WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN2305-2066

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

pharmtech & ingredients

АНАЛИТИКА ЭКСПО

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

GXP



МАШИНА ЗАКРУТКИ/УКУПОРКИ



IMACO **Hermes** серии **M**

Доступные решения по фасовке жидких и вязких продуктов



IMACO GROUP

В НОМЕРЕ:

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИОННАЯ СИСТЕМА КАК ИНСТРУМЕНТ РАЗРАБОТКИ ДИЗАЙНА И ТЕХНОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ С АМИДНЫМ СОРБЕНТОМ ДЛЯ АНАЛИЗА КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ

АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ТЕНДЕНЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИНСПЕКТИРОВАНИЯ ЗАРУБЕЖНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ЗА 2016 ГОД

АССОРТИМЕНТ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРАНСМУКОЗАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

СПОСОБЫ СТАБИЛИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПРИ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ РЕГИСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

№ 2 (19) МАЙ 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.

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.

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

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

ISSN 2305-2066

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

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

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

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

Научно-производственный рецензируемый журнал
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Содержание

Contents

От редакции	8	**Introduction**
Мероприятия	10	**Events**
Исследование	52	**Research**
Раздел «Фармацевтическая технология и нанотехнологии»		**«Pharmaceutical Technology and Nanotechnology» part**
Секция «Биофармация»		***«Biopharmacy» section***
Демина Н.Б.	56	*Demina N.B.*
БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИОННАЯ СИСТЕМА КАК ИНСТРУМЕНТ РАЗРАБОТКИ ДИЗАЙНА И ТЕХНОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ		BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATIOM SYSTEM AS A TOOL FOR THE DEVELOPMENT OF DRUG FORMULATIONS AND THEIR DESIGNS
Беляев А.П., Рубец В.П., Антипов В.В.	62	*Belyaev A.P., Rubets V.P., Antipov V.V..*
КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПАРАЦЕТАМОЛА		CALORIMETRIC OBTAINING OF PHARMACEUTICAL FORM OF PARACETOMOL
Секция «Современные технологии создания лекарственных форм»		***«Modern Technology of Creating Dosage Forms» section***
Кузнецова Е.Г., Рыжикова В.А., Саломатина Л.А., Севастьянов В.И.	66	*Kuznetsova E.G., Ryzhikova V.A., Salomatina L.A., Sevastianov V.I.*
ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МИКРОЭМУЛЬСИОННОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ИНСУЛИНА		STUDY OF CHARACTERISTIC PARAMETERS OF THE MICROEMULSION COMPOSITION FOR TRANSDERMAL INSULIN DELIVERY
Кедик С.А., Суслов В.В., Седишев И.П., Нгуен Т.Т.Т., Шняк Е.А.	74	*Kedik S.A., Suslov V.V., Sedishev I.P., Nguen T.T.T., Shnyak E.A.*
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ		DOSAGE FORMS OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY PHARMACEUTICAL SUBSTANCE FOR CONTROLLED RELEASE
Панкрушева Т.А., Маравина И.Н., Медведева О.А., Чекмарева М.С.	84	*Pankrusheva T.A., Maravina I.N., Medvedeva O.A., Chekmareva M.S.*
ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ ТАБЛЕТОК ДЛЯ РАССАСЫВАНИЯ С АЗИТРОМИЦИНОМ		STUDIES OF THE DEVELOPMENT OF ORO-DISPERSIBLE TABLETS WITH AZITHROMYCIN
Соловьёва Н.Л., Сокуренко М.С.	90	*Solovieva N.L., Sokurenko M.S.*
ЖЕВАТЕЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ РЕЗИНКА КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ (ОБЗОР)		MEDICINAL CHEWING GUM AS A PROMISING DRUG DELIVERY SYSTEM (REVIEW)
Шестаков Н.В., Лосенкова С.О., Закалюкина Е.В., Степанова Э.Ф.	96	*Shestakov N.V., Losenkova S.O., Zakalyukin E.V., Stepanova E.F.*
АССОРТИМЕНТ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРАНСМУКОЗАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ (АССОРТИМЕНТ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПЛЕНОК)		RANGE AND CHARACTERISTICS TRANSMUCOSAL DOSAGE FORMS
Беляцкая А.В., Краснюк И.И. (мл.), Краснюк И.И., Мачикина Т.Е., Коростелева Ю.А., Степанова О.И., Кашликова И.М., Сковпень Ю.В., Воробьёв А.Н.	102	*Belyatskaya A.V., Krasnyuk I.I. (jr.), Krasnyuk I.I., Machikina T.E., Korosteleva Yu.A., Stepanova O.I., Kashlikova I.M., Skovpen Y.V., Vorob'yov A.N.*
КЕТОПРОФЕН: ПРИМЕНЕНИЕ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ		KETOPROFEN: APPLICATION AND DOSAGE FORMS

Секция «Производство фармацевтических субстанций»

Бойко А.А., Морданов С.В., Хонина Т.Г., Чупахин О.Н.

ОПТИМИЗАЦИЯ ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА СУБСТАНЦИЙ КРЕМНИЙСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИОЛОВ

«Pharmaceutical Substances Production» section

108 *Boyko A.A., Mordanov S.V., Khonina T.G., Chupahin O.N.*

OPTIMIZATION OF EXPERIMENTAL INDUSTRIAL TECHNOLOGY OF SILICON-CONTAINING DERIVATIVES OF POLYOL SUBSTANCES PRODUCTION

Секция «Современные ингредиенты лекарственных форм»

Верниковский В.В., Третьякова Е.В.

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА В ПЕРОРАЛЬНЫХ СУСПЕНЗИЯХ

«Modern Ingredients of Dosage Forms» section

116 *Vernikovsky V.V., Tretyakova E.V.*

EXCIPIENTS IN ORAL SUSPENSIONS

Секция «Технологический контроль лекарственных форм»

Анурова М.Н., Бахрушина Е.О., Барнолицкий Г.Г., Кречетов С.П.

ОБОСНОВАНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ ОПТИМУМОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ГИДРОФИЛЬНОЙ ОСНОВЕ. СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ГЕЛИ

«Technological control of Dosage Forms» section

124 *Anurova M.N., Bakhrushina E.O., Barnolitskiy G.G., Krechetov S.P.*

THE DEFINITON OF THE RHEOLOGICAL OPTIMUM IN THE DEVELOPMENT OF SEMISOLID FORMS. DENTAL GELS

Секция «Иммунобиологические препараты»

Бибиков Д.Н., Волох О.А., Комиссаров А.В., Самохвалова Ю.И., Авдеева Н.Г., Никифоров А.К.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ БИОМАССЫ *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ С ЦЕЛЬЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ

«Immunobiological drugs» section

130 *Bibikov D.N., Volokh O.A., Komissarov A.V., Samokhvalova Yu.I., Avdeeva N.G., Nikiforov A.K.*

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE METHODS FOR *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 NIIEG BIOMASS CONCENTRATION TO BE USED IN MANUFACTURING OF LIVE TULAREMIA VACCINE

Секция «Нанотехнологии»

Новикова А.А., Кезимана П., Станишевский Я.М.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР)

«Nanotechnology» section

134 *Novikova A.A., Kezimana P., Stanishevskiy Ya.M.*

METHODS OF OBTAINING LYPOSOMES, USED AS DRUG DELIVERY SYSTEMS (REVIEW)

Раздел «Аналитические методики и методы контроля»

«Analytical and Quality Control Methods» part

Секция «Контроль качества химико-фармацевтических препаратов»

Барсукова Ю.Н., Мельникова О.А., Мельников М.Ю.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖЕЛЕЗА В ГЕМОСТАТИЧЕСКОМ СРЕДСТВЕ

«Quality Control of Chemical Drug Products» section

140 *Barsukova Yu.N., Melnikova O.A., Melnikov M. Yu.*

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS OF PHOTOMETRIC DETERMINATION OF IRON IN HEMOSTATIC TOOL

Баклыков А.В., Тумашов А.А., Котовская С.К., Уломский Е.Н., Русинов Г.Л., Русинов В.Л., Чупахин О.Н., Чарушин В.Н.

