права на РИД;
- осуществления с другими компаниями, в том числе конкурентами, кросс-лицензирования для получения легитимного доступа продуктов и технологий на существующие и новые рынки, технологического встраивания в существующие отраслевые цепочки создания продуктов;
- внесения права использования РИД или исключительных прав на РИД в уставные капиталы проектных компаний, в том числе малых инновационных предприятий (МИП).

Здесь необходимо отметить, что в краткосрочной перспективе фармацевтическая промышленность должна претерпеть существенные изменения, которые будут проходить эволюционно, но относительно быстро. Это другой тип промышленности, когда массовый характер носят не продукция в виде лекарств, а технологии и их реальное воплощение в оборудовании для создания этих лекарств.

Модель развития в этом случае формируется (сейчас это происходит в США) на основе новых биотехнологических, биоинформационных компаний, в основном на базе малых предприятий, имеющих тесное взаимодействие с университетами, центрами компетенций.

При этом повышение престижа учреждения за счёт создания успешных МИП является значимым фактором для учредителей, в то же время МИП заинтересованы в использовании «имени» учредителя.

ОФОРМЛЕНИЕ ПРАВ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Прежде чем приступать к созданию МИП при вузе или научной организации, необходимо выявить охраноспособные результаты в составе РИД, что является важным этапом трансфера технологии.

Нами рассмотрены две основные группы охраняемых РИД, которые наиболее характерны для правовой охраны продукции, создаваемой и используемой в фарминдустрии:

– объекты патентного права (изобретения, полезные модели, промышленные образцы),

– секреты производства (ноу-хау) как сведения конфиденциального характера.

Оформление патента на изобретение, промышленный образец и полезную модель и получение документа, удостоверяющего государственное признание права на эти объекты, а также приоритет, авторство и исключительное право на их использование, упрощает процесс трансфера технологий.

При этом в определенных случаях охрана в режиме ноу-хау является предпочтительней – например, если РИД не соответствует условиям патентоспособности, если невозможно проконтролировать и доказать использование технического решения конкурентом, когда отсутствуют достаточные средства на патентование (например, когда актуален вопрос об обеспечении защиты разработки в нескольких странах).

Крайне необходимо использование режима ноу-хау для защиты информации о разработке в период до подачи заявки на выдачу патента, выхода научной публикации и/или в целях защиты сопутствующей информации.

Ноу-хау также полезно для защиты РИД, права на который вносятся в качестве вклада в уставный капитал МИП таким образом, чтобы избежать предоставления преимуществ конкурентам, уже имеющим налаженное производство аналогичной продукции. Именно ноу-хау чаще всего вносят в уставный капитал МИП (рисунок 1).



Рисунок 1. Сведения о видах и доле результатов интеллектуальной деятельности, права на использование которых внесены в уставные капиталы хозяйственных обществ (хозяйственных партнерств) [1]

Для обеспечения правовой охраны РИД необходимо:

- Проанализировать целесообразность предоставления правовой охраны РИД, определяемую в том числе с учетом:
  - наличия финансовых средств на получение и поддержание охранных документов в силе;
  - востребованности РИД на рынке, в том числе за рубежом;
  - потенциальных направлений коммерциализации РИД и его особенностей;
  - закрепления за научной или образовательной организацией исключительных прав на перспективные технические (технологические) решения;
- Ограничивать доступ к информации о РИД и не допускать ее разглашения или опубликования до проведения анализа коммерческой ценности РИД и принятия решения о форме запрашиваемой

правовой охраны. В случае принятия решения о патентовании режим коммерческой тайны устанавливается для информации о РИД до публикации заявки;

- Определить порядок уведомления автором соответствующего подразделения научной или образовательной организации (уполномоченных должностных лиц) о созданных, потенциально охраноспособных РИД;
- Рассмотреть особенности процедуры оформления прав на РИД и возможные сроки предоставления правовой охраны, наличие альтернативных способов охраны РИД и достигаемую каждым из них степень охраны РИД, в том числе возможность пресекать нарушения исключительных прав;
- Выбрать оптимальный вариант охраны РИД, в том числе с учетом конкурентной среды и необходимости обеспечения комплексного подхода к правовой охране РИД, обеспечить подготовку и подачу заявок на выдачу патентов на РИД, способных к правовой охране в качестве изобретений, полезных моделей, промышленных образцов, их сопровождение, введение режима коммерческой тайны и другое;
- Обеспечить учет исключительных прав на РИД научной или образовательной организации (в том числе прав на РИД, приобретенных у сторонних организаций; государственный учет результатов НИОКР, выполняемых за счет средств федерального бюджета), в том числе бухгалтерский, актуализацию учетных данных, а также взаимодействовать с федеральными органами исполнительной власти по вопросам ведения реестров прав на РИД в соответствии с нормативными правовыми актами Российской Федерации.

ПРЕФЕРЕНЦИИ ДЛЯ МАЛЫХ ИННОВАЦИОННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ

В Российской Федерации порядок создания образовательными и научными учреждениями МИП определен статьей 103 Федерального закона от 29 декабря 2012 г. № 273-ФЗ «Об образовании в Российской Федерации» и статьей 5 Федерального закона от 23 августа 1996 г. № 127-ФЗ «О науке и государственной научно-технической политике».

Основной целью создания таких МИП является практическое применение (внедрение) РИД, исключительные права на которые принадлежат научным и образовательным организациям, являющимся бюджетными и автономными учреждениями (в том числе совместно с другими лицами). Такая форма коммерциализации прав на РИД позволяет организациям получать дополнительный доход, поступающий в их самостоятельное распоряжение.

Малые инновационные предприятия имеют следующие преференции:

1) предоставлено право создавать не только хозяйственные общества, но и хозяйственные партнерства;

2) сняты ограничения на доли в уставных капиталах хозяйственных обществ и складочных капиталах хозяйственных партнерств создаваемых МИП;

3) доходы от распоряжения долями или акциями в уставных капиталах хозяйственных обществ и вкладами в складочных капиталах хозяйственных партнерств поступают в самостоятельное распоряжение научного или образовательного учреждения;

4) дано право вносить в уставные и складочные капиталы права на результаты интеллектуальной деятельности, принадлежащие научному или образовательному учреждению совместно с другими лицами;

5) сняты ограничения на передачу неисключительных прав от МИП третьим лицам;

6) упрощена процедура заключения договоров аренды в отношении государственного или муниципального имущества научных и образовательных организаций без проведения конкурсов или аукционов в порядке и на условиях, определенных постановлением Правительства Российской Федерации от 12 августа 2011 г. № 677 (в рамках Федерального закона от 1 марта 2011 г. № 22-ФЗ);

7) предоставлена льготная ставка аренды: в первый год аренды МИП может платить 40% от размера арендной платы, ставка арендной платы составит 100% на четвертый год (постановление Правительства Российской Федерации от 12 августа 2011 г. № 677);

8) применяется упрощенная система налогообложения, в том числе введены пониженные тарифы страховых взносов: установлена ставка 14% до 2017 г. включительно.

Кроме того, созданные МИП могут участвовать в программах и проектах, поддерживаемых институтами развития и фондами поддержки научной, научно-технической, инновационной деятельности, включая ОАО «Российская венчурная компания», Фонд «Сколково», ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере», задачей которых является изыскание заинтересованных в использовании или внедрении различных разработок организаций и предприятий.

Одним из самых эффективных и привлекательных источников финансирования МИП является венчурное инвестирование, источниками которого в форме венчурных фондов могут выступать как государство, так и представители промышленных корпораций, частные инвесторы, пенсионные и страховые компании.

Таким образом, в настоящее время созданы благоприятные условия для коммерциализации результатов интеллектуальной деятельности с использованием МИП.

АНАЛИЗ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ МАЛЫХ ИННОВАЦИОННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ

По состоянию на конец 2016 года в базу данных занесены сведения о 2913 МИП, из них 106 МИП осуществляют деятельность в области медицины и лекарственных препаратов. Наибольшее количество МИП в виде хозяйственных обществ (хозяйственных партнерств) создали организации Минобрнауки России (78% от общего количества), Минсельхоза России (8%), ФАНО России (7%). При этом доля МИП, созданных подведомственными Минздраву России организациями, составляет всего около 3% [1].

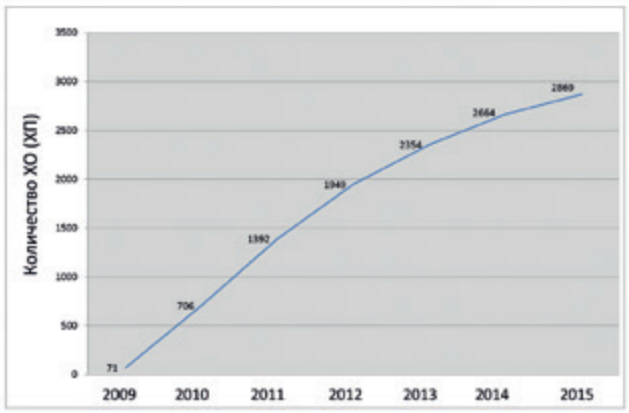


Рисунок 2. Динамика создания хозяйственных обществ (хозяйственных партнерств)

Проведенный анализ статистических данных о создании МИП показал, что число создаваемых по годам МИП уменьшается. Это говорит о том, что база учредителей, имеющая постоянную величину, в настоящее время достигла насыщения по генерации новых МИП. Эта база может дать до конца 2017 г. при наличии новых преференций, определенных законодательно, рост количества МИП не более 10–15% в год. Нужны новые инструменты и новые стимулы инновационной деятельности вузов и научных организаций.

При этом к драйверам роста потенциала МИП в области разработки инновационных лекарственных препаратов и вывода их на рынок можно отнести следующие:

- растущие расходы государства на закупку дорогостоящих препаратов по программам дополнительного лекарственного обеспечения;
- государственное финансирование программ импортозамещения биотехнологических лекарств;
- кластерная политика, способствующая развитию государственно-частного партнерства и привлечению зарубежных инвестиций;
- инвестиции институтов развития, позволяющие обеспечить финансирование молодых инновационных компаний, а также организовать трансфер зарубежных технологий;
- расширение национального календаря прививок, стимулирующее рост рынка вакцин;
- фокус на превентивную медицину, способствующий расширению сегмента лабораторной диагностики, включая создание новых диагностических систем, поиск новых биомаркеров;
- сохраняющийся высокий потенциал импортозамещения в биофармацевтике (антибиотики, гормоны, вакцины) [2].

В то же время ограничителями роста потенциала МИП в области разработки инновационных лекарственных препаратов и вывода их на рынок являются:

- положение, не позволяющее научным и образовательным организациям в качестве вклада в уставный (складочный) капитал МИП вносить исключительное право на РИД, что создает существенные риски как для самого предприятия, так и для потенциальных инвесторов, поскольку обладатель исключительного права может заключить лицензионные договоры на использование РИД с третьими лицами, что приведет к потере МИП конкурентного преимущества и поставит под угрозу реализацию инвестиционных проектов. Минобрнауки России предприняты законодательные инициативы и в Правительство РФ внесен соответствующий законопроект, которым предлагается дополнить возможности таких организаций по формированию уставного (складочного) капитала МИП внесением исключительного права на РИД в дополнение к имеющейся возможности внесения неисключительных прав, что соответствует международной практике создания малых инновационных предприятий;

- принятие нового порядка финансирования проведения этапа клинических исследований лекарственных препаратов [3], приведшее к тому, что из этого процесса полностью исключаются малые инновационные предприятия, созданные на базе НИИ и вузов (по разным оценкам, в научно-исследовательских институтах создается более 80% новых кандидатных лекарственных средств). Основной причиной этого является то, что выделяемая государством субсидия выдается на возмещение затрат. При этом обеспечить затраты из собственных средств или за счет привлечения кредитных ресурсов способны только крупные производственные предприятия. Таким образом, создан механизм, искусственно снижающий уровень конкуренции и создающий приоритеты только одному типу участников рынка разработчиков;
- отсутствие в России программ условной регистрации для ускорения доступа на рынок лекарственных средств, которые могут существенно повлиять на результативность терапии жизнеугрожающих и социально значимых заболеваний [4]. Косвенным эффектом применения условной регистрации является стимулирование разработчиков лекарственных средств к созданию новых эффективных препаратов за счет возможности более ранней коммерциализации разработок и соответственно становлению МИП. Практика регистрации лекарственных средств по предварительным (промежуточным) результатам клинических исследований предусмотрена законодательствами ЕС и США;
- неблагоприятная макроэкономическая и политическая ситуация, создающая риски при реализации инвестиционных проектов в России;
- устаревшая промышленная база отечественных фармкомпаний, не сертифицированных по GMP, существенно ограничивающая выпуск инновационных препаратов и вывод их на зарубежные рынки;
- высокая зависимость от импорта, например в области производства биотехнологических субстанций;
- недостаток квалифицированных кадров, отсутствие современных образовательных программ;
- существенный дефицит финансирования НИОКР;
- неясные правила локализации для иностранных биофармацевтических компаний, которые не стимулируют приток прямых иностранных инвестиций в экономику Российской Федерации;
- непрозрачный механизм государственных закупок вместе с отсутствием гарантированного сбыта – факторы, сдерживающие инвестиции частных компаний в разработки. Между тем в области биофармацевтики наличие спроса со стороны государства и механизма лекарственного страхования – основной драйвер роста для инновационных компаний;
- высокие логистические издержки и неразвитость таможенного регулирования, не позволяющие в короткий срок обеспечить поставки необходимого оборудования, материалов и реагентов;
- МИП, занимающиеся разработкой фармацевтической продукции, зачастую не в силах самостоятельно вывести на рынок новые лекарственные препараты, у них для этого нет необходимых финансовых средств, особенно в условиях, когда значительная часть потребностей российского рынка в медицинской продукции покрывается импортными лекарственными препаратами, конкурировать с которыми отечественный малый бизнес в большинстве случаев не в состоянии.

В этой связи необходим следующий комплекс первоочередных мер, способствующих беспрепятственному выводу на рынок инновационных лекарственных средств с использованием потенциала МИП:

- финансовая поддержка исследований и разработок, выполняемых МИП, с учетом особенностей динамики развития соответствующих проектов и уровня обеспеченности их частными инвестициями в рамках специальных программ, наподобие действующих в настоящее время в ЕС (Horizon´s 2020 SME Instrument [5]) и США (Small Business Technology Transfer [6]);
- финансовая поддержка инновационных проектов на продвинутых этапах, предваряющих выход новой продукции на рынок. Аналогом такой программы в ЕС является новая программа поддержки МСП – «Ускорение движения к инновациям» (Fast Track to Innovation pilot, FTI), запущенная в пилотном режиме в 2015 году [7];
- создание дополнительных механизмов финансовой поддержки через финансовых посредников, которые используют широкий спектр инструментов: беспроцентные или льготные кредиты, гарантии на кредиты, контргарантии, мезонинное (промежуточное) финансирование, венчурные инвестиции, акционерное инвестирование и др.;

- выделение средств на регистрацию лекарственных средств с включением соответствующего показателя в список основных, определяющих эффективность работы МИП;
- выделение средств на защиту РИД за рубежом (сегодня это реализовано только в Фонде «Сколково»: для защиты РИД за рубежом резидентам «Сколково» выделяются специальные гранты);
- интернационализация деятельности МИП за счет создания консультационных служб;
- проведение семинаров, вебинаров, обучающих программ, конференций по востребованным темам создания, ведения ХО (ХП);
- определение приоритетности поддержки МИП вузов со стороны региональных и муниципальных органов власти в сотрудничестве с учредителями и Минобрнауки России;
- введение специальных налоговых режимов (льготное налогообложение и/или налоговые каникулы) для инновационных предприятий, учитывающих, что коммерциализация РИД приносит доход не сразу, а по прошествии нескольких лет;
- упрощение процедуры согласования договоров аренды помещений и оборудования учредителями вузов/НИИ с целью повышения оперативности работы МИП, увеличения привлекательности сотрудничества с вузом и НИИ для бизнес-структур;
- ориентацияпри в первую очередь при формировании государственного заказа на разработки МИП;
- упрощение процедуры регистрации лекарственных препаратов, и в первую очередь дженериков. Существующие в США и ЕС схемы подразумевают достаточно быстрый вывод на рынок лекарственных препаратов, имеющих зарегистрированный аналог и соответствующих обязательным требованиям стандартов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, малые инновационные предприятия, созданные в научно-образовательной сфере для практического использования (внедрения) результатов интеллектуальной деятельности, могут являться существенной частью инновационной системы России. Однако важным фактором успешности МИП, особенно в области фармацевтики, является расширение различных государственных программ поддержки. Объективные оценки свидетельствуют о том, что осуществление программ помощи повышает уровень устойчивости малых фирм. Портфолио всех успешных программ поддержки малых предприятий в разных странах подтверждает тот факт, что в средне- и долгосрочной перспективе общественная отдача на государственные вложения в поддержку окупается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Учет и мониторинг малых инновационных предприятий научно-образовательной сферы. URL: https://mip.extech.ru/ (дата обращения 23.12.2016).
2. Письмо Минэкономразвития России от 23.12.2016 г. № 39789-ОФ/Д01и.
3. Постановление Правительства РФ от 1 октября 2015 г. № 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» государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» на 2013–2020 годы».
4. Письмо Минобрнауки России от 23.08.2016 г. № 1222/14.
5. Horizon´s 2020 SME Instrument // European Commission. Executive Agency for SMEs. 2015. URL: http://ec.europa.eu (дата обращения 27.12.2016).
6. SBIR/STTR. Frequently Asked Questions – General Questions // SBIR/STTR America´s Seed Fund. 2015. URL: http://www.sbir.gov (дата обращения 27.12.2016).
7. Fast Track to Innovation pilot (2015-2016) // European Commission. 2015. URL: http://ec.europa.eu (дата обращения 27.12.2016).

УДК 615.03

ОБЗОР ОСНОВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ПРАВИЛАХ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ (ПРИКАЗ ОТ 01 АПРЕЛЯ 2016 г. № 199н, ВВЕДЕННЫЙ ВЗАМЕН ПРИКАЗА МИНЗДРАВА ОТ 23 АВГУСТА 2010 г. № 708н)

М.С. Журавлева[1]*, М.В. Лебедева[1]

Резюме. В данной статье приведен обзор изменений в требованиях к процессам организации, планирования, порядку проведения и контроля качества доклинических исследований лекарственных средств, а также к оформлению их результатов и архивированию, утвержденных приказом Министерства здравоохранения РФ от 01 апреля 2016 г. № 199н.

Ключевые слова: надлежащая лабораторная практика, лекарственное средство, изменения, требования, обзор, доклинические исследования.

AN OVERVIEW OF THE MAIN CHANGES IN THE RULES OF GOOD LABORATORY PRACTICE (THE ORDER OF 01 APRIL 2016 № 199n ENTERED INSTEAD OF THE ORDER OF MINISTRY OF HEALTH OF 23 AUGUST 2010 № 708n)

M.S. Zhuravleva[1]*, M.V. Lebedeva[1]

Abstract. This article provides an overview of the changes in requirements, processes, organization, planning, conducting and quality control of preclinical studies medicines, as well as making their results and archiving, approved by order of Ministry of Health of the Russian Federation from 01 April 2016 N 199n.

Keywords: good laboratory practice, medicine, changes, requirements, review, preclinical studies.

1 – Независимый испытательный центр ООО «ОЛФАРМ», 117105, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 3А

1 – Independent testing center «OLPHARM», 3A, Nagatinskaya str., Moscow, 117105, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: juravleva@olpharm.ru

ВВЕДЕНИЕ

Согласно «Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации до 2025 года» одной из основных задач в области здравоохранения является контроль над получением эффективных и безопасных препаратов [1].

Все более пристальное внимание уделяется вопросу надлежащего контроля качества лекарственных средств, что обусловлено динамически изменяющимися международными подходами к оценке качества продукции, ужесточением требований национального и международного законодательства, а также интеграцией нашей страны в международное пространство. В этой связи возрастает роль соответствующей нормативной базы [2].

На современном рынке услуг в сфере анализа лекарственных препаратов для медицинского применения любая испытательная лаборатория соответствует или стремится соответствовать общепринятым правилам и стандартам.

Основная цель применения принципов GLP при проведении неклинических испытаний заключается в обеспечении высокого качества и надежности данных испытаний, связанных с безопасностью химических веществ и их соединений, содержащихся в лекарственных средствах, ветеринарных препаратах, пищевых и кормовых добавках, а также химических веществах промышленного назначения, в рамках гармонизации процедур тестирования [3].

Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (взамен приказа Минздрава от 23.08.2010 г. № 708н) введены измененные и дополненные правила организации проведения доклинических исследований (ДКИ) в целях гармонизации законодательства РФ с международными стандартами правил проведения лабораторных исследований лекарственных препаратов.

ОСНОВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ДОПОЛНЕНИЯ

Приказ № 199н вносит ряд важных изменений и пояснений в перечень требований к проведению доклинических исследований в испытательных лабораториях, в то же время большая часть правил остается аналогичной приказу № 708н и направлена на обеспечение еще большей надежности организации и проведения доклинических исследований.

В целях ознакомления с нововведениями предлагаем Вам сравнительный анализ приказов №№ 708н и 199н (таблица 1).

Таблица 1.

Изменения, внесенные в Правила надлежащей лабораторной практики

Изменения	Приказ № 708н	Приказ № 199н
Содержание	Выделено большее количество глав, последовательность этапов исследования в которых несколько нарушена	Число глав сокращено путем объединения их по тематике, но их изложение более последовательно: – требования к испытательной лаборатории и персоналу испытательной лаборатории, система обеспечения качества доклинических исследований; – проведение доклинических исследований; – оформление результатов доклинического исследования; – хранение документов и материалов доклинического исследования
Многоцентровое доклиническое исследование	Нет информации	Предусматривается, что фазы, этапы доклинического исследования могут проводиться на двух и более испытательных площадках, в том числе географически удаленных, организационно обособленных
Даты начала и окончания исследования	Не обозначены критерии начала и окончания доклинического исследования	Датой начала доклинического исследования является дата подписания руководителем доклинического исследования протокола (плана, программы) доклинического исследования, датой окончания доклинического исследования является дата подписания руководителем доклинического исследования заключительного отчета о проведенном доклиническом исследовании
Персонал	В ходе планирования и проведения ДКИ выделены роли руководителя организации, проводящей доклиническое исследование, ответственного исполнителя исследования и соисполнителей, а также группа специалистов организации для обеспечения независимого контроля качества ДКИ (группа контроля качества)	Введено понятие руководителя испытательной лаборатории, который обеспечивает комплекс мер, направленных на соблюдение персоналом настоящих Правил, по истечении срока хранения документов ДКИ уведомляет об этом организатора исследования, назначает лиц, ответственных за систему обеспечения качества, а также назначает руководителя доклинического исследования, ведущего исследователя и соответствующих по квалификации заданным целям исследователей
Стандартные операционные процедуры (СОП)	Ответственный исполнитель контролирует надлежащее выполнение утвержденных в организации стандартных лабораторных и производственных процедур. Нет указаний о процедуре утверждения СОП.	Руководитель испытательной лаборатории утверждает стандартные операционные процедуры. Руководитель испытательной лаборатории назначает лицо (лиц), ответственное за систему обеспечения качества испытательной лаборатории, в обязанности которого входит разработка стандартных операционных процедур, их своевременный пересмотр и доведение утвержденных СОП до сведения персонала испытательной лаборатории и систематическая проверка их соблюдения. Руководитель доклинического исследования обеспечивает представление исследователям стандартных операционных процедур, относящихся к доклиническому исследованию

Продолжение таблицы 1

Изменения	Приказ № 708н	Приказ № 199н
Сведения о соблюдении правовых и этических норм обращения с животными	Внесено как обязательный пункт отчета о результатах доклинического исследования с использованием животных	Нет информации о сведениях соблюдения правовых и этических норм обращения с животными
Уникальный идентификационный номер исследования	Есть указание о том, что образцы лекарственных средств, навески и другие материалы должны иметь индивидуальный шифр, позволяющий однозначно идентифицировать исследование, использовавшуюся тест-систему, методы, вид исследования, а также ссылку на ответственного исполнителя и соисполнителей	Внесено требование о присвоении уникального идентификационного номера каждому доклиническому исследованию
План и протокол исследования	Руководитель организации, проводящей доклиническое исследование, согласовывает план доклинического исследования. В плане доклинического исследования излагаются схемы и график проведения доклинического исследования (включая его этапы и части), описываются цели, задачи, методы (в том числе методы обобщения и оценки результатов), а также меры по обеспечению безопасности участвующих в нем животных. В протоколе доклинического исследования фиксируются действия, связанные с выполнением процедур доклинического исследования, осуществляемые в соответствии с утвержденным планом этого доклинического исследования. Ответственный исполнитель, организует и контролирует оформление протокола доклинического исследования и изменений к нему	Руководитель доклинического исследования утверждает протокол (план, программу) доклинического исследования. Доклиническое исследование проводится в соответствии с утвержденным руководителем исследования протоколом исследования, содержащим в том числе следующую информацию: а) сведения, идентифицирующие доклиническое исследование, исследуемое вещество; б) описание дизайна доклинического исследования, целей и задач доклинического исследования; в) описание исследуемого вещества; г) наименование и адрес организатора доклинического исследования; д) наименования и адреса участвующих в проведении доклинического исследования испытательных лабораторий, испытательных площадок; е) фамилии, имена, отчества (при наличии) и адреса руководителя доклинического исследования, ведущего исследователя, исследователей, принимающих участие в доклиническом исследовании; ж) планируемые даты начала и завершения доклинического исследования; з) подробное описание методов исследований, наименований тест-систем, используемых в доклиническом исследовании, с обоснованием их выбора, способы и пути введения исследуемого вещества, лекарственного средства (ЛС), методы статистической обработки. Изменения, дополнения в протокол исследования утверждаются руководителем исследования и приобщаются к протоколу исследования
Заключительный отчет о проведении ДКИ	В процессе проведения доклинического исследования ЛС ответственный исполнитель и соисполнители обеспечивают подготовку отчета о результатах доклинического исследования, включая заключение о возможности проведения в дальнейшем клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения. После окончания доклинического исследования отчет о его результатах утверждается руководителем организации, проводившей доклиническое исследование	Все данные, получаемые в ходе доклинического исследования, описываются исследователем в отчетах о проведении ДКИ с указанием даты составления такого отчета, фамилии, имени, отчества (при наличии) исследователя и проставлением подписи исследователя. Руководитель доклинического исследования подписывает заключительный отчет. Руководитель испытательной лаборатории назначает лицо (лиц), ответственное за систему обеспечения качества испытательной лаборатории, в обязанности которого входит проверка заключительных отчетов

Продолжение таблицы 1

Изменения	Приказ № 708н	Приказ № 199н
Валидация компьютеризированных систем	Нет информации	Валидацию компьютеризированных систем организует назначенное руководителем испытательной лаборатории лицо (лица), ответственное за разработку, валидацию, эксплуатацию и обслуживание компьютеризированных систем и имеющее соответствующую квалификацию, опыт и подготовку. Руководитель испытательной лаборатории обеспечивает контроль проведения валидации системы программного обеспечения. Руководитель доклинического исследования обеспечивает прохождение валидации компьютеризированных систем, используемых в доклиническом исследовании.
Хранение документов и материалов ДКИ	После завершения ДКИ все первичные данные, а также заверенные в установленном порядке копии плана и протокола доклинического исследования, отчета о его результатах и заключения группы контроля качества должны храниться в отдельных помещениях, специально выделенных для этих целей. Материалы ДКИ помещенные в архив, должны быть обозначены в соответствии с порядком хранения для быстрого поиска. Срок хранения архивных материалов определяется внутренним актом организации, проводящей доклинические исследования. Функции по архивированию и поддержанию архива должны быть возложены на специальных работников организации, проводящей доклинические исследования	Хранение документов и материалов ДКИ осуществляется в помещениях, имеющих режим ограниченного доступа и обеспечивающих конфиденциальность получаемых при доклинических исследованиях материалов и данных. К документам и материалам, подлежащим архивированию относятся: а) протокол исследования, исходные данные, пробы, образцы сравнения, отчеты о доклиническом исследовании; б) документы о проведенных проверках при проведении ДКИ; в) документы о квалификациях, обучении, опыте, должностные инструкции персонала испытательной лаборатории; г) документы и отчеты об использовании и калибровке оборудования; д) документы о валидации компьютеризированных систем; е) документы обо всех утвержденных, измененных, пересмотренных, отмененных стандартных операционных процедурах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из проведенного сравнительного анализа можно сделать вывод о более детализированном характере утвержденных требований приказа № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Определены новые единицы персонала, разграничивающие роли в контроле за проведением доклинических исследований, предусмотрена идентификация и маркировка документов и материалов исследования, подчеркнута значимость стандартных операционных процедур, являющихся элементом управления качеством исследований [4, 5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Минздрава России от 13.02.2013 № 66 (ред. от 07.04.2016) «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации».
2. А.В. Зажигалкин, О.В. Мезенцева, Д.О. Скобелев, А.А. Топорков, И.А. Косорукова. Применение нормативной базы как инструмент совершенствования деятельности в области контроля качества лекарственных средств и медицинских изделий // Вестник Росздравнадзора. 2015. № 3. С. 69–76.
3. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики.
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» (зарегистрирован Министерством юстиции Российской федерации 13 октября 2010 г., регистрационный № 18713).
5. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (зарегистрирован Министерством юстиции Российской федерации 15 августа 2016 г., регистрационный № 43232).
6. А.А. Крылатова, И.Е. Шохин, Е.П. Образцова, А.О.Монаенков. Опыт сертификации биоаналитической лаборатории согласно ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4(17). С. 216–219.

УДК 347.771

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СОКРИСТАЛЛЫ. ОСОБЕННОСТИ ОЦЕНКИ ПАТЕНТОСПОСОБНОСТИ

С.А. Синченко[1]*

Резюме. В связи с последними достижениями теоретической кристаллографии актуальным становится вопрос потенциала новых сокристаллов известных веществ как самостоятельных изобретений, а также вопрос оценки их новизны и изобретательского уровня. В данной статье автор постарался на основании сложившейся судебной практики проанализировать вопрос патентоспособности сокристаллов и выработать критерии, которые позволят с высокой долей вероятности рассчитывать на получение патента. Также автор приводит некоторые рекомендации по направлениям поиска новых сокристаллов.

Ключевые слова: сокристаллы, патентование.

PHARMACEUTICAL CO-CRYSTALLS. FEATURES OF ASSESING THE PATENTABILITY

S.A. Sinchenko[1]*

Abstract. In connection with the latest achievements of the theoretical crystallography the question of a potential patentability of new co-crystals of the known substances, as well as the estimation of their novelty and inventive step, becomes more and more relevant. In this article the author, basing on existing legal precedents, tries to analyze the question of patentability of co-crystals and to elaborate criteria, which help to increase chances for the patent granting. In addition, the author gives some recommendations with regard to the search directions for the new co-crystals.

Keywords: co-crystals, patenting.

1 – ООО «Кастальский и партнеры. Патентно-правовая группа», 119180, Россия, г. Москва, ул. Большая Полянка, д. 7/10, стр. 1, офис В35

1 – «Kastalskiy and partners. Patent law group», B35, 1, 7/10, Bolshaya Polyanka str., Moscow, 119180, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: semensinchenko@gmail.com
Тел.: 8 (495) 663 99 36

ВВЕДЕНИЕ

Очень часто при разработке новых лекарственных средств оказывается так, что активные ингредиенты этих средств (active pharmaceutical ingridient, API), которые обладают биологической активностью и на разработку которых, по последним оценкам, фармацевтические компании тратят суммы порядка миллиардов долларов, оказываются неприменимы в «чистом виде».

Возможны ситуации, когда полученная форма API является или слишком токсичной, или недостаточно устойчивой. Можно привести в качестве примера 4-аминопиридин, от момента открытия которого до начала промышленного изготовления и использования при лечении рассеянного склероза прошло порядка 25 лет, потраченных на поиск подходящей формы препарата.

Существуют различные пути решения таких проблем. В некоторых случаях удается обнаружить иную, более подходящую форму API. Когда-то возможно подобрать применимую соль. Другим вариантом могут стать сокристаллы – соединения двух или более компонентов, которые образуют уникальную кристаллическую структуру с уникальными свойствами [1]. Сокристаллы подразделяют на несколько видов: сольваты и их частный случай – гидраты, а также клатраты.

Согласно современным оценкам из известных API порядка 38% образуют гидраты и порядка 32% образуют сольваты [2].

С другой стороны, поиск новой формы API, новой соли API или поиск способов синтеза сокристаллов API является достаточно трудоемкой задачей. Ранее подобный поиск проводился фактически вслепую, на основании аналогий и предположений, однако в свете последних достижений в области теоретической кристаллографии можно предвидеть скорый прорыв в решении этого вопроса. Современные компьютерные системы поиска и предсказания кристаллических структур [3–5] значительно упрощают поиск устойчивых сокристаллов различных соединений, при этом поиск даже очень сложных структур осуществляется за конечное время порядка суток или даже часов. И сейчас все чаще звучат предложения использовать такие поисковые системы именно для создания новых форм уже известных лекарственных средств. Так, российскими учеными из лабора-

тории МФТИ на конференции «Future of Biomedicine 2015», проходившей во Владивостоке в сентябре 2015-го года, был сделан доклад о том, что им удалось предсказать и синтезировать кристаллы гидрата 4-аминопиридина.[1]

В то же время мотивы поиска новых сокристаллов могут быть различными. Так, некоторые занимаются поиском сокристаллов, рассчитывая на возможность обойти существующие патенты и выпустить дженерик, обеспечив потребность наиболее бедной части населения. На упомянутой конференции руководитель научной группы МФТИ Валерий Ройзен сказал, что «вторая причина [по которой мы занимаемся сокристаллами – *прим. автора*] состоит в неопределенном юридическом статусе подобных соединений, что позволяет обходить существующие патенты и, как следствие, производить дженерики, дешевые аналоги существующих лекарств».

С другой стороны, создатели оригинальных API и патентодержатели – транснациональные фарамацевтические корпорации ищут сокристаллы своих API для получения новых патентов и продления правовой охраны, т.н. evergreening [6, 7].

В связи с этим на первый план выходят вопросы, связанные с получением правовой охраны на новые кристаллические формы соединений, оценка новизны, а главное – изобретательского уровня новых сокристаллов известных API.

Вопрос оценки новизны и изобретательского уровня подобных соединений является относительно новым и специально не регламентирован какими-либо инструкциями или нормативными актами, то есть регламентированы лишь общие моменты. В связи с этим основным источником информации в этом случае становится имеющаяся на сегодня судебная практика. Рассматриваются только решения высших судебных инстанций, как имеющие наибольшее значение и наибольший авторитет.

К сожалению, в России и в мире еще не сложились устойчивые подходы в отношении патентования гид-ратов и сольватов. Однако существует сложившаяся практика оценки патентоспособности солей, а также полиморфных модификаций известных API. Далее попытаемся дать обзор наиболее известных и значимых судебных решений в российской и зарубежной практике.

СУДЕБНАЯ ПРАКТИКА

Первое дело, которое хотелось бы рассмотреть, – это дело[2] о полиморфных модификациях гидрохлорида ранитидина (Zantac) между британским фармацевтическим гигантом Glaxo и канадским производителем дженериков – компанией Novopharm. Для справки: полиморфные модификации – это различные кристаллические структуры одного и того же вещества [8]. К слову, по статистике [2], полиморфизм присущ от 25 до 80% всех известных соединений, в том числе и лекарственных средств. Этот вопрос не связан напрямую с сокристаллами, однако важен для полноты анализа. Выводы, сделанные судьями в процессе рассмотрения дела, могут быть распространены и на сокристаллы.

Гидрохлорид ранитидина (далее – RHCl) охранялся патентом US 128658. Однако на момент открытия данного вещества ученым компании Glaxo не было известно, что RHCl был присущ полиморфизм: он может существовать в двух формах – Form 1 RHCl и Form 2 RHCl. После открытия Form 2 RHCl, которая оказалась более приемлемой для коммерциализации, был получен второй патент – US 4521431, в котором была описана Form 2 RHCl через 29 пиков ИК-спектроскопии, а также новый способ для получения Form 2 RHCl.

В 1991 году компания Novopharm подала заявку ANDA[3] в FDA[4] на производство и реализацию Form 2 RHCl, однако получила отказ. Тогда компания подала заявку на производство Form 1 RHCl. Однако в этом случае представители Glaxo заявили, что это недопустимо и нарушает ‘431 патент. Они аргументировали это тем, что, как уже было известно на тот момент, при производстве Form 1 RHCl способом, описанным в ‘658 патенте, неизбежно получается некоторое количество Form 2 RHCl.

Стоит пояснить, что особенностью Form 1 RHCl и самого первоначального способа ее получения (патент ‘658) являлось то, что при ее получении способом, описанным в ‘658 патенте, получалось вещество, которое содержало также и Form 2 RHCl. В принципе такая ситуация, как сейчас уже выяснено, является стандартной для полиморфов. Так, можно привести в пример такие, ныне известные, соединения, как Nabumetone, при получении которого получается 20% метастабильной формы и 80% стабильной формы; Metformin, при производстве которого получается 16% микстуры (не твердого тела), 45% метастабильной формы, 45% стабильной формы; Acetaminophene, порядка 7500 экспе-

---

[1] Российские ученые впервые предсказали структуры сокристаллов лекарств, Материалы портала «Научная Россия», 15 сентября 2015 г.

[2] Glaxo, Inc., and Glaxo Group Limited, Plaintiffs-Appellants, v. Novopharm, LTD., Defendant-Appellee., 110 F.3d 1562 – April 4, 1997. URL: https://law.resource.org/pub/us/case/reporter/F3/110/110.F3d.1562.96-1466.html (дата обращения 20.01.2017).

[3] ANDA – Abbreviated New Drug Application.

[4] United States Food and Drug Administration (аналог российского Министерства здравоохранения в части выдачи удостоверений о регистрации лекарственных средств).

риментов получения которого дали 9% применимых образцов, которые содержали 4% кристаллической формы II, а остальное составляла кристаллическая форма I.

Тогда компания Novopharm скорректировала свою ANDA, указав, что планирует производство не более 10% Form 2 RHCl, подала иск о ненарушении, а также попыталась оспорить '431 патент на основании несоответствия его критерию «новизны».[1] Так, по мнению Novopharm, раз '658 патент позволял получать Form 2 RHCl, то это делает данную форму известной, а '431 патент – выданным неправомерно.

Суд первой инстанции, рассмотрев возражение Novopharm против выдачи '431 патента, не нашел в описании патента '658 способ, приводящий к получению Form 2 RHCl, но нашел способ, приводящий к получению любой кристаллической формы RHCl. На основании этого суд заключил, что '658 патент не порочит новизну '431 патента. Касательно возможности нарушения '431 патента при производстве Form 1 RHCl суд заключил, что в патенте '431 речь идет лишь о Form 2 RHCl. Далее суд сказал, что, даже если предположить, что смеси Form 1 и Form 2 RHCl нарушают патенты, Glaxo не доказало это. Апелляционный суд поддержал это решение, и компания Novopharm получила разрешение производить Form 1 RHCl при условии, что доля Form 2 RHCl не превысит 10%.

Это дело стало одним из первых дел подобного рода. Можно также увидеть в нем искусственное ограничение попыток создания вечнозеленых патентов – необоснованного продления срока охраны изобретения [6] и попыток получения охраны на предшествующий уровень техники, т.е. общедоступные решения.

Другой интересный прецедент – дело[2], касающееся амлодипина (Norvasc), между американской компанией Pfizer и крупнейшим канадским производителем дженериков Apotex. В этом деле речь идет о солях, однако оно также важно для полноты исследования вопроса статуса сокристаллов. Для справки: по определению, которое дает «Золотая книга «IUPAC», соли – химические вещества, которые состоят из катионов и анионов [9].

Амлодипин был открыт в 1982 г. в английской лаборатории Pfizer, после чего в 1986 году был получен патент US 4572909. Планировалось по определенным причинам использовать соли амлодипина, причем в качестве основной соли был выбран малеат амлодипина. В формуле '909 патента было при этом указано, что испрашивается охрана в том числе на «фармацевтически применимую соль кислоты и амлодипина». В описании был приведен открытый список таких солей, который однако не включал в себя явным образом бензосульфонат.

Проведенные далее испытания выявили ряд проблем с использованием малеата. Малеат амлодипина отлично подходит для изготовления капсул, но вот с производством на его основе прессованных таблеток (которые выгоднее) возникли трудности. Причина этого – его крайне высокая твердость, которая затрудняла постановку штампов на таблетки. В процессе поиска решения проблемы ученые Pfizer нашли другую приемлемую соль – бензосульфонат амлодипина, который обладая приемлемой твердостью был даже стабильнее малеата. В 1989 г. был получен второй патент US 4879303, уже на бензосульфонат амлодипина.