МЕТОДИКА СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОТРИАЗОЛА И ТРИАЗОЛОПИРИМИДИНОНА – СУБСТРАТА И ПОЛУПРОДУКТА СИНТЕЗА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «ТРИАЗИД» МЕТОДОМ ВЭЖХ

146 *Baklykov A.V., Tumashov A.A., Kotovskaya S.K., Ulomskiy E.N., Rusinov G.L., Rusinov V.L., Chupahin O.N., Charushin V.N.*

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF AMINOTRIAZOLE AND TRIAZOLOPYRIMIDINONE – SUBSTRATE AND INTERMEDIATE IN THE SYNTHESIS OF «TRIAZIDE» BY HPLC

Научно-производственный рецензируемый журнал
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Осипов А.С., Попова О.А., Рослякова Н.В., Кожемякина Л.Л. **152** *Osipov A.S., Popova O.A., Raslyakova N.V., Koshimyakina L.L.*

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ С АМИДНЫМ СОРБЕНТОМ ДЛЯ АНАЛИЗА КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ

APPLICATION OF CHROMATOGRAPHIC COLUMNS WITH AMIDE SORBENT TO THE ANALYSIS OF PLATINUM COORDINATION COMPOUNDS

Марьин А.А., Танцерева И.Г., Чистохин Ю.Г. **156** *Maryin A.A., Tansereva I.G., Chistohin Y.G.*

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ТАБЛЕТИРОВАННЫХ ФОРМ АМИНОКИСЛОТ В РЕЖИМЕ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ ДИФФУЗНОГО ОТРАЖЕНИЯ

STANDARDIZATION OF THE AMINO ACIDS TABLETS BY DIFFUSE REFLECTION IR SPECTROSCOPY

Гроховский В.И., Бендрышев А.А., Швец С.В., Орлов Д.А., Ваганова О.А. **160** *Grokhovskiy V.I., Bendryshev A.A., Shvets S.V., Orlov D.A., Vaganova O.A.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСОРБАТОВ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

DETERMINATION OF POLYSORBATE IN BIOTECH DRUGS

Секция «Поиск и разработка новых лекарственных средств» ***«New Drug Search and Development» section***

Колотова Н.В., Старкова А.В. **166** *Kolotova N.V., Starkova A.V.*

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АРОИЛГИДРАЗИДОВ 1,4-ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

BIOLOGICAL ACTIVITY OF AROYLHYDRAZIDES 1,4-DICARBOXYLIC ACIDS

Потапова А.Э., Теслев А.А. **170** *Potapova A.E., Teslev A.A.*

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРУКТУРЫ ПРОИЗВОДНЫХ 6-ГИДРОКСИПИРИМИДИН-4(*3H*)-ОНОВ НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В СИСТЕМЕ 1-ОКТАНОЛ – ВОДА

STUDY OF THE EFFECT OF STRUCTURE ON OCTANOL-WATER DISTRIBUTION OF 6-HYDROXYPYRIMIDINE-4-(*3H*)-ONES DERIVATIVES

Соснов А.В., Семченко Ф.М., Власов М.И., Тохмахчи В.Н., Соснова А.А. **176** *Sosnov A.V., Semchenko F.M., Vlasov M.I., Tohmahchi V.N., Sosnova A.A.*

РАЗВИТИЕ КОМПЛЕКСНОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ СИЛЬНОЙ И СРЕДНЕЙ БОЛИ. ЧАСТЬ I. МУЛЬТИТАРГЕТНОЕ КОМБИНИРОВАНИЕ ОПИОИДОВ И НЕНАРКОТИЧЕСКИХ АНАЛЬГЕТИКОВ ЦЕНТРАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

DEVELOPMENT OF COMPLEX PHARMACOTHERAPY OF SEVERE AND MODERATE PAIN. PART I. MULTITARGETED COMBINATION OF OPIOIDS AND NON-OPIOID ANALGESICS WITH CENTRAL EFFECTS

Кошевенко А.С., Юсковец В.Н., Яковлев И.П., Ананьева Е.П., Семакова Т.Л. **188** *Koshevenko A.S., Yuskovets V.N., Yakovlev I.P., Ananyeva E.P., Semakova T.L.*

ХЛОРИД 2-[(1Z)-1-(3,5-ДИФЕНИЛ-1,3,4-ТИАДИАЗОЛ-2(3H)-ИЛИДЕН)МЕТИЛ]-3,5-ДИФЕНИЛ-1,3,4-ТИАДИАЗОЛ-3-ИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ СОЕДИНЕНИЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

CHLORIDE-2-[(1Z)-1-(3,5-DIPHENYL-1,3,4-THYADIAZOLE-2(3H)-ILIDEN)METHYL]-3,5-DIPHENYL-1,3,4-THYADIAZOLE-3 AS A PROMISING COMPOUND FOR THE DEVELOPMENT OF NEW DRUGS

Абышев А.З., Журкович И.К., Ивкин Д.Ю., Нгуен К.Б. **192** *Abyshev A.Z., Zhurkovich I.K., Ivkin D.Yu., Nguyen C.B.*

СИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ВАРФАРИНА

SYNTHESIS, PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF SOME DERIVATIVES OF WARFARIN

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

Жилкина В.Ю., Ефимова И.А., Марахова А.И., Донцова О.Н. **200** *Zhilkina V.Yu., Yefimova I.A., Marakhova A.I, Dontsova O.N.*

ИЗУЧЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ВИТАМИННОМ СБОРЕ КРАПИВЫ И РЯБИНЫ (ОБЗОР)

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF BIOLOGICALY ACTIVE COMPONENTS IN MIXTURE OF MULTIVITAMIN RAW MATERIAL OF FOLIA URTICAE AND FRUCTUS SORBI (REVIEW)

Савицкий Н.И., Легостева А.Б. **208**

ИССЛЕДОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ПРОФИЛЯ *ZINGIBER OFFICINALE* (ZINGIBERACEAE) МЕТОДАМИ ТОНКСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Savitskiy N.I., Legosteva A.B

INVESTIGATION OF AMINO ACID PROFILE *ZINGIBER OFFICINALE* (ZINGIBERACEAE) BY THE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND SPECTROPHOTOMETRIC METHODS

Завадский С.П., Краснюк И.И. (мл.), Харитонов Ю.Я., Тарасов В.В., Кузьменко А.Н., Козин Д.А., Саидов Н.Б., Ольшанская О.В., Евграфов А.А. **214**

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ

Zavadskiy S.P., Krasnyuk I.I. (Jr.), Kharitonov Yu. Ya., Tarasov V.V., Kuzmenko A.N., Kozin D.A., Saidov N.B., Olshanskaya O.V., Evgrafov A.A.

THE PHYSICAL AND CHEMICAL METHODS FOR TESTING ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF HERBAL RAW MATERIAL AND ITS CONVERSION PRODUCT

Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Курманов Р.К., Мартынчик И.А. **222**

ГАСТРОПРОТЕКТИВНЫЕ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ВОЛОДУШКИ ЗОЛОТИСТОЙ ТРАВЫ ЭКСТРАКТА СУХОГО

Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Kurmanov R.K., Martynchik I.A.

GASTOPROTECTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF *BUBLEURUM AUREUM* L. DRY EXTRACT

Абышев А.З., Нгуен К.Б. **226**

ПРИРОДНЫЕ КОВАЛЕНТНО КОМБИНИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 2Н-1-БЕНЗОПИРАН-2-ОНА

Abyshev A.Z., Nguyen. C.B.

NATURAL COVALENTLY COMBINED DERIVATIVES OF 2H-1-BENZOPYRAN-2-ONE

Раздел «Эффективность и безопасность лекарственных средств»

«Drug Products Efficacy and Safety» part

Секция «Доклинические исследования»

«Preclinical Trials» section

Рудько О.И., Климов Е.А., Соболев В.В., Соснов А.В., Руфанов К.А., Семченко Ф.М. **236**

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА ДЕКСМЕДЕТОМИДИН НА БОЛЕВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Rudko O.I., Klimov E.A., Sobolev V.V., Sosnov A.V., Rufanov K.A., Semchenko F.M.

THE STUDY OF EFFECTS OF THE INTRANASAL DEXMEDETOMIDINE ADMINISTRATION ON PAIN SENSITIVITY

Рудакова И.П., Гашкова О.В. **242**

ОЦЕНКА АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МОРФОЛИНОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Rudakova I.P., Gashkova O.V..

ASSESSMENT OF ANTIARRHYTHMIC ACTIVITY AND SAFETY OF NEW DERIVATIVES OF MORPHOLINOACETIC ACID

Секция «Биоаналитические методики»

«Bioanalytical Methods» section

Яичков И.И., Хохлов А.Л., Джурко Ю.А., Шитов Л.Н., Трубников А.А. **246**

СПОСОБЫ СТАБИЛИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПРИ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (ОБЗОР)

Yaichkov I.I., Khokhlov A.L., Dzhurko Y.A., Shitov L.N., Trubnikov A.A.

METHODS OF STABILIZATION OF DRUG SUBSTANCES AND THEIR METABOLITES IN BIOLOGICAL FLUIDS DURING BIOANALYTICAL STUDY (REVIEW)

Научно-производственный рецензируемый журнал
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Раздел «Регуляторные вопросы»

Селезнева А.И., Глембоцкий С.В., Поляков С.В., Макарова М.Н., Макаров В.Г., Чурин А.А. **252**

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР НОРМАТИВНОЙ БАЗЫ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ НАДЛЕЖАЩЕГО КАЧЕСТВА ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В РОССИИ

Семин А.А., Наркевич И.А. **260**

АНАЛИЗ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЦЕНТРОВ ПО РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, СОЗДАВАЕМЫХ НА БАЗЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

Орлов В.А. **266**

АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ТЕНДЕНЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИНСПЕКТИРОВАНИЯ ЗАРУБЕЖНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ЗА 2016 ГОД

Мазова Н.В., Марченко А.Л., Марченко Н.В. **272**

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА НА ПРИМЕРЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГРУППЫ ИНГИБИТОРОВ ПРОТОННОЙ ПОМПЫ

Осмоловская И.А., Зарочинская О.В., Емельянов М.О., Сомов Д.В. **278**

ПРОБЛЕМЫ СООТВЕТСТВИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ ЗАПИСЕЙ ТРЕБОВАНИЯМ НАДЛЕЖАЩЕЙ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ПРАКТИКИ. СООБЩЕНИЕ I. АКТУАЛЬНОСТЬ СОХРАНЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ ЗАПИСЕЙ

Раздел «История фармации»

Цындымеев А.Г., Ягудина Р.И., Абдрашитова Г.Т., Крупнов П.А. **284**

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ РЕГИСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Денисова Е.В. **288**

ПРОИЗВОДСТВО АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ: КРИЗИС НА РУБЕЖЕ XX и XXI ВЕКОВ

Зеликсон Ю.И. **296**

ФАРМАКОПЕИ XIX – НАЧАЛА XX ВЕКОВ. РЕГЛАМЕНТАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

«Regulatory Issues» part

Selezneva A.I., Glembotsky S.V., Polyakov S.V., Makarova M.N., Makarov V.G., Churin A.A. **252**

ANALYTICAL REVIEW OF THE NORMATIVE BASE TO PROVIDE THE GOOD QUALITY OF PRECLINICAL STUDIES IN RUSSIA

Semin A.A., Narkevich I.A. **260**

THE ANALYSIS OF THE ACTIVITIES OF THE CENTRS FOR THE DEVELOPMENT OF DRUGS, CREATED ON THE BASIS OF EDUCATIONAL ORGANIZATIONS

Orlov V.A. **266**

KEY TRENDS ANALYSIS OF RESULTS OBTAINED FROM INSPECTING THE FOREIGN MANUFACTURERS OF MEDICINAL PRODUCTS IN 2016

Mazova N.V., A. L. Marchenko A.L., Marchenko N.V. **272**

THE ANALYSIS OF THE PHARMACEUTICAL MARKET ON THE EXAMPLE OF MEDICINES OF GROUP OF INHIBITORS OF THE PROTON POMP

Osmolovskaya I.A., Zarochinskaya O.V., Emelianov M.O., Somov D.V. **278**

PROBLEMS OF CONFORMITY OF THE RECORDS INTEGRITY WITH THE REQUIREMENTS OF GOOD MANUFACTURING PRACTICE.
REPORT 1. ACTUALITY OF THE RECORDS INTEGRITY CONSERVATION

«History of Pharmacy» part

Tsyndymeyev A.G., Yagudina R.I., Abdrashitova G.T., Krupnov P.A. **284**

IMPROVING THE SYSTEM OF REGISTRATION OF MEDICINES IN RUSSIAN FEDERATION

Denisova E.V. **288**

THE MANUFACTURING OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS IN RUSSIAN FEDERATION: THE CRISIS AT THE TURN OF XX TO XXI CENTURIES

Zelikson Yu.I. **296**

PHARMACOPEIAS OF XIX – EARLY XX CENTURIES. REGULATION OF THE PHARMACEUTICAL MANUFACTURING

Публикации партнеров **300** **Partner Publications**



BAUSCH
Advanced Technology Group

СИСТЕМА ДЛЯ РОЗЛИВА И УКУПОРКИ
Machine Type 535

- розлив в виалы, шприцы и картриджи
- системы дозирования: роторно-поршневой насос, перистальтический насос и пневматический дозатор
- автоматическая система позиционирования “X-Y”
- ламинарный бокс из высококачественной нержавеющей стали
- система оборудована высокоточным роботом, предназначенным для работы в чистых зонах
- наполнение и укупорка производится под вакуумом, что позволяет избежать контаминации и образования пузырьков



Гибкая модульная система от BAUSCH Advanced Technology Group –
надежное и оперативное решение для розлива до 200 контейнеров в минуту

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

ОТ РЕДАКЦИИ

Накануне выхода майского номера произошло знаменательное событие для фармацевтического рынка не только России, но всех стран-членов ЕАЭС: в силу вступил пакет из 26 документов, знаменующий начало работы единого рынка обращения лекарственных средств. То есть начиная с 6 мая фармпроизводители евразийского пространства могут осуществлять по наднациональным стандартам разработку, доклинические и клинические исследования, контроль качества, регистрацию, производство и дистрибьюцию лекарственных препаратов.

«Комиссия совместно с лучшими экспертами пяти государств ЕАЭС подготовила все необходимые документы для эффективной работы единого рынка лекарственных средств с учетом мирового опыта. Они направлены на снятие административных барьеров в области производства и допуска лекарств на рынки стран Союза. Эти документы позволят обеспечить и своеобразную «санацию» фармацевтического рынка, удалив с него лекарственные препараты, эффективность и безопасность которых не полностью изучены, а производство не соответствует стандартам надлежащей производственной практики», – приводится на портале ЕЭК цитата члена Коллегии (министра) Евразийской экономической комиссии **Валерия Корешкова**.

Несмотря на установление единых стандартов, на уровне национального регулирования рынка лекарственных препаратов остается ряд вопросов, среди которых

- администрирование выдачи разрешений на проведение доклинических и клинических исследований лекарственных средств;
- ценообразование на лекарственные средства и медицинские изделия;
- розничная торговля;
- государственные закупки лекарственных средств и иные процедуры, связанные с вопросами возмещения затрат в сфере обращения лекарственных средств;
- регулирование рекламы фармацевтических препаратов.

Также ряд экспертов, в том числе из Евразийской экономической комиссии, обращает внимание производителей лекарственных средств на особенности переходного периода, призванного обеспечить плавный переход от национальных правил к единому регулированию. «До 31 декабря 2020 года изготовитель имеет право выбирать, по каким правилам (национальным или единым) он будет осуществлять регистрацию лекарственного средства. Все лекарственные препараты, которые были зарегистрированы по национальным правилам до 31 декабря 2020 года, должны пройти перерегистрацию по правилам единого рынка до 31 декабря 2025 года. При подаче досье на регистрацию лекарственного средства до 31 декабря 2018 года производитель вправе предоставлять вместо сертификата GMP ЕАЭС национальные документы, выданные государствами-членами и подтверждающие соответствие его производства требованиям национальных правил GMP», – приводятся разъяснения на портале ЕЭК. Помимо этого, разъяснения о специфике деятельности производителей лекарственных средств в рамках единого рынка постоянно давались на протяжении активного конгрессно-выставочного сезона в период февраль – май. Подробнее ознакомиться с комментариями специалистов ЕЭК и иных профильных ведомств, участвующих в разработке нормативно-правовой базы единого рынка ЕАЭС, а также отвечающих за обеспечение фармбезопасности Российской Федерации, можно на страницах нашего издания (С. 11, 15–17, 23–24, 40–44).

Пожалуй, одним из самых обсуждаемых вопросов после начала функционирования единого рынка остается процедура приведения досье в соответствие с правилами ЕАЭС. Выступая на расширенном заседании Российского фармацевтического форума, начальник отдела координации работ в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий департамента технического регулирования и аккредитации ЕЭК **Дмитрий Рождественский** дал ряд разъяснений относительно тем, по которым с 6 мая ведется бурная дискуссия. В частности, **Дмитрий Рождественский** отметил, что при децентрализованной процедуре регистрации лекарственного препарата выбор государств признания осуществляется заявителем одновременно с выбором референтного государства, а в случае взаимного признания – последовательно в любые сроки по решению заявителя. Но в последнем случае замена референтного государства при последующем подтверждении регистрации и внесении изменений в досье невозможна. Что касается процедуры взаимного признания, то в данном случае в ходе приведения лекарственного препарата в соответствие с требованиями единого рынка необходимо учитывать следующее:

1. Если лекарственный препарат зарегистрирован только в одном государстве-члене ЕАЭС, то это государство является референтным.
2. Если лекарственный препарат зарегистрирован в нескольких государствах-членах ЕАЭС, выбор референтного государства проводится среди этих стран.
3. Государство, где лекарственный препарат не зарегистрирован, не может быть выбрано в качестве референтного.

Отвечая на вопрос, как подтвердить статус в стране производства зарубежного лекарственного препарата, **Дмитрий Рождественский** пояснил, что таким документом может быть копия СРР страны-производителя или документ о регистрации в стране-производителе (держателе регистрационного удостоверения), или пояснительная записка с обоснованием отсутствия данных о регистрации.