В 2006 году компания Apotex попыталась оспорить действие '303 патента на основании его очевидности для специалиста. По мнению канадцев, патент '909 указывает на возможное применение любых солей, в то время как из ряда источников [10] известно применение солей бензосульфоната в фармацевтике. И если суд первой инстанции встал на сторону Pfizer, то в апелляционном суде патент '303 был признан очевидным для специалиста. Приведем важную для дальнейшего исследования цитату судей:

«...Pfizer забраковал малеат амлодипина не потому, что тот не смог показать адекватное сочетание растворимости, pH... но потому, что он не был простым для производства, из-за твердости... Как максимум, Pfizer проводил рутинные проверочные исследования для поиска оптимальной соли... для упрощения коммерческого производства и продажи таблеточной формы лечебного амлодипина. Создание «продукта или способа, который предпочтительней, потому что сильнее, дешевле, чище... или лучше в других характеристиках... для повышения эффективности коммерческого использования... есть поведение универсальное и присущее всем» (DyStar, 464 F.3d at 1368). Бензосульфонат амлодипина является очевидным на основании того факта... что любая другая потенциальная соль амлодипина... может решить проблему твердости малеата амлодипина. Факт, что бензосульфонат амлодипина оказался лучшим... на самом деле не доказывает ничего, кроме рутинной оптимизации, которая очевидна для специалиста в данной области».

---

[1] Если говорить более точно, то иск заявлял о том, что '431 патент не новый, не имеет силы (выдан с нарушениями) и не нарушается. Такая непривычная постановка вопроса является практически стандартом для США, где подаются такие «тройные иски».

[2] Pfizer, Inc., Plaintiffs-Appeleee v. Apotex Inc. (formerly know as TorPharm, Inc.), Defendant-Appellant, 480 F.3d 1348 – March 22, 2007 (https://law.resource.org/pub/us/case/reporter/F3/480/480.F3d.1348.2006-1261.html).

Подобного рода прецеденты известны и в российской практике. Так, в 2016 г. был окончательно оспорен[1] патент на гемисульфат абакавира.

Абакавир (Abacavirum) охранялся патентом EP 0434450. Компанией ViiV Healthcare был получен евразийский патент EA 001809 на гемисульфат абакавира (двухосновную соль серной кислоты). Основным аргументом для оспаривания стала известность абакавира и его солей из патента '450, а также известность применения двухосновной серной кислоты для получения фармацевтически приемлемых солей. При этом в описании к патенту '809 не были подтверждены какие-либо преимущества именно гемисульфата перед другими солями, что позволило суду сделать вывод об очевидности патента '809.

Непосредственное отношение к сокристаллам имеет дело[2] между уже упоминавшимися британской GSK[3] и канадской компанией Apotex вокруг мощного антидепрессанта пароксетина[4] (Paxil).

Пароксетин был разработан в конце 1970-х годов и был запатентован (патент США US 4007196). В '196 патенте раскрывается пароксетин, его соли и его биологическая активность – свойства подавления тяжелой панической депрессии. Также были разработаны способы производства гидрохлорида пароксетина (PHC). В 1985 г. химик лаборатории GSK обнаружил новую кристалличскую форму PHC, когда работал над улучшением препарата. Новая форма являлась полугидратом PHC в противоположность ангидрату PHC, которым являлся оригинальный препарат. Полугидрат PHC представлял собой сокристалл воды и PHC, в котором каждая молекула воды была связана с двумя молекулами PHC. Новая форма обладала большей стабильностью и была проще для производства. На новую форму был получен патент US 4721723.

В 1998 году компания Apotex подает в FDA ANDA на свой дженерик пароксетина. В качестве API в заявке Apotex был указан ангидрат PHC, описанный в '196 патенте. Тогда же и начался судебный процесс, в котором были рассмотрены вопросы нарушения компанией Apotex '723 патента, а также патентоспособности '723 патента.

Ученые GSK с привлечением «теории исчезающих полиморфов» [11] показали, что ангидрат, который хочет производить Apotex, будет трансформироваться в полугидрат под воздействием влажности, давления и практически всегда присутствующих частиц полугидрата. По мнению британцев, ангидрат PHC был получен в лаборатории случайно, в нестабильной форме. Также они заявили, что с появлением полугидрата PHC старый полиморф PHC ангидрат исчез в своем чистом виде и теперь заменен на новый полиморф PHC полугидрат. Доводы представителей Apotex сводились к тому, что раз ангидрат PHC преобразуется в полугидрат, то при клинических испытаниях ангидрата по '196 патенту неизбежно должен был быть получен и полугидрат, а значит, клинические испытания являются данными об открытом использовании полугидрата и порочат новизну '723 патента.

Раздельным (не единогласным) решением судей апелляционный суд постановил, что действительно '196 патент не раскрывает полугидрат PHC, а также нет никаких объективных данных, что патент вообще когда-либо практиковался. Однако суд счел доказанным, что '196 патент раскрывает с неизбежностью способ, при реализации которого получается некоторые, пусть и недетектируемое, количество полугидрата PHC, а значит, это делает '723 патент не отвечающим критерию новизны.

Наиболее интересными, на наш взгляд, являются следующие утверждения судей.[5]

«Несмотря на всю сложность вопроса, анализ прост. Изобретения, впервые синтезированные в лаборатории, могут быть запатентованы в соответствие с §101. Процессы получения таких синтетических продуктов и/или процессы их использования также имеют право на патентную защиту в соответствии с §101. Однако процессы естественного воспроизведения, включая сексуальные, не сексуальные, цепные реакции или процессы распада, не могут получить па-

---

[1] Постановление СИП по делу СИП-225/2015 от 21.01.2016 г. ViiV Healthcare UK Limited v. «Фармасинтез». URL: http://kad.arbitr.ru/PdfDocument/6c4a6f78-739d-486e-9956-91228cfa9ac3/SIP-225-2015_20160121_Reshenija%20i%20postanovlenija.pdf (дата обращения 20.01.2017).

[2] SmithKline Beecham Corporation and Beecham Group, P.L.C., Plaintiffs-Appellants, v. Apotex Corp., Apotex, Inc., and TorPharm, Inc., Defendants-Cross Appellants., 403 F.3d 1331 – April 8, 2005. URL: https://law.resource.org/pub/us/case/reporter/F3/403/403.F3d.1331.03-1313.03-1285.html (дата обращения 20.01.2017).

[3] И Glaxo Inc. и SmithKline Beecham и GlaxoSmithKline – в сущности части одной большой корпорации. В настоящей статье вся корпорация сокращенно называется GSK.

[4] С этим препаратом связан также один из крупнейших в истории США (и один из крупнейших в мире) скандалов о недобросовестном проведением клинических испытаний – препарат приводил к повышению вероятности самоубийств, а также вызывал очень сильное привыкание. При этом, по результатам части последующих исследований, препарат оказался эффективен в лечении депрессий не более, чем плацебо.

[5] Вывод характерен для американской патентной системы, так как именно в США законодательно запрещено патентование «Законов природы» и «Природных явлений». Однако данный вывод, помимо прочего, выглядит очень разумным и может быть применен и в других юрисдикциях.

тентную защиту в соответствии с §101 (Chakrabarty, 447 U.S. at 309, 100 S.Ct. 2204; Funk Bros., 333 U.S. at 130, 68 S.Ct. 440). Объекты, полученные одним из вышеперечисленных естественных процессов, будь то неорганическая структура или жизненная форма, в силу очевидного факта также не должны быть объектами, которым может быть предоставлена охрана в соответствии с §101.

Это приводит к неизбежному выводу, который большинство относит к вопросу объема притязаний, а не патентоспособности. Если бы GSK заявляла права на «синтетический полугидрат PHC», то такая заявка покрывала бы лишь патентоспособные объекты и Apotex имел бы возможность утверждать ненарушение патента. Если бы GSK заявляла права на кристаллы, полученные в результате «естественного процесса преобразования», то такая заявка была бы явно непатентоспособной в соответствии с §101: хотя заявленное вещество является применимым и получаемым, оно было бы произошедшим естественно (Chakrabarty, 447 U.S. at 309, 100 S.Ct. 2204; Funk Bros., 333 U.S. at 130, 68 S.Ct. 440)... Пункт 1 формулы, как он заявлен, содержит комбинацию патентоспособного и не патентоспособного вещества и не является допустимым согласно §101».

Еще одним прецедентом, который будет рассмотрен, является дело[1] между упоминавшейся GSK и группой производителей дженериков. Дело развернулось вокруг патента US 5565467 на дутастерид (Avodart, также известен как Jalin).

Не приводя длительного описания данного дела, можно указать его основной вывод и интерес для настоящего исследования – в формуле изобретения допускается[2] применение фразы «фармацевтически приемлемые сольваты», являющейся некоторой аналогией фразы «фармацевтически приемлемые соли».[3] Обобщая этот вывод, можно заключить, что допустимо даже применение фразы «фармацевтически приемлемые сокристаллы».

По словам судей апелляционного суда:

«Нет причины, по которой специалист в данной области не поверит патентообладателю сольватов только лишь потому, что патентообладатель не раскрывает все сольваты, образованные всеми процессами сольватации».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно указать, что в соответствии с американской судебной практикой[4] сокристалл известного API будет однозначно патентоспособным и неочевидным для специалиста лишь в том случае, если он позволяет достичь какого-либо терапевтического эффекта в сравнении с оригинальным препаратом. Под таким эффектом может пониматься не только непосредственно повышение всасываемости или увеличение биоактивности, но и, например, улучшение стабильности. Однако улучшение стабильности (или другой «физической» характеристики) будет признано неочевидным, если низкая стабильность оригинального API делала невозможным его использование. По нашему мнению, такой подход является наиболее оптимальным для избежания патентования новых сокристаллов, которые, по сути, не дают ничего нового и не вносят какого-либо вклада в уровень техники.

К вопросу об опасности использования сокристаллов для необоснованного продления правовой охраны API можно отметить, что в соответствии с американской судебной практикой[5] недопустимо заявлять права на то, что получено естественным путем, в результате эволюционных процессов или процессов естественного распада. Данный подход видится нам совершенно правильным, так как исключает возможность получения охраны на предшествующий уровень техники, а также сужает возможности злоупотреблений – патентного троллинга. Несмотря на то, что вывод характерен для американского законодательства, он видится вполне разумным и его применение возможно и в других юрисдикциях.

Можно отметить также, что для защиты от недобросовестных действий конкурентов создателю нового API лучше заявить охрану не только на само вещество, но и на все его фармацевтически приемлемые сокристаллы.

В то же время нельзя не отметить, что вопрос оценки патентоспособности сокристаллов, а главное, оценки их изобретательского уровня в России практически не регламентирован. Не известна и судебная практика. Это создает существенные риски для недобросовестного использования возможности патенто-

---

[1] GlaxoSmithKline LLC (formerly known as SmithKline Beecham Corporation),Plaintiff-Appellee, v. Banner Pharmacaps, Inc. and Impax Laboratories, Inc., Defendants-Appellants, and Roxane Laboratories, Inc., Defendant-Appellant, and Mylan Inc. and Mylan Pharmaceuticals Inc., Defendants-Appellants, and Watson Laboratories, Inc. Florida, Defendant-Appellant. Nos. 13-1593, -1594, -1595, -1598 (Fed. Cir.) – February 24, 2014. URL: http://caselaw.findlaw.com/us-federal-circuit/1658181.html (дата обращения 20.01.2017).

[2] Судами США. Подобные случаи в российской практике не известны. Однако мы не видим здесь каких-либо препятствий.

[3] Фраза «фармацевтически приемлемые соли» стала уже неким стандартом в патентовании.

[4] В России подобные прецеденты, которые дошли бы хотя бы до Суда по интеллектуальным правам, не известны.

[5] В России подобные прецеденты, которые дошли бы хотя бы до Суда по интеллектуальным правам, не известны. Более того, как указывалось, вывод суда в деле Smith Kline v. Apotex характерен исключительно для американской системы.

вания сокристаллов или необоснованного продления правовой охраны лекарственных средств.

В заключение можно кратко резюмировать все вышесказанное и дать некоторые рекомендации.

Сокристаллы уже известных API могут быть патентоспособными самостоятельными изобретениями, однако при ряде условий. Так, сокристалл должен быть предпочтительнее для применения по каким-либо характеристикам, нежели оригинальный препарат. То есть обязательно должно быть подтверждено достижение технического результата, заключающегося в улучшении фармацевтических характеристик API, входящего в сокристалл. При этом патент на сокристалл не должен никаким образом охранять любые модификации API, которые могут быть получены естественным путем (например, путем естественного распада или самопроизвольных химических реакций).

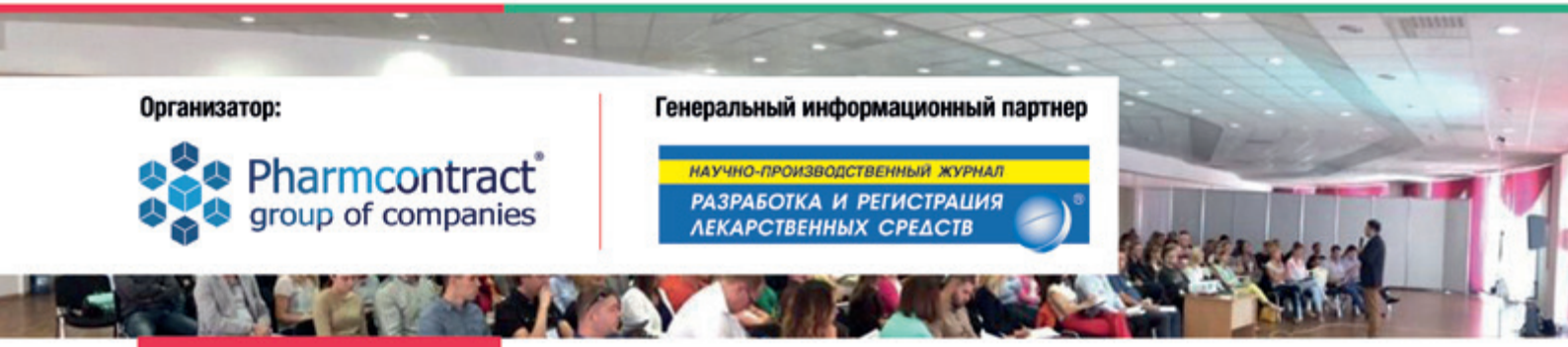
Таким образом, можно рекомендовать исследователям вести поиск новых сокристаллов не любых API, но тех API, применение которых в чистом виде затруднено по причинам их низкой стабильности, недостаточной биологической активности или высокой токсичности. В то же время выбор API лишь по принципу наибольшей финансовой привлекательности или общественной важности не рекомендуется.

ЛИТЕРАТУРА

1. G.P. Stahly. Diversity in single-and multiple-component crystals. The search for and prevalence of polymorphs and cocrystals // Crystal Growth & Design. 2007. T. 7. №. 6. С. 1007–1026.
2. J. Lindeman et al. Predictability in Solid State Chemistry and Patents // AIPLA Webinar. 2011.
3. A. Oganov. Discovering new materials and new phenomena with evolutionary algorithms // APS Meeting Abstracts. 2016.
4. H. Wang et al. CALYPSO structure prediction method and its wide application // Computational Materials Science. 2016. V. 112. P. 406–415.
5. T.F.T. Cerqueira et al. Materials design on-the-fly // Journal of chemical theory and computation. 2015. V. 11. №. 8. P. 3955–3960.
6. T.A. Faunce. The Awful Truth About Evergreening // The Age. 2004. P. 18–23.
7. А.В. Михайлов, Т.В. Сергунина. Иск о ненарушении исключительных прав для устранения неясности границ исключительных прав патентообладателя и исключения злоупотребления правом // Журнал Суда по интеллектуальным правам. 2016. № 13. С. 38–77.
8. А. Верма и др. Полиморфизм и политипизм в кристаллах. – М. 1969. 328 с.
9. A. Wilkinson, A. McNaught. IUPAC Compendium of Chemical Terminology (the «Gold Book»). 1997. 218 p.
10. S.M. Berge, L.D. Bighley, D.C. Monkhouse. Pharmaceutical salts // Journal of pharmaceutical sciences. 1977. V. 66. №. 1. P. 1–19.
11. J.D. Dunitz, J. Bernstein. Disappearing polymorphs // Accounts of chemical research. 1995. V. 28. №. 4. P. 193–200.

СЕМИНАР

Аналитическая экспертиза и современные методы контроля качества лекарственных средств и продуктов питания



Организатор: Pharmcontract group of companies

Генеральный информационный партнер НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

11 апреля
с 14.00 до 17.00
г. Москва,
КВЦ «Сокольники»,
павильон 7а3

Участие в семинаре БЕСПЛАТНОЕ!

В рамках семинара известные ученые и эксперты поделятся опытом интеграции современных методик в процесс контроля качества и безопасности лекарственных средств, продуктов питания, кормов для животных.

Представители известнейших на российском рынке производителей аналитического оборудования дадут рекомендации по организации лабораторий в соответствии со стандартами GLP.

Изюминкой семинара станут кейсы по биоаналитическим методикам и R&D биопродуктов.

По вопросам участия обращайтесь в Пресс-службу ГК «Фармконтракт» по тел.: **+7 (495) 252-00-98** или по e-mail: **infopress@phct.ru**

УДК 614.27; 615.11

О РОЛИ ГАЛЕНА В ФАРМАЦИИ

К.С. Гузев[1]*

Резюме. В работе представлены литературные данные об истории появления термина «галеновые препараты» и вкладе К. Галена в становление и развитие фармации. Источником информации служили материалы, опубликованные в отечественной и зарубежной литературе. Описаны некоторые рецепты лекарственных препаратов, применяемых Галеном в своей практике. Обсуждены технологические приёмы и наиболее часто применяемые лекарственные средства. На конкретных примерах показаны знания и опыт Галена в области фармации.

Ключевые слова: Гален, римский врач, филосов, галеновые препараты, история медицины и фармации.

GALEN AND KNOWLEDGE OF PHARMACY

K.S. Guzev[1]*

Abstract. The paper presents the literature data on the occurrence of the term «Galenic medicines» and the contribution of K. Galen in the formation and development of pharmacy. The source of information were the materials published in domestic and foreign literature. We describe some of the recipes for medicines used by Galen in his practice. Discussed technological techniques and the most frequently used drugs. Specific examples are shown the knowledge and experience of Galen in the field of pharmacy.

Keywords: Galen, a Roman physician, philosopher, Galenic medicines, the history of medicine and pharmacy.

1 – ЗАО «Ретиноиды», 111123, Россия, г. Москва, ул. Плеханова, д. 2/46, стр. 5

1 – JSC «Retinoids», bldg. 5, 2/45, Plekhanova str., Moscow, 111123, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: guzev3@yandex.ru

ГАЛЕНОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Для того, чтобы перейти к истории появления термина «галеновые препараты» и установлению конкретной роли Галена в развитии фармацевтической науки, необходимо ненадолго углубиться в эпоху Средневековья.

Известно, что термин «галеновые препараты» ввёл немецкий врач эпохи реформаторства Парацельс. В переводе с латинского это слово означает «выше Цельса» или «рядом с Цельсом». Таким образом, Парацельс – это не настоящее имя учёного, а псевдоним (модное веяние в середине XV–XVII в.). Настоящее имя Парацельса – Филипп Ауреол Теофраст Бомбаст фон Гогенгейм (von Hohenheim). Не касаясь его биографии подробно, необходимо сказать, что это был очень своеобразный человек, о котором сами немцы высказывали противоречивые мнения. Так, Г. Гезер пишет: «Парацельс является решительным приверженцем борьбы против существующего порядка в области медицины. Свои лекции в университете он читал по-немецки и начал свою работу с того, что публично, в аудитории перед студентами сжёг сочинения Галена и Авиценны, объявив, что «ремни его башмаков смыслят в медицине более, чем оба эти врача». Основу его теории составляет терапия, которая должна помогать природе – свежему воздуху, душевному покою, вину, посту и молитве. Парацельс большое внимание уделяет веществам, которые своими «скрытыми силами» возбуждают целительную силу природы, тушат или уничтожают «сем» болезни. Парацельс весь свет называет «аптекой», а Бога – «верховным аптекарем». Важнейшими лекарственными субстанциями Парацельс считает металлические препараты, эссенции и тинктуры из растений, главным образом опия [1]. Другие авторы, в частности Т. Мейер-Штейнег и К. Зугдоф, довольно высоко оценивая вклад Парацельса в медицину, не упоминают о его сильном стремлении реформировать все медицинские знания [2]. Но одно остаётся неизменным: основной заслугой Парацельса историки медицины как XIX в., так и века XX считают внедрение в лечебную практику химии [1–4]. Оценив влияние на организм различных металлов и отметив, что растения действуют лишь некоторыми своими составными частями, применив химические основы в лечении болезней, Парацельс посеял зародыши современной фармакологии» [5].

Интересна судьба выбранного псевдонима. Точно неизвестно, когда Теофраст взял себе звучный псевдоним Парацельс. Так, К. Сухомлинов отмечает, что в 1526 году, когда Теофраст начинает заниматься врачебной деятельностью в

Страсбурге, он уже называет себя Парацельсом. Тогда ему было 32 года [6]. В то же время Т. Мейер-Штейнег и К. Зугдоф утверждают, что псевдоним Парацельс взял себе гораздо раньше – около 1513 года, т.е. в возрасте 20 лет, когда обучался в Италии в городе Ферраре [2]. Каковы же причины взятия псевдонима? Самый простой ответ на этот вопрос найден нами в труде Т. Мейер-Штейнега и К. Зугдофа (1925): «Желая греколатинизировать своё родословное имя (Теофраст фон Гогенгейм), он присоединил к нему прозвище Парацельс» [2]. Но почему именно Парацельс?

Для того чтобы ответить на этот вопрос необходимо обратиться к биографии самого Корнелиуса Цельса. Цельс – это римский врач, живший между 25–30 гг. до р.Х. и 45–50 гг. р.Х.; он был сыном богатого рабовладельца и свои труды, в частности, по медицине писал для рабовладельцев, которые вынуждены были лечить своих рабов: в то время стоили они дорого. Здесь представляется интересным мнение о Цельсе Галена, который жил и творил в следующем столетии. По утверждению С. Ковнера, Гален называл Цельса дилетантом и врачом поневоле [3]. У самого С. Ковнера отношение к Цельсу сложное. С одной стороны, он пишет о нём так: «Во всём сочинении Цельса на каждом шагу просвечивает практический римский ум, отливший здесь в сильные, точно вычеканенные формы и выражения». С другой стороны, ссылаясь на Hecker, продолжает: «Такие умы не отличаются способностью обогащать искусство новыми открытиями, оттого мы находим здесь лишь картину современной Цельсу римской медицины, но без новых прибавлений» [3].

И всё-таки, чем Цельс привлёк внимание фон Гогенгейма?

Дело в том, что сочинение Цельса «О медицине» было найдено в середине XV века (около 1443 г.) Фомой Перетончелли де Сарцана, а первое его издание вышло в свет во Флоренции в 1478 году. Известно, что до конца XV в. вышло ещё пять изданий этой его работы [7]. Во времена Парацельса данный трактат считался новым и, вероятно, привлекал повышенное внимание врачей. Можно предположить, что Парацельс, изучая этот труд, довольно много почерпнул из него. В частности, наиболее близки Парацельсу были опыты Цельса по применению в лечении болезней некоторых металлов (мышьяк, медь, ртуть, сурьма). Сближает этих двух учёных и то, что свои труды они писали на родных языках: Цельс писал на латинском языке, а не на греческом, принятом в то время, а Парацельс – на немецком языке, а не на латинском. Думаю, что Парацельсу был близок и язык написания сочинений Цельса – краткий, если не сухой, очень лаконичный, а не расплывчатый и витиеватый. В сочинениях Цельса не чувствуется высокомерия автора, нет в нём и назидательной интонации, свойственной классическим греческим и ранним римским авторам. Кроме того, Цельс в историографии медицины стоит перед Галеном, и сам Гален часто цитировал Цельса (арсенал лекарственных средств, используемых Цельсом, практически полностью был принят Галеном). Видимо, ставя перед собой цель продолжения подходов Цельса, Парацельс видит себя рядом с ним или сразу после него и поэтому берёт именно такой псевдоним. Живя в эпоху реформаторства, Парацельс желал реформировать и медицину. Для этого он яростно выступал против признанных авторитетов, учения которых, по-сути, навязывались церковью. Отсюда, видимо, и появилась сильная неприязнь лично к Галену, а также ко всем знаниям, полученным медиками до него. Поэтому, желая противопоставить себя всем предшествующим врачам, он все их достижения подверг сомнению и отбросил в сторону, а все лекарственные препараты, применяемые ими, назвал галеновыми, вкладывая в это слово смысл всего устаревшего и неэффективного.

С середины XX в. некоторые авторы считают термин «галеновые препараты» устаревшим, представляющим интерес исключительно для истории медицины и фармации [8]. Однако существует и противоположная точка зрения: этот термин сохранился в память о великом греческом враче, оставившем нам свои знания, опираясь на которые наши современники продвинулись далеко вперёд в развитии фармацевтической науки [9]. В настоящее время понятие «галеновые препараты» употребляют для обозначения лекарственных средств, приготовленных из лекарственного растительного сырья и отдельных химических соединений путём несложных технологических приёмов с учётом свойств взятых ингредиентов.

ВКЛАД ГАЛЕНА В ФАРМАЦИЮ

Наверное, Гален удивился бы, узнав, что большая группа лекарственных средств, которыми он пользовался при лечении больных, названа его именем. Вот лишь несколько доводов в подтверждение этого тезиса.

1. Литературные труды Галена, дошедшие до нас, по некоторым данным, составляют от 280 до 400 произведений. Но лишь 5–6 из них так или иначе посвящены лекарствам (с описанием их приготовления и применения). Остальные его трактаты содержат знания по анатомии, хирургии, физиологии, диетике, другим медицинским дисциплинам, а также по философии и математике [2, 3, 10]. Из этого следует, что Гален, конечно, был врачом, но для него были чрезвычайно важны философские воззрения, а также общечеловеческие ценности.
2. Описывая свойства большинства из применяемых лекарственных веществ, сам Гален ссылается на Гиппократа, Феофраста, Диоскорида, Абу Мансура, Плиния, Ларгуса и других врачей, не приписывая их открытия себе. Этим он не только демонстрирует глубину своих познаний в медицине, но и в не меньшей степени указывает на их преемственность [11].

3. Есть точка зрения, что Гален оставил потомкам большое количество рецептов, записав их в своих трактатах. Во все времена после изобретения письменности люди записывали составы лекарств и способы их приготовления. Достаточно вспомнить глиняную табличку шумерских врачей, датируемую 2300 г. до н. э. Она содержит 15 рецептов различных лекарств и по праву считается первой Фармакопеей [12]. Гален поступал так же: обучаясь в различных медицинских школах, он записывал рецепты лекарств, а впоследствии изучал их лечебные свойства и приводил в своих трудах. Однако можно отметить, что Гален о лекарствах писал в прозе, в то время как некоторые врачи, в частности Авиценна, делали это в стихах [13].

4. Говорят, что Гален изменил понятие о лекарственных препаратах, творчески обновив точку зрения Гиппократа. Но ведь тот же Гиппократ имел своё понимание лекарственного средства, характерное для эпохи расцвета Древней Греции V–IV вв. до н.э. Не подлежит сомнению, что и Гален учитывал научные знания, характерные для его эпохи.

5. В заслугу Галену ставят и наличие специальной комнаты (officina) – лаборатории, мастерской или склада, т.е. помещения, в котором хранились и готовились медикаменты. Но такие комнаты были у всех врачей той эпохи, начиная с Гиппократа. Правда, они могли называться иначе, например apotheca. У всех врачей были свои лаборатории, специальное оборудование, помощники.

6. Утверждают, что Гален сам готовил свои лекарства. Но на Востоке до VIII в., а в Европе до XII в. всякий врач сам готовил снадобья для своих больных [14].

Всё сказанное выше даёт нам основания полагать, что Гален был высокообразованным для своего времени терапевтом (врачом-аллопатом) со своей теорией применения лекарств. Однако в серьёзных энциклопедических изданиях роль Галена в фармации отмечена очень скромно. Основное внимание уделено его философским и медицинским трудам [15]. Скорее всего, у врачей есть своё представление о Галене, а у фармацевтов своё.

Какие же представления существуют у современных провизоров о вкладе Галена в фармацевтическую науку? Приведём лишь некоторые из них.

И.И. Левинштейн отмечает, что Гален разделил лекарства на «простые, действующие элементарными свойствами, и сложные, действующие в зависимости от различного сочетания главных и побочных свойств», что он впервые оспорил постулаты школы Гиппократа, утверждавшие, что лекарства в природе даны в готовом виде, и выдвинул предположение, что в растениях и животных есть полезные соединения (лекарства) и вредные, которые надо отбрасывать [5].

Интересна трактовка вклада Галена в фармацию, изложенная доктором медицины К.С. Яцутой, в «Кратком курсе фармации и фармакогнозии». По мнению этого автора, все лекарственные препараты в смысле их приготовления Гален разделил на простые, к которым принадлежат вещества животного и растительного происхождения (травы, листья, корни, органы и ткани животных), химико-фармацевтические, приготовление которых производится химическим путём (сода, сера и т.д.), и сложные или галеновые препараты. Сложность галеновых препаратов, таким образом, заключается в том, что они могут состоять из представителей первых двух групп [16]. Однако, согласно данным Г. Гезера, сам Гален предпочитал применять простые лекарственные средства [1].

Интересна, на наш взгляд, и точка зрения историков медицины Т. Мейер-Штейнега и К. Зудгова, согласно которой Гален различал три стадии действия лекарств. В первой стадии, прежде всего проявляются основные, присущие свойства (теплота, холод, сухость, влажность). Во второй стадии осуществляется комбинированное действие этих основных свойств, в третьей стадии, наконец, реализуются специфические свойства отдельных лекарственных веществ (рвотное, слабительное, мочегонное действие). Следующим принципом деления лекарственных веществ является принцип «действующего вещества». По Галену, эти вещества различаются по степени действия. 1-я группа представлена соединениями с едва проявляющимся действием, 2-я группа – веществами с заметным действием, в 3-ю группу вошли сильнодействующие вещества и в 4-ю группу –вредные и разрушающие организм соединения [2].

С нашей точки зрения, ближе всех к пониманию вклада Галена в фармацевтическую науку подошёл профессор И.А. Муравьёв. Он считал, что исторический вклад Галена в фармацию заключается в том, что он изменил представления о лекарствах, которые сложились ко II в. под влиянием взглядов Гиппократа. Как уже было сказано выше, Гиппократ считал, что в природе лекарства даны в готовом виде и оптимальном сочетании и задача врача заключается в сохранении их природного состояния. Гален же впервые выдвинул положение, что в лекарствах – растительных или животных – есть вещества, которые полезны, т.к. оказывают лечебное действие, и есть вещества бесполезные и даже вредные, от которых можно и нужно избавляться. Так возникла идея об «извлечениях» из растений и животных, в которые переходят действующие вещества или, как раньше говорили, действующие начала. Отдавая дань достижениям Галена, И.А. Муравьёв пишет: «Значение Галена в развитии технологии лекарств и фармации вообще заключается в предложенных им принципах, теориях, технических приёмах и указаниях, которые были изложены в многочисленных работах, пережили его эпоху и пользовались большим авторитетом до XVI в.» [17]. Как видно, Иван Алексеевич разделяет точку зрения предыдущих авто-

ров, но в заслугу Галену ставит ещё и то, что он, помимо формулирования определённых теоретических основ фармации, предложил ещё и технические приёмы приготовления лекарств. Можно констатировать, что Гален при получении лекарств *осознанно перерабатывал сырьё с помощью особых приёмов, придавая ему форму, способную более эффективно проявить своё лечебное действие*.

В предыдущей части [18] мы указывали на широкие познания Галена в области лекарствоведения. В этой части мы попытались на конкретных примерах подтвердить на основе изучения открытых литературных источников знания Галена в области фармации и в частности фармацевтической технологии.

К сожалению, наши попытки обнаружить доступные для понимания современного читателя подлинные труды римского врача, посвящённые приготовлению лекарств, не увенчались успехом. Всё, что нам удалось найти, написано, как правило, в XV в. на классическом латинском языке да ещё и готическим шрифтом. Расшифровка этих трудов должна проводиться специалистами. Однако нам всё же удалось обнаружить источник с цитатами «из Галена», заслуживающий доверия. Речь идёт о грандиозном труде Авиценны «Канон врачебной науки». Имя Галена в «Каноне» повторяется довольно часто, что свидетельствует о большом влиянии его трудов на Ибн Сину. В 5 книгах «Канона» имя Галена встречается более 220 раз. Цитируя Галена, Ибн Сина называет его «достойнейшим из врачей». При описании свойств простых лекарственных средств часто встречаются слова: «Гален говорит…», «по Галену…», «согласно утверждению Галена…», «в отличие от Галена… ». То есть Авиценна, упоминая Галена, отзывается о нём с большим уважением и доброжелательством [19].

Ниже мы приводим несколько таких примеров, сопроводив их комментарием.

В книге II «Канона» Авиценна пишет: «Гален рассказывает, что ему как-то случилось чрезмерно растереть составные части каммунии (*семена тмина* – прим. авт.), и оно (*средство* – прим. авт.) превратилось в мочегонное, тогда как ранее ему было свойственно отпущение естества. Поэтому не нужно преступать меру при растирании лекарств, обладающих разреженным веществом». Этот пример показывает, что Гален уже в его время понимал важность такого технологического показателя, как размер частиц порошка при измельчении исходного сырья.

Интересны технологии приготовления лекарственных кашек с различным фармакологическим эффектом, приведённые в «Каноне» Ибн Сины.

1. «Лекарственная кашка Галена, лечащая почки, мочевой пузырь и в целом оздоравливающая всё тело. Растительные компоненты (листья, корни, семена – всего 13 компонентов), взятые в равных количествах, смешивают, тщательно измельчают, замешивают на меду, очищенном от пены».
2. Ещё одна лекарственная кашка от Галена, помогающая при болях в печени, кашле и кровавой рвоте, готовится следующим образом: берут 12 растительных компонентов, мёд, вино, камедь, все компоненты смешивают, тщательно измельчают, просеивают и замешивают на меду.
3. Кашка с куркумой по Галену «помогает от застарелых болей в печени, селезёнке, открывает все закупорки, случающиеся в органах пищеварения, изгоняет ветры, гонит мочу, помогает от всех болезней в почках, мочевом пузыре и в матке. Берут 21 растительный компонент, добавляют в эту смесь сколопендру аптечную и после измельчения и просеивания смачивают бальзамовым маслом и замешивают на меду».
4. Лекарственная кашка, из числа предложенных Галеном, эффективна при лечении болезней лёгких. «Вначале готовят смесь мёда и камеди терпентинового дерева. Смесь готовят в котле с двойным дном и, когда она начинает густеть, прибавляют гальбан и продолжают варить до того момента, когда им хотят капнуть, а капля не образуется. После охлаждения смеси в неё прибавляют остальные смешанные и тщательно измельчённые лекарственные компоненты».

Анализ представленных прописей, состоящих в основном из растительных компонентов, свидетельствует, что вначале Гален ингредиенты смешивал, тщательно измельчал и просеивал. Далее полученный порошок он смешивал с мёдом, который специально для этого варили, удаляя с его поверхности пену. Обращает на себя внимание тщательность, с которой проводилась подготовка растительного сырья. Его смешивали, измельчали, просеивали, добиваясь таким образом стандартных размеров частиц порошка. Если в первых двух прописях смесь измельчённых растительных компонентов сразу замешивали на меду, то в третьей прописи полученный порошок сначала смачивали маслом и только потом добавляли мёд. Вероятно, Гален уже знал, что использование масла позволяет экстрагировать из взятых семян полезные компоненты (например, эфирные масла), которые невозможно извлечь иным путём. Обращает на себя внимание предварительная подготовка мёда. Уже во II в. мёд варили, очищая его от нежелательных компонентов и продлевая тем самым срок его хранения. Ещё одна важная деталь – это использование котла с двойным дном. По нашему мнению, этот котёл не что иное, как водяная баня, которая позволяла удерживать постоянную температуру при упаривании жидких компонентов до заданной вязкости. Кстати, принцип определения вязкости полученного продукта по образованию капли мы используем до настоящего времени.

Приготовление общеукрепляющего и тонизирующего средства – уксусомёда, – по Галену, делается следующим образом: «берут хорошего мёда, ставят на слабо тлеющие угли, снимают пену, добавляют к не-

му уксуса не очень кислого и не слабого и осторожно кипятят на огне, чтобы они хорошо смешались и уксус не остался сырым. Затем охлаждают и сохраняют. Когда желают его употребить, то смешивают с водой. Но смешивать надо так, как любит больной. Тем, кто любит покислее, добавляют средства побольше, а тому, кто любит послаще, берут побольше воды».

При изготовлении этого средства обращает на себя внимание следующее. Первое – это подготовка мёда, т.е. кипячение и удаление из него пены, и второе – уксусомёд, о котором шла речь, можно рассматривать в качестве, как бы сейчас сказали, «внутриаптечной» заготовки с увеличенным сроком годности, которую при необходимости можно брать с собой к больному для приготовления лекарства непосредственно у его постели. Вероятно, Гален уже тогда знал о консервирующем свойстве мёда.

Интересно, что Гален для своих сиропов с мёдом рекомендует использовать разную воду. В одном рецепте Гален советует для приготовления сиропа из сотового мёда применять прозрачную пресную родниковую воду, а в другом – воду дождевую. Исходя из этого не подлежит сомнению, что Гален различал как простую, «минеральную», так и дистиллированную, «дождевую», воду.

Сложное средство Галена, которое помогает при «заболевании лёгочной трубки, язвы в лёгких, харканьи гноем и кровью», имеет многокомпонентный состав – содержит 16 различных ингредиентов. «При его приготовлении предварительно мёд и камедь терпентинового дерева варят в двойном сосуде. Когда смесь загустеет к ней прибавляют гальбан и варят до того предела, когда капли не расходятся. Затем смесь охлаждают и прибавляют все остальные компоненты в растёртом виде». Опять мы встречаем использование водяной бани. В этом рецепте интересна также раздельная переработка сухих и легкоплавких компонентов.

Галеном описано также лекарство против заболевания толстого кишечника (запора). «Берут шафрана, сумбула, мирры, белого перца, длинного перца и гальбана, бальзамного масла, китайской и цейлонской корицы, коры корня мандрагоры, выжатого сока мандрагоры, семян дикой моркови, сагапена. Растительные компоненты измельчают в смеси бальзамного масла и сока мандрагоры, а затем смешивают с мёдом». В данном случае, как мы видим, опять ароматные травы и семена предварительно измельчают в масле и лишь потом смешивают с мёдом.

Больные почки Гален рекомендует лечить лепёшками следующего состава: «берут очищенного лесного ореха, очищенного миндаля, очищенных семян садовой киссы, очищенных семян тмина, семян болиголова пятнистого, шафрана, семян огурца, опия, семян белены и семян сельдерея. Всё замешивают на меду, готовят лепёшки и дают пить с тёплой чистой водой». В этом рецепте для формирования лепёшки, основным компонентом которой являются растёртые орехи и семена растений, используют мёд.

Глазная мазь, названная Галеном «простой мазью», состоит из 13 компонентов, среди которых жжёная медь, опий, шафран, бобровая струя, мирра, оловянные белила и камедь. Всё замешивают на воде и смешивают с яичным белком. Интересно, что в состав мази входит антисептический, обезболивающий, а также противовоспалительный ингредиенты. А для того чтобы мазь обладала необходимыми физико-химическими свойствами, учёный замешивает её на яичном белке, вероятно, уже тогда зная о его эмульгирующих свойствах.

А вот две прописи клизм, которые употреблял Гален. Одна из них – это клизма Антония, соответствующая прописям древних. В неё входят «сушёный виноградный сок, йеменские квасцы, негашёная известь, медная окалина, аурипигмент и жжёная папирусная бумага. Всё это замешивают на сиропе из миртовых ягод и приготавливают лепёшки, которые перед применением растворяют либо в вине, либо в дождевой воде». Следующий рецепт клизмы Гален рекомендует для тяжёлых состояний, «когда больной вместе с рвотой извергает кал». «Берут семян белены и белого перца, опия, шафрана, душистого сумбула, слюногона. Всё измельчают и замешивают на варёном меду». Из прописей видно, что врач предварительно делает заготовки препарата в виде лепёшек, которые окончательно готовит к применению у постели больного. Более того, такие лепёшки можно было оставить родственникам больного для самостоятельного использования. Кстати, имеются сведения, что Гален, первый из врачей, по письменному запросу готовил свои лекарства и отправлял их с нарочным в другие города и страны [3].

Следующая пропись представляет собой пластырь из калкадиса (красного купороса), который Гален назвал «Фуники». Этот пластырь помогает «от моровой язвы, заживляет трудно заживаемые раны и язвы, помогает при переломах, ушибах и опухолях. Берут калкадис, старый жир, старое оливковое масло и оксид свинца. Жир расплавляют, калкадис растирают с частью оливкового масла. Отдельно в ступке растирают оксид свинца с остатками оливкового масла и объединяют в ступке все компоненты. Затем, после тщательного смешивания, всё это кладут на чистую сковороду и перемешивают пальмовой веточкой, чтобы вся масса стала однородной». Изучая последовательность действий в приготовлении этого пластыря, видно, что Гален раздельно измельчает калкадис и оксид свинца в частях оливкового масла и лишь после этого окончательно перемешивает все составные части лекарства в расплаве жира на сковороде [19]. Менье (1926) утверждает, что в обязанности Галена входило изготовление императорского териака [20]. Териак – это лекарственное средство, антидот, в состав которого входят

более 60 компонентов из различных фармакологических групп. Его приготовление является длительным, сложным и многоступенчатым процессом. Авиценна утверждает, что «терияк имеет пять степеней готовности – младенчество, отрочество, юность, старость и смерть. Он становится ребёнком через 6 мес. или один год. Затем он начинает расти, улучшая свои свойства, и становится лучшим через 10 лет в жарких странах или через 20 лет – в странах холодных. Через 20 или 40 лет его сила начинает слабеть и через 30 или 60 лет свойства терияка исчезают и он становится кашкой, лишённой свойств противоядия». Гален пытался и сократить, и увеличить количество компонентов, но в итоге первая пропись, предложенная Андромахом, осталась лучшим рецептом этого средства. Гален предложил способ определения его качества. Он пишет: «Нужно поймать дикого петуха, ибо он более сух по натуре, чем домашний, и пустить на него ядовитое насекомое, после чего ему дают терияк; если петух останется жив, значит терияк хороший» [19]. В благодарность за качество териака, изготавливаемого Галеном, император Антоний торжественно при всеобщих рукоплесканиях пожаловал ему золотую цепь с медалью, на которой была следующая надпись «Антоний, император римлян, – Галену, императору врачей» [20]. Мы считаем, что этот факт является высокой оценкой Галена современниками не только как врача, но и как фармацевта-технолога.