Единый рынок лекарственных средств ЕАЭС и взаимное признание регистрационных удостоверений требуют создания единой нормативно-регуляторной базы, в том числе по такому важному виду исследований воспроизведенных лекарственных средств, как исследования биоэквивалентности. Разъяснения относительно данного вида исследований дал главный редактор журнала «Разработка и регистрация лекарст-

венных средств», эксперт по вопросам биоэквивалентности **Игорь Шохин**:

«Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза были утверждены решением Совета Евразийской экономической комиссии. Именно данный документ должен стать руководящим стандартом для фармацевтических компаний, контрактно-исследовательских организаций, исследовательских центров, биоаналитических лабораторий, а также регуляторных органов. Руководство в целом гармонизировано с основными мировыми (EMA, FDA) и отечественными (Руководство по экспертизе лекарственных средств) стандартами по исследованию биоэквивалентности. Документ содержит следующие разделы: общие положения, определения, требования к дизайну, проведению и оценке исследований биоэквивалентности, тест кинетики растворения *in vitro*, отчет об исследовании, объем исследований при внесении изменений в регистрационное досье, а также приложения, предъявляющие требования к исследованию биоэквивалентности различных лекарственных форм лекарственных препаратов, к фармакодинамическим исследованиям, к сравнительным клиническим исследованиям, к процедуре «биовейвер» на основе биофармацевтической классификационной системы, к выполнению СТКР, валидации биоаналитической методики, к содержанию отчета об исследовании биоэквивалентности и СТКР, а также условные обозначения фармакокинетических параметров. Хотелось бы отдельно отметить, что в документе впервые приведены требования и подходы к проведению процедуры «биовейвер» (процедура оценки биоэквивалентности лекарственного препарата без проведения исследования *in vivo*). В Руководстве отмечено, что принципы концепции «биовейвер» могут применяться для подтверждения биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов, расширений оригинальных лекарственных препаратов, при внесении изменений в досье, требующих установления биоэквивалентности, для установления биоэквивалентности между лекарственными препаратами, применявшимися в начальных фазах клинических исследований, а также лекарственными препаратами, выводимыми на рынок. Конкретные условия, при которых применение процедуры «биовейвер» возможно, также приведено в документе».

Стоит отметить, что в настоящее время, помимо внутренних доработок нормативно-правовой документации, призванной гармонизировать требования и стандарты государств-членов ЕАЭС для максимально оперативного перехода к единому рынку лекарственных средств, ведется работа по признанию и включению Фармакопеи ЕАЭС в перечень мировых фармакопей и фармакопейных органов ВОЗ как одного из региональных стандартов качества.

«При разработке документов, обеспечивающих функционирование в ЕАЭС общего рынка лекарственных средств, нами были изучены и применены лучшие международные практики, учтен опыт ведущих экспертов международных организаций, регуляторных органов и фармацевтической промышленности. Это позволило в сжатые сроки создать масштабную наднациональную нормативную базу», – отметил член Коллегии (министр) ЕЭК **Валерий Корешков** на заседании Совета Международной федерации фармацевтических производителей и ассоциаций, в рамках которого министр ЕЭК встретился с директором секретариата ICH **Доной Ронан**. В ходе этой встречи министр ЕЭК отметил, что применение Медицинского словаря для регуляторной деятельности (MedDRA) предусмотрено правилами надлежащей клинической практики и правилами надлежащей практики фармаконадзора ЕАЭС, в связи с чем актуальной задачей взаимодействия ЕЭК и ICH является локализация MedDRA в русскоязычной версии. С учетом дальнейшего расширения применения документов ICH в правовой базе ЕАЭС стороны начнут процедуру включения Евразийской экономической комиссии в состав наблюдателей в ICH.

Помимо правового аспекта в области регламентации работы единого фармацевтического рынка можно отметить и инициативу бизнес-сообщества по консолидации национальных отраслевых ассоциаций. 18 мая 2017 года создано крупнейшее объединение производителей лекарственных средств на территории ЕАЭС – Евразийский фармацевтический альянс. Инициатором создания отраслевого объединения выступили АІРМ России, Республик Казахстан и Беларусь, Союз производителей и импортеров лекарств Армении. Основной целью новой бизнес-ассоциации задекларирована консолидация взаимоотношений между регуляторами, производителями и дистрибьюторами государств-членов ЕАЭС. Однако членами новой структуры могут стать только фармассоциации, работающие в Армении, России, Казахстане, Киргизстане и Белоруссии.

«Сегодня мы создали самую представительную региональную индустриальную платформу, объединившую крупнейшие фармацевтические ассоциации на территории государств-членов Евразийского экономического союза, фундаментальными принципами деятельности которых являются соблюдение высоких этических норм, закрепленных в соответствующих кодексах сторон, защита прав интеллектуальной собственности, а также содействие инновационному развитию систем здравоохранения наших стран», – пояснил исполнительный директор АІРМ **Владимир Шипков**. «Новая структура наметила взять на себя роль генератора и провайдера идей между фармацевтическими компаниями, государственными органами и Евразийской экономической комиссией. И важно то, что во главе угла своей деятельности Евразийский фармацевтический альянс ставит высокие этические принципы: только следуя этим принципам, возможно стремительное развитие производства и рынка фармацевтической продукции в каждом из государств-участников Евразийского экономического союза», – такие пояснения дал исполнительный директор Союза производителей и импортеров лекарств Армении **Самвел Закарян**. Президент Ассоциации международных производителей в Республике Казахстан **Вячеслав Локшин** убежден, что создание альянса – это важное решение, а сама организация открыта для всех, кто разделяет принципы, которые пропагандирует альянс.

САММИТ PHARMABUSINESS – 2017

14–15 февраля 2017 года в Москве в рамках саммита PharmaBusiness прошли XII Международная конференция «*Фармацевтический бизнес в России: перспективный сценарий развития фармацевтического рынка на 2017 год*» и VIII Аптечный саммит «*Эффективное управление аптечной сетью*». В ходе конференции порядка 650 специалистов отрасли обсудили ключевые вызовы, с которыми рынок может столкнуться в текущем году, и постарались найти превентивные меры. Саммит прошел при поддержке AIPM, АРФП, РАФМ, РААС, СПФО и ассоциации «Фармацевтические инновации». Информационным партнером выступил научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».





В рамках аналитической панели *«Мир вокруг нас: новые установки потребителей»* представители Ipsos Healthcare рассказали об источниках информации, которым сейчас доверяют покупатели, и о факторах, влияющих на успешность проведения рекламных акций в аптеках.

Заместитель генерального директора GFK Rus **Марина Безуглова** напомнила, что понимание глобальных трендов – ключ к пониманию поведения и потребностей современных потребителей: сегодня для покупателей имеют значение ценность опыта, стремление хорошо себя чувствовать и выглядеть, технологический фактор.

Анна Ермолаева из ALPHA RESEARCH & MARKETING представила основные макроэкономические показатели 2016 года, который стал первым стабильным годом. Среди тенденций 2017 года спикер отметила продолжение консолидации федеральных и региональных аптечных сетей, сохранение объёмов финансирования здравоохранения, перевод государственных аптечных сетей на закупки. Дистанционная торговля, пилотные проекты по лекарственному страхованию и система референтных цен, – все это обеспечит в 2017 году рост фармацевтического рынка на 6%.

Эксперт Aston Group **Мария Сдвижкова** отметила увеличение бюджетов на лекарственные средства и выделила среди основных тенденций в области государственного финансирования возвращение к 3-летнему бюджетированию, рост суммарных государственных расходов, развитие одноканального финансирования, гармонизацию лекарственных перечней с ЖНВЛП, рационализацию системы закупок лекарственных средств и уменьшение доли софинансирования территориальных программ ОМС.

Статистические данные об итогах прошедшего года и аналитический прогноз на 2017 год представил руководитель DSM Group **Сергей Шуляк**. Он отметил, что в 2017 году рынок начнёт расти в долларах и евро. «Уже сегодня увеличился объем продаж больших упаковок и ожидается серьезный рост рынка за счёт товаров, которые не контролирует государство», – заметил спикер.

Итоги 2016 года специалисты отрасли продолжили подводить в рамках традиционной дискуссионной панели *«Медиумы в фарме: итоги 2016 года и ожидания 2017 года. Взгляд в будущее!»* Для «Босналек», по словам **Валентины Бучневой**, прошедший год был сложным, но успешным: полное взаимодействие всех участников цепочки (производитель – дистрибьютор – покупатель) позволило достичь наилучших результатов. Солидарным с коллегой оказался и представитель Astra Zeneca – для компании, по словам **Искры Рейч,** 2016 год был очень успешный – рост составил более 6%, начался выпуск коммерческих продуктов на заводе в Калуге. В 2017 году в планах Astra Zeneca занять лидирующие позиции в науке.

Генеральный директор Abbott в России **Елена Карташева** обратила внимание участников конференции на тот факт, что в наступившем году будет много новых постановлений, которые в корне поменяют работу всех участников рынка. Несомненным плюсом грядущих изменений станет готовность отечественных компаний вкладывать больше средств в модернизацию производств. Старший вице-президент, генеральный директор Teva Россия и Евразия **Анна Ярвиц** сделала акцент на финансовые поощрения фармпроизводителей со стороны государства. По мнению спикера данный механизм позволит увеличить импорт. Говоря о планах компании, руководитель российского подразделения отметила, что в 2017 году планируется производство субстанций и химическое производство: «Большие планы у компании Teva на завод в Ярославле, который является одним из двух (второй на Гоа), который был построен, все остальные заводы были в разное время куплены компанией». Также **Анна Ярвиц** затронула обсуждаемую на российском фармацевтическом рынке тему о локализации производства субстанций, отметив, что если производство активных фармацевтических ингредиентов ориентировано на повышение экспортного потенциала российских производителей, особенно в части высокотехнологических активных компонентов, способствует развитию промышленности и повышению конкурентоспособности продукции на внутреннем и мировом рынке, то это является прогрессивным и стимулирующим фактором для экономики. И должно сопровождаться государственными стимулами и льготами в налоговом режиме, в выделении целевых субсидий, а также другими финансовыми преференциями. «Однако если целью углубления локализации до уровня производства субстанции является сужение конкурентного поля и искусственное ограничение количества участников в канале государственных закупок, то этот процесс может стимулировать создание монополий. И одна задача не тождественна другой в части удовлетворения врачей, пациентов и всей системы здравоохранения в возможностях выбора», – подчеркнула спикер.



Опасения представителя компании Teva разделяют и руководители профессиональных объединений – ФРФП, AIPM и СПФО. Руководители данных ассоциаций отметили, что предлагаемая Минпромторгом России схема может привести к снижению конкуренции на внутреннем рынке с формированием индивидуальной системы преференций в интересах узкого круга производителей. «Мы против принятия постановления о преференциях в том виде, который сейчас обсуждается. Эта мера не должна стать наказанием для тех, кто не успел построить производство фармсубстанций, а напротив, стимулировать компании к такому шагу», – прокомментировал **Виктор Дмитриев**.

Рассуждая о прогнозах на 2017 год, **Анна Ярвиц** остановилась на теме определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов в России и влиянии этого фактора на формирование единого рынка в рамках ЕАЭС: «Во многих странах «золотым стандартом» воспроизведенных препаратов являются лекарственные средства, имеющие фармацевтическую и терапевтическую эквивалентность, в одинаковой дозировке и формах выпуска. Например, препараты, рассматриваемые как эквивалентные в России, не могут считаться таковыми в Казахстане, где понятие взаимозаменяемости на законодательном уровне не введено, закупки производятся по МНН, форме выпуска и наличию в Национальном формуляре, очень приближенном к британскому, а также к «Оранжевой книге» FDA». Спикер убеждена, что взаимозаменяемость должна быть ясно описана как терапевтическая эквивалентность в сочетании с фармацевтической: «Позиция Teva по данному вопросу однозначна: мы считаем, что дженерические препараты должны быть «близнецами» оригинальных, то есть обладать полной фармацевтической и терапевтической заменяемостью, а не быть их «двойняшками».

Генеральный директор «РМИ Партнерс» **Владимир Гурдус** среди итогов прошедшего года отметил адаптацию к новому потребительскому спросу, выход из венчурных инвестиций и подготовку к запуску нового лабораторного комплекса. В 2017 году компания планирует повышать конкурентоспособность и увеличивать экспортный потенциал.

Подводя итоги, спикеры дискуссионной панели отметили, что в целом от 2017 года ожидают преимущественно позитивных тенденций.

Программа конференции продолжилась серией интервью с представителями крупнейших фармкомпаний, которые строились вокруг главного вопроса: «Легко ли быть инвестором в России?»

Исполнительный директор AIPM **Владимир Шипков** по опыту знает, что деньгами инвесторов зачастую пренебрегают, а это ведет к риску «бегства» инвестиций в другие страны. Партнер EY **Анна Гусе-**



ва отметила такую тенденцию, как увеличение объема инвестиций со стороны производителей, что в свою очередь способствовало притоку и российских фармпроизводителей.

Еще одной не менее актуальной темой, которую подняли в рамках серии интервью, стало формирование системы льгот для получения населением качественных и необходимых лекарственных препаратов.

14 февраля участники фармацевтического рынка России обсудили, пожалуй, самый злободневный и волнующий отрасль вопрос – участие в стартовавшем 1 февраля пилотном проекте по маркировке. Открывая сессию, начальник управления организации государственного контроля качества медицинской продукции Росздравнадзора **Валентина Косенко** обратила внимание всех собравшихся, что это уже не просто и не столько пилотный проект, но приоритетный проект государства. В этой связи, по словам представителя Росздравнадзора, производителям, дистрибьюторам и аптечным сетям не стоит дожидаться конца 2017 года, чтобы посмотреть, как завершится проект, а планомерно искать способы интеграции механизмов маркировки в свою деятельность. В противном случае, основные участники фармрынка окажутся в стрессовой ситуации. Более того, в дальнейшем маркировка станет частью ФЗ-61 «Об обращении лекарственных средств». Инициатором внесения в данный нормативный правовой акт изменений в области маркировки как обязательного элемента производственного процесса готов выступить Росздравнадзор.



Директор по экономике здравоохранения ГК «Р-Фарм» **Александр Быков** представил оценку компании финансовых затрат по внедрению технологий маркировки на предприятии. Оценка **Александра Быкова** во многом совпадает с тем, что готов предложить сегодня крупнейший национальный дистрибьютор технологического и аналитического оборудования ГК «Фармконтракт». Конечно, диапазон цен варьируется в зависимости от качества и комплектации маркировочной линии. Если компании Юго-Восточной Азии готовы предлагать линии с высоким качеством и скоростью нанесения кюар-кодов до 300 упаковок в минуту и возможностью online наблюдения/контроля за процессом маркировки, то европейские производители линий для сериализации предлагают более расширенное комплексное решение по стандарту GS1, способное удовлетворить требования на всех уровнях сериализации: L1, L2, L3. В среднем для установки маркировочной линии компания должна быть готова, по словам **Александра Быкова**, потратить порядка 100–150 тыс. евро. Безусловно, на рынке существуют и более дорогие предложения, сочетающие в себе не только нанесение идентификаторов на первичную, вторичную упаковку и сборные паллеты, но и системы считывания данных и их занесение в общую базу. Такие системы комплексного контроля во многом позволят производителю готовых лекарственных средств избежать финансовых и репутационных потерь от последствий так называемого вторичного вброса фальсифицированной и контрафактной продукции, которые представители Росздравнадзора и «Р-Фарм» оценивают в 2–3 млн руб.

Продолжая тему приоритетного проекта, поднятую **Валентиной Косенко**, генеральный директор ГК «Фармконтракт» **Тимофей Петров** обратил внимание участников конференции, что установка даже одной маркировочной линии (вне зависимости от ее цены) – процесс не сиюминутный: в среднем он занимает от 6–8 месяцев с учетом временных затрат на инсталляцию оборудования и валидацию процесса. Значит, чтобы к концу действия пилотной стадии процесса маркировки компании-первопроходцы (27 фармпроизводителей, включившихся в пилотный проект) подошли не просто подготовленными, но и уже на своем примере обкатали предлагаемую систему, смогли вовремя выявить ее слабые места, требующие доработки, им необходимо инициировать модернизацию, размещение заказа на оснащение своих производственных линий маркировочным оборудованием не позднее мая 2017 года. Предложений, в частности в портфеле ГК «Фармконтракт», достаточно. И ценовой диапазон действительно очень разнится. Однако любому производителю стоит задуматься о том, сможет ли та или иная предлагаемая система Track&Trace быть



интегрирована в любую линию на уровнях L4 (SAP, TraceLink, Oracle, IBM, и т.д.), имеет ли она соответствующее ПО, валидационную поддержку, как решается вопрос отбраковки и проч. Ответить на все эти вопросы производителям лекарственных средств необходимо в ближайшее время, поскольку процесс инсталляции, даже при условии оперативного согласования ТЗ и максимально детального просчета особенностей интеграции маркировочной линии в технологический процесс производства, займет не один месяц.

Доклад **Тимофея Петрова** вызвал живой интерес со стороны регуляторов и фармпроизводителей, поскольку каждая из этих сторон заинтересована в минимизации как финансовых затрат, так и репутационных потерь, что в настоящее время обеспечить довольно не просто. Как отметила **Валентина Косенко**, проект по внедрению маркировки как обязательного элемента производства появился в связи с тем, что «производители даже не знают цифры по тому, как представлена их продукция в аптеках и даже в целых регионах». Предлагаемые же ГК «Фармконтракт» решения на базе европейских производителей систем Track&Trace позволят контролировать перемещение всего объема произведенного товара с точностью до упаковки, начиная с конвейера до реализации в аптеках и лечебных учреждениях в режиме реального времени, когда на обработку и предоставление информации потребуются считанные секунды.