Дополнительными доказательствами глубоких знаний Галена в фармакологии и фармации могут служить сведения, обнаруженные в Византийском медицинском трактате XI–XV вв., опубликованном в серии «Византийская библиотека» под редакцией Г.Г. Литаврина. В небольшом трактате в отдельную главу были выделены «Взаимозаменители Галена», т.е. в своих трудах Гален часто рекомендует при отсутствии какого-либо лекарственного средства заменить его на другое, аналогичное по действию. Этих замен – 197, причём они настолько рациональны, что не потеряли своей актуальности и по сей день. Вот некоторые из них:

вместо душицы критской – шалфей трёхлопастный;
вместо плодов лавра – тимьян сухой;
вместо горчицы – семена репы;
вместо кошачьей мяты – дикая мята;
вместо семян моркови – семена водяного пастернака;
вместо плодов лавра – тимьян сухой;
вместо бальзама – сок, капающий с мирры;
вместо асфальта – сырые выжимки смолы;
вместо канифоли – сосновая смола;
вместо жира крокодила – жир морской собаки;
вместо жира оленя – жир гусиный;
вместо мышьяка – сульфид мышьяка;
вместо шлака свинца – окалина свинца;
вместо камня-пирита – камень, мечущий огонь;
вместо свинца жжёного – свинцовые белила;
вместо купоросной земли – медь жёлтая;
вместо квасцов – соль каменная.

Мы умышленно привели замены лекарственных препаратов из растительного, животного и минерального царств [21].

Таким образом, в представленной работе на конкретных примерах показаны знания и опыт Галена в области фармацевтической технологии. Всё это даёт нам основание считать Галена не только выдающимся врачом, но и одним из первых известных нам технологов, который при назначении тех или иных сложных лекарств учитывал свойства веществ, их дозы и разумные сочетания в смеси, а также лекарственную форму и способы её приготовления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы завершаем цикл [18, 22] работ о великом римском враче Галене, основной целью которого было попытаться раскрыть и оценить вклад учёного в развитие прежде всего фармации. Исходя из фактов, обнаруженных нами в доступных литературных источниках, уверенно можно сказать, что Гален – это поистине грандиозная личность. Его философские труды, работы по математике и астрономии интересны до сих пор. Совсем недавно вышли в свет два тома его общефилософских и натурфилософских трактатов, бережно переведённых на русский язык. Несомненно, он был выдающимся врачом древности. Многие поколения врачей изучали анатомию по его трактату «О назначении частей человеческого тела». Что же касается фармации, то его вклад в развитие нашей науки заключается, с нашей точки зрения, в следующем. Во-первых, ему удалось собрать воедино и описать простые и сложные лекарства, которыми пользовались врачи до него, а также рекомендованные им самим средства, после тщательной проверки их действия. Он значительно расширил их, добавив эффективные лекарства из растительного, животного и минерального царств. Многие из них применяются до сих пор. Во-вторых, положение теории Галена о полезных и вредных веществах в растениях открыли путь к развитию фитохимии, фармацевтической химии и технологии фито- и органопрепаратов. Конечно, его технологические приёмы сегодня кажутся простыми, но уже во II в. н. э. Гален осознавал, какие растения и какие их части надо обработать водой, какие вином или пивом, а какие растительным маслом. Уже тогда широко применялись мёд, нефть, растительная смола, камедь, множество минералов, металлы и их соли, а также полезные части животных (рога, яички, печень и др.). Приготовленные Галеном лекарственные формы можно было хранить длительное время, т.к. они содержали в своём составе необходимые консерванты.

И последнее. Хочется, чтобы современные провизоры никогда не забывали имени Клавдия Галена. Пусть напоминанием о нём служит нам якобы устаревший термин «галеновые препараты».

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Гезер. Основы истории медицины / Пер. с нем. врач Цукерман, под ред. приват-доцента Казанского университета А. Дохмана, с доб. и примеч. редактора. – Казань. 1890. 488 с.
2. Т. Мейер-Штейнег, К. Зудгоф История медицины / Пер. со второго немецкого издания под ред. д-ра В.А. Любарского и д-ра Гершуни. – М.: Гос. изд., 1925. 463 с.
3. С. Ковнер. Очерки истории медицины. Вып. третий / От Платона до Галена. – М. 1888. 436 с.
4. М.П. Мультановский. История медицины. – М.: Государственное издательство медицинской литературы, 1961. 347 с.
5. И.И. Левинштейн. История фармации и организация фармацевтического дела. – М.: Медицина, 1939. 223 с.
6. К. Сухомлинов. Медики, изменившие мир. От Гиппократа до Бурденко. – М.: Эксмо, 2014. с 384 с.
7. Цельс, Авл Корнелий. О медицине / Пер. Ю.Ф. Шульца. Вступ. ст. и ред. В.Н. Терновского. – М. 1959. 408 с.
8. М.Х. Бергольц. О развитии отечественной галеновой промышленности // Мед. пром. СССР. 1948. № 3. С. 14–19.
9. Ю.К. Сандер. Технология галеновых препаратов. – Ленинград: Ленинградское отд. Медгиз, 1950. С. 5–9.
10. L. Israelson. Die «materia medica» des Klaudios Salenos. Inaugural-dis-sertation doctors der Medcin. – Juriev. 1894. 208 p.
11. Гален. Сочинения. Том 1 / Под общ. ред., сост., вступ. ст. и комм. Д.А. Балалыкина; пер. с древнегр. А.П. Щеглова; научн. ред. А.П. Щеглова, Н.П. Шок. – М.: Весть, 2014. 656 с.
12. С.Н. Крамер. История начинается в Шумере. – М.: Книга по требованию, 2012. 254 с.
13. Абу Али Ибн Сина (Авиценна). Канон врачебной науки. 2-е изд. В 5 книгах. – Ташкент: «ФАН» Узбекской ССР, 1981.
14. Г.И. Маддиссон. К вопросу о «Галеновых» препаратах. Экспериментальные и критические данные для оценки доброкачественности и констатирования фальсификации их: дис. ... магистра фармации. – Одесса. 1908. 37 с.
15. Ф.А. Брокгауз и И.А. Эфрон. Энциклопедический словарь. Т. VII а. – СПб. 1892. С. 893–894.
16. К.З. Яцута. Краткий курс фармации и фармакогнозии. Изд. 3-е, испр. и доп. провизором Л.В. Соколовым. – СПб. 1907. С. 17.
17. И.А. Муравьёв. Технология лекарств. Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Медицина, 1971. 752 с.
18. К.С. Гузев. Гален и его знания в области лекарствоведения // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 3(16). С. 220–225.
19. Ибн Сина. Избранное // Избранная лирика Востока. – Т.: Изд. ЦК Компартии Узбекистана, 1981. 112 с.
20. Л. Менье. История медицины / Пер. с фр. д-ра И.А. Оксёнова. – М.-Л. 1926. С. 54–63.
21. Византийский медицинский трактат XI–XV вв. / Пер. с древнегр., вступ. ст.; комментарий; указатели Г.Г. Литаврина. – СПб: Изд.: Алетейя, 1997. 157 с.
22. К.С. Гузев. О Галене (страницы жизни и черты личности в оценке потомков) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1(14). С. 238–244.

ФАРМАКО ЭКОНОМИКА ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Екатеринбург
отель «Онегин»

27–28 марта 2017 г.

Министерство здравоохранения Свердловской области • Агентство оценки технологий здравоохранения • Журнал «Фармакоэкономика: теория и практика» • Интернет-портал www.pharmacoeconom.ru
Организаторы: Московское фармацевтическое общество • Конгресс оператор «Конгресс сервис»



В ПРОГРАММЕ КОНГРЕССА

Пленарное заседание

Комплексная оценка инновационных технологий здравоохранения при включении в систему государственного финансирования
- Обеспечение доступности медицинской и лекарственной помощи в Свердловской области
- Экономические проблемы российского здравоохранения
- Ключевые факторы доступности лекарственных средств или «экономить нельзя инвестировать»
- Инвестиционные программы в фармацевтической отрасли
- Практические результаты внедрения программы «риск-шеринг»

Специализированные сессии
- Фармакоэкономика сахарного диабета
- Фармакоэкономика в онкологии
- Фармакоэкономика в кардиологии
- Фармакоэкономика бронхиальной астмы
- Использование результатов фармакоэкономического анализа на уровне ЛПУ (для главных врачей)
- Фармакоэкономика в онкогематологии
- Специализированые сессии по нозологиям (в офтальмологии, ревматологии, рассеянном склерозе, псориазе, экстракорпоральном оплодотворении и др.)

Панельные дискуссии
- Фармакоэкономика хронических вирусных гепатитов
- Как найти точки соприкосновения в финансировании инноваций? (дискуссия администраторов здравоохранения и представителей фармацевтической отрасли)

Круглый стол
- Фармакоэкономика в онкогематологии

Образовательные семинары – «Лекция в рабочий полдень»
- Основы фармакоэкономического анализа для практического врача
- Фармакоэкономическое моделирование: возможности получения данных на уровне региона и страны в целом

Подведение итогов Конкурса молодых исследователей по фармакоэкономике на лучшую научную работу 2017 года, присланную на XI национальный Конгресс с международным участием «Развитие фармакоэкономики и фармакоэпидемиологии в Российской Федерации»

Данный Конгресс является уникальным специализированным мероприятием с участием ведущих отечественных и зарубежных специалистов. Это практическая площадка для обмена мнениями профессионалов в области фармакоэкономики и организаторов здравоохранения по практическому использованию полученных результатов последних фармакоэкономических исследований с выбором оптимальной стратегии финансирования.

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 конгресса оставляет за собой право вносить изменения в программу и состав докладчиков

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







РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКОГО И ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ



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

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ СЕРИАЛИЗАЦИЯ И СИСТЕМЫ TRACK & TRACE

АВТОР

A. Savas,

Управляющий директор
VISIOPHARMA Technologies GmbH

ПЕРЕВОД:

А.М. Гринченко,

руководитель отдела ГЛФ
ГК «Фармконтракт»

АННОТАЦИЯ

В конце 2016 года на российском фармацевтическом рынке был представлен один из лидеров в области производства продуктов и оборудования для сериализации (систем track&trace) и решений для фармацевтической промышленности – компания VISIOPHARMA Technologies GmbH. VISIOPHARMA предлагает прозрачные решения с целостным подходом – как для начального уровня серилизации продуктов, так и до полной интеграции всей системы для предприятия, в том числе на регуляторном уровне решений (L4/L5) в соответствии с текущими и новыми международными стандартами.

Уже имея множество реализованных, действующих и успешно работающих проектов, линий для фармацевтических производств в области сериализации и программного обеспечения, компания VISIOPHARMA может решать самые сложные задачи, исходя из собственного накопленного опыта.

На протяжении долгого времени VISIOPHARMA разрабатывала внутренние процедуры управления в области контроля качества, обучала и развивала свою команду с целью удовлетворить растущий спрос на системы Track&Trace и сериализацию в любой отрасли, включая фармацевтику.

Низкая стоимость, высокое европейское качество, широкий референс во всем мире делают компанию лидером на рынке оборудования данного назначения.

ВВЕДЕНИЕ

Обеспечение мер защиты и гарантия безопасности поставок продукции являются критически важными элементами для фармацевтических производителей, поставщиков, конечных пользователей и регуляторных государственных органов. Общественное и профессиональное мнение относительно качества фармацевтической продукции ухудшилось ввиду роста количества случаев фальсификации, контрафактных и некачественных лекарственных средств. Ужесточение требований к контролю упаковки и дистрибьюции в целом имеют важное значение для восстановления и поддержания на должном уровне доверия конечных пользователей.

Сериализация уникальным кодом и возможность четкого отслеживания благодаря системе Track and Trace позволят обеспечить полный контроль этапов поставки и передвижения лекарственных средств от их упаковки на производстве до конечного пользователя или до профессионального медицинского работника. В сочетании с другими методами борьбы с фальсификатами, такими как защита первого вскрытия, внешними и скрытыми маркировками, а также прочими средствами обеспечения безопасности продукта, сериализация подразумевает комплексный подход к защите.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

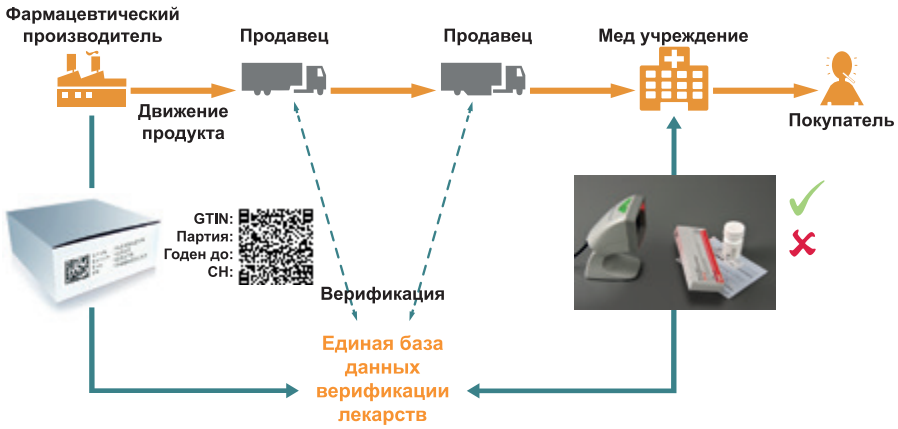


Рисунок 1. **Образец движения продукта**

ЧТО ТАКОЕ СЕРИАЛИЗАЦИЯ СЕЙЧАС?

- Защита имени бренда: фармацевтическая сериализация и отслеживаемость дают подробное представление о движении продукции в цепочке поставки, что позволяет предотвратить саму возможность подделки и мошенничества в определенной точке цепочки поставок (и, как следствие, ухудшения отношения к бренду) от производственного предприятия к пациенту.
- Согласование стоимости: может быть установлена и проконтролирована индивидуальная стоимость каждого промаркированного продукта, в том числе могут контролироваться стоимость, скидки для дистрибьюторов.
- Обратная логистика: при помощи фармацевтической сериализации компании могут получать необходимую информацию для отзыва, изъятия и возмещения потерь.
- Управление ресурсами: с помощью полученных данных от сериализации и всего процесса фармацевтические компании могут производить детальный анализ для управления ресурсами, при этом получая возможность планировать производство и сырьевую базу.
- Оптимизирование рабочих процессов: эффективность фармацевтических компаний может быть оптимизирована за счет снижения времени на обработку данных и уменьшения количества ошибок.
- Отзыв продукции: компании и регулирующие органы могут легко определить продукты, которые будут отозваны в цепочке поставок.
- Возврат: возвращаемые продукты, которые были проданы ненадлежащим образом клиенту, могут быть идентифицированы.
- Отслеживаемость партии: имея точный серийный номер продукции, можно обеспечить точность отслеживания продукции, а также увеличить доверие между торговыми партнерами.
- Выполнение заказа: отслеживаемость и идентификация каждого элемента поставки и их общего числа обеспечивают высокое качество исполнения заказа фармацевтическими компаниями.
- Маркетинг: сериализация и прослеживаемость обеспечивают качественный, быстрый доступ к информации всех заинтересованных сторон в цепочке поставки фармацевтических продуктов. В сочетании с процедурой аутентификации пользователя, это позволяет увеличить доверие конечного пользователя к продукту. В перспективе расширения географии поставок и выхода на новые рынки фармацевтические компании благодаря сериализации будут иметь возможность реагировать более оперативно, что облегчит и сократит время согласования всех вопросов местного нормативного характера.

КАК ОБЕСПЕЧИТЬ СООТВЕТСТВИЕ СЕРИАЛИЗАЦИИ И ПРОСЛЕЖИВАЕМОСТИ?

Сериализация и прослеживаемость требуют определенного уровня взаимодействия между системами, которые используют все участники цепочки поставки, включая торговых агентов. Это достигается за счет общепринятых на законодательном уровне в некоторых странах мира стандартов. Большинство стран используют стандарт GS1 для своих директив.

GS1 представляет собой определенный перечень стандартов для идентификации, сбора и обмена информацией между всей цепочкой поставок. Воплощая стандарты GS1 в качестве основополагающих принципов в построении основ сериализации, фармацев-



Рисунок 2. Стандарт GS1 для идентификации, фиксации и обмена данными

тические компании приобретают необходимую базу, от которой они могут отталкиваться и тем самым снизить риски введения данной системы и повысить ее эффективность.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ФИКСАЦИЯ И ОБМЕН ДАННЫМИ

Внедрение стандарта GS1 помогает компаниям идентифицировать, фиксировать и обмениваться важной информацией касательно всей цепочки поставки от производства до аптеки.

Идентификация

Существуют определенные коды в каждом баркоде. Они используются и, как правило, отображаются для цифрового сканирования и чтения. GS1 Indentification Numbers (коды индентификации) уникальны для каждого продукта, логистической единицы, местонахождения, активов, документов отгрузки, партий и услуг для каждой цепочки поставок – от производителя до конечного потребителя. GS1-идентификаторы, используемые для фармацевтики, включают в себя:

- Global Trade Item Number (GTIN) – глобальный номер товара: уникальный идентификатор продаваемого продукта, который может содержать также информацию о серийном номере, номере партии и сроке годности.
- Serial Shipping Container Code (SSCC) – серийный код транспортной упаковки: идентификатор, позволяющий легко обнаружить необходимую упаковку при транспортировке.
- Global Location Number (GLN) – глобальный идентификационный код предприятия: определяет местоположение и участников цепочки.

Фиксация

GS1-носители информации способны фиксировать различный объем информации с учетом различных потребностей того или иного этапа поставки, включая при этом номер партии, серийный номер, срок годности и т.д. Носители информации включают в себя линейные и 2D DataMatrix баркоды (штрихкоды) и EPC-коды (Electronic Product Code – электронный код продукта) с радиочастотной идентификацией (RFID – Radio Frequency Identification). Многие произ-



Рисунок 3. **Применение уникальных идентификаторов упаковок разных уровней, от первичной до поддона для создания обобщенных данных в фармацевтической цепочке поставки**

водители используют код GS1 DataMatrix на каждом уровне в комбинации с GS1-128 и иногда RFID на уровне групповой упаковки в короба и укладки на паллеты.

Обмен данными

Стандарт GS1 способствует и поддерживает беспрепятственный обмен данными между торговыми партнерами. Эти стандарты информации позволяют прослежива всю цепочку электронных и коммерческих данных и включают в себя:

- Global Data Synchronization Network (GDSN) – глобальная система синхронизации данных: синхронизированный ресурс хранения исходных данных, который позволяет в режиме реального времени всем партнерам цепочки поставки обмениваться точной и оперативной информацией.
- Electronic Product Code Information Services (EPCIS) – информационный сервис электронного кода продукта (EPC): стандарт для обмена данными между торговыми партнерами.

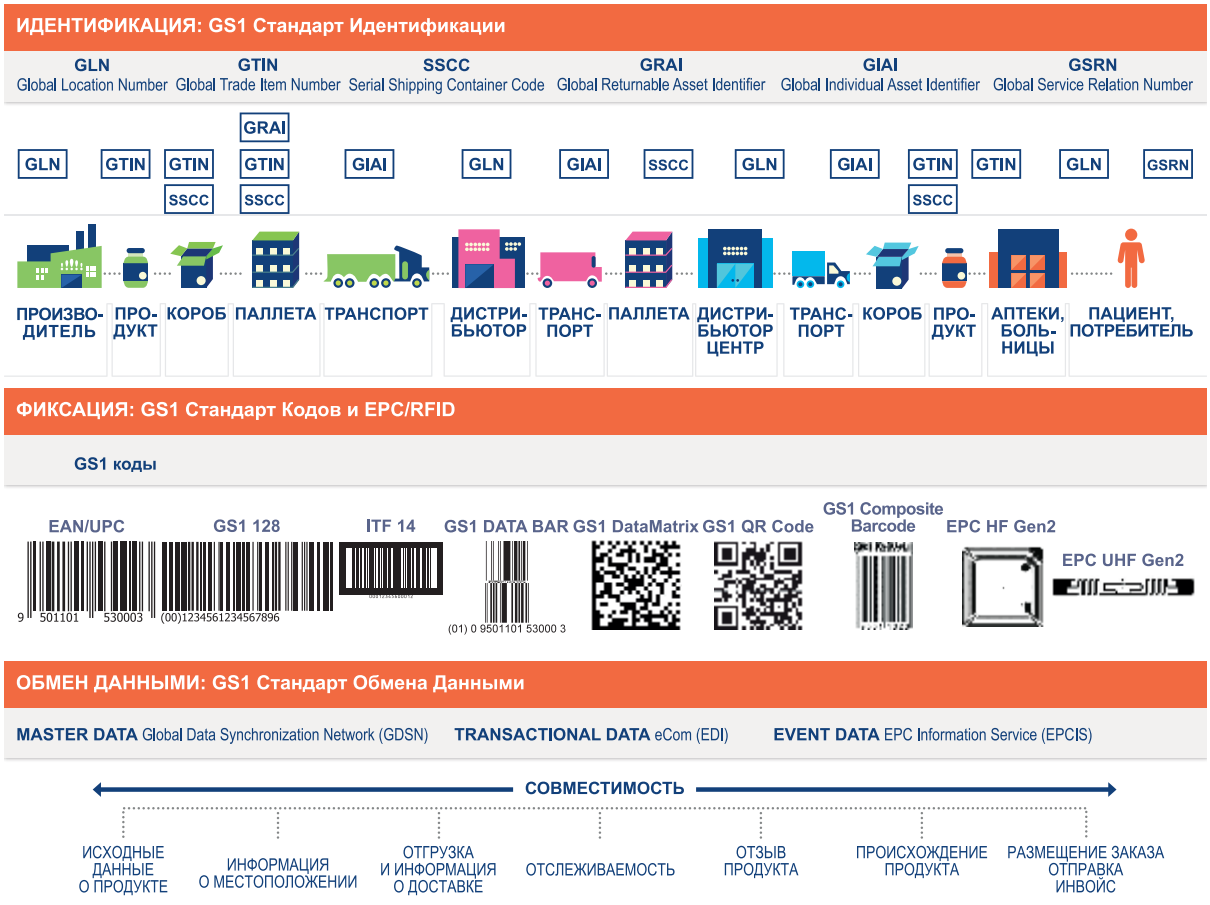


Рисунок 4. **Обмен данными в рамках стандарта GS1**

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИ ПОЛНОСТЬЮ АВТОМАТИЗИРОВАННОМ ТЕСТЕ «РАСТВОРЕНИЕ»

АВТОР

К. Уиткэнек,
SOTAX (USA)

ПЕРЕВОД:

А.С. Сапронов,
key account manager
ГК «Фармконтракт»



ВВЕДЕНИЕ

Понятие «автоматизация» применительно к тесту «Растворение» может восприниматься по-разному. Под полной автоматизацией подразумевается несколько вещей: полностью автономная (без вмешательства оператора) подготовка среды растворения, проведение теста «Растворение» и автоматизированная очистка системы перед началом следующего теста. При этом методы могут быть абсолютно разными или может использоваться один и тот же метод, который повторяется раз за разом.

«Когда мы рассматриваем существующие на рынке системы растворения, мы обязательно учитываем, какие из них требуют наибольших временных затрат на установку (подготовку к тестированию) и очистку. Весьма интересно, что отбор проб с автоматического коллектора фракций является основной областью применения полуавтоматических систем растворения», – объясняют в Agilent Technologies.

Ключевой задачей, которую можно решить с помощью полностью автоматизированной системы растворения, является повышение эффективности работы лаборатории. Решение указанной задачи достигается за счет оптимизации управления и очистки тестера: быстрая подготовка, наполнение и слив среды, водяная баня со встроенным быстродействующим термостатом, автоматизированная функция отбора образцов и автоматическая очистка после завершения теста – все это позволяет проводить тест «Растворение» без контроля со стороны оператора.

Более того, автономное проведение теста «Растворение» позволяет лаборантам освободить время для выполнения более важных задач: разработки метода, валидации процесса, проверки данных и верификации.

Сокращение времени цикла испытаний с помощью стратегического внедрения автоматизации в лабораториях позволяет многим компаниям оставаться конкурентоспособными. Размещая автоматизированные системы в научно-исследовательских подразделениях или в отделах контроля качества, компании могут легко осуществить трансфер методов, что позволяет сократить время вывода на рынок новых продуктов.

Недостаток в лабораторных исследованиях – одно из ключевых нареканий со стороны надзорных органов в фармацевтической промышленности. Полностью автоматизированные тестеры растворения, снижая вероятность человеческих ошибок и упрощая процесс исследования, существенно

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

повышают качество данных исследования. Каждый тест «Растворение» выполняется таким же образом и по той же схеме, что и предыдущие серии тестов, тем самым обеспечивая получение более точных данных. Каждый шаг записывается в защищенную базу данных, сводя к минимуму возможности ошибочного ввода параметров и исключая зависимость полученных результатов тестов от операторов.

Безопасность обеспечивается за счет снижения воздействия опасных веществ, используемых во время тестирования. К тому же автоматизация уменьшает эргономическое напряжение, устраняя необходимость выполнения рутинных задач: отбора проб и фильтрации.

РУЧНОЙ ТЕСТЕР ИЛИ ПОЛНОСТЬЮ АВТОМАТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА?

Когда отбор проб при растворении осуществляется вручную, то каждая стадия процесса до, во время и после теста выполняется химиком-аналитиком, который заполняет каждый сосуд подготовленной средой и периодически измеряет их объем с помощью мерного цилиндра. Ввод образца также проводится вручную, а значит, существует риск, что таблетки даже из одной партии опустятся на дно стакана растворения в различных направлениях. Если во время теста имеет место замена среды растворения, то это может быть наиболее субъективным моментом в тестировании.

Изменение pH среды также очень важно для лекарственных форм с пролонгированным и модифицированным высвобождением. Процесс ручного изменения pH приводит к тому, что результаты теста становятся зависимыми от того, как именно и как быстро была произведена замена среды. В ходе отбора проб существует риск получить необъективные результаты, поскольку аналитик может взять пробу некорректно: расположить канюли с разной высотой и ориентацией в сосуде. Аналогичная ситуация может сложиться и на завершающем этапе – этапе очистки: она может быть проведена неравномерно и не будет полной. Таким образом, при ручном проведении теста «Растворение» существует риск увеличения затрат при снижении эффективности.



Рисунок 2. Ручное тестирование растворения

Полностью автоматизированные системы растворения позволяют проводить тест «Растворение» автоматически и идентично, получать точные данные, исключая возможность ошибки со стороны лаборанта за счет его минимального участия в процессе, что в конечном итоге оправдывает инвестиции. Действия лаборанта ограничиваются лишь подготовкой тестера,

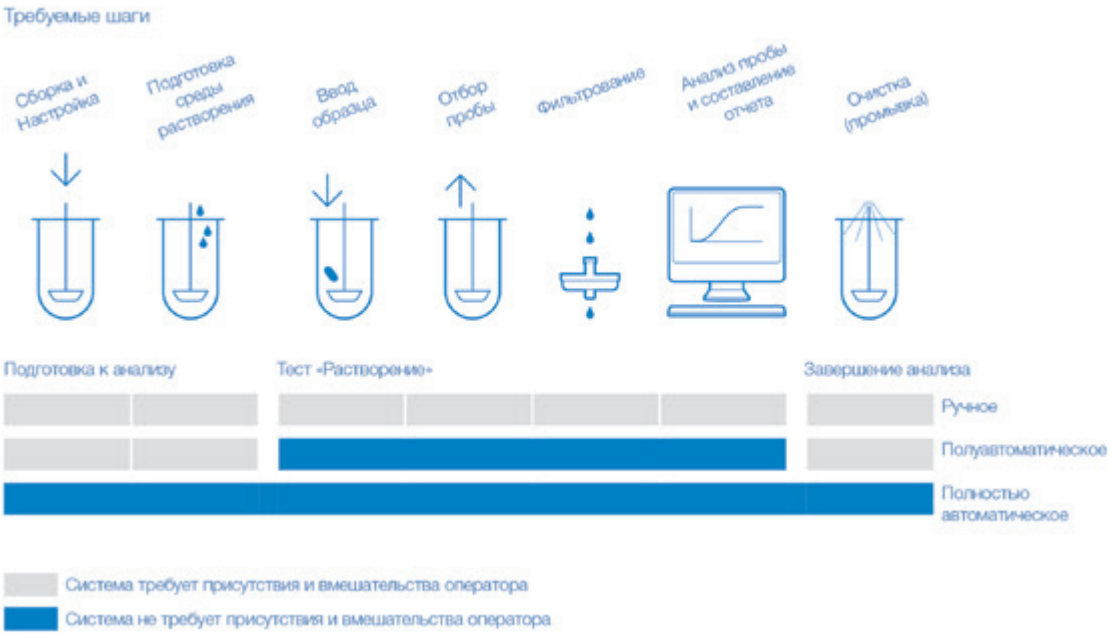


Рисунок 1. Ручное, полуавтоматическое и полностью автоматическое тестирование лекарственных средств на растворение



Рисунок 3. Полностью автоматизированное тестирование растворения

настройкой самого теста и программированием метода. Все остальные этапы проведения теста «Растворение»: ввод и отбор проб, фильтрация, количественное определение и формирование отчета, а также очистка – выполняются автоматически. Более того, все этапы теста или серии тестов могут проводиться в непрерывном режиме в течение всего дня, ночи и даже в выходные дни, что существенно сокращает время простоя, увеличивает производительность и освобождает дополнительное время для исследовательской деятельности операторов.

ПОЛНОСТЬЮ АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ИЛИ ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКИЙ ТЕСТЕР РАСТВОРЕНИЯ?

Наличие коллектора фракций и автоматический отбор проб крайне удобны и позволяют осуществлять отбор проб из стаканов в запрограммированные временные интервалы. Это особенно полезно при исследованиях с несколькими временными точками отбора проб. Кропотливые задачи по дегазации, наполнению и очистке сосудов также могут осуществляться в автоматическом или полуавтоматическом режимах, что позволяет обеспечить повторение метода. С точки зрения окупаемости инвестиций выбор полуавтоматизированных тестеров не имеет серьезных отличий, как если бы аналитик продолжал проводить тест «Растворение» вручную. Время проведения теста в этом случае одинаково. В случае полной автоматизации теста «Растворение» лаборанту не потребуется учавствовать в процессе. Следовательно, при полной автоматизации процесса при задании временного интервала тестирования и программировании метода, по которому система его будет проводить, оператору не придется выполнять дополнительные манипуляции для перехода к следующему тесту после завершения предыдущего.

РУЧНОЕ ИЛИ АВТОМАТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ПАРТИИ?

Аргумент в пользу использования полностью автоматизированной системы базируется на том, что при ручном/полуавтоматизированном тесте «Растворение» аналитик тратит практически все свое время на поддержание и контроль за работой системы: ему (аналитику) приходится использовать одновременно несколько водяных бань (как правило, 4-8), и практически 100% своего времени он будет тратить на проведение теста «Растворение». Как следствие, у аналитика практически не останется времени на другую работу. При использовании полностью автоматизированных систем аналитику необходимо только настроить и запрограммировать тестирование продукта, например в начале дня, а все оставшееся время он может посвятить разработке технологии производства новых продуктов. В результате существенно увеличивается эффективность и производительность труда как самого сотрудника, так и компании в целом. Окупаемость инвестиций от перераспределения труда за счет автоматизации теста «Растворение» оценивается в следующих показателях: общий временной интервал на весь цикл тестирования, пропускная способность и прерывание процесса (технические неисправности).

МНОГООБРАЗИЕ МЕТОДОВ ВО ВРЕМЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ОДНОЙ ПАРТИИ

Автоматизированные тестеры позволяют проводить исследование различных типов лекарственных форм или задействовать разнообразные методы, задать различные условия испытания одной партии продукта. Система Sotax AT MD способна в полностью автоматическом режиме провести до 8 серий анализов растворения в 6 стаканах, отобрав при этом пробы и проанализировав их на хроматографе или спектрофотометре, задокументировав все полученные результаты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трудоемкая задача по вводу проб и очистке стаканов тестера растворения быстро решается за счет полной автоматизации процесса: полностью автоматические системы автоматизируют весь процесс исследования растворения, начиная от подготовки среды и заканчивая очисткой и промывкой системы растворения.

Несколько тестов одинаковых либо различных продуктов можно выполнить последовательно друг за другом без необходимости вмешательства оператора, который может освободившееся время потратить на разработку новых продуктов.

GE Healthcare

ПОВЫШЕННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ ОТ ГРИППА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ОДНОРАЗОВЫХ ПРОДУКТОВ

АВТОРЫ

J. Lidferfelt,
A.C. Mangusson,
GE Healthcare Lifescience, Швеция



ReadyToProcess™

ВВЕДЕНИЕ

Разработка и производство вакцин – одна из наиболее сложных на сегодня задач в области биофармацевтических препаратов. Проекты в области исследований и разработки характеризуются технической сложностью, а производство ведется методами, которые могут быть негибкими и затратными. Но производство вакцин может также хорошо окупать себя, и один из путей к успеху – внедрение одноразовых продуктов, для того чтобы производственные процессы стали более гибкими и менее затратными. Лишенные гибкости методы производства могут поставить производителей в невыгодное положение, особенно когда необходимо в кратчайшие сроки произвести миллионы доз новой вакцины. Гибкие платформы для одноразового применения, такие как линия продуктов ReadyToProcess™, включают одноразовые биореакторы, готовые к применению хроматографические продукты и автономные модули подачи жидкости, фильтрации и считывания данных. Они сокращают длительность производственных процессов, а также помогают обеспечить безопасность и стандарты качества вне зависимости от места расположения производства.

Производство вакцин против вируса гриппа, вызывающего как сезонные вспышки, так и пандемии, по-прежнему является самым востребованным видом производства инактивированных и живых ослабленных вирусных вакцин.

Потребность в таких вакцинах продолжает расти вследствие повышенного интереса к иммунизации, особенно на новых рынках [1]. Кроме того, сезонные изменения в штаммах вируса, а также локальные вспышки заболеваемости требуют повышенной гибкости и скорости при производстве вакцин против гриппа [2].

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ФЕРМЕНТАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА В ОДНОРАЗОВЫХ БИОРЕАКТОРАХ

При традиционном способе производства вакцины против гриппа используются оплодотворенные куриные эмбрионы. Это трудоемкий метод, кроме того, он требует больших площадей и обладает ограниченной масштабируемостью. Переход на методы, основанные на культуре клеток и одноразовых продуктах, делает процесс производства вакцин более гибким, что позволяет значительно сократить время до клинических испытаний вакцины и ее регистрации, таким образом сокращая время до выхода продукта на рынок.

Magnusson и др. ранее показали, что системы WAVE Bioreactor™ могут применяться для размножения вируса в культуре клеток линии Vero с использованием одноразовых продуктов и условий для роста клеток, не включающих компоненты животного происхождения [3] (рисунок 1). Они разработали процесс культивирования без компонентов животного происхождения, что важно с точки зрения законодательного регулирования при производстве вакцин для человека и критично в случае живых вирусных вакцин, поскольку способов инактивации некультуризованных (занесенных из внешней среды) вирусов не так много. Они сумели вырастить данные культуры клеток без использования компонентов животного происхождения, разработав при этом быстрый, простой процесс, который позволяет за короткий срок перейти к промышленным масштабам производства. Биореакторная система WAVE Bioreactor 20/50, в которой используется одноразовый биореактор Cellbag™, проявила себя как быстрая, удобная альтернатива стальным биореакторам, поскольку ее легко собрать и не требуется валидировать CIP.



Система WAVE Bioreactor™

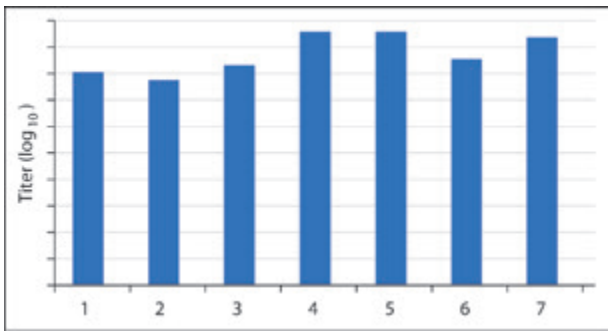


Рисунок 1. Значения TCID50 из семи различных культур вируса объемом 2 л, которые культивировали в системе WAVE Bioreactor (время до сбора вируса — 72 ч)

СБОР ВИРУСА ГРИППА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОРАЗОВЫХ СИСТЕМ

После размножения вируса гриппа с использованием метода, основанного на культуре клеток, вирус необходимо извлечь из культуральной среды. С использованием одноразовых модулей ReadyCircuit™ для удаления клеточного дебриса, микроносителей и примесей из клеток хозяина (белки и ДНК) разработали метод получения вируса. Модули ReadyCircuit включают в себя мешки, трубки, сенсоры и фильтры, которые образуют замкнутые системы очистки, позволяющие поддерживать стерильность и избавиться от требующих много времени этапов производства, необходимых при использовании обычных методов. Данный процесс был верифицирован на вирусе гриппа, полученном на клеточных линиях MDCK и Vero.

УДАЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ДЕБРИСА И МИКРОНОСИТЕЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ ТУПИКОВОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Микроносителям и целым клеткам давали время осесть; для дальнейшего осветления супернатанта использовали модуль ReadyCircuit, предназначенный для проведения последовательной тупиковой фильтрации с использованием фильтров ULTA™ Prime GF с порами 2,0 мкм и ULTA Prime GF с порами 0,6 мкм (рисунок 2). Перед началом фильтрации мембрану увлажняли буфером PBS (физиологический раствор с фосфатным буфером – phosphate-buffered saline). Для создания потока жидкости через фильтр использовался перистальтический насос, для оценки отфильтрованного объема – весы и для того, чтобы следить за давлением в системе, – одноразовый датчик давления. Буфер PBS применялся также для промывки фильтров с целью увеличить выход продукта. Конечная нагрузка на фильтр составляла 87 л/м^2, а конечное входное давление – 0,1 бар. Выход гемагглютинина (ГА) был >95%.

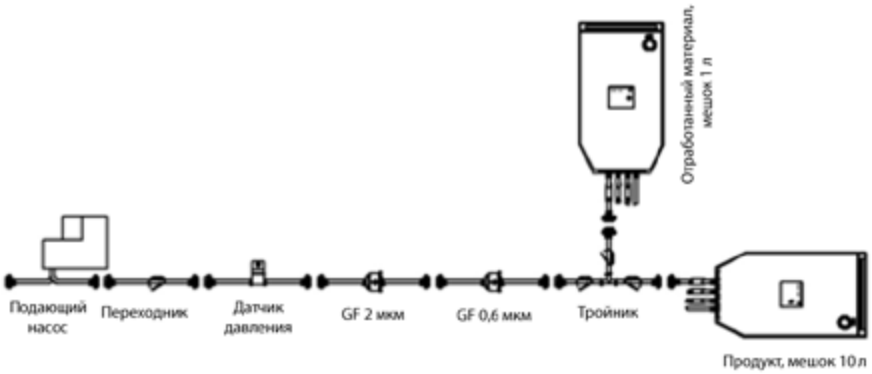


Рисунок 2. Модуль ReadyCircuit для последовательной фильтрации с использованием фильтров ULTA Prime GF 2,0 мкм и ULTA Prime GF 0,6 мкм с целью дальнейшего осветления супернатанта

КОНЦЕНТРАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА И УДАЛЕНИЕ ДНК И БЕЛКОВ КЛЕТКИ ХОЗЯИНА

Второй модуль ReadyCircuit, предназначенный для тангенциальной фильтрации, с половолоконным фильтром ReadyToProcess 500 кДа использовался, чтобы в 22 раза повысить концентрацию вируса, а также для удаления ДНК и белков клеток хозяина методом диафильтрации (6 объемов) (рисунок 3). Два перистальтических насоса использовались для создания потоков жидкости, две пары весов – для оценки объемов и три одноразовых датчика давления – для того, чтобы следить за перепадом давления в фильтрующем элементе и трансмембранным давлением. Контроль потока проводился с помощью ручных клапанов. Для диафильтрации и извлечения продукта использовался буфер PBS. При нагрузке на фильтр, составляющей 57 л/м^2, достигалась пропускная мощность в 62 л/м^2 со средней производительностью, составлявшей 23 л/м^2/ч. Выход ГА на стадии концентрации составлял 80%, а суммарное логарифмическое снижение концентраций белков клетки хозяина и ДНК на обоих этапах фильтрации составляло 0,8 и 1,4, соответственно.