В рамках сессии *«Российско-иностранный тандем: годы идут, правила меняются»* представители российских и зарубежных фармпроизводителей лекарственных средств обсудили необходимость ведения диалога с регуляторами на постоянной основе и рассмотрели различные сценарии развития событий. В роли спикеров выступили Александр Кузин («Новамедика»), **Марина Велданова** («Ипсен»), Владимир Христенко («Нанолек») и **Павел Шустров** (Pfizer). **Владимир Христенко** рассказал о партнерах и совместных продуктах, главным из которых на данный момент является Пентаксим, которому принадлежит 80% рынка. Одну из главных целей на 2017 год спикер определил как обеспечение доступа этой вакцины на рынок, чтобы все дети могли получать ее бесплатно. **Павел Шустров** поделился схемой поиска партнеров: поиск Pfizer начинает в открытых источниках, далее сотрудники наносят первичные визиты в 5–7 предприятий, из которых остается только 2–3. Именно к этому узкому кругу предположительных партнеров организовывается выезд специалистов с проверкой на 2–3 дня. И только после начинаются переговоры о подписании контракта.



Первое профессиональное собрание специалистов фармрынка на площадке XII Международной конференции «Фармацевтический бизнес в России: перспективный сценарий развития фармацевтического рынка на 2017 год» – это насыщенная двухдневная деловая программа, в ходе которой гости и спикеры обсуждают самые актуальные тренды отрасли в наступающем году. Так, во второй половине первого дня конференции прошел ряд параллельных сессий.

На сессии *«Последний рубеж. Добровольно-принудительно или патент без права на защиту»* директор института экономики здравоохранения ВШЭ **Лариса Попович** высказала свою точку зрения, согласно которой принудительное лицензирование приведёт к росту цен на препараты и призвала обратить внимание на крайне высокую степень имиджевых рисков, которые делают невозможным принятие решения о принудительном лицензировании. Солидарен с представителем ВШЭ и исполнительный директор ассоциации InPharma **Вадим Кукава**: «Мы не получим препараты дешевле и не получим препара-



ты должного качества». Директор отдела по работе с государственными органами и юридическими вопросами по региону Россия и Евразия «АстраЗенека Россия» **Ирина Иванищева** вообще не видит никаких положительных сторон в принудительном лицензировании. Старший партнер юридической фирмы «Городисский и партнеры» **Илья Горячев** посоветовал коллегам задуматься о защите патентов, т.к. за последнее время значительно улучшились суды по интеллектуальной собственности.

В ходе сессии *«Трансформация роли медицинского представителя и КАМа»* директор по маркетингу «Герофарм» **Марина Рыкова** отметила, что за последние годы медицинские представители сильно поменялись. Солидарна с ней и зав. кафедрой организации лекарственного обеспечения и фармакоэкономики Первого МГМУ им. И.М. Сеченова **Роза Ягудина**: «Рынок не тот, что в 90-е годы; медицинские представители и врачи не те, что раньше. Ранее информацию о лекарствах получали централизованно, поэтому на рынке, где каждый день появлялись новые препараты, медицинские представители и были очень ценны, сейчас же рынок насыщен информацией». Руководитель направления специализированных и зрелых препаратов Teva **Татьяна Ларичева** считает, что если раньше стоял вопрос в том, как отказаться от медицинских представителей, сейчас же мы говорим о том, что медицинские представители просто должны быть разными и самостоятельно создавать дополнительную ценность препарата.

Сессия *«Omnichannel vs Multichannel. Еще больше каналов, еще меньше порядка»* собрала представителей отделов маркетинга фармкомпаний, работающих на российском рынке. Руководитель направления GfK Health в России **Ольга Черниченко** среди основных задач, которые должны решить маркетологи при работе на рецептурном рынке, выделила следующие: оценка эффективности различных точек контакта; необходимость изучения пути к клиенту; взаимоотношение с брендом. Среди затрат спикер отметила персональные контакты, промо-материалы, образовательные мероприятия, рассылки, клинические испытания. Руководитель проектов дистанционного маркетинга «Бристол-Майерс Сквибб» **Рудольф Даннелян** поделился опытом компании при организации работы с врачебным сообществом. Руководитель направления по развитию каналов продвижения «АстраЗенека Россия» **Сергей Мастягин** убежден, что в работе маркетолога крайне важно исходить из цели: «Чем сложнее цель стоит перед маркетологом, тем выше должен быть уровень его образования и подготовки. Разные требования будут предъявляться к сотруднику, осуществляющему выкладку в аптеке, и сотруднику, продвигающему новый препарат онкологу». Директор по развитию «ПрофитМед» **Игорь Климанов**, подводя итоги встречи маркетологов, заметил, что сегодня маркетинг выходит на новый уровень в связи с особой требовательностью потребителей.



Проведение в начале февраля ежегодной конференции ***«Фармацевтический бизнес в России – 2017»*** стало хорошей традицией. Первое мероприятие в череде конгрессно-выставочной деятельности, консолидирующее ключевых участников рынка, всегда привлекает внимание в силу насыщенной деловой программы. Например, спикеры дискуссионной панели *«Инновационное развитие фармацевтической промышленности»* не пришли к единому мнению о состоянии и тенденциях развития фармпрома.

Исполнительный директор ассоциации InPharma **Вадим Кукава** видит необходимость в поиске для каждой компании своих ниш, а управляющий партнер «РМИ Партнерс» **Максим Горбачёв** убежден, что сложно не изобрести молекулу, сложно вывести её на рынок.

Директор по экономике здравоохранения ГК «Р-Фарм» **Александр Быков** считает, что в России сейчас отсутствует инновационный климат и очень мало действительно интересных разработок.

Материал подготовлен совместно с компанией infor-media Russia и пресс-службами TEVA и ГК «Фармконтракт»

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ СТРАН ЕАЭС И СНГ

28 февраля – 1 марта 2017 года в Москве прошла 8-я конференция по ключевым вопросам развития фармацевтического сектора в рамках единого рынка ЕАЭС и национальных рынков. В ходе специального блока о вызовах и перспективах развития единого рынка участники форума обсуждали вопросы интеграции деятельности регуляторных органов, особенности расширения процедуры регистрации в одной стране на другие страны, а также вопросы ценообразования и формирования ценовой политики на лекарственные средства в связи с необходимостью определения единой цены на производимые и находящиеся в обращении на территории ЕАЭС препараты. Без преувеличения, главная площадка, на которой собираются более 50 экспертов фарминдустрии со всего СНГ (Казахстан, Белоруссия, Армения, Грузия, Узбекистан, Таджикистан, Монголия и Кыргизия), руководители ключевых отраслевых ассоциаций и крупнейших фармкомпаний, а также основных регуляторных органов, устанавливающих правила работы рынка, в этом году была поддержана Евразийской экономической комиссией.



8-й Фармацевтический Форум стран ЕАЭС и СНГ, организованный Институтом Адама Смита, открылся расширенной сессией *«ЕАЭС – вызовы и перспективы развития единого рынка»*. В рамках сессии были рассмотрены вопросы регулирования, стандартизации и исследования лекарственных средств в рамках ЕАЭС, процедуры регистрации лекарственных препаратов, в том числе подготовки регистрационного досье, механизмы выдачи сертификатов GMP и их взаимное признание. Как пояснил начальник отдела координации работ в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий департамента технического регулирования и аккредитации ЕЭК **Дмитрий Рождественский**, согласно решению Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года № 93 «О признании результатов инспектирования производства лекарственных средств», российский производитель, имеющий на руках сертификат GMP, полученный, например, в Республике Беларусь, может пойти на регистрацию в России. Однако это ре-



Дмитрий Рождественский

шение распространяется только на производителей лекарственных средств государств ЕАЭС; к импортерам оно неприменимо.

Директор центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «НЦЭСМП» и председатель Фармакопейного комитета ЕАЭС **Елена Саканян** акцентировала внимание участников пленарного заседания и гостей форума на значимости стандартизации лекарственных средств, подчеркнув, что фармакопея играет ключевую роль в процессе стандартизации – фармакопейные стандарты содействуют в осуществлении регуляторными органами контроля качества фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Они [фармакопейные стандарты] также позволяют потребителю или производителю составить независимое суждение о качестве товара, способствуя таким образом охране здоровья населения.