Рисунок 3. Модуль ReadyCircuit с половолоконным фильтром ReadyToProcess 500 кДа в 22 раза повышал концентрацию вируса и удалял посредством диафильтрации ДНК и белки клетки хозяина

ПРЕИМУЩЕСТВА ОДНОРАЗОВЫХ СИСТЕМ ДЛЯ СБОРА ВИРУСА

Длительность производственного цикла для описанного выше рабочего процесса была сравнима с длительностью таких же производственных циклов, использующих традиционные системы. Как и в случае культивирования вируса, использование одноразовых систем для сбора вируса исключает необходимость собирать, очищать и стерилизовать систему. В нашем примере общая длительность рабочего процесса при использовании одноразовых модулей ReadyCircuit снизилась с 13,5 ч до 5,5 ч. Кроме того, модули ReadyCircuit повышают гибкость рабочего процесса, поскольку, используя платформу, можно производить несколько продуктов без риска их перекрестной контаминации и более безопасно, поскольку живой вирус гриппа находится в герметично закрытом контейнере.

Мы показали, что системы WAVE Bioreactor и одноразовые модули ReadyCircuit могут с успехом применяться для культивирования вируса гриппа. Мы достигли высокого выхода гемагглютинина и сократили общее время до сборки вируса с 13,5 ч до 5,5 ч. Кроме того, на этапе сбора вируса мы сумели удалить 85% белков клетки хозяина и 96% ДНК, облегчив таким образом последующие этапы очистки, направленные на удаление этих примесей.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. Shahani. Market Research Report: Vaccine technologies and global markets. 2010. 79. p.
2. S. Shahani. Market Research Report: Vaccine technologies and global markets. 2011. 81 p.
3. A.-C. Magnusson, T. Lundström, M. Lundgren. Optimization of Conditions for Producing Influenza Virus in Cell Culture Using Single-Use Products // BioProcess International Industry Year Book. 2011–2012. P. 112–113.
4. M. Farshid, R. Taffs, D. Scott, D. Asher, K. Brorson. The clearance of viruses and transmissible spongiform encephalopathy agents from biologicals // Curr Opin Biotechnol. 2005. V. 16. № (5). P. 561–567.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОИЗВОДСТВА КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ В РОССИИ

АВТОРЫ

Е.А. Шмаков,

руководитель центра
надлежащих инженерных практик
ФБУ «ГИЛС и НП»

Б.В. Бровченко,

зам. генерального директора
ООО «АЗТ Фарма К.Б.»

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время фармацевтическая промышленность находится на стадии активной модернизации. Ежегодно вводится в эксплуатацию существенное количество производственных площадок. Увеличивается количество площадок по выпуску высокоактивных лекарственных препаратов. Растет количество контрактных площадок. Проводятся работы по реконструкции имеющихся производств, модернизируются производственные участки. Ведутся работы по увеличению эффективности производственных площадок.

На сегодняшний день у производителей лекарственных средств нередки случаи возникновения несоответствий производственных помещений существующим лицензионным требованиям. К таким несоответствиям относятся: не закрытые коробом воздуховоды внутри чистого помещения, керамическая плитка, швы между которой обработаны штукатурными материалами, использование производственной мебели с деревянными деталями. В большом количестве случаев выявляют несоответствие, при котором стены и потолки производственных помещений покрыты масляной или водоэмульсионной краской.

Полная реконструкция таких помещений является весьма затратным и долгосрочным мероприятием. При переосна-





ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

щении производители стремятся снизить издержки за счет применения материалов, которые обеспечат высокую скорость монтажа, долговечность при использовании и будут соответствовать современным требованиям надлежащих практик; также необходимо учесть особенность чистых помещений, заключающуюся в сложности демонтажа конструкции после завершения монтажных работ, поэтому требования, предъявляемые к материалам отделки, весьма высоки.

В этом ключе основную часть инвестиции в реконструкцию составляют затраты на конструкции чистых помещений, как один из основных элементов создания стоимости производимого продукта, а также ключевой элемент системы обеспечения качества конечного продукта.

Конструкции чистых помещений не зря обычно объединяют в комплекс чистых помещений, поскольку, как и в любом конструкторе, от продуманности всего комплекса зависит финальный результат и качество сборки: по аналогии с конструкторами фирмы LEGO, которые собираются и разбираются бесконечное количество раз, в то время как аналоги не дают плотного соединения уже после второй сборки-разборки. В этом комплексе рискованно заменить одну деталь на деталь другого производителя без риска появления проблем на этапе сборки. Многие монтажные организации пытались и пытаются это сделать, однако зачастую сталкиваются с проблемой отсутствия стыковки элементов разных производителей, даже несмотря на то, что каждый из производителей является весьма продвинутым.

К тому же рынок конструкций для чистых помещений в настоящее время является достаточно пестрым и характеризуется широким спектром предлагаемых материалов, фирм-производителей из разных стран мира.

АНАЛИЗ ОСНОВНЫХ ПРЕДЛОЖЕНИЙ ПО КОНСТРУКЦИЯМ ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

В таблице 1 мы постарались отразить одновременно основные особенности производителей, сгруппированных по странам мира, и представить основные преимущества и недостатки каждой группы производителей. Данная таблица является собирательным образом производителей одной страны. Естественно, что в одной группе существуют производители с разными условиями по представленным параметрам. Однако в целом по выделенным группам значения параметров, как правило, отличаются несущественно.

Как видно из представленной таблицы, каждая из групп имеет как свои положительные стороны, так и отрицательные. Однако в связи с активизацией российского фармацевтического рынка можно говорить о том, что российские производители ограждающих конструкций чистых помещений неизбежно будут работать над совершенствованием своих технологий для предоставления качественного конструктива по ценам значительно меньшим, чем производители из Европы, при этом качество продукции будет существенно лучше, чем у производителей из Индии и Китая. Это будет способствовать тому, что производители из России займут существенную нишу на рынке конструкций для чистых помещений и будут в дальнейшем более конкурентоспособными по отношению к производителям западных стран.

В данном случае для оптимизации бюджета строительства комплекса чистых помещений и отсутствия привязки к колебаниям курса иностранных валют можно и нужно всерьёз задуматься о применении полного конструктивного решения от отечественного произ-

Таблица 1.

Анализ основных предложений по конструкциям чистых помещений

Страна производства	Сроки изготовления, недели	Срок доставки, недели	Ремонт и доборные элементы	Стоимость	Срок эксплуатации, год	Монтаж	Примечания
Россия	3–4	1	Оперативно, дешево	Средняя	2–4	Местные бригады	Оперативная поставка
Западная Европа	7–8	2–4	Оперативно, дорого	Высокая	3–5	Выездные бригады, дорого	Крайне дорогостоящее решение
Восточная Европа				Выше средней и высокая	2–4		Дешевле, но есть проблемы с оперативностью
Китай	4–6	8	Долго, дёшево	Ниже средней	1–3	Затруднительно	Сложности размещения заказа
Индия							Сложности коммуникаций и дальнейшего монтажа

водителя. По скорости реакции на дозаказы, замену испорченных материалов в процессе монтажа, по возможности монтажа силами местных подрядчиков вариант использования отечественного конструктива для чистых помещений является на сегодняшний день наиболее интересным из всех возможных.

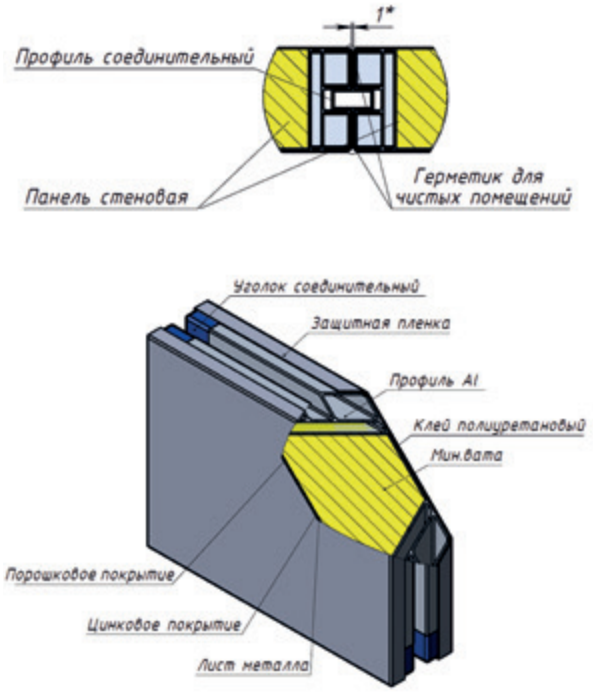
Существуют проблемы с нормативной базой и требованиями в области организации производства лекарственных средств, в связи с которыми образуется определенный вакуум в области требований к конструкциям чистых помещений. В настоящий момент на территории ЕАЭС ведется разработка и гармонизация нормативной базы требований в области производства лекаственных средств. Рассмотрим более детально требования к материалам покрытий и сами материалы.

Требования к материалам и поверхностям чистых помещений регламентируются правилами надлежащей производственной практики (приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации № 916 от 14.06.2013 с изменениями от 18.12.2015) и ГОСТом Р ИСО 14644-4-2002. Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 4. Проектирование, строительство и ввод в эксплуатацию.

Комплекс чистых помещений включает в себя базовые ограждающие элементы, служащие физическим барьером, обеспечивающим герметичность:

- Панель стеновая

Чаще всего это легкие каркасные трехслойные панели, состоящие из двух внешних стальных листов и слоя утеплителя базальтовой минераловатной плиты на синтетическом связующем слое. Периметр панели выполнен из стального профиля для обеспечения дополнительной жесткости конструкции и обеспечения самонесущих свойств.



Стеновая сэндвич-панель

- Панель вытяжная для чистых помещений

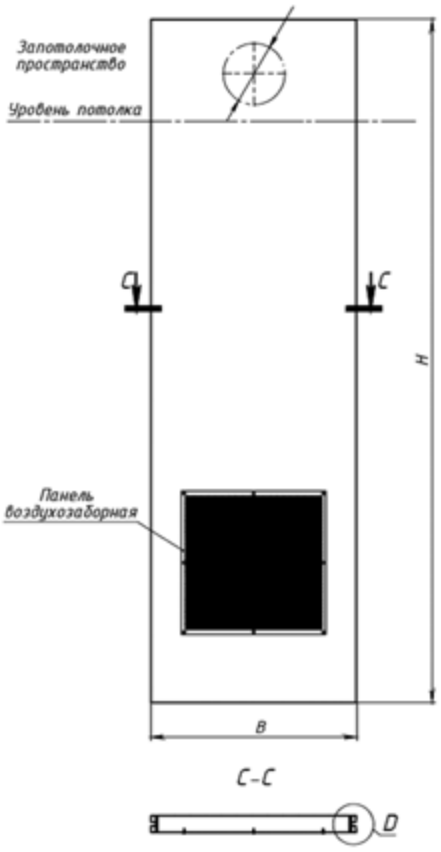
Применяется для организации вытяжного канала. Используется с фильтром или без него. За счёт глубины всего 50 мм не создаётся дополнительная застойная зона около организованного вытяжного канала. Подключается к системе вентиляции за границами подвесного потолка.



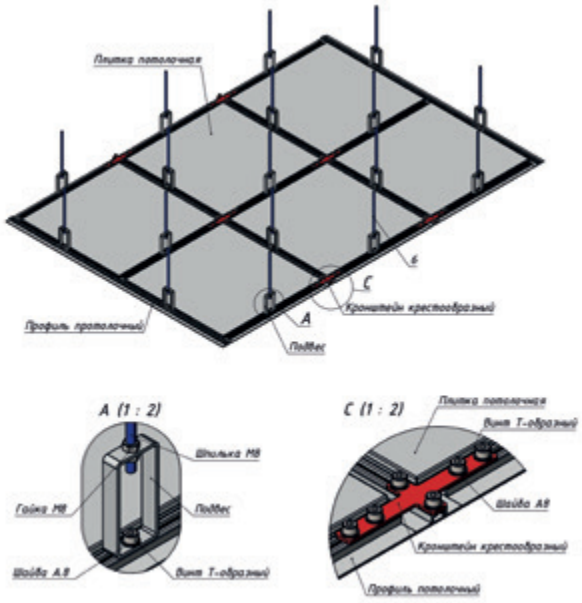
Остекление

- Потолок для чистых помещений

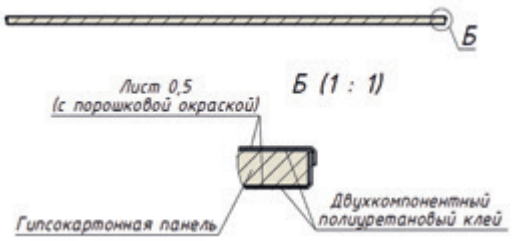
Конструкция потолка представляет собой несущий каркас, изготавливаемый из алюминия, и потолочные кассеты. Данный тип потолка монтируется к



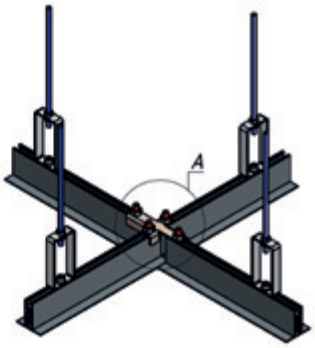
Вытяжная панель

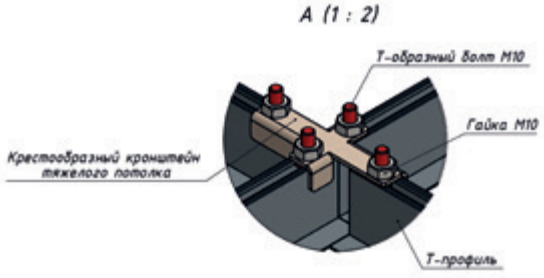


Потолок легкий



Плитка потолочная



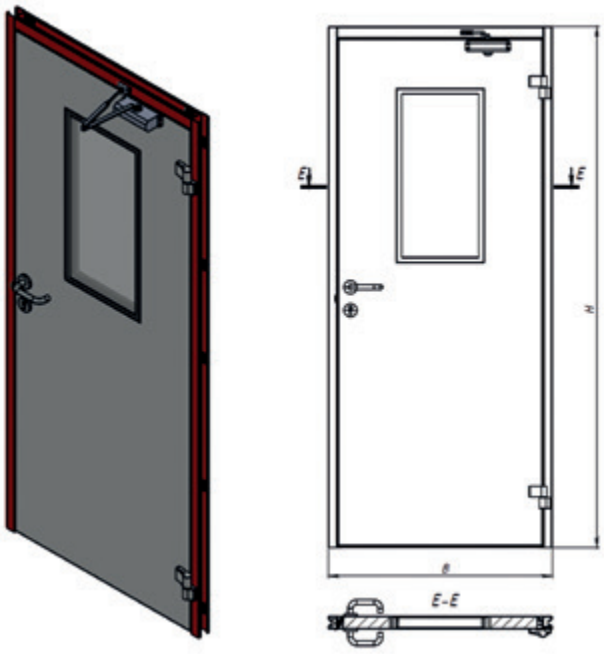


Потолок тяжелый

несущему каркасу со стороны запотолочного пространства. В подвесную систему потолка могут быть встроены светильники для чистых помещений и воздухораспределители с фильтрами с автономными подвесами к капитальным конструкциям. Панели выдерживают значительные перепады давления между чистым помещением и запотолочным пространством. Потолок оснащен модульной сеткой с изменяемым размером растра и гибким выбором размера сетки. Потолочные плитки облицованы металлом со всех сторон, что сводит к минимуму количество выделяемых частиц вне чистого контура.

- Двери для чистых помещений

Выполняют функцию создания герметичного барьера в чистых помещениях. Дверное полотно является сэндвич-конструкцией. Основу составляет тепло- и шумоизолирующий сердечник из негорючих жестких базальтовых плит или эквивалент с перпендикулярно направленным волокном. Двери бывают с остеклением (двухслойное остекление заподлицо с поверхностью панели) и без него. Двери имеют уплотнение по периметру соприкосновения двери с коробом и оснащены пороговым уплотнением в виде шторки с автоматической системой поднимания-опускания при открывании двери.



Дверь однополая для чистых помещений

- Шлюзы и передаточные окна:

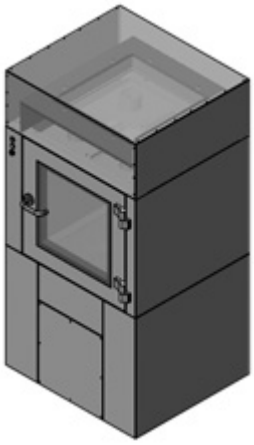
Обдувочный шлюз.

Предназначен для очистки одежды персонала, входящего в чистое помещение, от загрязняющих и зараженных частиц или для перемещения габаритных грузов. Шлюзы устанавливаются на входе в чистое по-

мещение, применяются в виде основного или дополнительного входа для персонала в чистое помещение и выхода из него без вмешательства в функционирование чистого помещения и минимизации его загрязнения. Активный обдувочный шлюз работает автономно от системы вентиляции – может быть установлен в любом месте помещения, требуется только подключение к электропитанию.

Передаточное окно.

Применяется для перемещения габаритных грузов (палет, тележек, технологического оборудования) в чистое помещение и для выноса из чистого помещения без вмешательства в функционирование чистого помещения и для минимизации его загрязнения. Может быть оснащено встроенным вентилятором, при его отсутствии обработка поверхностей производится встроенной УФ-лампой.

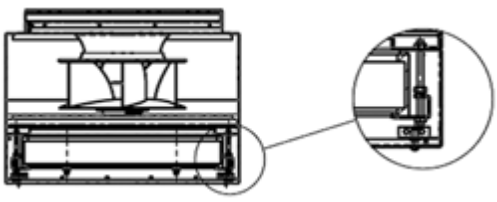


Активное передаточное окно

- Элементы системы вентиляции:

Модуль потолочный приточный.

Воздухораспределители обеспечивают очистку воздуха от взвешенных в нем микрочастиц и микроорганизмов и его подачу в виде ламинарного потока. В качестве фильтров применяются ячейковые складчатые фильтры HEPA, предназначенные для высокоэффективной финишной очистки воздуха и стерилизующей фильтрации. Воздухораспределитель оснащен портами для проведения DOP-теста и поджимами для обеспечения герметичности установки фильтра.



Воздухораспределитель вентилятором

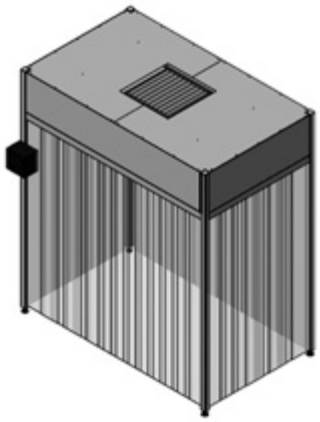
Вентиляционный модуль приточный.

Применяется в конструкциях локальных чистых зон и в чистых помещениях высоких классов чистоты, в том числе там, где требуется создание банка воздуха в запотолочном пространстве. Используется для автономной подачи очищенного воздуха в чистых помещениях и зонах.

- Локальные чистые зоны

Чистые зоны представляют из себя воздухораспределители с вентилятором, закрепленным на каркасе. Ограждения могут быть выполнены из каленого стекла, литого поликарбоната или ПВХ-ламелей. Изготавливаются чистые зоны для создания классов чистоты ISO 3-8.

Позволяют существенно экономить бюджет за счет локального увеличения класса чистоты в помещении. Возможность демонтажа чистых зон позволяет переместить их с одного производственного участка на другой. Имеют минимальный срок изготовления и монтажа.



Локальная чистая зона

- Светильники для чистых помещений

Светильники, предназначенные для освещения чистых помещений, обладают высокой стойкостью, надежностью и герметичностью. Все наружные поверхности светильников допускают обработку моющими и дезинфицирующими веществами и растворами. Представляют собой коробчатую конструкцию, выполненную из окрашенного порошковой эмалью листового металла или алюминия, с нижней стороны герметично установлена рамка с рассеивателем света из опалового стекла, легко открываемая для доступа к внутренним элементам светильника.

- Напольное покрытие

Напольное покрытие может быть выполнено в трёх вариантах: наливной пол, гомогенный антистатический линолеум или фальшпол (применяется, как правило, в электронике, реже в фармацевти-

ческой промышленности). Полы и покрытия для них должны быть непористыми, противодействующими скольжению, антистатическими, легкоочищаемыми, устойчивыми к износу, к используемым чистящим и дезинфицирующим средствам, с высокой коррозионной устойчивостью.

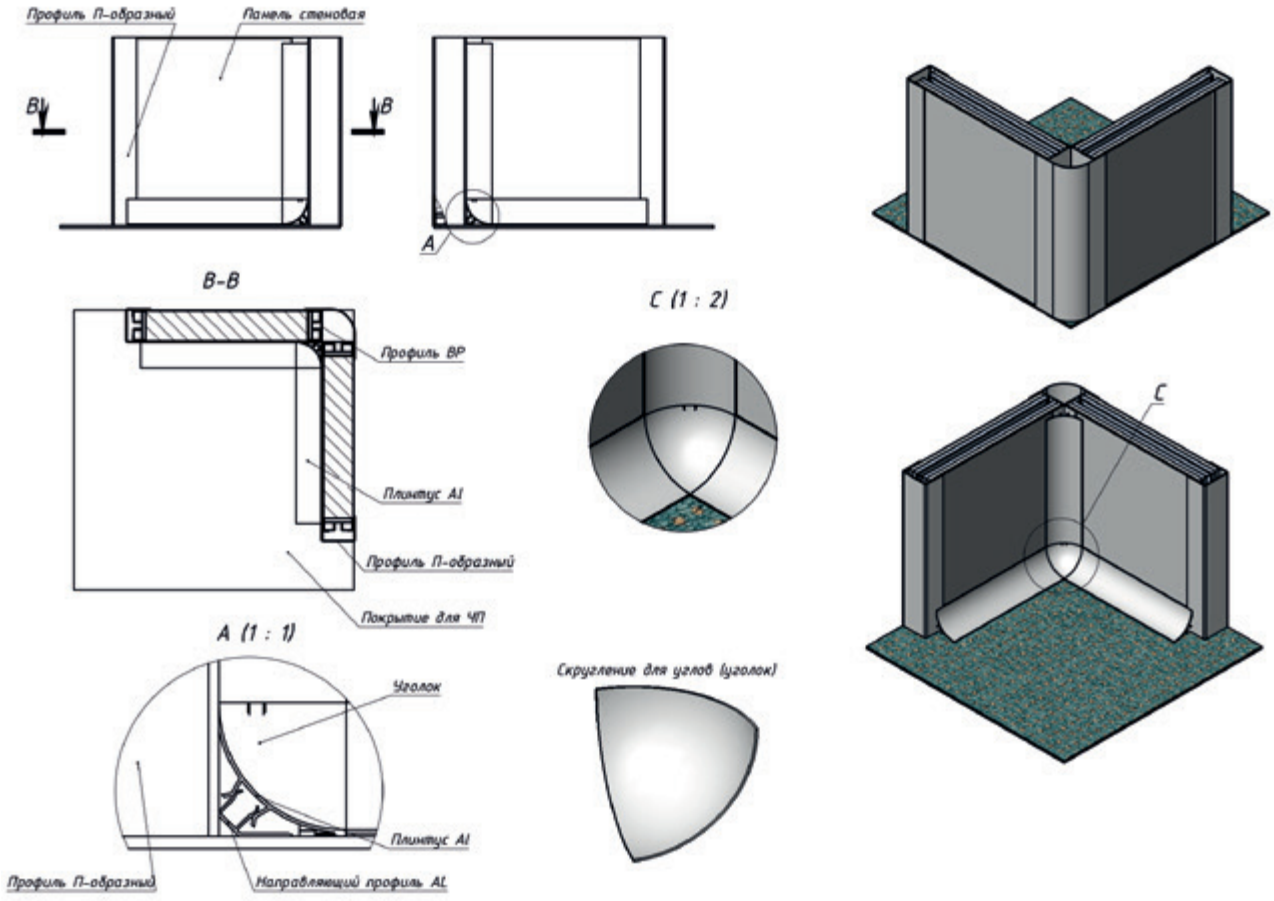
Конструктивное исполнение всех элементов стеновых ограждений и потолков должно обеспечивать получение ровных поверхностей без выступов и углублений. Все внутренние поверхности должны быть гладкими, непористыми, без изломов, раковин, ступенек и т.д. Стыки между элементами – герметизированными при помощи материалов, пригодных для использования в чистом помещении, которые не выделяют частиц, способными выдерживать дезинфекцию и разрешенными для использования по гигиеническим требованиям. Для обеспечения эффективной очистки переходы между полом, потолком и стеновыми панелями конструктивно выполняются скругленными. *Внутренние поверхности должны соответствовать* требованиям заданного класса чистоты помещения и отвечать следующим требованиям:

- гладкая поверхность, не выделяющая веществ, способных привести к контаминации, устойчивая к воздействию дезинфицирующих средств и ультрафиолетового облучения;
- устойчивость к механическим повреждениям и естественному износу;
- легкая доступность для мытья и обработки дезинфицирующими средствами;
- герметичность, обеспечивающая отсутствие неконтролируемых перетоков воздуха и поддержание повышенного или пониженного давления в чистом помещении относительно смежных помещений.

Остекленные элементы стен и дверей не должны открываться. На дверях должно быть как можно меньше горизонтальных поверхностей и выступов. Дверные петли должны легко открываться и чиститься, поверхность должна быть гладкой.

Типовыми материалами для поверхностей стен и потолков являются гипсометаллические листы (ГМЛ), металлические сэндвич-панели (МСП) и панели из слоистого пластика высокого давления (HPL-панели), а также стеклопакеты (СП).

Гипсометаллический лист состоит из металлического листа с полимерным покрытием и листа гипсокартона. Эта панель является финишной отделкой помещения и не требует дальнейшей обработки (окраски, шпатлевки, грунтовки). Эти панели являются



Соединение трех профилей. Узел со стеклопакетом и дверью

материалом для отделки стен, для монтажа перегородок и потолков внутри помещения. Помимо отделки, дает теплозвукоизоляционные и огнезащитные функции. Монтаж панелей производится на тот же профиль, который применяется при монтаже гипсокартонных конструкций. Технология крепежа позволяет исключить возможность накопления пыли в стыках и шовных пространствах.

Специальный влагонепроницаемый стойкий клей делает примыкание гипсокартона к металлическому листу очень плотным. Гипсокартонные листы состоят из несгораемого гипсового сердечника, все плоскости которого кроме торцевых кромок облицованы картоном, прочно приклеенным к сердечнику.

Металлическая сэндвич-панель – это панель, которая состоит из двух металлических листов с двухсторонним полимерным покрытием и наполнителем между листами. В качестве наполнителя используют минеральную базальтовую вату, пенополиуретан, гипсоволокнистый лист или полиизоцианурат. Полиизоцианурат – теплоизоляционный материал нового поколения, представляющий собой комбинацию иглопробивного стеклополотна и алюминиевой фольги, которые соединяются с помощью полимерного связующего под воздействием температуры и давления. Относится к слабогорючим материалам, термостоек, устойчив к воздействию грибков, плесени и ультрафиолетового излучения, не подвержен коррозии и гниению. Обе стороны сэндвич-панели являются лицевыми. Панели используются в тех случаях, когда нужно разделить оснащаемое помещение на чистые зоны или создать стеновую перегородку. Сэндвич-панели могут использоваться в качестве обшивки наружных и внутренних поверхностей стен, потолков.

В качестве металлического листа используется оцинкованная сталь марок 08Ю, 08КП, FePo3G, алюмоцинкованная сталь, никельсодержащая нержавеющая сталь (аустенитная), безникелевая нержавеющая сталь [безникелевая сталь более устойчива к воздействию высококоррозионых материалов, таких как, например, треххлористый фосфор (PCl3)].

Для покрытия стали применяют следующие полимеры:

- Пластизоль (PVC): в состав входит модифицированный поливинилхлорид и пластификаторы; толщина покрытия – до 200 мкм; отличается прочностью к механическим повреждениям; не обладает высокой температурной стойкостью (до +80 °С) и портится под воздействием УФ при высокой температуре.
- Пурал (Pural) – полиуретан с добавлением полиамида; толщина покрытия – 35–50 мкм; устойчив к УФ-облучению, имеет повышенную прочность к механическому и химическому воздействию; температура эксплуатации – до 120 °С.
- ПВДФ (PVDF) – поливинилиденфторид, состоит из поливинилфторида (80%) и акрила (20%), толщина покрытия – 15–35 мкм; самое прочное к механическим повреждениям и самое устойчивое к УФ-излучению покрытие, обладает самоомываемостью за счет небольшого коэффициента натяжения поверхности, устойчиво к агрессивным химическим средствам; диапазон температуры эксплуатации – от –60 °С до +120 °С.
- Полиэстр – самое популярное из полимерных покрытий, толщина покрытия – 25 мкм; имеет отличную устойчивость к УФ-излучению и коррозии; устойчив к слабоагрессивным и неагрессивным химическим средствам; температура эксплуатации – до +120 °С.
- ПЭТФ – полиэтилентерефталат; нетоксичен, химически инертен, не выделяет вредных веществ, не отслаивается; толщина покрытия – 20 мкм; выдерживает обработку агрессивными химическими средствами (например, перекисью водорода); выдерживает широкий диапазон температурных колебаний; имеет антистатические свойства, что минимизирует оседание пыли и частиц.

Сравнительная характеристика покрытий приведена в таблице 2.

Сталь может быть окрашена эпоксидно-полиэфирной порошковой краской и краской с антибактериальным покрытием. Порошковая краска с антибактериальным покрытием – это краска на основе смеси эпоксидной и полиэфирной смол и неорганического соединения серебра, которое надежно предотвращает рост и распространение бактерий, грибков и плесени.

HPL – это слои листов материала, состоящие из волокон целлюлозы (как правило, бумаги), пропитанных термопластичными формальдегидными смолами, и склеенные между собой методом прессования под высоким давлением. Этот процесс характеризуется непрерывной подачей тепла (более 130 °С) и высокоспецифического давления (≥6 МПа), позволяющей распределить и затем отвердить термопластичные смолы для получения гомогенного (без пор) материала. Полученный материал химически устойчив к большому количеству моющих, дезинфицирующих средств, различных химических реагентов, отличается устойчивостью к механическим повреждениям, на поверхности не размножается грибок; не бликует при ярком освещении, не оставляет разводов от ветоши.

Пол чистого помещения может быть полимерным наливным, без сварных швов, с антистатическими свойствами или выполнен из специального антистатического непористого линолеума.

Помимо учёта требований к конструкциям и используемым материалам, необходимо осуществлять

Таблица 2.

Сравнительная характеристика покрытий

Наименование покрытия	Состав	Стойкость к УФ-облучению	Обработка перекисью водорода	Мин. температура эксплуатации, °С	Макс. температура эксплуатации, °С	Толщина покрытия	Особые свойства
Пластизоль	модифицированный поливинилхлорид и пластификаторы	удовлетворительная	нет данных	+10	70-80	200 мкм	Не стоек к совместному воздействию УФ и температуры
Пурал (Pural)	полиуретан с добавлением полиамида	хорошая	нет	-15	+120	35–50 мкм	Повышенная стойкость к механическому воздействию
ПВДФ (PVDF)	поливинилиденфторид (80%) акрил (20%)/поливинилиденфторид (70%) и акрил (30%)	отличная	да	- 60	+120	15–35 мкм	Растворяется ацетонами, ДМСО, бутиламином
Полиэстр	полиэстр	хорошая	нет	-10	+120	25 мкм	Стоек к коррозии
Advantica™ CL Clean	полиэтилентерефталат	удовлетворительная	да	нет данных	нет данных	20 мкм	Обладает антистатическими свойствами
Advantica™ L Control	пленка-ламинат ПВХ	хорошая	да	нет данных	нет данных	120 мкм	Обладает антистатическими свойствами
Эпоксидно-полиэфирная порошковая краска	смесь эпоксидной и полиэфирной смол	хорошая	да	нет данных	нет данных	130 мкм	Возможность добавки в состав соединений серебра для получения антибактериальных свойств
HPL-пластик	волокна целлюлозы, пропитанные термопластичными формальдегидными смолами	отличная	да	нет данных	нет данных	4–15 мм	Отсутствуют поры

подбор покрытий с учетом средств, применяемых при санитарной обработке. Важной частью при выборе материалов покрытий в чистом помещении является учет программы санитарных мероприятий на конкретном производстве в части соблюдения класса чистоты. Например, в высоких классах чистоты зачастую используют классические дезинфицирующие средства, такие как хлорсодержащие или кислородсодержащие средства, обладающие высокой коррозионной активностью, но широко применяются ввиду их обширного спектра действия и дешевизны.

Производители конструкций проводят специализированные опыты по обработке дезинфицирующими средствами, по результатам которых можно в начале оформления заявки выбрать покрытие необходимой устойчивости. Если не учесть этого факта при подборе покрытий, то можно столкнуться с проблемами их преждевременного разрушения и незапланированных затрат.

Для дезинфекции поверхностей в чистых помещениях предлагаются дезинфицирующие средства отечественного и зарубежного производства, имеющие в составе активные вещества из следующих химических групп:

- хлорсодержащие,
- средства на основе активного кислорода,
- средства на основе спиртов,
- средства на основе альдегидов,
- средства на основе четвертичных аммониевых солей (ЧАС),
- средства на основе гуанидинов и третичных аминов.

В таблице 3 приведён сравнительный анализ дезинфицирующих средств.

Большинство современных дезинфицирующих средств подходит для использования в помещениях, спроектированных и построенных в соответствии с надлежащей производственной практикой, выполняют свою функцию и не повреждают материал поверхностей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конструкции для чистых помещений исполняются в различных цветовых решениях, но, как правило, это помещения белого, бело-серого цвета. Иногда некоторые элементы (чаще двери) имеют контрастное

Таблица 3.

Сравнительный анализ дезинфицирующих средств

Дезинфицирующее средство	Концентрация, %	Интервал возможной экспозиции	Стабильность рабочего раствора	Антимикробная активность				Коррозия, разрушение	Раздражающее действие
				Бактерии	Микобактерии	Споры	Вирусы		
Хлорсодержащие смеси	0,5–1,0	10–60 мин	меньше 1 дня	высокая	высокая	высокая	высокая	да	да
Перекисные смеси	4–6	20 мин	7 суток	высокая	непостоянная	непостоянная	высокая, непостоянная	незначительно	Нет
Смеси на основе четвертичных аммониевых солей (ЧАС)*	0,1–0,5	5–20 мин	высокая	средняя	непостоянная	нет	низкая	нет	нет
Глутаровый альдегид	2,0	5 мин – 3 ч	14-28 суток	высокая 5-10 мин	высокая 20 мин	высокая 3 ч	высокая 5–10 мин	нет	да
Этанол/изопропанол	60–70	1-10 мин	в закрытой емкости очень долго	высокая	высокая	нет	средняя	незначительно	нет
Фенолсодержащие растворы**	1,0–2,0	10–15 мин	высокая	высокая	средняя	нет	средняя и низкая	незначительно	да

Примечание: *Разбавленные растворы могут быть средой для роста грамотрицательных бактерий.
** Потенциально токсичны.

покрытие. Обратимся к современным офисам. Зонирование, фирменный стиль, цветовые решения создают условия, которые способствуют настрою сотрудника на необходимый вид работы. Если в офисах вопрос можно решить использованием различных текстур, материалов, флористических элементов, то в чистых помещениях ситуация иная. Компании, заинтересованные в эффективных сотрудниках, зачастую оказываются в ситуации, при которой сложно оформить помещение в желаемом виде. Элементы декора – дополнительный источник накопления загрязнений, однако при продуманном подходе данное загрязнение можно свести к минимуму и сделать его выдерживающим обработку дезинфицирующими средствами.

При использовании подхода персонализации рабочего места компании обращаются непосредственно к производителям конструкций для чистых помещений. С учётом требований к покрытию и обработке производители наносят на конструкции специализированные пленки, окрашивают готовые изделия в фирменном стиле компании или используют элементы, которые отражают назначение помещения. Есть возможность разработать индивидуальные дизайнерские решения либо использовать стандартные. К тому же оформление чистых помещений может быть и полезным. С помощью инфографики изображаются сообщения, которые могут помочь в работе: «навигация», «условные знаки» и другие элементы. Всё чаще фармацевтические производства обращаются с потребностью в оформлении помещений для создания приятной рабочей атмосферы.

Проработка этих вопросов и создание нормативной базы позволит российским производителям конструкций для чистых помещений уверенно занять лидирующую позицию на российском рынке, а также расширить географию поставок на страны Европы и СНГ. Одновременно заказчики получат инструмент оценки и выбора производителя конструкций чистых помещений, отвечающих всем требованиям к конкретному типу производства, который операется на объективную оценку параметров и технических характеристик производимых конструкций для чистых помещений.

Актуальные вопросы, стоящие перед производителями конструкций чистых помещений, равно как и перед заказчиками комплексов чистых помещений:

- Отсутствие требований к материалам покрытий, толщине покрытий в зависимости от типа производства.
- Отсутствие методических рекомендаций по обработке поверхностей дезинфицирующими средствами.
- Необходимость поиска оптимального соотношения типа и вида покрытия в разрезе стоимости изделия, срока его службы и применимости в разных производственных зонах.
- Отсутствие требований к конструкции и принципу работы воздушных шлюзов и передаточных окон.



MTEX

Строительство модульных заводов

для фармацевтики, биотехнологии и других видов производства

99%
будущего здания изготавливается на заводе

90
рабочих дней
монтаж здания на площадке

20
рабочих дней
для ввода производства в эксплуатацию

Для строительства фармацевтических заводов и биотехнологических производств

Быстрое увеличение производственных площадей под новые цели

Быстрый ввод в эксплуатацию

Выход на рынок быстрее конкурентов

+7 (495) 646-13-82
info@mtxclean.ru
http://mtxclean.ru/

ООО «МТЕХ» г. Люберцы,
ул. 65-летия Победы, 1, корп. 15

НОВЫЕ МЕТОДЫ ICH И USP ДЛЯ ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ICP-MS И ICP-OES ДЛЯ ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛИЗА

АВТОРЫ

Amir Liba,
Ed McCurdy,
Ross Ashdown,
Agilent Technologies

АННОТАЦИЯ

Американская Фармакопея (USP) наряду с Международной конференцией по гармонизации (ICH) разрабатывают новые методы для неорганических примесей в медикаментах, а также их ингредиентах. Текущий USP-метод <231> «анализ на допустимое содержание тяжелых металлов» признан не соответствующим требованиям и удален из общих статей USP <232> («Пределы») и <233> («Процедуры») в декабре 2015 года. В новых методах рассматриваются ограничения текущего метода, а также будет расширен перечень анализируемых веществ с уменьшением максимального предельно допустимого воздействия, принимая во внимание сам метод воздействия. Новые методы включают в себя использование минерализации проб в закрытых сосудах, а также оборудование, которое гарантирует точное воспроизведение и определение концентрации каждого отдельно взятого анализируемого вещества. В данной статье представлены новые общие статьи Фармакопеи USP, требования и нормы Международной конференции по гармонизации ICH для элементных примесей (Q3D), а также соответствие требованиям новых методов приборов ICP-MS серии 7900 и ISP-OES серии 5100 производства компании Agilent Technologies.

ВВЕДЕНИЕ

Наличие примесей в фармацевтических образцах обусловлено не только токсичностью загрязняющих веществ, но и тем фактом, что данные вещества могут отрицательно влиять на стабильность и срок годности лекарственного средства, а также вызывать нежелательные побочные эффекты. Ввиду этого необходимо отслеживать и контролировать наличие органических и неорганических (элементных) примесей в сырье, включая воду, которая используется при производстве лекарственных препаратов; вспомогательные вещества; активные фармацевтические ингредиенты (АФИ); формообразующие вещества (стабилизаторы, наполнители, связующие вещества, красители, ароматизаторы, покрытия и т.д.). Необходимо также отслеживать примеси, которые попадают в вещества во время производственного процесса: каталитические остатки или же загрязняющие вещества с производственного оборудования.



Agilent Technologies

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Нормативно-правовые акты касательно безопасности и эффективности медикаментов разрабатываются в большинстве стран и регионов отдельно, тем не менее большинство фармацевтических компаний реализуют свою продукцию по всему миру. Ввиду этого в 1990 году была сформирована Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения человеком (ICH), которая координирует и контролирует уровень максимально допустимого предельного воздействия, а также аналитические методы по всему миру. Международная конференция по гармонизации ICH, которая включает в себя контролирующие органы из США, Европы и Японии, а также представительские организации из других стран, определила нормы и требования для элементных примесей (Q3D). Данные нормы и требования (Q3D) находятся на этапе рассмотрения 2b (черновик, выпущенный после проведения консультации) и ожидают утверждения всеми участвующими надзорными органами.

Все производители фармацевтических продуктов, предназначенных к использованию на территории США, должны соответствовать требованиям проведения процедур измерения допустимых пределов загрязняющих веществ (включая элементные примеси), которые определяются Американской Фармакопей (USP). Контролирующим органом, который несет ответственность за принудительное обеспечение исполнения всех норм и требований, является Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA). USP разрабатывает новую методологию для отслеживания неорганических примесей (элементных) в фармацевтическом сырье наряду с ICH Q3D. Предложенные новые общие статьи Фармакопеи USP <232> («Пределы») и <233> («Процедуры») официально утверждены в августе 2015 года и реализованы в декабре 2015 года.