В руководстве по надлежащей фармакопейной практике (GPhP) закреплено, что фармакопейные стандарты являются государственными стандартами, разработанными на основе достоверных научных знаний, а также точных аналитических измерений и сопутствующих валидационных данных. Эти стандарты позволяют осуществлять независимое тестирование и являются важнейшей составляющей системы поддержания стандартов, способствующих обеспечению качества, безопасности и эффективности готовых лекарственных средств, в т.ч. стандартов GMP. В то же время, учитывая, что на сегодня в мире действует 49 фармакопей (в соответствии с реестром фармакопей ВОЗ), которые различаются между собой, например, по используемым технологиям, перечню охватываемых лекарственных средств, процедуры стандартизации не во всех государствах одинаковы: «Фармакопеи тесно вплетены в соответствующие национальные или региональные регуляторные системы и отражают спецификации, принятые регуляторными органами стран». Конечно, начиная с 1948 года в мировой фармакопейной практике появился ряд успешных примеров гармонизации: созданы Международная Фармакопея, Европейская Фармакопея, активно обсуждается процесс создания Евразийской фармакопеи. Но для создания единой наднациональной фармакопеи государствам-членам ЕАЭС необходимо провести гармонизацию национальных фармакопей, ввести и активно применять стандарт ВОЗ «Надлежащая фармакопейная практика» (GPhP) на всех уровнях разработки, подготовки и оценки нормативной документации по контролю качества лекарственных средств. Гармонизация фармакопей государств-членов ЕАЭС может быть проведена в два этапа:

1) разработка гармонизированных общих фармакопейных статей (монографий) Фармакопеи ЕАЭС, устанавливающих требования к методам контроля качества лекарственных средств и оборудованию, лекарственным формам, фармацевтическим субстанциям и вспомогательным веществам, стандартным образцам, реактивам, упаковочным материалам, микробиологической чистоте и др. Таким образом, за период 2017–2018 года удастся подготовить первую и вторую части первого тома Фармакопеи ЕАЭС;

2) разработка гармонизированных частных фармакопейных статей (монографий) на фармацевтические субстанции (включая субстанции для фармацевтического применения в ветеринарии), лекарственные препараты и др. Эти статьи станут основой для создания второго тома Фармакопеи ЕАЭС.



Резюмируя свое выступление, **Елена Саканян** отметила, что разработки в науке и врачебной практике, глобализация и наличие в обороте некачественной, поддельной, ложномаркированной, фальсифицированной, контрафактной продукции требуют от фарма-



Елена Саканян

копей постоянного пересмотра монографий и других текстов. Более того, спикер убеждена, что гармонизация и укрепление сотрудничества между фармакопейными комитетами и регуляторными органами, сопровождаемое взаимодействием с производителями, помогут в решении новых задач и преодолении ограниченности ресурсов.

На практической сессии-дискуссии *«Существующие вопросы и сложности, с которыми сталкивается индустрия, работая на рынке ЕАЭС»* **Андрей Савин** (QuintillesIMS) отметил, что у многих стран, входящих в ЕАЭС, есть система регулирования цен: например, в Казахстане она вводится в 2017 году, а в России цены уже регулируются по определенным сегментам. Однако ценовое регулирование может привести к дефициту лекарственных средств. Еще одна сложность при работе на рынке ЕАЭС – это валютные изменения в странах-участницах, которые будут влиять на потоки товара между странами ЕАЭС. Генеральный директор Liqvor Pharmaceuticals **Сергей Матевосян** подчеркнул, что фактически свободного передвижения лекарственных средств на рынке ЕАЭС нет: в каждой стране необходимо проходить регистрацию и получать сертификат. **Валентин Петров** (Белорусская ассоциация международных фармацевтических производителей) отметил, что рынок ЕАЭС требует создания общих правил поступления товаров на единый рынок: «Если производитель будет понимать, что он имеет рынок, производство будет развиваться». Директор по регуляторным вопросам по России и Евразии Teva **Андрей Коновалов** озвучил намерение компании принять участие в пилотном проекте по регистрации препаратов в соответствии с процедурами ЕАЭС: «Мы понимаем, что это займет определенное время и заинтересованы в совместной работе с профессиональными ассоциациями и Евразийской экономической комиссией для отработки новых процедур на практике. Как и многие другие компании, Teva проводит активную работу по проверке досье зарегистрированных препаратов для приведения в соответствие с требованиями ЕАЭС и подготовку к подаче на регистрацию новых лекарственных препаратов. Осознавая важность унификации законодательства стран-членов ЕАЭС, касающегося работы фармрынка, мы планируем включить в пилотный проект 2 препарата, которые будут подаваться на регистрацию в разных государствах ЕАЭС по двум процедурам:

1) процедура взаимного признания: препарат будет подаваться на регистрацию в Белоруссии с последующим признанием в России;

2) приведение досье зарегистрированного препарата в соответствие с требованиями ЕАЭС: препарат, зарегистрированный в Казахстане, будет приводиться в соответствие с требованиями Союза, после чего регистрация будет признаваться в России.

Такое сотрудничество является полезным и взаимовыгодным. Евразийская экономическая комиссия сможет на практике отработать процедуры Союза по экспертизе, регистрации и взаимодействию экспертных организаций государств-членов. А полученный Teva опыт в рамках регистрации препаратов будет способствовать более быстрому внедрению правил ЕАЭС в регуляторную практику компании и переходу к работе в условиях единого рынка».

В рамках серии специальных презентаций участники и гости конференции обсудили государственное регулирование лекарственного обеспечения на рынках в странах СНГ, особенности фармацевтического рынка Казахстана в условиях общего рынка, возможности утвержденного информационного ресурса Казахстанский национальный лекарственный формуляр. Специальный фокус был направлен на фармацевтический сектор Монголии. Представители национальных центров экспертизы Армении, Казахстана и Киргизстана уделили особое внимание вопросам регистрации и клинических исследований лекарственных средств, а также совместно с экспертами из других государств обсудили актуальные тенденции борьбы с контрафактными и фальсифицированными лекарственными средствами, обменявшись опытом по созданию заградительных барьеров на пути проникновения данной продукции на рынки государств-членов ЕАЭС. Гости и спикеры пришли к единому мнению, что первым шагом на пути к консолидированной борьбе с фальсифицированными лекарственными средствами должно стать создание единой базы данных (реестра) по выявленным нарушениям.

ВЫСТАВКА «IPHEB & CPHI RUSSIA-2017»

28–30 марта 2017 года на ВДНХ прошла VII Международная выставка и форум фармацевтических ингредиентов, производства и дистрибьюции лекарственных средств «IPhEB & CPhI Russia». За семь лет мероприятие стало традиционным местом весенней встречи всех, кто интересуется направлениями развития российской и мировой фармотрасли. Начиная с 2014 года постоянным местом проведения выставки стала Москва, что существенно расширило границы экспозиций и географический состав участников: более 150 компаний из 19 стран, включая Индию, Китай, Чехию, Грецию, Швецию, Италию, США. Еще более широкий географический профиль наблюдался среди гостей выставки и форума: 3119 посетителей-специалистов из 54 стран мира.



В приветственном письме заместителя министра промышленности и торговли Российской Федерации **Сергея Цыба** отмечено, что выставка фармацевтических ингредиентов, производства и дистрибьюции лекарственных средств и международный форум в сфере фармацевтики и биотехнологий – площадка, на которой объединены инновации, современные технологии, новые подходы, способные изменить российский фармацевтический рынок. В рамках форума представители органов власти, профессиональных отраслевых ассоциаций и фармкомпаний обсуждают актуальные вопросы и законодательные тенденции в области фармацевтики и биотехнологий, устанавливают новые деловые контакты, укрепляют существующие партнерские отношения. Заместитель руководителя государственного GMP-инспектората, директор ФБУ «ГИЛС и НП» **Владислав Шестаков** среди актуальных вопросов, дискуссии по которым были запланированы в рамках форума, отметил совершенствование научной и производственной базы, создание конкурентоспособной продукции, внедрение международных стандартов качества, развитие фармакологии и улучшение качества лекарственных средств.