В 2000 году Комитет по лекарственным препаратам для медицинского применения (CHMP) Европейского агентства лекарственных средств (EMA) опубликовал нормы и требования для контроля 14 элементов в готовых лекарственных формах (CHMP/SWP/4446/2000). Однако данные нормы и требования сфокусированы только на остатках катализаторов или реагентах, которые добавляются при производственном процессе, в то время как новые методы ICH и USP будут включать в себя несколько токсических элементов, которые могут находиться в загрязняющих веществах.

Текущий метод USP, который используется для отслеживания неорганических загрязняющих веществ в фармацевтических образцах, – это колориметрический анализ, описанный в общей статье <231>. Данный метод (более известный как «анализ на допустимое содержание тяжелых металлов») основывается на осаждении 10 сульфидообразующих элементов (Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb и Sn) в реакции с такими реагентами, как тиоацетамид. Далее цветной осадок визуально сравнивается со стандартом Pb (свинец) 10 ppm для определения соответствия образца показателям предельно допустимого содержания тяжелых металлов. Помимо очевидного потенциального варьирования, которое имеет непосредственное отношение к субъективному визуальному сравнению, метод USP <231> является граничным испытанием, основанным на суммировании 10 элементов, что, в свою очередь, исключает возможность определения концентрации каждого отдельно взятого элемента. Также данный метод не может использоваться для определения таких необходимых элементов, как Cr (хром) и элементов платиновой группы (PGE), которые обычно используются в качестве производственных катализаторов. Более того, использование тиоацетамида и сероводорода H_2S запрещено в большинстве стран мира.

Методы ICH Q3D и USP <232> включают в себя более широкий перечень анализируемых веществ, включая катализаторы и элементные загрязняющие вещества, которые попадают из сырья при производственном процессе из окружающей среды, а также упаковочную систему (CCS). Максимально допустимые значения в новых методах определяются, исходя из уровня токсичности, а не из возможностей использования метода. Новый метод USP <233> рекомендует использование современных систем, таких как многоэлементные ICP-MS и ICP-OES, в то время как в методе USP <231> используется колориметрический анализ.

Метод USP <233> также описывает предполагаемые варианты подготовки образца, которые необходимо будет использовать, включая метод микроволнового разложения проб в закрытом сосуде для обеспечения полного разложения и удержания нестабильных элементов. Для сравнения: метод USP <231> требует выполнения прокаливания образца в печи при температуре до 600 °C. Такая высокая температура неизбежно приводит к потере нестабильных анализируемых веществ, включая критичный токсичный элемент Hg (ртуть) [1–3].

В статье 1995 года «Stimuli to the Revision Process» («Причины для пересмотра процесса») первого Фармакопейного форума (PF) Блейк отметил, что «из-за потери металла при его прокаливании действительность результатов проведения общих испытаний по текущим методам USP [<231>], JP и Eur.Ph. находится под большим вопросом» [1]. В последующей статье [4] 2000 года Ванг предложил использовать современный инструментальный (приборный) метод (ICP-MS) вместо колориметрического анализа, указанного в методе USP <231>. В статье [4] описываются некоторые ограничения и недостатки метода USP <231>: «методы, основанные на интенсивности цвета осаждаемых сульфидов, являются неспецифичными, малочувствительными, времязатратными, трудозатратными и чаще всего обеспечивают низкий уровень восстановления (либо же полное отсутствие восстановления)».

Признание данных недостатков привело к возникновению программы замены метода USP <231> новым инструментальным методом, который обеспечивает получение более надежных, точных и конкретных результатов с высоким уровнем чувствительности. Три новые общие статьи Фармакопеи USP, относящи-

еся к элементным примесям, разрабатывались параллельно со статьями USP <232>, <233> и <2232>. Статья USP <2232> ограничена диетическими добавками, в то время как статьи USP <232> и <233> описывают взаимодействие с фармацевтическими ингредиентами и продуктами.

В таблице 1 приведены данные о пределах допустимой суточной дозы (PDE) для нового перечня из 15 анализируемых веществ (As, Cd, Hg, Pb, V, Cr, Ni, Mo, Cu, Pt, Pd, Ru, Rh, Os и Ir), которые определены в USP <232> [5]. Самая последняя ревизия статьи USP <232> (декабрь 2013) была опубликована для открытых комментариев 1 марта 2014 года на Фармакопейном форуме (PF) 40(2). Данный черновик был обновлен, и в его содержание были включены ревизии, рекомендованные коллегиальным экспертным органом по элементным примесям. Это было сделано специально, чтобы частично адаптировать нормы и требования USP <232> к ICH Q3D (Шаг 2) [6]. Некоторые отличия между двумя данными методами все же остались: ICH Q3D определяет предельное содержание для 24 элементов в общем, включая Li, Co, Se, Sn, Sb, Ba, Au, Ag и Tl, которые не внесены в перечень метода USP <232>. Оба метода включают в себя большинство токсичных элементов (As, Cd, Hg и Pb, «Big Four» – большая четверка), которые контролируются на более низких уровнях, чем другие анализируемые вещества, и должны быть измерены во всех образцах.

Перечень анализируемых веществ, а также значения уровней предельно допустимого содержания в методах ICH Q3D [6] и USP <232> [5] разрабатывались на основании токсикологических данных, а не исходя из возможностей метода (как в случае с USP <231>), и впервые перечень веществ стал включать неорганические катализаторы (платиновая группа PGE, Pd, Ru, Rh, Os и Ir). Каталитические металлы должны измеряться в том случае, если они были добавлены во время процесса синтеза или обработки образца (в общих случаях согласно нормам и требованиям Европейского агентства лекарственных средств – EMA).

Статья USP <232> включает в себя раздел, который описывает элементные формы (виды) элементов. В данном разделе отмечено, что элементы As и Hg находятся вне особого внимания ввиду того, что некоторые формы гораздо токсичнее других. Значение предельной суточной дозы PDE для As расчитывается, исходя из неорганических форм, если измеренная общая концентрация As превышает пределы PDE. В данном случае необходимо провести повторный анализ с использованием процедуры, которая позволит провести разделение и количественное определение различных видов As. Проведение данной процедуры необходимо ввиду того, что неорганический As – арсенит [As (III)] и арсенит [As (V)] – является более токсичным по сравнению с общими органическими формами, такими как арсенобетаин. Вещественный анализ необходим для разделения различных химических форм и подтверждения того, что уровень неорганического As (сумма арсенита и арсената) находится ниже предела значения допустимой суточной дозы PDE. Подобным образом предел Hg основан на неорганической Hg (Hg^{2+}), которая является формой, вероятнее всего находящейся в лекарственных препаратах; метилртуть (MeHg) – более токсичная форма, и ее присутствие в лекарственных формах является маловероятным. Тем не менее метилртуть (MeHg) необходимо отделить и измерить в случае, если образцы, полученные из материала (например, ткань рыбы), могут содержать ее в значительном количестве. Хроматографическое разделение различных форм данных элементов приводит к снижению уровня интенсивности сигнала по сравнению с комбинированной «общей» концентрацией элементов, которая обуславливает необходимость занижения пределов определения на используемом приборе.

Таблица 1.

Анализируемые вещества согласно ICH Q3D, USP <232> и EMA и значения допустимой суточной дозы (PDE) (мкг/день) для элементных примесей в готовых лекарственных формах. Значения пределов приведены для лекарственных форм орального применения; для парентерального и ингаляционного применения используются другие значения [5]

Класс ICH	Элемент	ICH (мкг/день)	USP (мкг/день)	EMA (мкг/день)
Класс 1	As – Мышьяк	15	15	н/в
	(неорганич.)			
	Cd – Кадмий	5	5	н/в
	Hg – Ртуть	40	15	н/в
	(неорганич.)			
	Pb – Свинец	5	5	н/в
Класс 2A	Co – Кобальт	50		
	Mo – Молибден	180	180	250
	Se – Селен	170		
	V – Ванадий	120	120	250
Класс 2B	Ag – Серебро	170		
	Au – Золото	130		
	Ir – Иридий	1000*	100	100**
	Os – Осмий	1000*	100	100**
	Pd – Палладий	100	100	100
	Pt – Платина	1000	100	100
	Rh – Родий	1000*	100	100**
	Ru – Рутений	1000*	100	100**
	Tl – Таллий	8		
Класс 3	Ba – Барий	13000		
	Cr – Хром	11000	н/с	250
	Cu – Медь	1300	1300	2500
	Li – Литий	780		
	Ni – Никель	600	600	250
	Sb – Сурьма	1200		
	Sn – Олово	6400		
Класс 4	Mn – Марганец			2500
	Zn – Цинк			13000
	Fe – Железо			13000

Примечание: * Значение допустимой суточной дозы PDE на основании платины Pt из-за недостаточности данных.

** Предел подкласса – значение допустимой суточной дозы PDE определяется исходя из суммы элементов

н/в – не включен в перечень Европейского агентства лекарственных средств (EMA).

н/с – не считается безопасным для применения за исключением ингаляционного введения.

Значения пределов допустимой суточной дозы PDE для методов ICH, USP<232> и EMA, которые приведены в таблице 1, используются для лекарственных форм орального применения; для иных способов применения используются другие значения допустимых пределов. Например, для лекарственных препаратов парентерального применения необходимо использовать модифицированные значения допустимых пределов суточной дозы PDE, которые обычно ниже значений для препаратов орального способа применения. Инфузионные препараты (LVP; с дневной дозой более 100 мл) могут контролироваться путем измерения элементных примесей в каждой составляющей препарата, и в таком случае показатели пределов должны быть ниже более чем в 100 раз по сравнению со значениями для препаратов орального способа применения. Например, каждая отдельная составляющая инфузионного препарата должна содержать менее чем 0,15 мкг/г неорганической Hg и менее чем 1 мкг/г каждого отдельно взятого катализатора (Ir, Os, Pd, Pt, Rh и Ru).

Для конвертации значений предельно допустимой концентрации (PDE) в значения концентрации в лекарственных формах или их составляющих (АФИ, вспомогательные вещества и т.д.), USP <232> и ICH Q3D предлагают использование нескольких подходов. Например, метод USP <232> предоставляет значения пределов для каждой отдельной составляющей лекарственных субстанций и вспомогательных веществ, предполагая, что максимальное значение предельно допустимой суточной дозы находится на уровне менее или эквивалентом значению 10 г/день (таблица 2). Первоочередное применение значений пределов для составляющих препаратов – это скорее контроль качества при производстве, нежели конечная сертификация продукта, так как данные значения позволяют производителям лекарств и медикаментов контролировать концентрацию примесей в сырье и вспомогательных веществах, которые будут использоваться для производства лекарственной формы. Для обеспечения качества продукта путем контроля производственных процессов и состава сырья методы ICH Q3D и USP <232> стали соответствовать целям проектирования качества (QbD), что, в свою очередь, позволило увеличить их применение в фармацевтическом производстве для понимания и управления источниками варьирования в продуктах и процессах. Как и в случае с пределами PDE, пределы концентрации, приведенные в таблице 2, также основаны на значениях показателей для лекарственных форм орального применения. Для препаратов ингаляционного и парентерального способа применения используются иные значения показателей пределов.

Для любого образца, который требует усвоения или минерализации, пределы дневной суточной дозы PDE и пределы концентрации необходимо откорректировать в зависимости от коэффициента разбавления, применяемого во время подготовки образца. Например, предел дневной суточной дозы PDE для Cd в продуктах орального способа применения составляет 5 мкг/день или же 0,5 мкг/г в лекарственной форме для препарата с максимальной суточной дозой в 10 г/день. Коэффициент разбавления 250 во время минерализации образца (например, образец массой 0,2 г минерализируется и разбавляется в конечный объем 50 мл) помог бы получить значение предела концент-

Таблица 2.

Пределы составляющих для элементных примесей фармацевтической субстанции и вспомогательных веществ с максимальным уровнем дневной дозы ≤ 10 г/день [5, 6]. Значения пределов составляющих для препаратов парентерального или ингаляционного применения будут гораздо ниже для большинства элементов

Класс ICH	Элемент	ICH Q3D** (мкг/г)	USP <232>** (мкг/г)	EMA CHMP/ SWP/ 4446/ 2000 (текущий) (мкг/г)
Класс 1	As – Мышьяк	1.5	1.5	н/в
	(неорганич.)			
	Cd – Кадмий	0.5	0.5	н/в
	Hg – Ртуть (неорганич.)	4	1.5	н/в
	Pb – Свинец	0.5	0.5	н/в
Класс 2A	Co – Кобальт	5		
	Mo – Молибден	18	18	25
	Se – Селен	17		
	V – Ванадий	12	12	25
Класс 2B	Ag – Серебро	17		
	Au – Золото	13		
	Ir – Иридий	100*	10	10***
	Os – Осмий	100*	10	10***
	Pd – Палладий	10	10	10
	Pt – Платина	100	10	10
	Rh – Родий	100*	10	10***
	Ru – Рутений	100*	10	10***
	Tl – Таллий	0.8		
Класс 3	Ba – Барий	1300		
	Cr – Хром	1100	н/с	25
	Cu – Медь	130	130	250
	Li – Литий	78		
	Ni – Никель	60	60	25
	Sb – Сурьма	120		
	Sn – Олово	640		
Класс 4	Mn – Марганец			250
	Zn – Цинк			1300
	Fe – Железо			1300

Примечание: * Значение допустимой суточной дозы PDE на основании платины Pt из-за недостаточности данных.

** Предложенное значение.

*** Предел подкласса – значение допустимой суточной дозы PDE расчитывается, исходя из суммы элементов.

н/в – не включен в перечень Европейского агентства лекарственных средств (EMA).

н/с – не считается безопасным для применения за исключением ингаляционного введения.

рации минерализованного образца (значение J), равного 2 мкг/л (ppb) для Cd. Точное восстановление должно быть продемонстрировано при значении 0,5 J (1 мкг/л) с необходимостью использования предела определения ниже данного уровня (таблица 2). Таблица 3 наглядно демонстрирует изменение значения J в зависимости от уровня минерализации / разбавления.

Таблица 3.

Подсчет текущего значения показателя J (мкг/л, ppb) с различными уровнями минерализации для продуктов орального способа применения с суточной дозой ≤10 г. Для получения дополнительных значений показателя J при 250-кратном разбавлении см. таблицу 4

Элемент	J при 250-кр. раз.	J при 50-кр. раз
As-Мышьяк (неорг.)	6	30
Cd-Кадмий	2	10
Hg-Ртуть (неорг.)	6	30
Pb – Свинец	2	10

В таблице 4 приведены предложенные значения пределов составляющих продуктов для орального применения по методу ICH Q3D с типичным уровнем минерализации раствора образца (при 250-кратном разбавлении). Предложенные пределы для метода USP <232> также приведены в данной таблице. Их значения являются практически идентичными за исключением значений элементов платиновой группы PGE (остатки катализатора), которые имеют значения в 10 раз ниже, чем в методе ICH Q3D, и за исключением случая с Pd. Значения пределов определения масс-спектрометра Agilent ICP-MS 7900 также включены в таблицу 4, что, в свою очередь, подтверждает тот факт, что данный прибор полностью соответствует требованиям пределов определения, необходимых для фармакопейного анализа, даже при использовании небольшого объема образца и при использовании большого коэффициента разбавления. Пределы составляющих лекарственного препарата и его вспомогательных веществ парентерального или ингаляционного способа применения значительно ниже для большинства элементов (до 100 раз), чем пределы значений для препаратов орального применения. Например, предел составляющей



Масс-спектрометр Agilent ICP-MS 7900

для Pd в методе USP <232> – 10 мкг/г для препаратов орального способа применения, 1,0 мкг/г – для парентеральных препаратов и 0,1 мкг/г – для ингаляционных препаратов. Даже если мы принимаем во внимание коэффициент разбавления, то данные уровни в минерализованном образце все равно легко определяются в диапазоне масс-спектрометра Agilent ICP-MS 7900.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Таблица 4.

Пределы составляющих (значения J) для элементных примесей при 250-кратном (0,2 г минерализируется в конечный объем 50 мл) разбавлении образцов, анализируемых вместе с инструментальными пределами определения (IDL) (мкг/л, ppb) масс-спектрометра Agilent ICP-MS 7900. Максимальный уровень примесей, применяемый к продукту орального способа применения с суточной дозой ≤10 г*

Класс ICH	Элемент	ICH Q3D** µg/L, ppb	USP <232> ** µg/L, ppb	Agilent ICP-MS 7900 IDLs*** мкг/л, ppb
Класс 1	As – Мышьяк (неорганич.)	6	6	0,005
	Cd – Кадмий	2	2	0,0001
	Hg – Ртуть (неорганич.)	16	6	0,001
	As – Мышьяк	2	2	0,0002
Класс 2A	Co – Кобальт	20		0,0002
	Mo – Молибден	72	72	0,0002
	Se – Селен	68		0,02
	V – Ванадий	48	48	0,005
Класс 2B	Ag – Серебро	68		0,0005
	Au – Золото	52		0,0002
	Ir – Иридий	400	40	0,0002
	Os – Осмий	400	40	0,0005
	Pd – Палладий	40	40	0,0001
	Pt – Платина	400	40	0,0002
	Rh – Родий	400	40	0,0001
	Ru – Рутений	400	40	0,0002
	Tl – Таллий	3.2		0,0001
Класс 3	Ba – Барий	5200		0,0005
	Cr – Хром	4400		0,002
	Cu – Медь	520	520	0,002
	Li – Литий	312		0,01
	Ni – Никель	240	240	0,002
	Sb – Сурьма	480		0,0002
	Sn – Олово	2560		0,001
Класс 4	Mn – Марганец			0,001
	Zn – Цинк			0,002
	Fe – Железо			0,01

Примечание: * Значения пределов компонентов для препаратов парентерального или ингаляционного способа применения значительно ниже для большинства элементов.
** Предложенные значения.
*** Инструментальные пределы определения IDL измерены при предпочтительном изотопе в матрице из 1% HNO_3/0.5% HCl.

Широкий перечень типов фармацевтических образцов может потребовать проведения анализа с использованием методов ICH Q3D и USP <232>/<233>,

что, в свою очередь, делает непрактичным использование детализированного подхода подготовки образца в конкретном методе, который подходил бы для всех типов образцов. Некоторые фармацевтические образцы могут анализироваться в неразбавленном состоянии, в то время как другие образцы могут быть подготовлены при помощи простого разбавления / растворения в водном растворе (например, в воде или разбавленной кислоте) или в подходящем органическом растворителе (например, 2-бутоксиэтанол : вода (25:75) [3], ДМСО или ДМЭ). При использовании методов, которые предполагают применение простого разбавления / растворения в водном растворе или органическом растворителе, необходимо принимать во внимание значения показателей химической стабильности и в случае с органическими растворителями – переменную испаряемость составляющих раствора. Для большинства АФИ разбавление в органическом растворителе является наиболее предпочтительным подходом и, в свою очередь, это может потребовать использование дополнительных средств стабилизации анализируемых веществ во избежание варьирования восстановления из-за наличия более или менее летучих веществ по сравнению с калибровочным стандартом [8].

Большое количество вспомогательных веществ, АФИ и конечных продуктов не будут растворяться в любом общеиспользуемом водном растворе или органическом растворителе, что, в свою очередь, приводит к необходимости использования кислотного гидролиза.

В методе USP <233> прописано использование сильных кислот для гидролиза нерастворимых образцов. Также данный метод предполагает индивидуальную разработку и валидацию состава кислоты и метода проведения гидролиза в лабораторных условиях, который обеспечивает приемлемый уровень восстановления и стабильности для конкретных образцов. Тем не менее существует несколько общих правил, применяемых к большинству типов образцов, которые нуждаются в проведении гидролиза:

- Элементы в методах ICH Q3D и USP <232> включают Hg и элементы платиновой группы PGE. Данные элементы химически нестабильны при низком уровне концентрации в окислительной матрице, такой как азотная кислота (HNO_3) или нитриты/пероксид ($HNO_3/H2O_2$) [9, 10]. В методе USP <233> указано, что образцы, которые анализируются при помощи ICP-MS, должный включать в себя подходящий стабилизатор при измерении Hg (Hg – это необходимое анализируемое вещество в измеряемых образцах согласно общим статьям). Для обеспечения стабильности Hg и элементов платиновой группы PGE в фармацевтическом образце рекомендуется добавлять HCl во все растворы при концентрации около 1% в качестве комплексообразующего агента. Иногда рекомендуется использование хлорида золота (III) для стабилизации Hg в растворе, но он не подходит для подготовки фармацевтического образца; так, золото Au – это требуемое анализируемое вещество (класс 2B) согласно методу ICH Q3D.
- Фармацевтические продукты могут быть смесью АФИ, наполнителей, связующих веществ, красителей и покрытий. Данные покрытия могут быть органическими полимерами, которые предназначены для защиты от кислотной атаки в желудке и таким образом обеспечивают контроль высвобождения субстанции с небольшим уровнем интенсивности. Учитывая диапазон типов образцов, а также их варьирование в комплексных матрицах, вполне вероятно, что микроволновое разложение, как правило, можно использовать для обеспечения полного разложения фармацевтических образцов. Микроволновое разложение в закрытых сосудах является предпочтительной техникой разложения твердых образцов согласно методу USP <233. Разложение в закрытом сосуде также позволяет устранить любые проблемы, связанные с потерей летучих элементов, таких как Hg. Ранее мы уже обсуждали эту проблему в методе USP <231>.

ВАЛИДАЦИЯ

Требования метода USP <233> по проведению валидации зависят от используемой процедуры (одна из процедур ICP или альтернативная процедура). Данная процедура, которая определена в фармакопейной статье, будет считаться анализом на предельно допустимую концентрацию или количественным определением. Анализы на предельно допустимую концентрацию должны подтверждать выявляемость, повторяемость и специфику измерения, в то время как количественные анализы должны демонстрировать точность, отклонения (повторяемость и промежуточную прецизионность) и специфику.

Валидация пригодности системы, а также проверка эксплуатационных параметров масс-спектрометра Agilent ICP-MS для проведения процедур анализа на предельно допустимую концентрацию и количественного анализа определены в методе USP <233> и описаны в отдельном примечании по применению [14].

ПРИБОРЫ ДЛЯ АНАЛИЗА

Одной из главных целей предложенных новых общих статей USP является замена текущего колориметрического анализа (USP <231>) современным инструментальным аналитическим методом [11]. ICP-MS и ICP-OES – это приборы, которые должны использоваться согласно USP <233>.

ПРЕИМУЩЕСТВА ICP-MS

Преимущества использования ICP-MS в контексте низких пределов определения для всех контролируемых элементов и конкретных видов анализа были обсуждены ранее. Масс-спектрометр Agilent 7900 ICP-MS

идеально подходит для анализа вариабельных матриц с высоким содержанием хлоридов, которые обычно используются для разложения фармацевтических образцов:

- Масс-спектрометр ICP-MS 7900 обеспечивает более высокую температуру плазмы по сравнению с другими коммерческими моделями ICP-MS (с самым низким показателем отношения сигналов CeO/Ce – около 1%). Это гарантирует улучшенное разложение матриц и ионизацию плохо ионизируемых элементов, таких как As, Cd, Hg, и элементов платиновой группы PGE Os, Ir и Pt. Распылительная камера, которая охлаждается посредством эффекта Пельтье, является предпочтительной конфигурацией оборудования ICP-MS, что описано в статье USP <233>, и стандартной конфигурацией для Agilent ICP-MS 7900. ICP-MS 7900 может оснащаться уникальной системой Agilent для ввода образцов с высоким содержанием матрицы (UHMI), которая обеспечивает идеальный допуск матрицы при помощи высокоточного управляемого и воспроизводимого разбавления аэрозоля. Использование данной системы позволяет повысить устойчивость плазмы, обеспечивая лучшую ионизацию и значительно снижая подавление сигнала, и в то же время значительно снизить воздействие интерфейса и ионных линз на недиссоциированную матрицу образца при анализе образцов с высоким содержанием растворенных солей (до 25%).
- ICP-MS 7900 оснащается октапольной реакционной системой четвертого поколения (ORS4), которая оптимизирована для работы с гелием (He) в режиме столкновения с дискриминацией по кинетической энергии (KED) для удаления помех.
- Режим работы с гелием позволяет проводить удаление плазмы и матричных многоатомных помех вне зависимости от состава образца и без времязатратной оптимизации конкретного образца или анализируемого вещества, характерной для методов ICP-MS, которые используют реактивные газы [12]. Режим работы с гелием в ICP-MS 7900 позволяет проводить запуск анализа образцов, которые содержат большое либо переменное количество хлорида (например, из HCl при типичном разделении фармацевтического образца) без нанесения вреда для обнаружения элементов, которые могут пострадать от воздействия хлоридсодержащих многоатомных перекрытий. Таковыми элементами являются ^{75}As (перекрытие из $^{40}Ar35Cl$), ^{51}V ($^{35}Cl^{16}O$), ^{52}Cr ($^{35}Cl1^{6}O^{1}H$) и ^{53}Cr ($^{37}Cl^{16}O$). Все эти элементы могут легко и точно определяться при помощи ICP-MS 7900 при высоком уровне процентного содержания HCl.
- Режим работы с гелием на ICP-MS 7900 также позволяет устранить многоатомные помехи от изотопов каждого анализируемого вещества, поэтому вторичные или квалификационные изотопы доступны для подтверждения анализируемого вещества. В особенности это полезно при проведении фармакопейного анализа ввиду того, что в статье USP <233> указано, что процедура должна давать возможность однозначно определять каждый целевой элемент в присутствии других составляющих образца, таких как иные анализируемые вещества и составляющие матрицы. Использование вторичных изотопов в качестве квалификационных ионов – это надежная и уникальная функция ICP-MS 7900 в режиме работы с гелием [13].
- В случае, если АФИ или другие материалы могут быть растворены в органическом растворителе, ICP-MS должен допускать проведение стандартного анализа таких растворителей. Ввиду того, что ICP-MS 7900 в стандартной конфигурации оснащается распылительной камерой, которая охлаждается посредством эффекта Пельтье, Вам не придется вносить изменения в конструкцию стандартной камеры для проведения аспирации органических растворителей. Опционально возможна установка 5-го регулятора массового расхода, который позволит добавлять кислород в плазму для воспламенения органической матрицы, вводить образец, а также проводить легкую замену частей интерфейса на части, устойчивые к воздействию растворителя. Более того, передовой РЧ-генератор с функцией сопоставления частот, обновленная конструкция горелки и параметры воспламенения плазмы на ICP-MS 7900 обеспечивают допуск использования системой летучих органических растворов; даже нерастворимые в воде растворители могут использоваться напрямую.
- ICP-MS 7900 легко интегрируется в системы ВЭЖХ Agilent Technologies или любые другие системы ВЭЖХ (жидкостная хроматография / ионная хроматография), что позволяет проводить разделение различных «видов» химических форм элемента, как в случае с As и Hg, если «общая» концентрация элемента превышает пределы допустимой суточной дозы PDE.
- Также при помощи ICP-MS 7900 возможно проведение быстрого полуколичественного сбора скрининга в режиме работы с гелием. Эта функция позволяет определить характеристики неизвестных образцов. Данный режим работы может также применяться для определения загрязняющих веществ во время проведения процесса или же для анализа неисправностей при производстве.

Для того чтобы убедиться в том, что режим работы с гелием на ICP-MS 7900 был эффективным при удалении хлоридсодержащих помех, полученных от HCl, использованной во время процесса разделения, элементы, которые были максимально подвержены воздействию HCl (V и As), измеряются в режиме работы без использования газа, так же как в режиме работы с гелием. Калибровка обоих режимов приведена на рисунке 1, где отображено резкое улучшение пределов определения для данных элементов.

На рисунках 1a и 1c приведены данные о калибровках в режиме работы без газа для V и As соответственно, в то время как на рисунках 1b и 1d приведены данные о калибровках в режиме работы с гелием для тех же двух элементов.

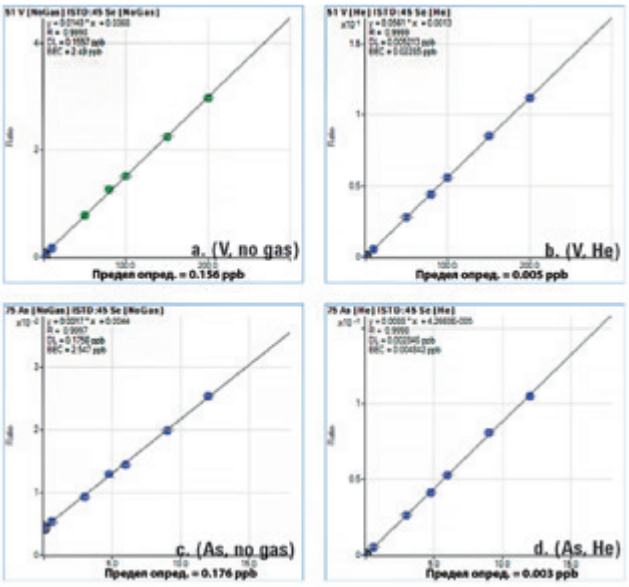


Рисунок 1. Калибровки для элементов с помехами V и As в режиме работы без газа (a и c) и в режиме работы с гелием (b и d) демонстрируют эффективное удаление хлоридсодержащих помех в режиме работы с гелием (аналогичные условия ячеек для всех элементов; кислотная матрица 1% HNO_3/0,5% HCl)

В режиме работы без газа хлоридсодержащие помехи приводят к повышению фоноэквивалентных концентраций (BEC) для обеих элементов (2,49 мкг/л для V и 2,55 мкг/л для As). Режим работы с гелием обеспечивает снижение коэффициента как минимум в 100 раз относительно BEC для обеих элементов V и As (0,023 мкг/л для V и 0,005 мкг/л для As) благодаря эффективному удалению многоатомных ClO и ArCl в октапольной реакционной системе четвертого поколения ORS4 в ICP-MS 7900.

Эффективное снижение помех на мкг/л (ppt) фоновых уровней гарантирует то, что эти потенциально сложные элементы могут быть определены с высоким уровнем надежности при регулируемых уровнях в диапазоне вариабельных и комплексных матриц, которые обычно анализируются в фармацевтических лабораториях.

ПРЕИМУЩЕСТВА ICP-OES

ICP-OES обладают высокими показателями чувствительности при высоких нагрузках матрицы, они легки в управлении и гарантируют высокую пропускную способность образцов.

ICP-OES Agilent серии 5100 идеально подходит для проведения анализов фармакопейных образцов, используя методологию статей USP <232> и USP <233>. Данные приборы обладают следующей функциональностью и показателями производительности:

- Обработка быстрых изменений в матрице образца. Метод USP <233> используется и выполняется в диапазоне комплексных матриц: фармацевтические составляющие, растворенные в водном растворе или органическом растворителе. Аксиально просматриваемая вертикальная горелка ICP-OES 5100 обладает высоким показателем уровня чувствительности и стандартным «радиальным размещением» для быстрого и легкого варьирования в образце матрицы в отношении высокого уровня общего количества растворённых твёрдых частиц в водных растворах или же в органических растворителях.
- Способность системы ICP-OES 5100 обрабатывать высокие нагрузки матрицы (25% TDS) обеспечивает разложение более высоких масс образца при помощи рекомендуемых процедур микроволнового разложения образцов в закрытых сосудах. Сниженные уровни разбавления позволяют минимизировать присутствие источников загрязнения, а также наличие ошибок при разбавлении, которые содействуют при выявляемости и точности согласно USP <233>.
- Долгосрочная стабильная производительность прибора является важным фактором, который обеспечивает надлежащий уровень повторяемос-



Agilent ICP-OES 5100

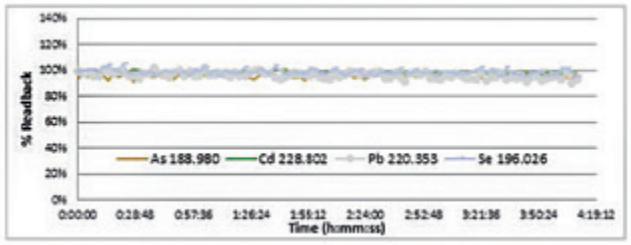


Рисунок 2. Долгосрочная стабильность данного образца, который содержит 250 мкг/л As, Cd, Pb и Se, составляла <2,4% RSD на протяжении более чем 4 ч. Матрица образца составляла 25% ч/д NaCl. Измерение выполнялось при помощи ICP-OES 5100 с двойной горелкой, 2?4 мм инжектора и увлажнителя аргона (AHA). Не выполнялась повторная калибровка и не использовалась внутренняя корректировка стандарта

ти в соответствии с требованиями USP <233>. Постоянная стабильность сигнала ICP-OES 5100 достигается посредством использования газового контроля потока массы на всех плазменных газах, твердофазного РЧ со свободным ходом для генерирования плазмы и благодаря небольшому количеству подвижных частей в термостатированной оптике. На рисунке 2 отображен график долгосрочной стабильности ICP-OES 5100 в чрезвычайно комплексной матрице.

- ПЗС-детектор в ICP-OES 5100 обладает широким диапазоном длин волн, который позволяет проводить подтверждение концентрации целевого анализируемого вещества посредствjм метода USP <232>. Это достигается путем верификации значения подсчитанной концентрации из первичной эмиссии длин волн с подсчетом концентрации при альтернативной эмиссии длин волн одного и того же элемента. Данная техника наглядно демонстрирует специфичность метода USP <233> и обеспечивает аналитикам получение непредвзятого результата. В таблице 5 приведены значения «внутриметодной» верификации концентрации при помощи продолжительного измерения 2 отдельных эмиссий длин волн Cd с трехразовым повторением.

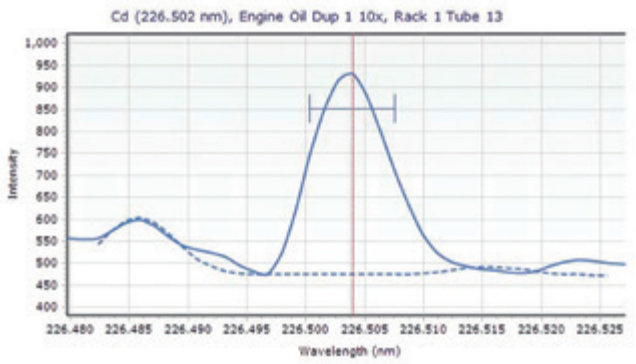


Рисунок 3. Спектр Cd 226 в 21-элементном масле и смеси растворителя

Широкий диапазон длин волн ICP-OES 5100 в сочетании с чувствительностью прибора и разрешением позволяют проводить четкое разложение целевого анализируемого вещества USP из 14 других целевых анализируемых веществ, которые, скорее всего, присутствуют при гидролизе или в смесях растворов. На рисунке 3 отображен спектр разложения Cd при длине волны 226,502 нм. Спектр демонстрирует возможности разрешения и чувствительности ICP-OES 5100 для других общих матриц для фармакопейного анализа, масляный образец растворен в керосине, Cd при концентрации 35 мкг/л в масляном растворе или растворителе.

Таблица 5.

Концентрация Cd в масляном образце из 2 различных эмиссий длин волн при приблизительной концентрации в 35 ppb

Измерение	Измеренная концентрация Cd, при 214,439 нм (мг/л)	Измеренная концентрация Cd, при 226,502 нм (мг/л)
1	0,0374	0,0354
2	0,0393	0,0345
3	0,0361	0,0348

КАКУЮ ИНСТРУМЕНТАЛЬНУЮ ТЕХНИКУ СЛЕДУЕТ ВЫБРАТЬ?

Если Ваша лаборатория занимается анализом лекарственных средств или их составляющих, которые требуют проведения процесса разделения/разбавления или растворения в органических растворителях, тогда низкие пределы определения ICP-MS 7900 могут иметь основное значение. Точно так же, если лекарственные средства предназначены для парентерального или ингаляционного способа применения (для таких препаратов пределы допустимой суточной дозы PDE значительно ниже), Вы сможете провести точное измерение при помощи ICP-MS Agilent серии 7900.

Если Ваша лаборатория:

- занимается анализом сырья для препаратов орального способа применения и лекарственных продуктов, которые требует незначительно разбавления образца или не требует разбавления вообще,
- требует высокую пропускную способность образцов,
- снижения уровня затрат,
- тогда ICP-OES Agilent серии 5100 идеально подходит для Ваших требований, касающихся проведения анализов.

СОБЛЮДЕНИЕ НОРМАТИВНЫХ ТРЕБОВАНИЙ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

21 CFR (часть 11) и EU/PIC/S (приложение 11)

Соблюдение нормативных требований является ключевым аспектом анализа образца в фармацевтическом производстве. Часть 11 в разделе 21 CFR регламентирует продовольственную группу продуктов и лекарственные препараты в США, а также включает в себя национальные требования в области хранения и защиты электронных записей и применения электронных подписей. Аналогичные нормативные требования в ЕС определяются EU GMP (приложение 11). Данные требования также формируют основу стандартов, которые адаптированы 48 контролирующими органами (в настоящее время), что устанавливает PIC/S. US FDA 21 CFR (часть 11) и EU/PIC/S (приложение 11) направлены на обеспечение безопасности, целостности и отслеживаемости электронных записей, включая данные, аналитические отчеты и прочие записи (такие как ежедневные проверки эксплуатационных качеств), связанные с использованием аналитического прибора.

Четыре требования о соответствии касательно аналитических результатов приведены в таблице 6.

Компания Agilent Technologies предоставляет широкий выбор программных решений для использования в лабораторных условиях и соблюдения нормативных требований: системы хранения данных Agilent OpenLAB и OpenLAB ECM (редактор контента на предприятии) обеспечивают безопасное хранение данных на сервере, контроль версий и функции управления записями для данных ICP-MS.

Agilent SDA (программа управления спектроскопической базой данных) применяется в приборах Agilent ICP-OES и ICP-MS и работает незаметно для пользователя с ПО ICP Expert для ПО MassHunter, используемого в ICP-OES и ICP-MS, что позволяет проводить простое сравнение раствора для одной установки ICP-OES или ICP-MS.

Программа управления спектроскопической базой данных Agilent SDA обеспечивает многоуровневый доступ к системе ICP-OES, а также позволяет регулировать и контролировать использование функционала системы путем использования паролей для каждого отдельного пользователя. Программа Agilent SDA для ICP-OES использует спектральный администратор конфигураций (SCM), который является простым инструментом для создания, настройки и управления данными в отношении безопасности системы, управления пользователями и обработки данных.

Таблица 6.

Соблюдение нормативных требований анализа образца в фармацевтическом производстве

Требования о соответствии	Решение
Валидация системы, включая квалификацию проекта (DQ), производственный контроль качества QC, обслуживание в течение срока эксплуатации, квалификацию монтажа IQ и операционную квалификацию OQ, а также эксплуатационную поверку (PV или PQ) для аналитических приборов и ПО	Производственные записи по качеству, сертификаты валидации ПО и записи квалификации оборудования
Управление доступом к рабочей станции для контроля прибора и обработки данных	ПО для контроля доступа пользователей (UAC) (с ограничением пользовательского доступа и защитой паролем)
Контроль электронных записей (безопасное хранение, контроль версий файлов, журнал регистрации событий, электронные подписи, архивирование / распаковка файлов)	Встроенное ПО и компьютерные системы, которые сочетают в себе функции UAC для управления электронными записями, генерируемыми во время работы в лаборатории
Функционирование и использование системы, испытание пригодности, процедуры и физический доступ в лабораторию и к записям	Результаты проведения испытаний для проверки эксплуатационных качеств из системы испытания пригодности (SST); документы стандартных операционных процедур (SOP) для аналитических методов испытания; записи обучения персонала и т.д. Надлежащий контроль физического доступа в лабораторию

В совокупности ПО ICP-MS MassHunter (контроль доступа пользователей) для ICP-MS 7900, Agilent OpenLAB (система хранения данных), OpenLAB ECM (редактор контента на предприятии) и SDA предоставляют широкий диапазон решений, которые полностью соответствуют требованиям 21 CFR (часть 11) и EU/PIC/S (приложение 11) для работы с единичными экземплярами ICP-MS в лабораториях или же в международных предприятиях с широким перечнем таких приборов. Контроль доступа пользователей гарантирует надежный уровень отслеживания попыток доступа, в то время как серверное ПО OpenLAB, или ECM или SDA (устанавливается на ПК) обеспечивают надлежащий уровень защиты и целостности файлов / данных. Использование базы данных или структуры LCDF (расположение, системный блок, секция баз данных, папка) обеспечивает надежное хранение аналитических результатов и отчетов в формате PDF в файлах, которые защищены контрольными суммами. Гибкая и многоуровневая система контроля доступа пользователей Agilent для ICP-MS интегрируется с соответствующим ПО Agilent, что гарантиру-

ет безопасность, целостность и отслеживаемость данных ICP-MS и обеспечивает полное соответствие нормативным требованиям. В сочетании с сертификацией качества производства, установкой и проведением операционной квалификации (IQ и OQ) аппаратной части ICP-MS, а также его ПО компания Agilent Technologies предоставляет полный перечень услуг по обеспечению соответствия требованиям для сертифицированных лабораторий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процедура разработки новой методологии для подготовки и анализа фармацевтических образцов описана в статьях ICH Q3D и USP <232>/<233>, что позволяет фармацевтическим лабораториям проводить обновление методологии и инструментария для устранения серьезных ограничений текущего испытания на предельное содержание тяжелых металлов (USP <231>) и соответствовать принципам качества через проектирование QbD. Новые общие статьи USP <232>, <233> и <2232> рекомендуют использование новых методов подготовки и стабилизации образца и определяют новые аналитические методы, которые основаны на современных приборах ICP.

Компания Agilent Technologies производит ICP-OES и ICP-MS, которые предоставляют идеальные возможности анализа широкого диапазона фармацевтических продуктов наряду с использованием методов ICH Q3D и USP <232>. ICP-MS Agilent серии 7900 ICP-MS обладает идеальными аналитическими способностями для использования по методу USP <232>, с низкими пределами определения и широким динамическим диапазоном (до 11 порядков) для всех контролируемых элементов. В сочетании с превосходным допуском матрицы это позволяет обрабатывать высокие и варьируемые матрицы, которые используются в фармацевтических лабораториях, в то время как режим работы с гелием обеспечивает эффективное устранение помех и доступ к вторичным изотопам для подтверждения.

ICP-MS 7900 может проводить вещественный анализ для разделения и количественного определения различных видов элементов, в которых уровень токсичности связан с элементной формой. ICP-MS 7900 также может выполнять быстрый полуколичественный анализ или сбор скрининга для проверки загрязняющих веществ других элементов или для контроля процесса. Сертификация качества, предоставление полного пакета валидационных услуг, а также интегрирование с ПО Agilent OpenLAB, ECM или SDA гарантируют наличие полного пакета соответствующих решений в ICP-MS 7900 для фармацевтических производителей, которые хотят использовать методы ICH Q3D или USP <232>/<233>.

Использование ICP-OES Agilent серии 5100 – это простое и экономически эффективное решение для проведения анализов сырья и конечных лекарственных форм орального способа применения по методу USP <232>. Аппаратная часть данного прибора в сочетании с ПО обеспечивают надлежащий уровень скорости и возможностей для обработки комплексных матриц, а также стабильность, простоту управления и проведения технического обслуживания. Данные характеристики гарантируют полное соответствие прибора нормативным требованиям текущих статей Фармакопеи USP.

ЛИТЕРАТУРА

1. K. B. Blake. Harmonization of the USP, EP, and JP heavy metals testing procedures // Pharm. Forum. 1995. № 21(6). P. 1632–1637.
2. R. Ciciarelli, D. Jäkel, E. König, R. Müller-Käfer, M. Röck, M. Thevenin and H. Ludwig. Determination of metal traces – a critical review of the pharmacopoeial heavy metal test // USP Pharm Forum. 1995). № 21(6). P. 1638–1640.
3. N. Lewen, S. Mathew, M. Schenkenberger and T. Raglione. A rapid ICP–MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds // J Pharm Biomed Anal. 2004. № 35. P. 739–752.
4. T. Wang, J. Wu, R. Hartman, X. Jia and R. S. Egan. A Multi-Element ICP-MS Survey Method as an Alternative to the Heavy Metals Limit Test for Pharmaceutical Materials // J. Pharm. Biomed. Anal. 2000. № 23(5). P. 867–890.
5. <232> Elemental Impurities – Limits. URL: http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/key-issues/m5192.pdf (дата обращения 15.01.2017).
6. Draft Guideline for Elemental Impurities Q3D Step 2b, July 2013, International Conference on Harmonisation
7. <233> Elemental Impurities – Procedures. URL: http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/key-issues/c233_final.pdf (дата обращения 15.01.2017).
8. A. S. Al-Ammar and J. Northington. Accuracy improvement in the determination of palladium in pharmaceuticals by eliminating volatility error when using ICP-MS coupled with direct introduction of sample dissolved in organic solvents // J. Anal. At. Spectrom. 2011. № 26. P. 1531–1533.
9. S. E. Jackson, B. J. Fryer, W. Gosse, D. C. Healey, H. P. Longerich and D. F. Strong. ICP-MS—a powerful tool for high-precision trace-element analysis in earth sciences: evidence from analysis of selected USGS reference samples // Chem. Geol. 1990. № 83. P. 119–132.
10. A. Frimpong, B. J. Fryer, H. P. Longerich, Z. Chen and S. E. Jackson. Recovery of precious metals using nickel sulfide fire assay collection: problems at nanogram per gram concentrations // Analyst. 1995. № 120. P. 1675–1680.
11. S. Lira, P. Brush, L. Senak, C. Wu and E. Malawer. Validating ICP-MS for the Analysis of Elemental Impurities According to Draft USP General Chapters <232> and <233> // Pharm. Forum. 2008. № 34(6). P. 1613–1618.
12. E. McCurdy and G. Woods. The application of collision/reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry to multi-element analysis in variable sample matrices, using He as a non-reactive cell gas // J. Anal. At. Spectrom. 2004. № 19. P. 607–615.
13. S. Wilbur and E. McCurdy. Sensitive, simultaneous determination of P, S, Cl, Br and I containing pesticides in environmental samples by GC hyphenated with collision-cell ICP-MS // Spectroscopy. 2010. № 25(5). P. 2–7.
14. S. Hussain, A. Liba and E. McCurdy. Validating the Agilent 7700x ICP-MS for the determination of elemental impurities in pharmaceutical ingredients according to draft USP general chapters <232>/<233> // Agilent publication, 5990-9365EN (2011).

Adam Smith CONFERENCES

PHARMASI

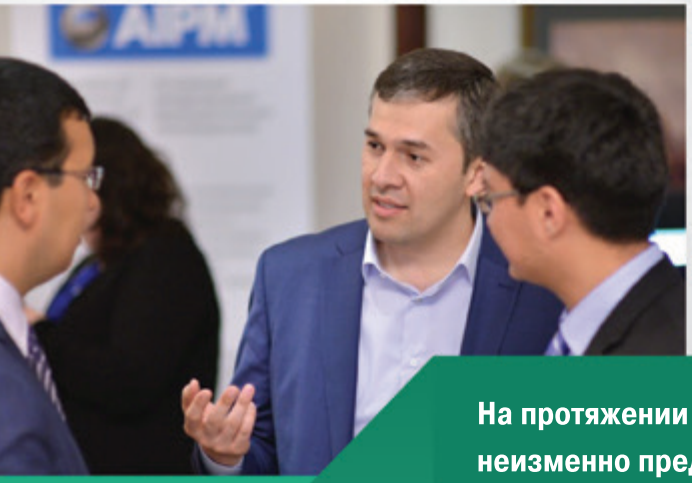
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ СТРАН ЕАЭС И СНГ

28 ФЕВРАЛЯ - 1 МАРТА 2017

ОТЕЛЬ "INTERCONTINENTAL MOSCOW TVERSKAYA"

ПРИСОЕДИНЯЙТЕСЬ К ОБСУЖДЕНИЮ НАИБОЛЕЕ ВАЖНЫХ ЗАДАЧ, СТОЯЩИХ ПЕРЕД ОТРАСЛЬЮ СЕГОДНЯ, И АНАЛИЗУ ОСНОВНЫХ ТЕНДЕНЦИЙ, КОТОРЫЕ ОКАЗЫВАЮТ ВЛИЯНИЕ НА КОММЕРЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ ФАРМКОМПАНИЙ, РАБОТАЮЩИХ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ СЕКТОРЕ ПРОСТРАНСТВА СТРАН ЕАЭС И СНГ





СРЕДИ СПИКЕРОВ:



Азиза Бахшиева
Генеральный директор
Авромед (Азербайджан)



Сергей Матевосян
Генеральный директор
Liqvor Pharmaceuticals (Армения)



Батырбек Машкеев
Генеральный директор
VIVA Pharm (Казахстан)

На протяжении последних семи лет Форум не только неизменно представляет абсолютно уникальную программу, которая ежегодно разрабатывается при участии и активных рекомендациях ведущих игроков сектора, но и дает всем участникам возможность присоединиться к интересным дискуссиям и кулуарным обсуждениям наиболее важных вопросов с более, чем 200 участниками из разных стран. Если Вы интересуетесь фармрынками стран ЕАЭС и СНГ, то это профессиональное мероприятие для Вас!

КОД СКИДКИ 10%: AS1115GMP

ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СКРИНИНГ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ПОМОЩИ ICP-MS AGILENT СЕРИИ 7500CE В РЕЖИМЕ СОУДАРЕНИЯ С ГЕЛИЕМ

Лекарственные препараты

АВТОРЫ

Rebeca Santamaria-Fernandez,
Sheila Merson,
Ruth Hearn LGC,

Queens Road Teddington,
Middlesex, TW11 0LY,
Великобритания

АННОТАЦИЯ

В данной статье описан быстрый полуколичественный элементный анализ фармацевтических образцов с использованием ICP-MS Agilent серии 7500ce в режиме подачи гелия в реакционно-столкновительную ячейку. Полиатомные интерференции устраняются в ячейке после соударения с атомами гелия, тем самым обеспечивая быстрое определение всех присутствующих элементов в фармацевтических препаратах. Элементы, определение которых обычно затруднено из-за полиатомных интерференций, также определяются методом полуколичественного анализа. Результаты определения следовых компонентов, полученные из трех разных партий фармацевтических таблеток, согласовываются с результатами, полученными при проведении количественного анализа. Данный метод обладает огромным потенциалом и является быстрым аналитическим инструментом в цепи фармацевтического производства.

ВВЕДЕНИЕ

Контроль примесей в лекарственных препаратах – это критический показатель в фармацевтической промышленности [1]. Большинство фармацевтических продуктов не должны содержать неорганические примеси. Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) и Британская Фармакопея (BP) настоятельно рекомендуют проводить полное исследование проблем наличия загрязняющих веществ в строго определенные промежутки времени. Поэтому необходимо использовать методы быстрого скрининга для определения неорганических загрязняющих примесей.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Agilent Technologies

Наличие загрязняющих веществ в фармацевтических продуктах может быть связано с их наличием в активных фармацевтических ингредиентах (АФИ), вспомогательных веществах или красителях. Загрязнение может быть вызвано условиями производственного процесса (например, попадание реагентов, смазывающих масел и остатков катализаторов). Серийное производство в большинстве случаев включает в себя использование реакционных емкостей, емкостей для перемешивания, воды, фильтров и другого оборудования. Недостаточно чистое состояние любого из компонентов производственной цепочки может привести к неорганическому загрязнению продукта. Таким образом, отслеживание элементного состава субстанции широко используется для идентификации неизвестных образцов и для получения информации относительно производственного процесса. Было замечено, что в некоторых фармацевтических продуктах наличие неорганических примесей приводит к значительному снижению стабильности и срока годности препарата [1]. Методы быстрой оценки неорганических примесей являются предметом повышенного интереса в фармацевтической промышленности. Данные методы позволяют быстро проводить контроль качества и отслеживать элементное профилирование большого количества образцов с неизвестным составом. Именно поэтому неорганические примеси должны быть быстро обнаружены, после чего должны быть предприняты соответствующие действия.

В данной работе продемонстрирован потенциал полуколичественного элементного скрининга с использованием масс-спектрометрии с индукционной плазмой (ICP-MS), технологии реакционно-столкновительной ячейки (ORC) и подачи в нее гелия. Полуколичественный анализ зарекомендовал себя в ситуациях, в которых недоступны калибровочные стандарты или требуется проведение быстрого скрининга большого количества неизвестных образцов [2–4]. Однако существует мало публикаций по применимости данного вида анализа к реальным образцам. Последние достижения в области изучения технологии реакционно-столкновительной ячейки показали, что октопольная реакционная система (ORS) способна устранять многоатомные помехи благодаря использованию управляемой дискриминации по кинетической энергии (KED) в режиме соударения с гелием, тем самым обеспечивая проведение точного полуколичественного анализа в неизвестных матрицах.

Полуколичественный элементный скрининг проводился на наборе из 29 элементов и для сравнения были выполнены количественные измерения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка образца

Шесть фармацевтических таблеток из трех разных партий антивирусного препарата использовались при изучении данного вопроса. Таблетки были измельчены при помощи пестика и ступки. Приблизительно 0,06 г образца было точно взвешено и разложено с 4 мл азотной кислоты с высокой степенью очистки (Romil, Кембридж, Великобритания) и 2 мл высокоочищенной перекиси водорода (Romil, Кембридж, Великобритания) с помощью метода микроволнового разложения. Микроволновая программа состоит из процесса нагревания образцов до 180 °C на протяжении более чем 10 мин и последующего их удержания в течение 20 мин. По завершении процесса охлаждения полученный раствор был растворен в 30 мл деионизированной воды, и затем данный раствор использовался для элементного определения при помощи ICP-MS.

Бланки и документы по контролю качества используются при каждом запуске процесса разложения. Растворы Aquacheck (используются в программе проверки квалификации Aquacheck) с известным уровнем концентрации анализируемых веществ (от 2 нг/г [ppb] Cd до 11 мкг/г [ppm] Ca) анализировались в качестве независимых проверок качества (QC) точности измерения ICP-MS при каждом запуске.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разложение образца выполнялось при помощи микроволновой системы Multiwave 3000 (Perkin Elmer, Биконсфилд, Великобритания). Измерения проводились при помощи ORC-ICP-MS Agilent серии 7500ce – масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой и реакционно-столкновительной ячейкой, который работает в режиме полуколичественного анализа с использованием гелия для проведения элементного скрининга. Условия настройки приведены в таблице 1. Интегрированная система ввода образца (ISIS) использовалась вместе с распылителем на скорости насоса в 0,1 об/с во время анализа и промывалась для минимизации уровня перегрузки плазмы по матричным компонентам.

Таблица 1.

Настройки, которые использовались для полуколичественного анализа в режиме подачи гелия

Мощность РЧ	1520 Вт
Расстояние горелка – скиммер	8,0 мм
Газ-носитель	0,88 л/мин
Вспомогательный газ	0,27 л/мин
Расход образца	0,5 мл/мин
Распылитель	Стеклянный концентр., MicroMist
Распылительная камера	Охлаждаемая до 2 °C
Материал конусов интерфейса	Ni
Газ ячейки	He
Расход газа в ячейке	4,6 мл/мин
Напряжение KED	+2 В

Использовалась горелка с инжектором с внутренним диаметром 2,5 мм. Использовалась 30-секундная стабилизация между различными режимами проведении измерений в разных режимах подачи газа-реактанта. Измерения проводились три раза, и образец контроля качества использовался при каждом запуске.

Полуколичественное измерение в режиме соударения с гелием

Для более точного полуколичественного определения очень важно, чтобы все элементы использовались в равных условиях. Таким образом достигается близкое соотношение между откликами близко расположенных элементов. Уникальной особенностью октопольной реакционной системы ICP-MS Agilent 7500 является то, что она устраняет полиатомные интерференции дискриминацией по кинетической энергии (KED) в режиме соударения с гелием, что, в свою очередь, позволяет проводить точный полуколичественный анализ широкого диапазона элементов в неизвестных образцах. Гелий – инертный газ, и именно поэтому в ячейке не происходит формирование новых интерференций и отсутствует потеря анализируемого вещества при проведении реакции. Интерференции, которые формируются в плазме, устраняются при помощи физического процесса «молекулярного фильтрования» [2].

Полиатомные интерференции устраняются в режиме соударения с гелием ввиду их размера. Используется только один набор настроек ORS вне зависимости от типа матрицы. Данный подход является достаточно простым, быстрым, точным и свободным от интерференций для всех анализируемых веществ (обратите внимание на то, что необходимо использовать изотопы, свободные от помех, для элементов, которые страдают от изотопных помех).

Прибор был настроен на стандартные надежные условия для плазмы (таблица 1). Единичный калибровочный стандарт, который содержит 100 ppb Al, Ce, Cd, Co, Li, Tl, U, и Y, был приготовлен на 10% HNO_3 (в весовом отношении) для обновления факторов полуколичественного отклика для настройки элементов по всему диапазону массы. Это означает, что некалибруемые элементы обновляются при помощи интерполяции между калиброванными изотопами. ПО ChemStation для ICP-MS выполняет данную процедуру в автоматическом режиме. Несмотря на то, что можно использовать любое количество элементов для полуколичественной калибровки, увеличение количества элементов приводит к снижению диапазона массы, на котором факторы интерполируются между измеренными эталонными элементами, и, как результат, снижению уровня точности. Была выполнена внутренняя стандартизация с использованием типичного набора внутренних стандартных элементов по всему диапазону масс.

Чувствительность в режиме полуколичественного анализа с использованием гелия – это существенный показатель, точно так же как и в режиме полного количественного анализа, в котором используется аналогичная продолжительность времени интегрирования. Так как пределы определения с помощью данного метода не были предварительно рассчитаны в полуколичественном режиме в данной работе, они могут быть оценены исходя из измерения полуколичественных факторов отклика и отклика в образцах с низким содержанием определяемых элементов. Например, на рисунке 1 отображен отклик изотопов Cd одного из образцов. Калиброванный полуколичественный фактор отклика для 111Cd составлял 9,960 Гц/ppb и отклик для 111Cd в данном образце – 41 Гц (с великолепным соответствием соотношения изотопов) в расчетной концентрации 4,1 ppt (пг/г) в растворе. На основании этих данных было использовано значение в 100 ppt (50 ppb в оригинальном образце) в качестве предела определения для всех измеренных элементов в полуколичественном режиме. Полуколичественные параметры обнаружения представлены в таблице 2.

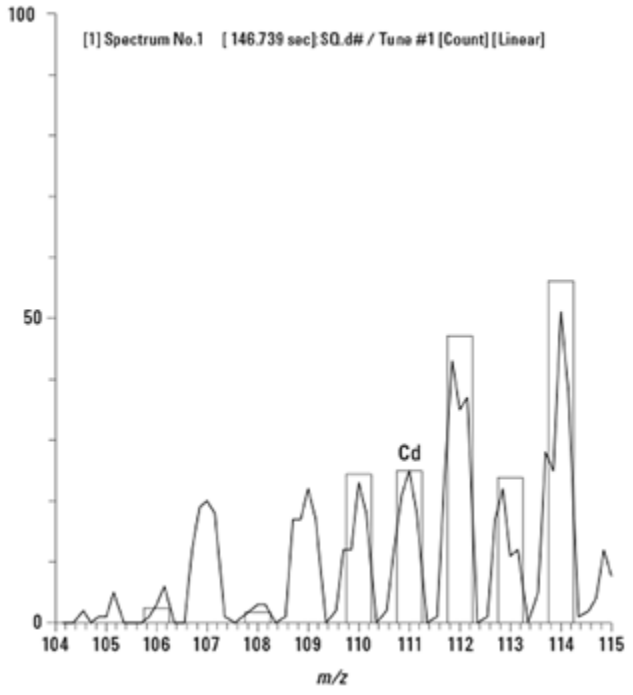


Рисунок 1. Изотопы Cd в антивирусном препарате, измеренные в полуколичественном режиме соударения с гелием приблизительно при 5 ppt. Перекрытие демонстрирует ожидаемую нормализацию соотношения изотопов на уровень отношения массы к заряду 111

Таблица 2.

Полуколичественные параметры обнаружения ИСП-МС

Время исследования	150 с
Режим обнаружения	Скачок на пике спектра
Количество масс *m/z*	250
Время интегрирования	0,6 с
Кол-во точек на массу	6
Повторение	1
Время доставки образца	50 с
Время стабилизации	20 с
Промывка после обнаружения	30 с

Полное количественное измерение (сравнение)

Для сравнения были проведены полные количественные измерения в режимах работы без газа, с гелием и перекисью. Были подготовлены многоэлементные стандарты и получена калибровочная кривая по пяти точкам. Калибровочные стандарты содержали следующие элементы: Al, As, Au, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Ge, Li, Mg, Mo, Nd, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Si, Sb, Sn, Sr, Te, Ti, Tl, V, Zn, и Zr от 1 ppb до 2,000 ppb подготовлены в 1% HNO_3 (в весовом отношении).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были проанализированы шесть таблеток противовирусного препарата из трех разных партий. Результаты приведены для каждой из партий: B1, B2, и B3. На рисунке 2 отображен профиль следовых элементов, полученный при помощи полуколичественного анализа в режиме соударения с гелием и при полном количественном анализе. В каждом из случаев два профиля показывают очень хороший уровень согласования.

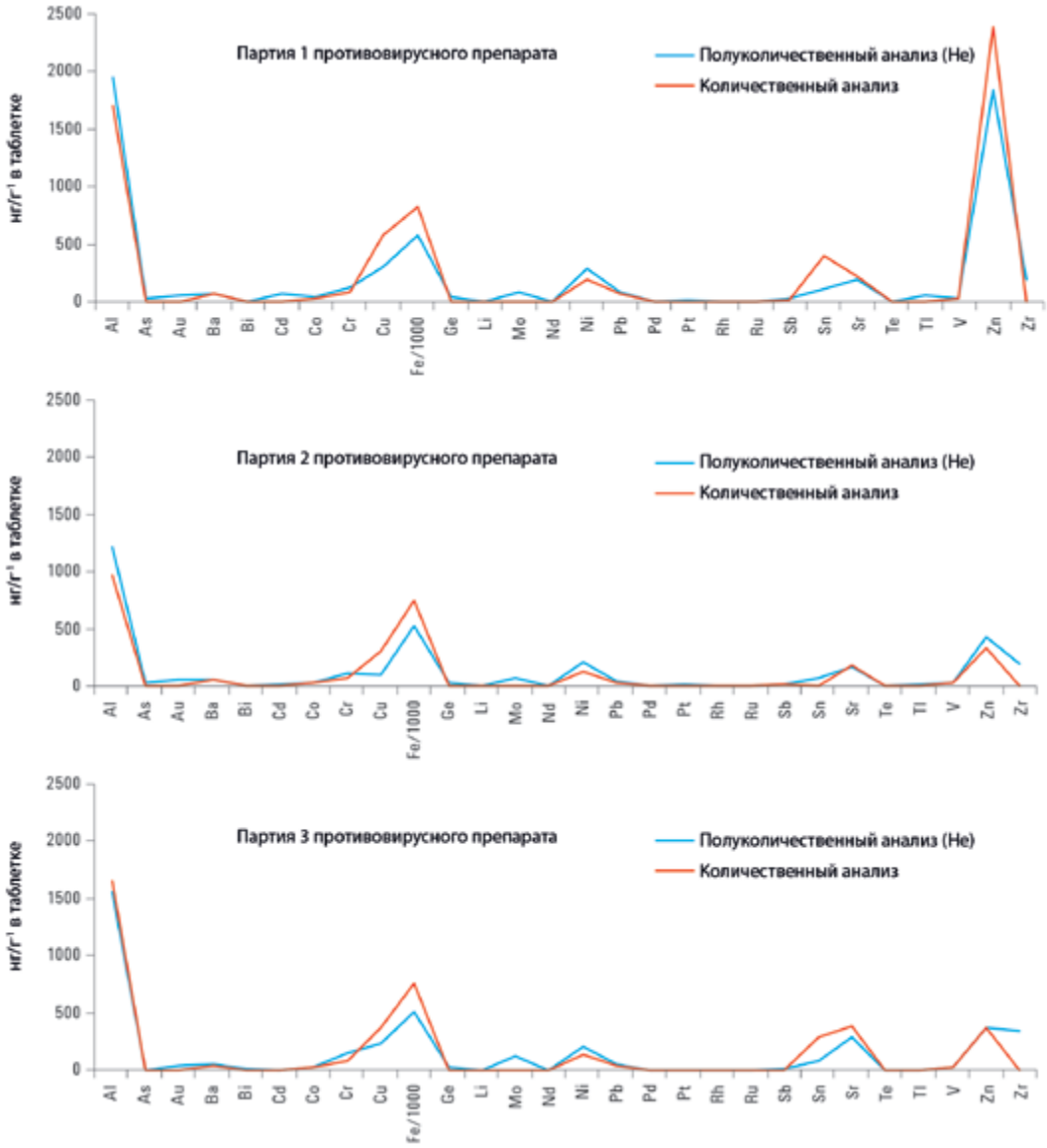


Рисунок 2. Результаты профилирования рассеянных металлов для фармацевтических таблеток от партии 1 до партии 3. Полуколичественные результаты сравниваются с результатами количественного анализа на графике. Концентрация Fe была разделена на 1,000, и результаты приведены в нг/г

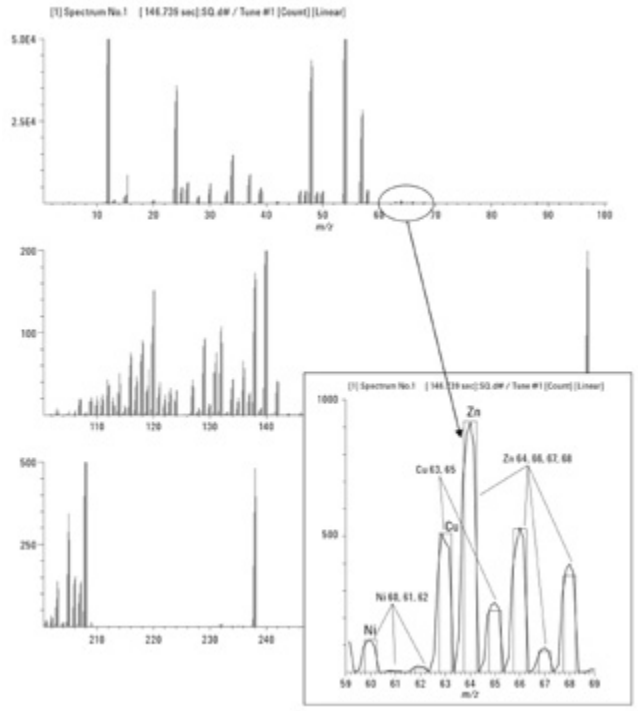


Рисунок 3. Полное сканирование спектра в полуколичественном режиме противовирусного препарата с представлением элементного состава образца. Вставка демонстрирует расширенную область m/z от 60 до 70, включая все изотопы для Ni, Cu и Zn с демонстрацией всех теоритических соотношений изотопов

Очень важно указать на то, что набор анализируемых элементов в препарате, включая Co, Cr, Cu, Fe, Ni, V, и Zn, – это все элементы с изотопами, которые могут страдать от полиатомных интерференций в сложных матрицах. На рисунке 3 отображен спектр полного сканирования всего массового диапазона, полученный из разового полуколичественного анализа, включая увеличенную вставку, демонстрирующую область для Ni, Cu, и Zn. Идеальное совпадение с природным соотношением изотопов для всех трех элементов подтверждает отсутствие полиатомных интерференций. Те элементы, которые были найдены в фармацевтических таблетках ниже предела определения, также включены в график. Ввиду того, что это является важной информацией для скрининга примесей в фармацевтических продуктах, это также важно для понимания того, какие элементы не присутствуют выше пределов обнаружения.

Результаты анализируемых элементов в таблетах для внутренней сертификации контроля находились в диапазоне ±30% от значения сертифицированной концентрации, всего лишь от 2 ppb для Cd до более чем 11 ppm для Ca в водяных растворах.

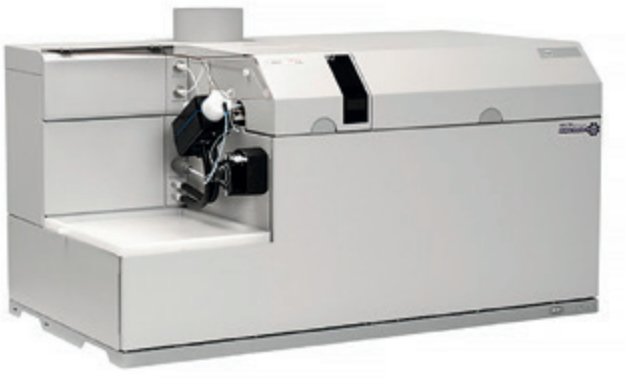
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Контроль присутствия неорганических примесей в фармацевтических таблетках является чрезвычайно важным процессом в цепочке фармацевтического производства и поэтому требует наличия инструментов быстрого проведения элементного скрининга.

В данной работе описан потенциал полуколичественного элементного скрининга при помощи масс-спектрометрии с индукционной плазмой (ICP-MS), реакционно-столкновительной ячейкой (ORC) и использованием гелия. Элементы, «сложные» для определения из-за образования полиатомных интерференций, также проанализированы методом полуколичественного анализа, получены данные наличия следовых элементов в фармацевтических препаратах из трех разных партий в согласовании с теми содержаниями, которые были получены при проведении полного количественного анализа. Полуколичественный скрининг в режиме соударения с гелием доказывает эффективность удаления полиатомных интерференций, обеспечивая быстрый скрининг настоящих фармацевтических образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Roy. Pharmaceutical Impurities – A Mini Review // AAPS PharmSciTech. № 3(2). Article 6. URL: http://www.aapspharmscitech.org (дата обращения 29.01.2017).
2. G. Woods, E. McCurdy and S. Wilbur. Interference-Free Semiquantitative Analysis Using the Agilent 7500ce ICP-MS // Agilent Technologies publication 5989-0741EN.
3. M. Oishi and K. Fukuda. Analysis of Electro-ceramics by Laser Ablation ICP-MS // Agilent Technologies publication 5989-0321EN.
4. S. Wilbur. Faster, Simpler, More Accurate Semiquantitative Analysis Using the Agilent 7500cx ICP-MS // Agilent Technologies publication 5989-6662EN.



Масс-спектрометр Agilent серии 7500ce

РАСПЫЛИТЕЛЬНАЯ СУШИЛКА NANO SPRAY DRYER B-90 HP. МЕЛКИЕ ЧАСТИЦЫ, ОБРАЗЦЫ МАЛОГО ОБЪЕМА, ВЫСОКИЙ ВЫХОД ПРОДУКТА

Материал предоставлен
BUCHI Labortechnik

ВВЕДЕНИЕ

Разработка распылительной сушилки первого поколения Nano Spray Dryer B-90 послужила мощным толчком к развитию инновационного метода распылительной сушки. Новая технология позволила создавать субмикронные частицы, которые нашли широкое применение в самых различных отраслях благодаря своим уникальным свойствам. В предлагаемой статье рассмотрено несколько основных практических способов использования распылительного высушивания: данные, полученные ранее на установке первого поколения, сравнивали с результатами экспериментов, выполненных на распылительной сушилке Nano Spray Dryer B-90 HP второго поколения.

Представленные результаты показывают, что распылительная сушилка Nano Spray Dryer B-90 HP позволяет выполнять распылительное высушивание модельного белка, такого как бычий сывороточный альбумин (БСА), а также высушивание основной фармацевтической (сополимер молочной и гликолевой кислоты, ПЛГА) и пищевой (мальтодекстрин) добавок. Отчасти результаты, полученные с использованием распылительной сушилки Nano Spray Dryer B-90 HP, схожи с результатами, полученными на предыдущей модели, однако производительность высокоэффективных распылительных сушилок нового поколения выше.

РАСПЫЛИТЕЛЬНАЯ СУШИЛКА NANO SPRAY DRYER B-90 HP

Nano Spray Dryer представляет собой лабораторную распылительную сушилку, которая в бережном режиме производит субмикронные частицы (0,2–5 мкм) из растворов, наноэмульсий или наносуспензий. Распылительное высушивание происходит в пять основных этапов:

1. Подготовка пробы.
2. Распыление.
3. Испарение растворителя.
4. Сбор частиц.
5. Извлечение порошка.

Распылительная головка производит мелкие капли, которые впрыскиваются в верхнюю часть распылительной сушилки сонаправленно потоку осушающего газа. Распылительная головка вибрирует в ультразвуковых частотах, произведенных пьезоэлектрическим приводом, поэтому движение тонкой перфорированной мембраны может быть охарактеризовано его колебательной частотой и амплитудой.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ



Рисунок 1. Распылительная сушилка BUCHI Nano Spray Dryer B-90 HP

Распылительная сушилка Nano Spray Dryer B-90 предоставляет полный контроль над этими параметрами и предлагает максимальные возможности для оптимизации процесса. Нагревательный модуль создает ламинарный поток осушающего газа и обеспечивает однородное распределение теплоты в сушильной камере. Это позволяет деликатно упарить растворитель из капелек, полученных с помощью распылительной головки. Масса и размер частиц не влияют на качество сбора частиц. Коллектор работает благодаря электростатическому заряду частиц, в то время как циклонные коллекторы, по некоторым данным, неэффективны при сборе частиц с диаметром менее 1 мкм [1]. Частицы, взвешенные в осушающем газе, отклоняются к электростатическому коллектору, где оседают и формируют слой частиц. После чего слой порошка может быть собран.

ПРИМЕНЕНИЕ

Хотя распылительная сушка как технология существует много лет, в научной периодике продолжают регулярно появляться новые публикации об этой технологии. В этих работах большинство исследований выполнено на распылительных сушилках BUCHI Mini Spray Dryer B-290 или BUCHI Nano Spray Dryer B-90.

Широкое распространение метод распылительной сушки получил в фармацевтической отрасли. Он применяется для высушивания наполнителей, чистых фармацевтических препаратов или для создания капсул. Частицы, произведенные распылительным высушиванием, главным образом предназначены для перорального (путем проглатывания) или ингаляционного (путем вдыхания) приема лекарственных средств [1–4], однако все более популярной становится трансдермальная или местная система доставки (посредством нанесения на кожу или слизистые оболочки глаз) лекарственных препаратов [5, 6]. Несмотря на то, что в литературе по большей части речь идет о фармацевтических и биологических образцах, встречаются интересные способы применения и в области химии, прежде всего в статьях, посвященных материаловедению [7, 8]. В литературе можно найти упоминания о распылительном высушивании пищевых продуктов, при котором происходит инкапсуляция нутрицевтиков (биологически активных добавок, БАД), формирующих полимерные стенки или оболочки в процессе такого распылительного высушивания [9, 10].

Использование оборудования фирмы BUCHI показало, что частицы модельного белка (такого, как БСА), природного продукта (такого, как куркумин), основные фармацевтические наполнители (ПЛГА, Kollidon 30™) и пищевые наполнители (например, мальтодекстрин), так же как и агломераты наночастиц (например, оксида кремния), были успешно высушены распылением на Nano Spray Dryer B-90 HP.

Задача этой статьи отобрать и классифицировать ключевые исследования, выполненные с помощью распылительной сушилки Nano Spray Dryer B-90, начиная с 2010 года и по настоящее время, сосредоточившись на БСА, ПЛГА и мальтодекстрине, с тем чтобы повторить их и сравнить имеющиеся данные с результатами, полученными на высокопроизводительной версии распылительной сушилки Nano Spray Dryer B-90 HP.

РАСПЫЛИТЕЛЬНОЕ ВЫСУШИВАНИЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Основное применение распылительное высушивание нашло в фармацевтической промышленности, главным образом при разработке способов доставки лекарственных препаратов. Результаты, полученные при распылительном высушивании модельного белка (БСА) и популярного наполнителя (ПЛГА), рассматриваются в данной статье.

РАСПЫЛИТЕЛЬНОЕ ВЫСУШИВАНИЕ БСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ B-90 HP

Из-за особых свойств у БСА есть множество применений в естественнонаучных дисциплинах, таких как клеточная культивация, инвитро-диагностика (исследования в пробирке), фармацевтические препараты для людей и животных, молекулярная биология,

серология (исследования свойств сыворотки крови) и фундаментальные исследования. Кроме того, БСА очень хорошо изучен и используется как модельный белок в многочисленных биохимических исследованиях [11]. Ранее об исследованиях белка, такого как БСА, или фермента с использованием распылительного высушивания сообщалось в работах Ли и др. (2011) и Бюрки и др. (2011) [12, 13].

Ли и соавторы получили наночастицы высушенного распылением БСА из водных растворов этого белка, используя различные размеры мембраны и различные концентрации БСА, в то время как Бюрки и соавторы получили ферментативный порошок бета-галактозидазы с полным сохранением активности этого фермента и высокими выходами, произведенными распылительной сушилкой B-90 [12, 13].

Возможность применения распылительной сушилки B-90 HP для производства субмикронных частиц белка была также исследована BUCHI, в качестве модельного белка использовался БСА. Полученные результаты сравнивали с результатами предыдущих исследований (работа Ли). Распылительная сушилка B-90 HP работала в режиме с открытым контуром. Различные концентрации БСА были высушены распылением с использованием маленькой, средней и большой распылительных головок для исследования влияния типа головки и концентраций БСА на размер получаемых частиц (рисунок 2). Особое внимание уделялось защите белка от денатурации во время процесса; использование высокой скорости насоса и хранение раствора в ледяной бане были частью мер, применяемых с этой целью.

Применимость распылительного высушивания БСА как модельного белка была продемонстрирована компанией BUCHI в прикладных исследованиях. Используя различные наборы параметров и типы распылительных головок, получили частицы размером от 0,133 до 6,9 мкм. Кроме того, было показано, что размер частиц и распределение по величине росло с увеличением диаметра форсунок и концентрации раствора. Этот результат соответствует наблюдениям предыдущих исследований распылительной сушилки [14].

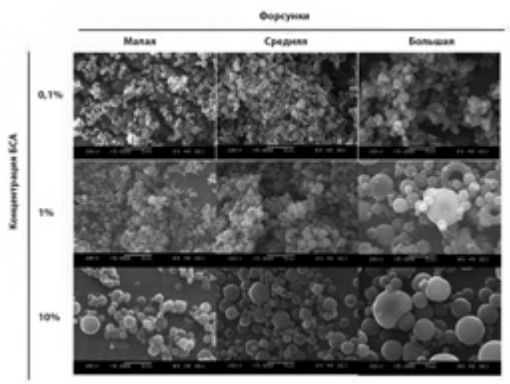


Рисунок 2. Фотографии со сканирующего электронного микроскопа частиц, полученных с использованием малой, средней и большой форсунок (слева на право), с концентрациями БСА (сверху вниз) 0,1%, 1% и 10% БСА

РАСПЫЛИТЕЛЬНОЕ ВЫСУШИВАНИЕ ПЛГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ B-90 HP

В последние десятилетия биополимеры на основе молочной и гликолевой кислот и их сополимеры вызвали большой интерес в качестве носителей при создании различных медицинских устройств и систем доставки лекарственных средств благодаря их превосходной биологической совместимости, способности к биоразложению и отсутствию токсичности в организме человека [4]. Полимеры ПЛГА коммерчески доступны и одобрены американским Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA). Полимеры и сополимеры могут использоваться в различных вариантах молекулярных масс и соотношений молочной и гликолевой кислот. Эти соединения обычно применяются для создания препаратов с контролируемым высвобождением действующего компонента в организм. Несколько таких продуктов уже можно найти на рынке [15]. Как ранее рассмотрено в работе Шафрота и др. (2012), распылительное высушивание используется в нескольких исследованиях с целью развития возможности получения микронных и субмикронных частиц ПЛГА [15]. Интересные результаты исследования были продемонстрированы Амсалем и соавторами (2016), где наноструктурированные наночастицы формировались с помощью распылительной сушилки B-90. Образовавшиеся частицы состояли из ПЛГА, который выступал в качестве материала, из которого были сформированы стенки наночастиц, а архитектура гетерогенной системы была заполнена малыми интерферирующими РНК, составляющими ядро общей наноструктуры. В этом исследовании были получены частицы размером меньше 1 мкм, как сообщается, производительность составила около 20 мл/ч, при работе с мембранами 4 мкм [16].

Похожий эксперимент был проведен компанией BUCHI с использованием распылительной сушилки B-90 HP. Так же как и в исследовании Амсалема и др. (2016), ацетонитрил был выбран в качестве растворителя для распылительного высушивания ПЛГА. В процессе распыления чистого ацетонитрила из-за низкой электропроводности раствора наблюдался вращающийся спрей и капли, формирующиеся на распылительной головке. Для улучшения электропроводности к раствору добавили воду и 0,005% ацетата натрия. Добавление воды и соли привело к образованию конического спрея с пропускной способностью 106 мл/ч.

В этих экспериментах были использованы мембраны среднего размера сушилки B-90 HP, в результате чего были получены сферические частицы размером от 156 нм до 2 мкм, при этом большинство из них имело размер меньше 1 мкм (рисунок 3). Пропускная способность была увеличена в 5 раз по сравнению с результатами, полученными Амсалем и др. (2016), и это не привело к увеличению размера частиц. Капельки, по-

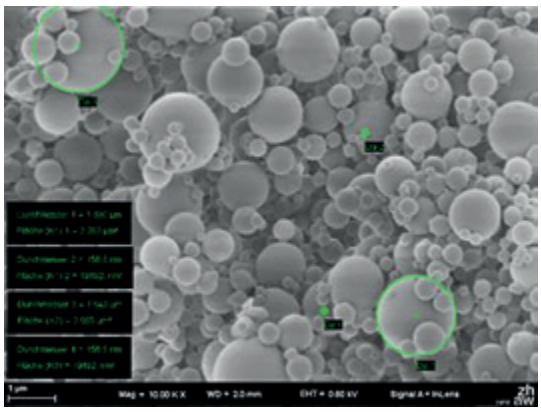


Рисунок 3. Субмикронные сферы ПЛГА, полученные BUCHI на распылительной сушилке B-90 HP

лученные с использованием средней распылительной головки сушилки B-90, имели средний массовый диаметр (MMD) между 5 и 8 мкм, что соответствует размерам капелек, измеренных Шмидом и соавторами (2011) для мембраны 4 мкм, как в предыдущем опыте [17]. Эти результаты объясняют наблюдаемые размеры частиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возможность осуществлять распылительное высушивание фармацевтических веществ и наполнителей в органических и водных растворах была продемонстрирована и литературным обзором и экспериментами компании BUCHI. Такие способы применения показывают, что распылительная сушилка B-90 имеет потенциал для инновационного использования в фармацевтической промышленности, поскольку позволяет осуществлять распылительное высушивание чувствительных соединений, таких как белок. Высокопроизводительная версия установки позволяет проводить распылительную сушку, используя воду и органический растворитель, с увеличением производительности и отсутствием негативных влияний на размер частиц.

В статье был рассмотрен далеко не исчерпывающий список интересных применений распылительной сушилки B-90. Также были продемонстрированы возможности применения её высокопроизводительной версии Nano Spray Dryer B-90 HP в тех же целях без отрицательного влияния на качество получаемых частиц для ключевых исследований в областях, связанных с фармацевтической и пищевой промышленностью. Новая, модернизированная версия распылительной сушилки Nano Spray Dryer B-90 представлена в 2017 году. Она позволяет увеличить производительность при производстве субмикронных частиц и различных инновационных материалов в рамках уже существующего отработанного процесса. Более того, новые возможности, такие как функция автоматической остановки и настройка частоты распыления, позволят более гибко управлять процессом и добиться новых результатов, недостижимых прежде, в сфере инновационных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Sosnik, K. Seremeta. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers // Advances in Colloid and Interface Science. 2015. V. 223. P. 40–54.
2. A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, R. Saurel. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients // An overview, Food Research International. 2007. № 40. P. 1107–1121.
3. X. Li, N. Anton, C. Arpagaus, F. Belleteix, T. Vandamme. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90 // Jounal of Controlled Release. 2010. № 147. P. 304–310.
4. S. Sharma, A. Parmar, S .Kori, R. Sandhir. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications // Trends in Analytical Chemistry. 2016. № 80. P. 30–40.
5. A. Maged, A. Mahmoud, M. Ghorab. Nano Spray Drying as a Novel Approach To Formulate Stable Econazole Nitrate Nanosuspension formulations for Ocular Use // Molecular Pharmaceutics. 2016. № 13. P. 2951–2965.
6. T. Beber, D. Andrade, B. Kann, M. Fontana, K. Coradini, M. Windbergs, R. Beck. Submicron polymeric particles prepared by vibrational spray-drying: Semisolid formulation and skin penetration/permeation studies // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2014. № 88. P. 602–613.
7. R. Suryaprakash, F. Lohmann, M. Wagner, B. Abel, A. Varga. Spray drying as a novel and scalable fabrication method for nanostructured CsH2PO4, Pt-thin-film composite electrodes for solid acid fuel cells // Royal society of chemistry. 2014. № 4. P. 60429–60436.
8. S. Sama, R. Das, S. Brar, Y. Bihan, G. Buelna, M. Verma, C. Soccol. Application of magnesium sulfate and its nanoparticles for enhanced lipid production by mixothrophic cultivation of algae using biodiesel waste. 2014. P. 1–7.
9. Q. Hu, H. Gerhard, I. Upadhyaya, K. Venkitanarayanan. Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum Arabic and lecithin and evaluation of drying technologies // International Jounal of Biological Macromolecules. 2016. № 87. P. 130–140.
10. M. Zhou, T. Wang, Q. Hu, Y. Luo. Low density lipoprotein/pectin complex nanogels as potential oral delivery vehicles for curcumin // Food Hydrocolloids. 2016. № 57. P. 20–29.
11. T. Peters. All about albumin: biochemistry, genetics and medical application. - San Diego: Academic Press, 1995. 8 p.
12. K. Bürki, I. Jeon, C. Arpagaus, G. Betz. New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer // International Journal of Pharmaceutics. 2011. № 408. P. 248–256.
13. S. Lee, D. Heng, K. NgW, H. Chan, R. Tan. Nano Spray Drying: A novel method for preparting protein nanoparticles for protein therapy // International Journal of Pharmaceutics. 2010. № 403. P. 192–200.
14. C. Arpagaus. A Novel Laboratory-Scale Spray Dryer to Produce Nanoparticles // Drying Technology. 2012. № 30. P. 1113–1121.
15. N. Schafroth, C. Arpagaus, U. Jadhav, S. Makne, D. Douroumis. Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process // Colloids and Surfaces B: biointerfaces. 2012. № 90. P. 8–15.
16. O. Amsalem, T. Nassar, S. Benhamron, P. Lazarovici, S. Benita. E. Yavin. Solid nano-in- nanoparticles for potential delivery of siRNA // Journal of Controlled Release. 2016. URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.043 (дата обращения 03.02.2017).
17. K. Schmid, C. Arpagaus, W. Friess. Evaluation of the Nano Spray Dryer B-90 for pharmaceutical applications // Pharmaceutical Development and Technology. 2011. № 16. P. 287–294.
18. Sub-micron Bovine Serum Albumin Particles / BUCHI Application Note № 272. 2017.
19. PLGA sub-micron particles by Nano Spray Drying / BUCHI Application Note № 273. 2017.
20. Production of Kollidon 30™ particles / BUCHI Application Note № 274. 2017.
21. Nano spray drying maltodextrin from solution and emulsion / BUCHI Application Note № 275. 2017.
22. Curcumin sub-micrometer particles by nano spray drying / BUCHI Application Note № 276. 2017. \Preparation of SiO2 agglomerated particles / BUCHI Application Note № 277. 2017.

ПРИМЕНЕНИЕ ПОРТАТИВНЫХ РАМАНОВСКИХ СПЕКТРОМЕТРОВ ДЛЯ ВХОДНОГО КОНТРОЛЯ СЫРЬЯ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

АВТОР

В. Шунтиков,
руководитель направления
Metrohm АО «АВРОРА»

ВВЕДЕНИЕ

Рамановская спектрометрия является экспрессным и неразрушающим аналитическим методом идентификации и контроля качества лекарственных средств и входного сырья, поскольку дает возможность получить индивидуальный спектр молекулы вещества (так называемые спектральные «отпечатки пальцев»). Данный метод не требует какой-либо предварительной подготовки образца, а также позволяет проводить измерение через упаковочный материал: пластик, прозрачное и темное стекло, пленку и т.д. Метод рамановской спектроскопии описан как в российской, так и в международных Фармакопеях (Ph.Eur., USP).

Использование современных технологий при производстве рамановских спектрометров позволило значительно уменьшить размер прибора, и в настоящее время существует большое количество переносных моделей с высокой разрешающей способностью и соотношением сигнал/шум. С учетом всех возможных факторов (флюоресценция, эффективность возбуждения и т.д.) наиболее оптимальным решением являются приборы с длиной волны лазера 785 нм. Они позволяют проводить исследование большинства веществ, не опасаясь высокого уровня флуоресценции.

Большинство выпускаемых компактных и портативных рамановских систем имеют схожую конструкцию измерительных систем, которые затрудняют идентификацию и количественный анализ проб в полевых условиях. Данная конструкция дает ряд преимуществ: низкое значение потребляемой мощности, малый размер и разрешение для идентификации широкого диапазона веществ. Основной особенностью данной конструкции является очень малый фиксированный размер лазерного пучка, т.е. точки в анализируемой пробе, которого достаточно для анализа чистых веществ. С другой стороны, для большинства промышленных применений портативных устройств требуется более высокое спектральное разрешение и большая площадь пучка, т.к. большинство веществ и проб являются гетерогенными. Помимо этого, узкий лазерный фокус повышает удельную мощность, что, в свою очередь, приводит к локализованному нагреванию пробы.

Портативные системы Mira производства Metrohm AG (Швейцария) решают данную проблему благодаря применению технологии Orbital-Raster-Scan (ORS) (рисунок 1). Стандартные конструкции спектрометров с широкой оптической пропускной способностью и большей площадью анализа (широким лазерным пучком) не позволяют добиться требуемого для идентификации высокого спектрального разрешения.

В данной статье мы покажем примеры того, какое применение находят рамановские спектрометры при контроле качества входного сырья на производственных предприятиях, в частности, в фармацевтике.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

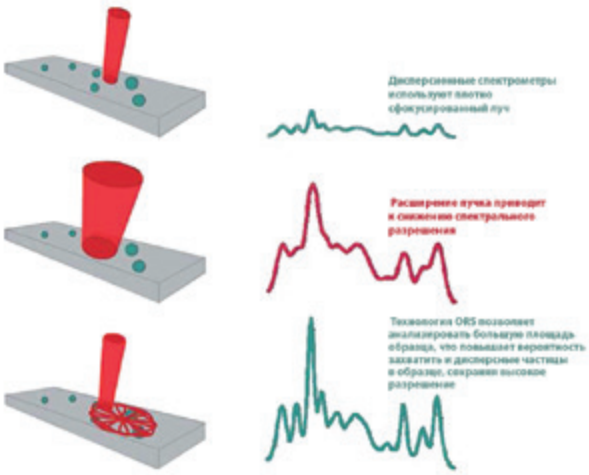


Рисунок 1. Дисперсионные спектрометры используют плотно сфокусированный луч (сверху). Расширение пучка приводит к снижению спектрального разрешения (в центре). Технология ORS (снизу) позволяет анализировать большую площадь образца, что повышает вероятность захвата и дисперсных частиц в образце при сохранении высокого разрешения

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВХОДЯЩЕГО СЫРЬЯ

В соответствии с требованиями GMP (ГОСТ Р 52249-2009) на фармацевтические производства налагается ряд требований по входному контролю, например установление подлинности веществ, проверка каждой упаковки партии материала и т.д. Для обеспечения данных требований могут применяться различные методы, например БИК-спектроскопия, ИК-спектроскопия и т.д. Очевидно, что к оборудованию для идентификации будет предъявляться ряд требований и пожеланий:

А) надежность конструкции для эксплуатации в складских помещениях;

Б) портативность для оперативности и повышения эффективности контроля;

В) простота эксплуатации – возможность использования любым оператором;

Г) однозначность идентификации сырья;

Д) неразрушающий метод анализа, не требующий пробоподготовки.

Всем этим требованиям отвечают портативные рамановские спектрометры. Суть идентификации заключается в сравнении спектров исследуемого материала со спектром в библиотеке прибора. Это может быть как созданная пользователем, так и поставляемая с прибором библиотека рамановских спектров.

Фактически итогом идентификации является сравнение спектральных «отпечатков пальцев» и определение исследуемого вещества на основании индекса совпадения. Таким образом, прибор отвечает на простой вопрос: что это за материал? Этого может быть явно недостаточно, чтобы определить качество материала.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ВХОДЯЩЕГО СЫРЬЯ

Второй важный вопрос при входном контроле сырья: надлежащего ли материал качества? Портативные рамановские спектрометры позволяют получить ответ и в данном случае.

Спектрометр MIRA M-3 производства Metrohm AG, показанный на рисунке 2, позволяет создать не только библиотеку спектров материалов, но и определить надлежащее качество каждого вещества. Данная функция реализована с применением методов хемометрики.



Рисунок 2. Портативный рамановский спектрометр MIRA M-3 позволяет проводить анализ как в виале, так и непосредственно через упаковку

Хемометрика (хемометрия) – это метод получения химических данных с помощью математических методов обработки данных.

Для определения качественных характеристик товара пользователю требуется провести измерение нескольких партий вещества надлежащего качества. Это позволяет создать математическую модель и учесть все возможные отклонения материала от идеальных спектров (библиотек) определенного материала. Современное программное обеспечение (например, MiraCal 3.0) не требует от оператора глубоких познаний в области хемометрики и проводит моделирование в автоматическом режиме на основе полученных данных.

После построения необходимой модели становится возможным проведение не только идентификации, но и качественного анализа сырья. Таким образом, портативный рамановский спектрометр позволяет ответить на два вопроса: что это за вещество и надлежащего ли оно качества?

Безусловно, дальнейшее развитие программной базы приборов позволит проводить и количественный анализ компонентов, например активных фармацевтических субстанций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение портативных рамановских спектрометров позволяет обеспечить выполнение требований GMP в части обеспечения входного контроля сырья. Кроме того, современные спектрометры (например, MIRA M-3) позволяют проводить не только идентификацию, но и качественный анализ как входного сырья, так и готовой продукции (в том числе для выявления фальсификата).

ПОЛНАЯ АВТОМАТИЗАЦИЯ МЕТОДА SISCAPA® ПРИ ПОМОЩИ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ СТАНЦИИ BIOMEK NX^P

АВТОРЫ

М. Разави,
Л. Андерсон,
Р. Ип,
М. Поуп,
Т. Пирсон

SISCAPA Assay Technologies, Вашингтон, США

М. Ковальски
Т. Джнос-Ро,

Beckman Coulter Life Sciences, Индианаполис, США

К. Хантер,

SCIEX, Редвуд, США

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время растет интерес к трансляционным исследованиям с использованием метода масс-спектрометрии (MS/MC). А вместе с этим и потребность в решениях для автоматизированной пробоподготовки образца. Как правило, пробоподготовка является многоэтапной, а протоколы – очень капризными и трудоемкими, что в свою очередь требует высокого уровня подготовки специалиста. Предлагаемое решение для автоматизации исследования по методу SISCAPA (Stable Isotope Standards and Capture by AntiPeptide Antibodies) позволяет стандартизовать пробоподготовку образца и избежать ошибок, связанных с человеческим фактором.

SISCAPA – это иммунно-масс-спектрометрический метод, в котором высокоаффинные антитела, специфичные к протеотипическим пептидам, используются для обогащения целевого пептида из образца, содержащего смесь белков (например, плазмы), ферментативного расщепления и количественного определения путем сравнения со стандартом в известной концентрации, меченным стабильным изотопом. Этот метод позволяет воспроизводимо определять более низкую концентрацию белка и увеличивать поток исследований. Процесс пробоподготовки состоит только из этапов последовательного добавления реагентов. Разделение (центрифугирование или хроматография) не используются в протоколе, благодаря чему его легко запрограммировать на автоматизированной дозирующей станции. Было показано, что автоматизация методики SISCAPA позволяет проводить количественное определение белков различного размера и концентрации в образце с воспроизводимостью на уровне 5% [1].

В данной статье описан первый полностью автоматизированный на станции Biomek NX^P процесс пробоподготовки по методу SISCAPA (рисунок 1). Образцы плазмы или сыворотки, специфичные антитела SISCAPA и соответствующие стандарты, меченные стабильным изотопом, размещаются на рабочем столе станции. Автоматизированный протокол выполняет:

1. Трипсинизацию образца.
2. Обогащение целевых пептидов по методу SISCAPA.
3. Отмывку и элюцию образца в специальный планшет.

Далее обогащенные пептиды анализируются на масс-спектрометре QTRAP 6500 (рисунок 1). Протокол не требует вмешательства оператора и позволяет проводить пробоподготовку до 10 планшетов (960 образцов) в день на одной станции Biomek NX^P.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

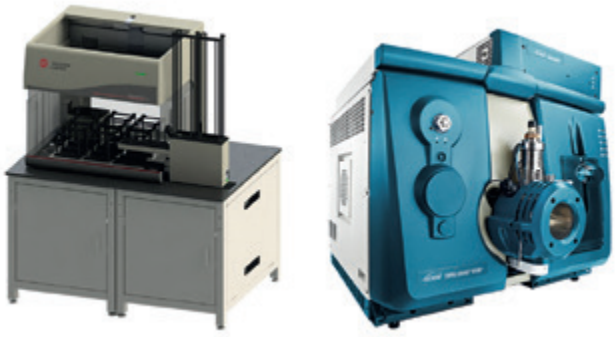


Рисунок 1. Лабораторная станция Biomek NX^P и масс-спектрометр QTRAP 6500

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пептиды, антитела и образцы плазмы

Для примера были выбраны пять искусственно трипсинизированных протеотипических пептидов различного размера, которые присутствуют в плазме в различных концентрациях (таблица 1). Соответствующие стандарты (SIS), меченные стабильным изотопом, были синтезированы твердофазным методом компанией New England Peptide (Массачусетс, США). Аргинин и лизин с терминальным изотопом углерода обеспечивают сдвиг массы на +10 а.е.м. и +8 а.е.м., соответственно.

Высокоаффинные антитела, специфичные к целевым пептидам, были предоставлены компанией SISCAPA Assay Technologies Inc. (Вашингтон, США).

Смесь образцов человеческой плазмы была предоставлена компанией BioReclamation Inc. (Нью-Йорк, США).

Таблица 1.

Перечень анализируемых белков

Белок	Стандартный диапазон концентрации (нг/мл)	Молекулярный вес (Дальтон)	Последовательность пептидов
Альбумин	35,000,000–50,000,000	69,367	LVNEVTEFAK
Аполипопротеин B	400,000–1,250,000	515,605	FPEVDVLTK
Цистанин C	600–1,500	15,799	ALDFAVGEYNK
Растворимый рецептор трансферрина	1,800–4,600	84,871	GFVEPDHYVVVGAQR
Мезотелин	10–80	68,986	LLGPHVEGLK

Протокол

Протокол детально описан в статье [1] и схематично представлен на рисунке 2. Сперва образцы денатурировали в смеси мочевины, триса и Трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорида (TCEP) (концентрация 9 М, 0,2 М и 0,03 М, соответственно). После денатурации образцы алкилировали 0,06 М раствором йодацетамида, разводили 0,2 М трисом до конечной концентрации мочевины 1 М и расщепляли трипсином в соотношении белка к ферменту 10:1. Длительность этапа расщепления (3 ч) была подобрана экспериментально и обеспечивает максимальный выход эндогенных сигналов всех исследуемых белков. Стандарты (SIC пептиды) были добавлены перед проведением трипсинизации. После расщепления в образцы были добавлены специфичные к эндогенным пептидам и CIS стандартам антитела, связанные с магнитными частицами с белком G. Магнитные частицы, обогащенные целевыми пептидами, подвергались сериям промывок. Для освобождения от антител элюция пептидов проводилась в кислотной среде. Очищенные пептиды были проанализированы на масс-спектрометре SCIEX QTRAP 6500 с системой нанохроматографии nanoLC 425.

- Перенос образов в планшет для денатурации.
- Внесение алкалирующего агента.
- Внесение трипсина и SIC пептидов (стандартов).
- Инкубация при 37 °C, 3 ч.
- Внесение магнитных частиц, связанных с антителами.
- Внесение промывающего буфера, осаждение на магнитном штативе, отбор промывающего буфера.



Рисунок 2. Автоматизированный технологический процесс SISCAPA

- Внесение промывающего буфера, осаждение на магнитном штативе, отбор промывающего буфера.
- Внесение промывающего буфера, перенос магнитных частиц в чистый планшет, осаждение на магнитном штативе, отбор промывающего буфера.
- Внесение буфера для элюции, осаждение на магнитном штативе, перенос элюата в LS/MS планшет.

Оценка погрешности

Смесь образцов человеческой плазмы была исследована в 16 повторах. Элюаты из восьми проб собрали в пул. Их использовали для оценки погрешности измерений масс-спектрометра (CV_{MS}). Оставшиеся 8 элюатов обрабатывали отдельно для оценки общей погрешности исследования ($CV_{общий}$). Следующая формула была использована для подсчета погрешности пробоподготовки на станции Biomek NX^P:

$$CV^2_{Biomek} = CV^2_{общий} - CV^2_{MS}.$$

ПЕРЕДАЧА ОБРАЗЦОВ НА ПЛАСТИНУ С ДЕНАТУРИРУЮЩИМ АГЕНТОМ

Настройка лабораторной станции Biomek NX^P

Технологический процесс SISCAPA был автоматизирован при помощи лабораторной станции Biomek NX^P с 96-канальной усовершенствованной системой (EST). Особенности конструкции системы EST позволяют проводить настройки используемых наконечников и тем самым обеспечивают проведение анализа частично заполненных образцами пластин. Гибкая панель станции Biomek оснащается орбитальным шейкером и инкубатором встряхивателем (Inheco, Германия), в то время как накопитель Biomek Stacker позволяет по необходимости использовать дополнительные наконечники для пипеток, реагенты и рабочие пластины. Вместимость накопителя позволила сделать процесс полностью бесконтактным и автоматизированным. Чертеж рабочей панели системы Biomek, а также исходная конфигурация SISCAPA изображены на рисунках 3A и 3B.

Конфигурация масс-спектрометра

Для каждого целевого пептида энергии соударения и потенциалы разделения были оптимизированы введением 10 мкл 100 фмоль/мкл раствора пептидной смеси в систему ЖХ-МС/МС и проанализированы при помощи ПО Skyline (Вашингтонский университет, США). Платформа ЖХ-МС/МС состояла из системы nanoLC™ 425, работающей в режиме микропотока, и системы QTRAP 6500 (SCIEX, США). 15 мкл аликвота каждого образца проходила через систему с конфигурацией «ловушка-извлечение», в которой изократный градиент при 3% буффере B (2 мин) использовался для промывки солей в отходы. После этого включался клапан ловушки, а аналитический градиент использовался для разделения пептидов на 2,7 мкм колонке HALO Peptide-ES C18 (SCIEX) со скоростью потока 10 мкл/мин. Целевые пептиды были разделены при помощи 10-минутного аналитического градиента 0,1% раствором муравьиной кислоты (МК)/5% ДМСО в воде, как растворителе A и 90% ацетонитрила/5% ДМСО в 0,1% муравьиной кислоты (МК) в качестве растворителя B. Пиковая степень расширения анализировалась при помощи ПО MultiQuant™ (SCIEX).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Технологический процесс, приведенный в данной статье, был спроектирован на основании трех ключевых факторов:

- Демонстрация точности дозирования жидкости.
- Полностью бесконтактная и высокопроизводительная система с возможностью обработки до ~1000 образцов в день.

Было определено, что двумя ключевыми этапами, которые значительно влияют на точность технологического процесса, будут этапы добавления SIS пептида и перемещения чистой пластины. Добавление SIS пептида было оптимизировано манипулированием параметров дозирования жидкости:

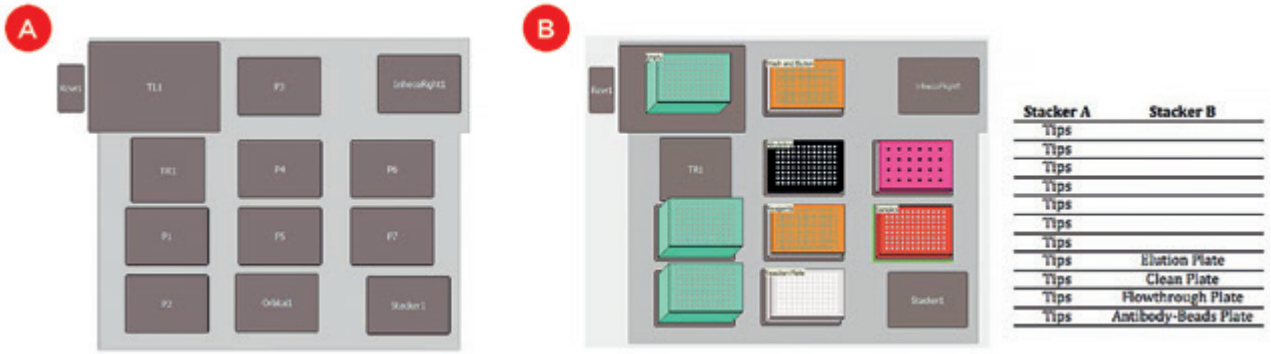


Рисунок 3. Чертеж рабочей панели системы Biomek (A) и исходная конфигурация SISCAPA (B), включая содержимое накопителя

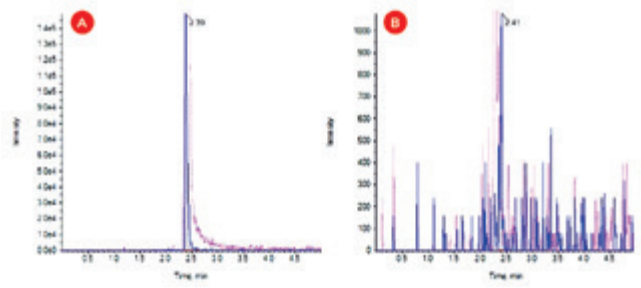


Рисунок 4. Хроматограмма для эндогенного пептида ApoB (синий цвет) и соответствующего пептида SIS (розовый цвет) с (A) и без (B) чистой пластины в протоколе

5 мкл ведущий воздушный зазор был аспирирован перед всасыванием смеси пептида SIS, содержимое было выдуто в жидкость на скорости 10 мкл/с без прикосновения наконечника. Далее чистая пластина была промыта для снижения количества неспецифичных побочных пептидов и для улучшения соотношения сигнал-шум и общего коэффициента вариаций CV. На рисунке 4 отображена степень важности использования чистой пластины во время процедуры промывки.

Типичные хроматограммы для пяти эндогенных пептидов изображены на рисунке 5 с демонстрацией различия в концентрации. Распределение коэффициента вариаций CV для эксперимента приведено в таблице 2. Общий коэффициент CV технологического процесса находился в диапазоне от 2,1% до 6,7% для различных белков. В соответствии с предыдущими отчетами погрешность при проведении некоторых анализов (альбумин и растворимый трансферриновый рецептор) была в первую очередь обусловлена измерениями масс-спектрометра и, следовательно, это делало невозможным проведение точной оценки небольшой погрешности из-за самого технологического процесса Biomek SISCAPA. В тех случаях, в которых изменение погрешности подготовки входящего образца было возможным, результаты варьировались в диапазоне от 3,6 до 5,0% для различных белков. В данных случаях погрешность была обусловлена вариабельностью процесса разложения, а погрешность дозирования и обработки жидкости ввиду самой процедуры SISCAPA.

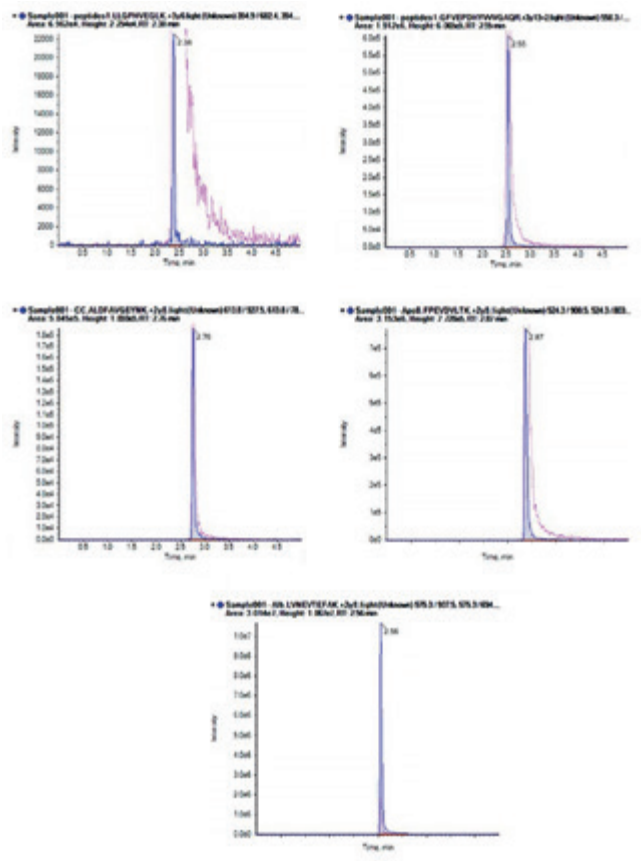


Рисунок 5. Хроматограммы обогащенных из белков эндогенных и SIS пептидов >8 порядков

Таблица 2.

Анализ коэффициента вариаций CV

	Alb	ApoB	CC	sTfR	Meso
MC CV	4,1%	3,3%	1,0%	3,2%	5,7%
Biomek CV	Н/Д	4,6%	5,0%	Н/Д	3,6%
Общий CV	2,1%	5,6%	5,1%	2,7%	6,7%

Примечание: Использовались восемь технических повторов для подсчета общего коэффициента вариаций CV всего технологического процесса. Восемь репликатов были смешаны в конце технологического процесса и перед проведением MC анализа для подсчета коэффициента вариаций CV для MC. Коэффициент вариаций CV Biomek был оценен при помощи формулы суммы квадратов

Данный метод полностью предназначен для обработки двух паллет с 96 посадочными местами каждая (192 образцов) в течение 4,5 ч, в то время как автоматизированный метод является очень гибким к адаптации исследования небольшого количества маленьких образцов. Выполнение пяти последовательных запусков сделает возможной обработку 960 образцов в день одним прибором, тем самым гарантируя желаемый показатель производительности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из полученных результатов, мы можем смело утверждать, что автоматизация технологического процесса SISCAPA на платформе Biomek NX^P позволит проводить точные измерения белков различных размеров, а также уровеня их концентрации в плазме. Очень важным является тот факт, что данный технологический процесс был специально разработан для бесконтактной и высокопроизводительной обработки образцов и именно благодаря этому он может быть широко использован в прикладных исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Razavi, L. Anderson, M. Pope, R. Yip, T. Pearson. High precision quantification of human plasma proteins using the automated SISCAPA Immuno-MS workflow // N. Biotechnol. 2016. № 33. P. 494–502. doi: 10.1016/j.nbt.2015.12.008.

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОДУКЦИИ IgG В КЛЕТКАХ ЛИНИИ CHO

АВТОРЫ

М. Ковальски,

Штатный научный исследователь
Beckman Coulter Life Sciences,
Индианаполис, США

Д. Апийо,

Менеджер по маркетингу
Pall ForteBio, Фремонт, США

Р. Таккар,

Продакт-менеджер
Pall ForteBio, Фремонт, США

Т. Джонс-Ро,

Менеджер по маркетингу
Beckman Coulter Life Sciences, Индианаполис, США

ВВЕДЕНИЕ

Моноклональные антитела уже давно являются важным инструментом молекулярного и клеточного анализа. Со временем они стали использоваться и в клинической практике как биологические средства лечения заболеваний. Антитела вырабатываются в клеточных линиях, скрининг которых позволяет определить экспрессируются ли белки в достаточном количестве и с желаемыми посттрансляционными модификациями, обладают ли они требуемой специфичностью и аффинностью. Выявив линию-продуцент, можно оптимизировать состав культуральной среды, что позволит усилить клеточный рост и/или продукцию белка и достичь более высоких титров антител.

Наверное, наиболее часто для продукции белка используют клеточную линию CHO (клетки яичника китайского хомяка). Она может расти как на подложке, так и в суспензии. Суспензионная культура содержит большее количество клеток на единицу среды и может культивироваться в биореакторах. В продаже имеется много вариантов «оптимизированных» сред для культивирования клеток CHO. Однако каждый конкретный экспрессионный клон может требовать для максимального синтеза белка особых условий, и коммерческие среды будут для него субоптимальными.

Идеальным подходом к оптимизации среды является планирование факторного эксперимента, в котором тестируется множество комбинаций ее компонентов в различных концентрациях. Однако такие факторные эксперименты значительно увеличивают количество условий, которые необходимо протестировать. Стандартные методы оценки продукции IgG и других белков зачастую трудоемки (например, ИФА) или очень медленны (например, ВЭЖХ) и не подходят для факторного эксперимента, требующего высокой скорости

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

анализа. Для сравнения, система Octet (Pall ForteBio, рисунок 1) определяет связывание молекул в реальном времени при помощи биослойной интерферометрии, что позволяет проводить количественный или кинетический анализ. Эта технология исключает необходимость подготовки образца помимо опционального этапа разведения, а высокопроизводительные модели системы могут одновременно обрабатывать до 96 проб.

В данной статье мы показали, как объединение высокоскоростного анализа продукции IgG при помощи системы Octet NTX с автоматизированной подготовкой образцов среды на лабораторной станции Biomek FX^P (рисунок 1) позволяет провести факторный эксперимент с целью оптимизации экспрессии IgG в клетках линии CHO. При этом лабораторная станция Biomek FX^P используется для подготовки 96 вариантов среды и посева клеток в нескольких повторностях, подготовки планшетов и образцов для системы Octet HTX и инициации XTT-теста для лучшего понимания влияния компонентов среды на рост клеток CHO.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия CHO

CHO DP-12 clone #1934 (ATCC) – это линия клеток яичника китайского хомячка CHO, стабильно экспрессирующая рекомбинантные антитела класса IgG1 человека к интерлейкину 8. Клетки линии CHO культивировали на подложке в среде DMEM + GlutaMAX (Thermo Fisher), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят (Thermo Fisher), 2 мкг/мл рекомбинантного инсулина человека (Sigma), 0,1% следовых элементов A и B (Corning) и 200 мМ метотрексата (Sigma), при 37 °C в атмосфере с 5% CO_2.

Планирование факторного эксперимента по оптимизации культуральной среды

В качестве базовой среды для оптимизации выбрали среду CD OptiCHO (Thermo Fisher). Многократное пассирование клеток в среде OptiCHO приводит к суспензионному росту, хотя изначально культура имеет адгезионные характеристики. Культивирование на подложке позволяет подсчитывать клетки, анализируя их изображение, и предотвращает захват клеток при отборе среды для анализа продукции IgG.

Такие дополнительные компоненты, как полиамин, SPITE, раствор заменимых аминоксилот для среды MEM (NEAA), раствор для биореакторов с подведенным значением pH («биореакторный буфер», все от фирмы Sigma Aldrich), GlutaMAX, HEPES и CHO CD EfficientFeed A (все от фирмы Thermo Fisher), были протестированы на предмет возможного усиления продукции IgG.

Для подготовки множества образцов среды с различными комбинациями компонентов использовали лабораторную станцию Biomek FX^P, снабженную 8-канальной дозирующей насадкой и 96-канальным дозирующим модулем с возможностью выборочной насадки наконечников (EST). Эта функция позволяет осуществлять одновременный перенос содержимого 4, 16 или 48 лунок. HEPA-фильтр, интегрированный в станцию Biomek FX^P, обеспечивал стерильность во время манипуляций с клеточными культурами.

Содержимое четвертого 96-луночного планшета (рисунок 2) четырежды переносили в разные четверти 384-луночного планшета с прозрачным дном. Затем в каждую лунку высевали по 40000 клеток CHO в общем объеме 100 мкл/лунку. На создание множества вариантов среды с различными комбинациями компонентов



Рисунок 1. Автоматизированная оптимизация продукции IgG. Для подготовки множества образцов среды с различными комбинациями компонентов использовали лабораторную станцию Biomek FX^P (A). Титр антител класса IgG, продуцируемых клетками линии CHO, анализировали при помощи системы Octet HTX (B). Количество клеток и XTT-поглощение определяли с помощью системы SpectraMax i3x Multi-Mode с цитометром SpectraMax MiniMax 300 Imaging (C)

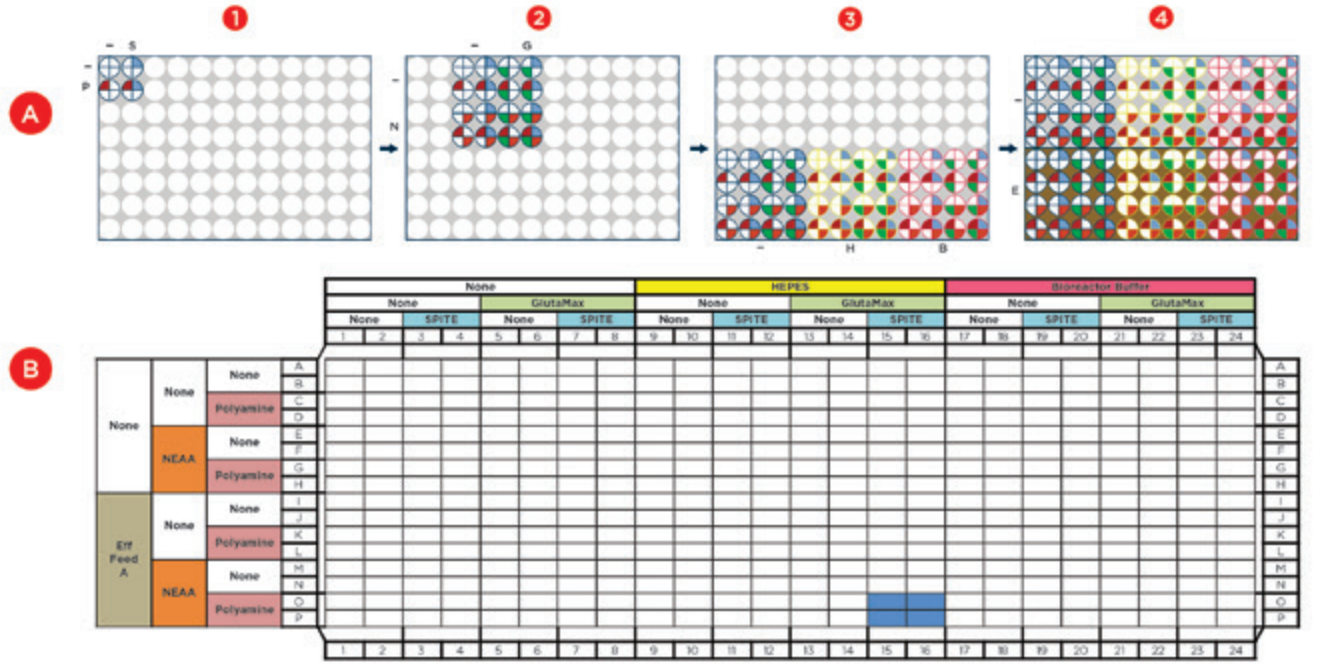


Рисунок 2. Подход к автоматизированному факторному эксперименту. A) Для внесения реагентов в глубоколуночные планшеты на всех этапах использовали 8-канальную дозирующую насадку. Для переноса подготовленных комбинаций реагентов из 4, 16 или 48 лунок одного планшета в такое же количество лунок другого планшета использовали 96-канальный дозирующий модуль с возможностью выборочной насадки наконечников. Краткие описания: 1) Среду (–), полиамин (P) и SPITE (S) скомбинировали в 4-х лунках первого планшета. 2) Среду (–), GlutaMAX (G) и NEAA (N) скомбинировали в 16-ти лунках второго планшета. Содержимое лунок полиамин/SPITE первого планшета перенесли в 4 четырехлуночных квадранта второго планшета. 3) Среду (–), HEPES (H) и биореакторный буфер (B) внесли по отдельности в 16 лунок третьего планшета. Множество комбинаций компонентов, полученное во втором планшете, перенесли в каждый из этих наборов из 16-ти лунок в третьем планшете. 4) Среду (–) и Efficient Feed A (E) внесли по отдельности в 48 лунок четвертого планшета. Множество комбинаций компонентов, полученное в третьем планшете, перенесли в каждый из этих наборов из 48-ми лунок в четвертом планшете. B) Содержимое четвертого 96-луночного планшета четырежды переносили в разные четверти 384-луночного планшета. Таким образом, получили 96 уникальных вариантов сред с различными комбинациями компонентов в четырех повторностях. Голубым цветом отмечены ряды и столбцы лунок, заполненные полиамином, SPITE, GlutaMAX, NEAA, HEPES и Efficient Feed A

и на посев клеток понадобилось 20 мин. Клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO_2, в течение 2–4 суток, а затем проводили анализ продукции IgG и клеточного роста.

Количественный анализ IgG

При помощи лабораторной станции Biomek FX^P из каждой лунки культурального планшета переносили по 50 мкл среды в соответствующую лунку 384-луночного черного планшета с наклонным дном (Pall ForteBio). Образцы анализировали при помощи системы Octet HTX с биосенсорами Dip и Read™ белка A, который связывает IgG прямо из среды. Сначала образцы гидратировали базовой средой OptiCHO, затем восстанавливали 10 мМ раствором глицина pH 1,7 и нейтрализовали базовой средой OptiCHO. Гидратацию, восстановление и нейтрализацию выполняли при помощи станции Biomek FX^P. Процесс обработки занял 7 мин, а анализ 384 образцов при помощи системы Octet HTX с использованием 96 биосенсоров потребовал менее 20 мин.

Из 700 мкг/мл раствора калибратора белка A (Pall ForteBio) приготовили серию последовательных разведений в среде OptiCHO с диапазоном концентраций 0–50 мкг/мл. Полученные растворы проанализировали при помощи биосенсоров белка A в трех повторностях. Результаты измерений для калибратора позволили построить стандартную кривую, угол начального наклона которой использовали для определения скорости связывания, и 5-параметрическую логистическую кривую (взвешенную по Y^2) для определения ответной реакции образцов. Поскольку в лунках содержались образцы среды с разными комбинациями компонентов, каждый из них был протестирован с калибратором, чтобы убедиться в отсутствии существенного влияния на результаты анализа продукции IgG или базовые показатели.

Анализ клеточного роста

После первоначального посева клеток, но до анализа продукции IgG, при помощи системы SpectraMax i3x Multi-Mode с цитометром SpectraMax MiniMax 300 Imaging получили по одному изображению каждой

лунки культурального планшета в светлом поле. Количество клеток на изображении определяли при помощи технологии StainFree Cell Detection с включенной настройкой CellsC.

Поскольку в разных культуральных средах морфология колоний клеток CHO может отличаться, результаты оценки клеточного роста верифицировали при помощи XTT-теста. После отбора образцов сред для анализа продукции IgG к клеткам добавляли по 15 мкл XTT (Cell Signaling) при помощи станции Biomek FX^P, а затем планшеты инкубировали при 37 °C. Через 1–4 ч инкубации при помощи системы SpectraMax i3x Multi-Mode измеряли поглощение света с длинами волн 475 нм и 660 нм.

Анализ данных

Результаты повторных измерений усредняли и импортировали в программное обеспечение Design-Expert 8.0.2 (Stat-Ease) для выявления факторов, существенно влияющих на клеточный рост или продукцию IgG как по отдельности, так и в комбинации друг с другом. Кроме того, ПО Design-Expert использовали, чтобы спрогнозировать условия, при которых продукция IgG будет максимальной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Главная цель оптимизации – это определение условий, при которых уровень продукции IgG будет наивысшим. Усиление продукции IgG возможно как в результате увеличения клеточной производительности, так и/или ускорения клеточной экспансии. Мы проанализировали клеточный рост и титр антител, чтобы оценить степень влияния двух процессов.

Анализ изображений лунок через 30 мин после посева подтвердило равномерное распределение клеток по планшету (CV=6,1%). Это дает уверенность в том, что все наблюдаемые позднее различия являются следствием разного состава сред. На рисунке 3 показаны результаты количественного определения титров антител класса IgG через 4 дня инкубации в 96 различных вариантах среды. Более сильное испарение жидкости в лунках, расположенных по краям планшета, искажало результаты измерения концентрации IgG. Обе лунки, показавшие наиболее сильно отклоняющиеся результаты, были угловыми (рисунок 3C). Повторности с краевыми лунками имели более высокий коэффициент вариации (CV=9,6%) по сравнению с повторностями по центру планшета (CV=2,9%). Поскольку указанные эффекты были существенными, мы исключили внешние лунки из вычислений. В итоге средний титр антител составил от 7,8 до 14,6 мг/мл, а при культивировании в базовой среде OptiCHO – 8,8 мкг/мл. Это означает, что после одного цикла оптимизации среды удалось определить условия, которые могут усиливать продукцию IgG на 66%.

Для выявления факторов, оказывающих существенное влияние на титр IgG, как в отдельности, так и в сочетании с другими факторами, использовали статистическое программное обеспечение (таблица 1). Если говорить об отдельных компонентах среды, то полиамин и GlutaMAX усиливали, биореакторный буфер снижал, а SPITE, HEPES и EfficientFeed A практически не влияли на продукцию IgG. Однако в сочетании с GlutaMAX и биореакторным буфером SPITE оказывал значительное влияние на продукцию IgG (рисунок 4). Без буфера SPITE ослаблял положительный эффект, оказываемый GlutaMAX (рисунок 4A), но в со-

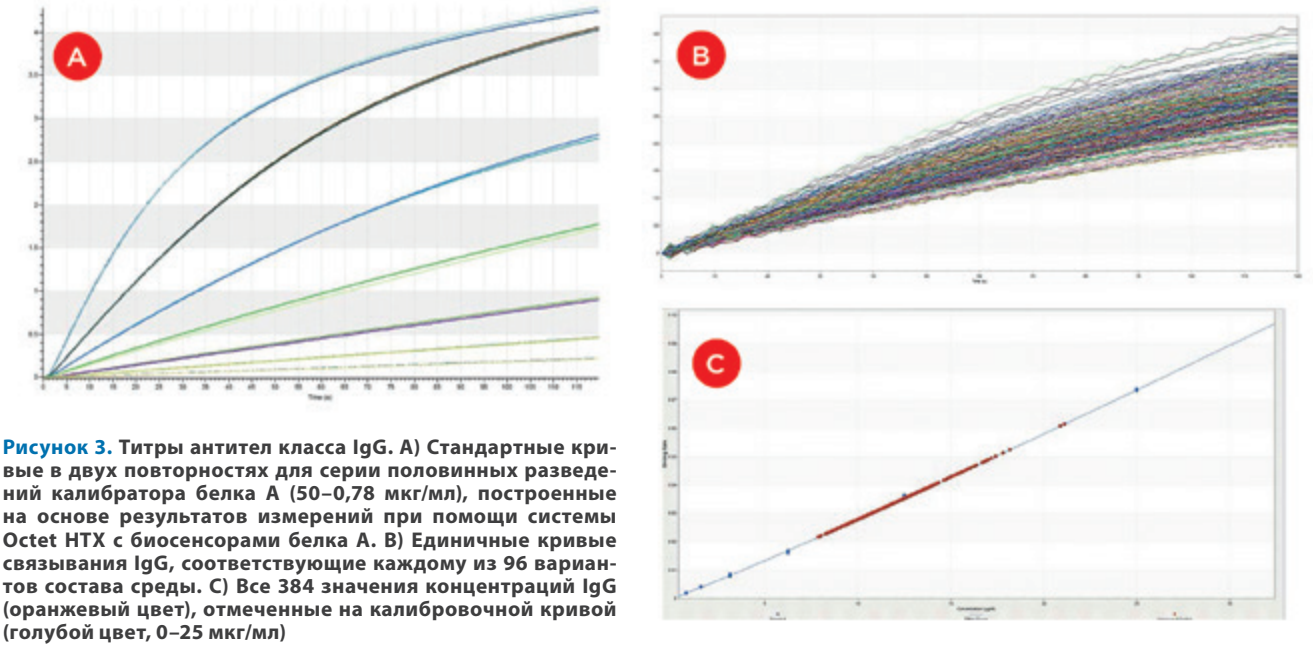


Рисунок 3. Титры антител класса IgG. A) Стандартные кривые в двух повторностях для серии половинных разведений калибратора белка A (50–0,78 мкг/мл), построенные на основе результатов измерений при помощи системы Octet HTX с биосенсорами белка A. B) Единичные кривые связывания IgG, соответствующие каждому из 96 вариантов состава среды. C) Все 384 значения концентраций IgG (оранжевый цвет), отмеченные на калибровочной кривой (голубой цвет, 0–25 мкг/мл)

четании с биореакторным буфером он производил значительный положительный эффект (рисунок 4B). Сочетание всех трех компонентов приводило к самому высокому уровню продукции IgG (рисунок 4C). Эти результаты демонстрируют преимущество факторного анализа: ни SPITE, ни биореакторный буфер не были бы использованы для дальнейших экспериментов, если бы изначально их эффекты анализировали по отдельности.

Для изучения потенциального механизма усиления продукции IgG мы проанализировали влияние дополнительных компонентов среды на клеточный рост при помощи статистического программного обеспечения. По отдельности GlutaMAX и SPITE значительно увеличивали количество клеток, определяемое при помощи цитометра SpectraMax MiniMax, а вместе оказывали еще более существенное влияние, в то время как EfficientFeed A снижал количество клеток (таблица 1). Клетки линии CHO преимущественно организованы в среде OptiCHO в трехмерные кластеры. GlutaMAX, по-видимому, увеличивает размер колоний, а SPITE изменяет их морфологию и/или увеличивает количество отдельных клеток, растущих между колониями. Из-за трехмерного характера клеточных колоний результаты измерений числа клеток при помощи изображений могут быть занижены или завышены, поэтому в качестве дополнительного средства количественной оценки относительного числа клеток использовали XTT-тест.

И снова для исключения влияния испарения в краевых лунках на результат XTT-теста мы рассматривали только внутренние лунки. Подобно результатам, наблюдаемым при помощи изображения, GlutaMAX оказывал существенное положительное влияние на клетки, в то время как SPITE усиливал поглощение XTT только в присутствии биореакторного буфера. Эффект GlutaMAX также усиливался в присутствии этого буфера. Любопытно отметить, что EfficientFeed A оказывал положительное влияние на поглощение XTT, но в присутствии SPITE этот эффект нивелировался. Наконец, HEPES оказывал отрицательное влияние на XTT-сигнал (таблица 1). Не исключено, что различия в средах могут искажать результаты XTT-теста (например, буферная емкость/pH могут оказывать влияние на характеристики химической реакции). Но если для какого-то компонента (например, GlutaMAX), резуль-

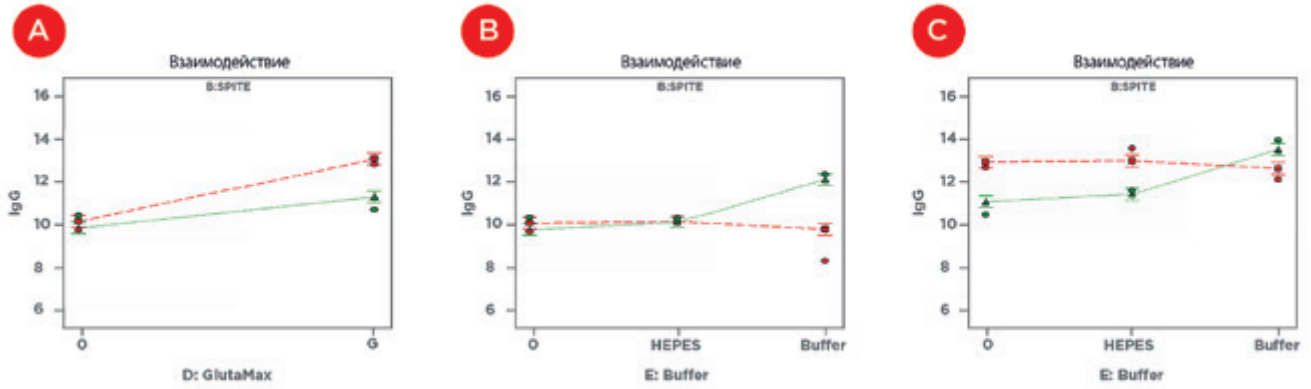


Рисунок 4. Взаимодействие дополнительных компонентов. A) Положительное влияние GlutaMAX на титр IgG (красная линия) ослабляется в присутствии SPITE (зеленая линия). B) SPITE (зеленая линия) приводит к увеличению титра IgG только в присутствии биореакторного буфера. C) SPITE (зеленая линия) усиливает положительное влияние GlutaMAX на титр IgG (красная линия) в присутствии биореакторного буфера. Без факторного анализа подобные наблюдения были бы невозможны

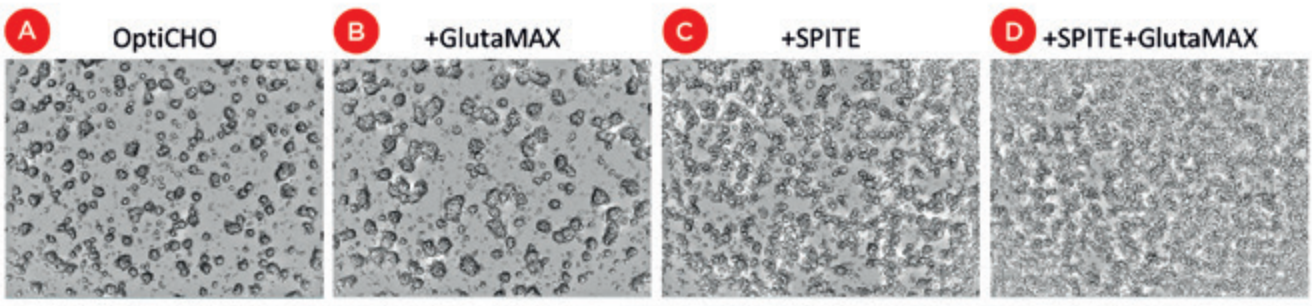


Рисунок 5. Влияние дополнительных компонентов на клеточный рост. A) Изображение колоний клеток CHO, культивируемых в среде OptiCHO, полученное при помощи цитометра SpectraMax MiniMax. B) В присутствии GlutaMAX размеры колоний клеток CHO увеличиваются. C) Добавление SPITE приводит к появлению большего числа отдельных клеток между колониями. D) Комбинация GlutaMAX и SPITE оказывает еще более существенное влияние на число клеток, чем каждый из этих компонентов в отдельности

таты, полученные при анализе изображений, подтверждаются в ходе XTT-теста, то последний можно считать дополнительным доказательством влияния этого компонента на клеточный рост.

Для создания модели, которая по 96 точкам могла бы предсказать оптимальные условия для экспрессии IgG, использовали статистическое программное обеспечение. Такое моделирование снижает вероятность использования «ложно положительных» результатов, по сравнению с ситуацией, когда мы принимаем за оптимальные условия вариант среды, показавший максимальную концентрацию антител в единичном эксперименте. Опираясь на данную модель, можно спрогнозировать, что титр IgG, которые продуцируют клетки CHO в среде с полиамином, SPITE, GlutaMAX и биореакторным буфером, составит 13,6 мкг/мл. Это на 42% больше аналогичного показателя продукции антител (9,6 мкг/мл) в базовой среде OptiCHO.

Таблица 1.

Влияние дополнительных компонентов среды на титр IgG и клеточный рост

Компонент	Титр IgG	Число клеток	XTT
Полиамин	+		
SPITE		+	
NEAA			
GlutaMAX	+	+	+
Биореакторный буфер	-		+
EfficientFeed A		-	+
SPITE+GlutaMAX	–	+	
SPITE+буфер	+		+
SPITE+EfficientFeed A			–
GlutaMAX+Биореакторный буфер			+

Примечание: «+» – увелчиние показателя, «–» – снижение показателя, пустая ячейка – эффект отсутствует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье показано, как оптимизация среды может усилить рост клеток CHO и продукцию белков. При помощи факторного эксперимента удалось определить условия, увеличивающие титр антител на 42–66% по сравнению с коммерчески доступными средами, оптимизированными для культивирования клеток CHO. Также мы выявили факторы, которые не влияют на экспрессию антител, и исключение их из состава культуральной среды позволит снизить стоимость продукции. Анализируя комбинации всех дополнительных компонентов, удалось определить сочетания, оказывающие положительное влияние на продукцию IgG. Но они никогда не были бы установлены при индивидуальном анализе каждого компонента. Такой факторный эксперимент очень трудно выполнить в ручном режиме. Он потребовал бы 184 переноса жидкостей с использованием 1- и 8-канальных дозаторов, а в случае более сложного эксперимента, число необходимых действий значительно бы выросло. Автоматизация такой задачи не только значительно снижает вероятность ошибки, но и экономит время исследователя, которое он может потратить на планирование экспериментов и анализ данных.

Анализируя в дополнение к титру IgG количество клеток, мы отделили факторы, которые напрямую влияют на клеточный рост (GlutaMAZ, SPITE), от факторов, которые влияют только на продукцию IgG, не оказывая воздействия на рост клеток (полиамин). Эта дополнительная информация дает основания предположить, что поэтапное добавление компонентов может иметь практическую значимость, если сначала простимулировать рост клеток, а затем запустить продукцию белка. Кроме того, по всей видимости, существует баланс между этими двумя эффектами: слишком сильный рост клеток может ограничивать энергию, доступную для продукции IgG, и наоборот, значительные затраты энергии на продукцию белков замедляет клеточный рост. И в этом случае факторный подход с большей вероятностью позволит определить условия для соблюдения оптимального баланса.

Планируя такой факторный эксперимент, следует учитывать, что различные дополнительные компоненты могут влиять на результаты анализа. Например, добавление смеси линолевая кислота / леиновая кислота / альбумин (Sigma Aldrich) изменяет базовый уровень показаний системы Octet даже в отсутствии клеток или стандартов. Поскольку не все лунки содержали бы данный компонент, было бы сложно отличить истинное усиление продукции IgG от ложно-положительных результатов. Поэтому данный компонент не стоит включать в эксперимент. Как было отмечено выше, существует возможность того, что различные факторы будут влиять на характеристики прикрепленных клеточных колоний. Это может исказить результаты подсчета клеток на изображении и повлиять на XTT-тест, поэтому полезно использовать разные методы анализа для предсказания механизмов действия.

Еще одним из факторов, искажающих результаты эксперимента, является испарение среды в крае-

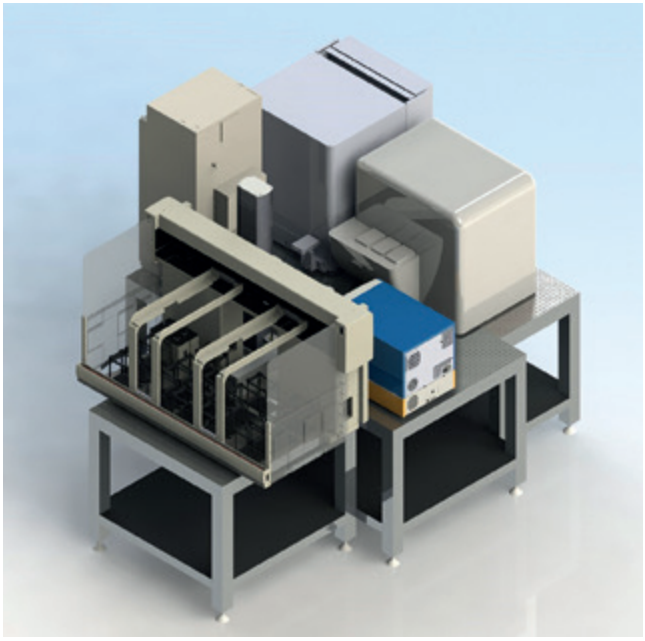


Рисунок 6. **Высокопроизводительная система анализа белков. 3D-визуализация демонстрирует, каким образом система Octet HTX и платформа SpectraMax i3x Multi-Mode с цитометром SpectraMax MiniMax могут быть интегрированы в лабораторную станцию Biomek FX^P в сочетании с местом для хранения и инкубаторами и использованы для высокоскоростной обработки и анализа образцов. Результаты анализа при помощи системы Octet запускают определенный последующий протокол дозирования жидкостей на станции Biomek FX^P без вмешательства оператора (например, протокол для экспансии клона, показавшего максимальную продукцию IgG)**

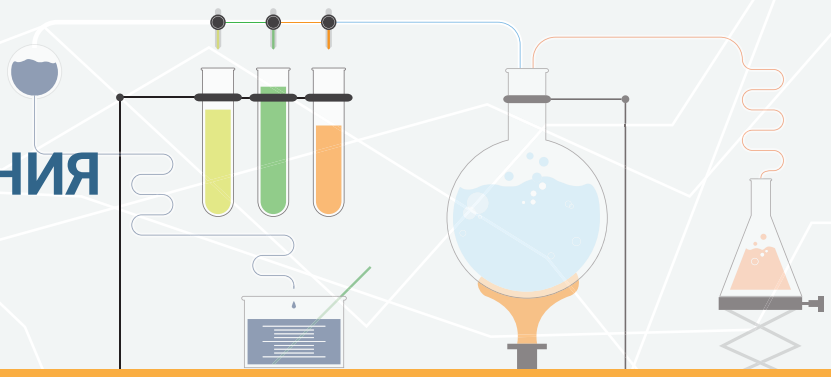
вых лунках. Один из способов его минимизировать – уменьшить продолжительность культивирования клеток. Например, на второй день инкубации клеток коэффициенты вариации титров IgG в повторностях во внутренних лунках составлял 2,5%, а во внешних – 3,8% (по сравнению с 9,6% на 4-й день). Однако культивируя клетки дольше, мы с большей вероятностью определим условия, которые можно лучшим образом адаптировать для биореактора, в котором культивирование может растянуться на недели. Другие способы минимизации краевых эффектов включают в себя использование краевых лунок только для испарения или (как сделано здесь) исключение из рассмотрения лунок, в которых наблюдаются краевые эффекты. Многоканальный дозирующий модуль с функцией EST станции Biomek FX^P позволяет заполнить реагентами и клетками только 308 внутренних лунок 384-луночного планшета, а в остальные 76 лунок по периферии планшета налить воды. Наконец, для учета эффекта испарения можно использовать возможности 8-канальной дозирующей насадки с датчиком уровня жидкости, чтобы вычислить объем среды в каждой лунке и внести поправку в анализ. Но это будет скорость лимитирующей стадии процесса по сравнению с другими этапами анализа продукции IgG.

Из-за простоты подготовки проб и высокой скорости их обработки система Octet HTX является отличным инструментом для высокопроизводительных приложений, таких как скрининг экспрессионных клонов. Для достижения максимальной скорости рабочего процесса мы интегрировали систему Octet HTX в лабораторную станцию Biomek FX^P (рисунок 6). Такая конфигурация обеспечивает автоматическую загрузку и обработку образцов, количественный анализ белков и кинетические исследования. Также система может использовать результаты анализа для запуска дополнительного протокола дозирования (например, протокол для экспансии клона, показавшего максимальную экспрессию IgG, в большие лунки). Комбинация всех возможностей станции Biomek FX^P и системы Octet HTX позволяют сэкономить время, силы и деньги, затрачиваемые при оптимизации и анализе продукции белка.

BECKMAN COULTER
Life Sciences

VIII ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

СТРАТЕГИИ ПРОДВИЖЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ТОВАРОВ И БРЕНДОВ



10 апреля 2017 года • Soglasie Holl

ПОЧЕМУ ВАМ СТОИТ ПРИНЯТЬ УЧАСТИЕ?

- **ПРАКТИЧЕСКИЙ ОПЫТ** как международных, так и российских фармкомпаний.
- **ПРОГРАММА-КОНСТРУКТОР.** выберите тему, интересную именно вам!
- **ОСОБЕННАЯ АТМОСФЕРА!**
- **6+ МАСТЕР-КЛАССОВ.** Не абстрактные стратегии, а только необходимая в работе практика!
- **ИНТЕРАКТИВНЫЙ ФОРМАТ** — масса возможностей и всего за один день!

В ПРОГРАММЕ МАСТЕР-КЛАССЫ:

- **МАГИЯ СОЗДАНИЯ:** 7 эффективных практик применения нейромаркетинга
- **ТЕОРЕМА** эффективности продвижения лекарственных средств через аптечные сети в условиях роста цены на телерекламу
- **ЛАБОРАТОРИЯ ПРАКТИКУМ!** Многоканальный маркетинг, примеры успеха.
- KPIs эффективной коммуникации: мультиканальное продвижение, зрелость компании, примеры изменения стратегии и достижений с использованием MCM
- **ПСИХОЛОГИЯ:** Тонкости профессиональной коммуникации на фармацевтическом рынке: ошибки, методики формулировки и психология восприятия целевыми аудиториями
- **СЛУЖБЫ СПАСЕНИЯ!** Нестандартные инновационные способы продвижения лекарственных средств – что это? Трудно ли их внедрять в нашей зарегулированной среде?
- **ИНСТРУМЕНТАРИЙ.** Digital marketing: ожидания, реальность, сложности и пути их преодоления
- **БЛОКБАСТЕР.** Нуждаются ли в продвижении препараты-бестселлеры? Или их громкие имена сами себя продают?
- **ПО ЛЮБВИ.** 400 законных способов влюбить врачей/аптекарей/пациентов в свой продукт. Все уже изобретено или здесь есть место новациям?

ДЛЯ ЛЮБИТЕЛЕЙ ОСТРЕНЬКОГО:

- **ВЕЧЕРНИЙ ДИСКУССИОННЫЙ КЛУБ** «Что делает фармотрасль для укрепления своей репутации среди населения?»

НАША ИЗЮМИНКА: Вечер «пожирателей рекламы»!
Ежегодная номинация «Лучший рекламный ролик»

Воспользуйтесь скидкой для «РАННИХ ПТАШЕК» и «ХОЧУ БЫТЬ В КУРСЕ ВСЕГО»!
Обратите внимание на различные возможности по участию и скидки!

Оргкомитет конференции: тел.: +7 495 995-80-04, e.pronenko@infor-media.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕНЕТРАЦИИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

АВТОРЫ

М.В. Дунаева,

Менеджер по продукции
Anton Paar

ВВЕДЕНИЕ

Консистенция образцов зачастую является очень важным параметром, ведь именно консистенция определяет, как образец будет вести себя в процессе использования. В фармацевтической промышленности консистенция очень важна для таких продуктов, как мази или крема. Очень важно предсказать, как будет вести себя мазь при нанесении, будет ли хорошо ложиться на кожу, выдавливаться из флакона, не будет ли слишком густой или, наоборот, жидкой. В зависимости от консистенции мази втираются, намазываются или накладываются на кожу. Провести оценку таких характеристик можно с помощью пенетрометра.





ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ПЕНЕТРОМЕТР ОТ ANTON PAAR

Тест на пенетрацию, согласно Европейской Фармакопеи 2.9.9, является официальным методом особенно для таких образцов, как вазелин. Пенетрация или единицы пенетрации – это мера консистенции материала, представляющая собой расстояние в десятых долях миллиметра, на которое тестовое тело заданной формы, расположенное вертикально, проникает в образец за фиксированный период времени при заданной температуре.

Пенетрометр PNR12 австрийской компании Anton Paar полностью удовлетворяет требованиям фармацевтической промышленности. Широкий ассортимент испытательных систем включает в себя системы, подходящие для исследования фармацевтических образцов в соответствии со стандартами:

- Испытательная система Полый конус (U.S. Pharmacopeial Convention).
- Испытательная система Микроконус по Кляйн (European Pharmacopoeia 2.9.9).

Кроме того, производителем разработан пакет квалификационых документов «Smart» для фармацевтической промышленности.

Практический аспект применения пенетрометра PNR12

Рассмотрим более подробно методику проведения испытания на примере образцов парафинов.

Испытания проводились на пенетрометре PNR12 (Anton Paar), использовали систему Микроконус. К достоинствам данной системы можно отнести малый объем образца (до 4 мл), легкое заполнение без пузырьков, быстрое термостатирование, хорошая воспроизводимость и повторяемость, легкая очистка, система подходит для образцов с широким диапазоном консистенций.

В качестве образцов были выбраны: Vaselinum Album (белый, мягкий) и Vaselinum Flavum (желтый мягкий).

Испытания проводились в соответствии с European Pharmacopoeia 2.9.9 – это официальный метод, в частности для вазелина.

Этапы проведения испытания:

Подготовка образца: заполнить три контейнера образцом и термостатировать 24 ч при 25 °С.

Подготовка к эксперименту:

Установить прибор на горизонтальную поверхность без вибраций. Подготовить чистые, сухие конус и плунжер. Установить контейнер с образцом на центрующий диск.

Установки:

- Время пенетрации: 5 с.
- Температура 25 °С.
- Общий вес измерительной системы: 23,8 г.

Измерение:

В меню прибора выбирают программу GRASE (смазки). Устанавливают плунжер с измерительным телом в прибор. Запускают программу, после этого плунжер на несколько секунд зафиксируется в стартовом положении и начнет опускаться вниз. Используя колесо управления для регулировки скорости, измерительную систему опускают до момента контакта с поверхностью образца. После нажатия на кнопку Старт прибор позволит плунжеру свободно опускаться в образец в течении 5 с. По истечении времени пенетрации плунжер поднимется на 20 мм на 2 с, после чего вернется в исходное положение. На дисплее отображается результат.

По окончании эксперимента конус очищается от образца с помощью этанола.

В результате эксперимента были получены по три результата для каждого образца, данные имели хорошую сходимость, и на их основе были получены средние значения:

Образец	Тест 1 результат в 0,1 мм	Тест 2 результат в 0,1 мм	Тест 3 результат в 0,1 мм	Среднее в 0,1 мм
Vaselinum Album	97	97	99	98
Vaselinum Album	95	97	94	95
Vaselinum Flavum	94	97	95	95
Vaselinum Flavum	97	99	97	98

В случае, если три результата отличаются более чем на 3% от среднего значения, число испытаний может быть увеличено до 6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пенетрометр PNR12 отвечает всем требованиям фармацевтической промышленности в области исследования консистенции образцов и позволяет легко получить данные пенетрации образцов в широком диапазоне консистенций.

АНАЛИТИКА
ЭКСПО

15-я Юбилейная международная выставка
лабораторного оборудования
и химических реактивов

11-13 апреля 2017 года
Москва, КВЦ «Сокольники»








Организатор

ITE

+7 (499) 750-08-28
analitikaexpo@ite-expo.ru

Золотой спонсор

Фармконтракт®
группа компаний

Получите
электронный билет
analitikaexpo.com

BINDER
Best conditions for your success

НАДЛЕЖАЩАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ПРАКТИКА: ЧТО ЗА ЭТИМ СКРЫВАЕТСЯ?

АВТОР

И. Каннгиссер,

руководитель отдела по выпуску продукции для моделирования условий окружающей среды
BINDER GmbH

АННОТАЦИЯ

Компания BINDER является крупнейшим в мире специалистом по выпуску камер для моделирования условий окружающей среды, предназначенных для научной и промышленной сфер. Ассортимент продукции включает в себя оборудование для повседневных процедур, высокоспециализированных работ в сфере исследований и разработок, производства и контроля качества. Сотрудники компании регулярно разрабатывают специализированные курсы, которые читают в Центре повышения квалификации в сфере техники и окружающей среды в Технологическом институте Карлсруэ (KIT). В настоящей статье представлены выдержки из курса по введению в «Надлежащую лабораторную практику» QL334-18. [С полной версией курса можно ознакомиться на https://www.binder-world.com/ru/]



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ВВЕДЕНИЕ

Надлежащая лабораторная практика, кратко именуемая стандартом GLP (Good Laboratory Practice), – это система контроля качества, включающая в себя все организационные структуры, а также совокупность анализов и исследований лекарственных препаратов. Особенно важным этапом надлежащей лабораторной практики является надежная обработка первичных данных исследования, так как любые манипуляции с данными содействуют процессу выдачи допуска или ускоряют его. К подобным манипуляциям прибегают для того, чтобы затраченное рабочее время и понесенные расходы на «неклинические» исследования не оказались напрасными. Поэтому надлежащая лабораторная практика регламентирует не только требования, предъявляемые к персоналу, помещениям и специальному оборудованию, но и сферы ответственности на время исследований и после них. Основополагающим является принцип контроля несколькими специалистами. Поэтому под разрешительной документацией должно стоять несколько подписей. Лишь при наличии допуска проводится научная оценка, для которой требуется подача полного комплекта документов. Если комплект документов неполный, допуск выдается с задержкой или не выдается вовсе, ведь отсутствие документов, подтверждающих проведение анализов или исследований, расценивается как непроведение таковых. Поэтому для получения допуска крайне важно подавать весь комплект документации.

Надлежащая лабораторная практика была внедрена в 1978 году, но еще за несколько лет до этого Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) благодаря данному стандарту смогло выявить существенные нарушения при проведении химико-токсикологических исследований. Оказалось, что в некоторых случаях использовались любые средства для получения разрешения на использование лекарства на конкретном рынке, чтобы длительный период исследований и связанные с этим расходы не были напрасными. Самым известным примером нарушений в ходе химико-токсикологических исследований является, пожалуй, скандал с Контерганом, масштабы которого не поддаются точному определению и по сей день. Поэтому сложно также оценить, каким образом неправильная нагрузка скажется на других суставах и элементах опорно-двигательного аппарата у пострадавших. Это потребовало создание системы контроля качества, регламентирующей вопросы организации и управления, а также типовые условия неклинических исследований безопасности. Под неклиническими исследованиями подразумеваются любые лабораторные исследования, проводимые без участия человека. Кроме того, надлежащая лабораторная практика распространяется лишь на определенные вещества, так называемые «регулируемые» вещества. К таковым относятся лекарственные препараты, пестициды и химикаты. В сфере разработки лекарственных препаратов в первую очередь требуется проведение экотоксикологической оценки, химико-токсикологических исследований и фармацевтических исследований безопасности в строгом соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики. Таким образом, надлежащая лабораторная практика должна применяться во всех случаях подготовки документации для получения допуска. Надлежащая лабораторная практика была внедрена для обеспечения надежности данных, а также для их признания во всем мире. Основная задача – обеспечить возможность прослеживания и воспроизведения хода исследования, а также распределение сфер ответственности и хранение документации. Научная оценка проводится только после получения допуска. В соответствии с этим надлежащая лабораторная практика регламентирует требования, предъявляемые к персоналу и помещениям, а также прочие организационные требования, касающиеся, например, оснащения исследовательского центра. Данная система контроля качества охватывает также аспекты планирования и проведения исследований по правилам надлежащей лабораторной практики.

СТРУКТУРА ПЕРСОНАЛА

Для организации работ по правилам надлежащей лабораторной практики требуется определенная структура персонала с целью обеспечения и соблюдения установленных требований. Структура персонала не зависит от иерархии в компании или институте. Ниже представлена структура исследовательского центра, которая отвечает требованиям надлежащей лабораторной практики.



Администрация исследовательского центра несет (полную) ответственность за организацию и работу исследовательского центра, а также за его бюджет. Наряду с этим администрация отвечает за соблюдение принципов надлежащей лабораторной практики в ис-

следовательском центре. Руководитель исследования управляет проведением соответствующего исследования по правилам надлежащей лабораторной практики и отвечает за соответствие исследования установленным принципам. Это подразумевает в первую очередь проведение самого исследования и составление отчета. Выполняющий исследования персонал также отвечает за качество и надежность данных. При этом особое внимание должно быть уделено точной регистрации первичных данных исследования сразу после их получения.

Для обеспечения определенной объективности персонал службы контроля качества и ответственные за архив не должны принимать участие в исследованиях по правилам надлежащей лабораторной практики. Их обязанности могут быть переданы также сторонним предприятиям. Данное требование является непростой задачей с точки зрения распределения персонала, особенно в небольших институтах. Кроме того, должен быть определен порядок замещения должностей, который обуславливает привлечение дополнительного персонала. Решением для небольших учреждений может стать возложение нескольких обязанностей на одного человека. Благодаря этому затраты на оплату труда 2 сотрудников идут как за одного, если ответственность за архив и контроль качества передаются стороннему предприятию. Речь при этом идет о руководителе исследовательского центра и руководителе исследования.

В каких же случаях возможно совмещение обязанностей? Ответ на этот вопрос представлен в таблице 1.

Кроме того, требуется учет персональных данных, например опыта работы, должностных инструкций и регулярного обучения, подтверждаемого сертификатами. Такая документация подлежит регулярному обновлению.

ПОМЕЩЕНИЯ И ОБОРУДОВАНИЕ

Согласно надлежащей лабораторной практике необходимо выделить и отметить специальные зоны. Это требуется для хранения предметов снабжения для лабораторных животных и содержания самих животных, а также распространяется на сами лабораторные помещения. Определенные требования предъявляются также к используемому оборудованию, особенно к компьютеризированным системам. Путем регулярной проверки, очистки, техобслуживания и калибровки необходимо обеспечить надлежащую работоспособность оборудования. Если в рамках надлежащей лабораторной практики задействовано дополнительное оборудование, требуется ведение регистрационных журналов, по которым можно отследить использование оборудования и проверки его работоспособности. Кроме того, в наличии должно быть соответствующее руководство по эксплуатации, а также документация о проведении техобслуживания и ремонта. Используемые компьютеризированные системы должны быть разработаны и валидированы согласно принципам надлежащей лабораторной практики. Эти же требования распространяются на их эксплуатацию и техобслуживание. При этом должна быть предусмотрена защита от постороннего доступа, будь то физическая или логическая (в виде пароля). При валидации требуется соблюдение еще одного международного стандарта, руководства GAMP 5 (надлежащая практика автоматизированного производства). Исследовательские центры могут существенно сократить свои затраты на компьютеризированные системы, если приобретут оборудование, предназначенное для надлежащей лабораторной практики. Компания BINDER GmbH предлагает, например специальное программное обеспечение к камерам для моделирования условий окружающей среды, которое отвечает требованиям надлежащей лабораторной практики, благодаря чему этим же требованиям отвечают и

Таблица 1.

Случаи, при которых допускается совмещение обязаностей

	Администрация исследовательского центра	**Руководитель исследования / персонал, выполняющий исследования**	**Ответственный за архив**	**Контроль качества**
Администрация исследовательского центра		Невозможно	В исключительных случаях	Невозможно
Руководитель исследования / персонал, выполняющий исследования	Невозможно		Невозможно	Невозможно
Ответственный за архив	В исключительных случаях	Невозможно		Да, ограниченно
Контроль качества	Невозможно	Невозможно	Да, ограниченно	

сами камеры. Это снимает с исследовательского центра часть задач, и камеру для моделирования условий окружающей среды можно использовать в рамках надлежащей лабораторной практики без принятия дополнительных мер. Кроме того, особые требования предъявляются к архиву, что проявляется, например в строгой защите данных от постороннего доступа, которая дает право доступа только ответственному за архив и его заместителю. При необходимости в архив может попасть любой другой человек, но только в сопровождении соответствующего сотрудника. Это строгое правило призвано исключить любые манипуляции с документацией. Срок хранения документов составляет на сегодняшний день не менее 15 лет, поэтому размер архива должен определяться количеством исследований, проводимых по правилам надлежащей лабораторной практики.

ХОД ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ПРАВИЛАМ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ

В качестве подготовки к исследованию по правилам надлежащей лабораторной практики должен быть назначен руководитель исследования, который затем составляет план исследования. План исследования должен быть предоставлен до начала проведения экспериментально-исследовательских работ и одобрен руководителем исследовательского центра, службой контроля качества и заказчиком. Только после этого разрешено начинать исследование.



План исследования содержит хронологическое описание порядка проведения исследования, а также методов и частоты проведения исследования. После утверждения плана исследования эти сведения являются обязательными и подлежат изменению лишь в крайних случаях. Любое изменение оформляется в виде дополнения к плану исследования. При этом различают и поправки к плану исследования, которые требуются при наличии дополнений, изменений, обновлений или корректировок сведений, и отклонения от плана исследования, которые требуются в непредвиденных случаях, при наличии неисправностей или человеческого фактора.

Исследование в рамках надлежащей лабораторной практики проводится на основании плана исследования и документируется в установленном порядке. Документирование должно быть выполнено таким образом, чтобы документацию можно было всегда точно и целиком соотнести с соответствующим исследованием. Кроме того, все данные должны иметь отметку с инициалами проверяющего и датой и дальнейшему изменению не подлежат. Таким образом обеспечивается отслеживаемость данных в ходе всего исследования и после его окончания. Наряду с этим возможны проверки со стороны службы контроля качества, которая следит за соблюдением принципов надлежащей лабораторной практики. Любое исследование по правилам надлежащей лабораторной практики завершается составлением заключительного отчета. Краткий отчет требуется также в случае прекращения исследования. Такой отчет составляется руководителем исследования и затем одобряется службой контроля качества, которая дополняет его пояснением и результатами своей проверки.



Камера для моделирования условий окружающей среды BINDER MKF 115



РегЛек – ЕАЭС
2017

25 апреля 2017 г.,
Москва
гостиница «Холидей Инн»

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

«ЭКСПЕРТИЗА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ЕАЭС»
РЕГЛЕК – ЕАЭС 2017

В ПРОГРАММЕ КОНФЕРЕНЦИИ

- Формирование нормативно-правовой базы, регламентирующей обращение лекарственных средств в ЕАЭС
- Процедуры регистрации и экспертизы
- Требования к показателям качества различных групп лекарственных средств
- Требования к проведению доклинических и клинических исследований лекарственных средств
- Формирование досье на лекарственные средства для регистрации и внесения изменений
- Проведение этической экспертизы клинических исследований
- Фармакопея ЕАЭС

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

ЛИНИИ СТЕРИЛЬНОГО РОЗЛИВА ОТ **DAEYONG PHARMATECH**



Комбнированные линии розлива | *Линия розлива во флаконы* | *Линия розлива в ампулы*

Качественные комплексные решения Daeyong Pharmatech позволяют решать задачи асептического наполнения с высокой производительностью. Многолетний опыт работы, современные технологии дозирования на основании сервоприводов, системы инспекции и соответствие всем современным требованиям, использование только высококачественных комплектующих – все это в сумме с приемлемой стоимостью делает предложение компании Daeyong Pharmatech привлекательнее и интереснее в сравнении с европейскими аналогами!

Тип продукта	Мойка		Сушка и стерилизация	Наполнение и укупорка			Закрутка или закатка	
Растворы для инъекций	Роторная ультразвуковая мойка для флаконов и ампул	DWM-4000U	Туннель для стерилизации и сушки с ламинарным потоком DLT-4000 DLT-3000 DLT-2000 DLT-1000	Машина наполнения и укупорки резиновыми пробками	Наполнение и запайка ампул	DAF-3000	Закрутка/ Закатка	DPC-1000 DPC-2000
					Наполнение/ Укупорка пробками	DLF-3000		
						DLF-2000		
						DLF-1000		
		DWM-3000U		Машина стерильной рассыпки порошка и укупорки	Вакуумные дозаторы	DPF-3000		
		DWM-2000U				DPF-1500		
	Роторная моечная машина для флаконов	DWT-2000		Машина стерильной рассыпки порошка и укупорки (для малых доз)	Вакуумные дозаторы	DDF-1000	Закатка	DAC-3000
					Шнековые дозаторы	DPF-1000A		DAC-2000
						DPF-500A		
		DWT-1000		Машины наполнения порошком или жидкостями		DLP-1000		DAC-1000
				Вакуумная укупорка		DVS-2000		
Глазные капли				Лини фасовки глазных капель				DEF-2000
Сиропы	Машина мойки	DWT-500L DWT-500L		Автоматическая машина наполнения и укупоривания пробкой/капельницей		DLF-500	Закрутка	DSC-500

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



ФАРМКОНТРАКТ МЕДИА

РЕКЛАМНО-МАРКЕТИНГОВАЯ КОМПАНИЯ

ЭФФЕКТИВНОЕ ПРОДВИЖЕНИЕ И ВЫВОД ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА РЫНОК РОССИИ И СНГ

МЕРОПРИЯТИЯ | **ИЗДАТЕЛЬСТВО** | **ДИЗАЙН** | **ИССЛЕДОВАНИЯ** | **PR** | **DIGITAL**



Участие в **200** крупнейших отраслевых мероприятиях в год



Издание отраслевых книг **«под ключ»**

Общий тираж более **10 млн.** экземпляров

sponsor consulting – решение, выходящие за рамки традиционного спонсорского пакета!



Повышение квалификации в рамках образовательной лицензии №037755 от 08.08.2016





Проведение порядка 50 авторских семинаров и конференций, вебинаров от гуру и Богов вашей отрасли (привлечение международных экспертов)



Технические тексты, ориентированные на вашу ЦА и привлекающие покупателей



Лучшие журналы фармацевтической отрасли на русском и английском языках

Профессиональная площадка для представления производственных мощностей российских контрактныхпроизводств

Дизайн. Ребрендинг. Выделение ваших продуктов на конкурентном рынке

SEO продвижение. Контекстная реклама. SMM.



+7 (499) 258-11-06 INFO@PHCT-MEDIA.RU WWW.HHCT-MEDIA.RU



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:
115054, Москва, ул. Дубининская, д. 57, стр. 2, оф. 2.306.
Также Вы можете оформить подписку на нашем сайте в разделе «Подписка»: **www.pharmjournal.ru**

Благодарим Вас за неоценимый вклад в развитие Журнала!