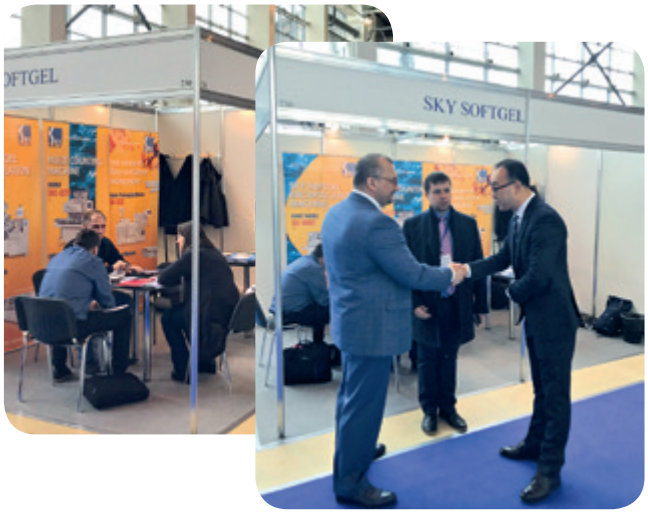
Приветствуя участников и гостей «IPhEB & CPhI Russia», **Владислав Шестаков** представил мини-от-

чет о деятельности возглавляемого им института: «За 2016 год из Минпромторга в ФБУ «ГИЛС и НП» было передано 465 заявок (из 630), проведены инспекции в 40 странах мира на 18 производственных площадках, утверждено 163 отчета, выдано 88 заключений GMP, 38 – отказано в выдаче. А за первый квартал 2017 года эти показатели позволяют прогнозировать их колоссальный рост: Минпромторг передал институту 125 заявок, по которым уже проведена 101 проверка». До конца года специалисты ГИЛС и НП должны провести не менее 500 инспекций. Деятельность института, как и проведение выставки-форума, преследует решение задачи по развитию экспортного потенциала российской фармотрасли, повышения уровня доверия к национальному опыту и выводу отечественной продукции на мировой уровень качества. Ряд такой продукции был представлен в рамках коллективной экспозиции российских фармкомпаний под эгидой Минпромторга России и кластера медицинской, фармацевтической промышленности, радиационных технологий Санкт-Петербурга: НПО «Петровакс Фарм», «Нацимбио», BIOCAD, «Фармстандарт», НПО «Дом Фармации» и др.





Помимо готовых лекарственных форм российского производства на выставке можно было познакомиться и с предложением компаний по оснащению фармпроизводств технологическим оборудованием для организации полного цикла производства мягких желатиновых капсул. Данное решение представил спонсор выставки, крупнейший национальный дистрибьютор технологического и лабораторного оборудования ГК «Фармконтракт» совместно со своим корейским партнером Sky Softgel. Отличительной особенностью счетно-фасовочных линий Sky является запатентованная технология подачи, подсчета, фасовки и укупорки, которая не требует форматных частей при переходе на другой продукт или замене емкости (например, от пластика до стекла). Блистерные машины Sky представляют собой машины балконного типа со всеми современными системами инспекции, протяжки на основе сервоприводов, с питателями под различные типы продукции. Помимо этого, команда Sky Softgel при посредничестве ГК «Фармконтракт» готова предложить российским заводам различные типы оборудования для приготовления и подготовки лекарственного препарата (в т.ч. желатина), инкапсуляции, сушки, контроля качества выпускаемой продукции с последующей фасовкой и укупоркой допущенной к реализации на рынке продукции.



Не менее интересной оказалась и деловая программа форума, ключевыми темами которого стали вопросы, связанные с национальным развитием фармацевтического рынка: работа отечественной системы инспектората, перспективы развития отечественного фармацевтического рынка, особенности хранения и перевозки лекарственных средств, маркировка и глобальные тенденции в сфере фармацевтической упаковки.

Минпромторг России в продолжение темы своей экспозиции организовал круглый стол *«Производство субстанций в Российской Федерации как значимый фактор в развитии российского фармацевтического рынка»*, на котором обсуждались экономика производства субстанций для собственного производства готовых

лекарственных форм и для продажи, взаимодействие науки и бизнеса в создании инновационных препаратов, экспортный потенциал российской продукции и перспективы развития новых предприятий по производству фармсубстанций на территории Российской Федерации.

Открывая дискуссию, исполнительный директор СПФО **Лилия Титова** отметила, что после распада СССР большинство российских предприятий, производящих фармсубстанции, было закрыто из-за экономической нецелесообразности, поскольку продукция Индии и Китая была более конкурентоспособна. Сегодня ввоз фармсубстанций в Россию составляет более 2000 т в год. В прошлом году Россия импортировала 749 наименований субстанций из 40 стран на 61 млрд руб. «Однако эпоха дешевых китайских субстанций подходит к концу. В Китае происходит стремительный рост цен на эту продукцию. Так, за последние 5 лет цена на субстанцию левомицитин поднялась с $13 до $50–60 за килограмм. Поэтому возрождение синтеза фармсубстанций в России – это вопрос национальной безопасности страны», – подчеркнула спикер.



С 2014 года российская фармацевтика взяла курс на импортозамещение и развитие фармацевтического производства полного цикла на территории страны. Правительством России были разработаны меры государственной поддержки отечественных предприятий. В 2015 году было принято постановление Минпромторга России, предоставляющее возможность компаниям обращаться за субсидиями на производство субстанций. «В рамках госпрограммы Минпромторг России поддержал разработку 132 лекарственных препаратов, из которых 65 проектов – это реализация производства фармсубстанций, – пояснила начальник отдела развития фармацевтической промышленности департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **Ольга Макаркина**. – Из 12 проектов, которые были поддержаны в 2015–2016 году, 6 – это проекты по производству фармсубстанций. В настоящее время 241 из 642 МНН лекарственных препаратов из перечня ЖВНЛП производится из отечественных субстанций». По состоянию на 1 января 2017 года лицензию на производство только субстанций получили 36 компаний, не считая тех, кто наряду с субстанциями производит и готовые лекарственные формы. «Мы возмещаем лизинговые платежи на приобретение оборудования, – отметила **Ольга Макаркина**. – В прошлом году мы внесли изменения, чтобы расширить перечень субсидируемых проектов и оказать поддержку большему числу компаний». Результаты этой работы не заставили себя ждать.

«Усолье-Сибирский химфармзавод – одно из немногих отечественных производств, которое более 50 лет занимается крупнотоннажным производством фармсубстанций. После развала СССР предприятие пришло в упадок. До 2011 года убытки завода составляли 170 млн руб. в год, – рассказал генеральный директор предприятия **Сергей Тюстин**. – В 2012 гг. за счет модернизации технологических схем химического синтеза всего за один год удалось снизить убытки со 170 до 70 млн руб. в год. В 2013–2015 гг. за счет увеличения энергоэффективности предприятия, введения дополнительных мощностей по выпуску субстанций, расширения номенклатуры продукции был введен в эксплуатацию участок готовых форм, что позволило перерабатывать собственные субстанции, которые синтезируются на заводе. Эти шаги вывели предприятие на безубыточный уровень. В 2016 году объем производства субстанций возрос до 380 т в год, а прибыль – до 90 млн руб. Сейчас предприятие одновременно выпускает 7 субстанций, что значительно увеличило объемы производства и снизило себестоимость продукции. В настоящее время завод способен синтезировать более 20 субстанций, получать полупродукты из элементарных химических соединений и формировать конкурентоспособные цены, сопоставимые с ценами китайских производителей. Развивая технологии многостадийного синтеза, предприятие повышает качество выпускаемых субстанций и конкурентоспособность продукции, заключает долгосрочные контракты с ведущими российскими фармпредприятиями и экспортирует субстанции в Германию и страны СНГ. В этом году завод планирует запустить производство новой субстанции для производства ЖНВЛП, предназначенных для лечения туберкулеза, невралгии и сердечно-сосудистых заболеваний».

О своем положительном опыте в сфере конкуренции с китайскими производителями субстанций рассказал директор ОАО «ГЕРОФАРМ-Био» **Дмитрий Буровик**: «Мы разработали собственную технологию производства субстанций и готовых лекарственных форм, полностью соответствующих требо-

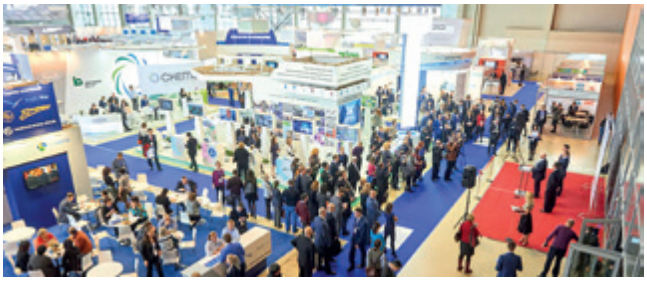
ваниям европейских и американских фармакопей по качеству, однако они значительно дешевле китайских. Сегодня компания производит 150 кг субстанции инсулина в год, что покрывает 25% потребностей РФ. В планах строительство второго завода, который позволит выпускать 1200 кг субстанции инсулина в год, что полностью покроет потребности страны, а в дальнейшем позволит экспортировать продукцию, прежде всего в страны азиатского и южноамериканского регионов».

Коммерческий директор НТФФ «ПОЛИСАН» **Дмитрий Борисов** обратил внимание участников круглого стола на такой важный аспект производственного процесса, как контроль качества: «Можно уделять много внимания качеству продукции предприятий-поставщиков, но когда контролируешь цепочку от начала до конца – от синтеза субстанции до хранения и транспортировки готовых лекарственных форм – это дает реальные результаты». По информации, которую предоставил коммерческий директор компании, группа компаний «Полисан» продолжает расширять производство с целью освоения производства инновационных субстанций и выпуска новых оригинальных препаратов. В то же время сегодня значительную часть субстанций «Полисан» закупает за рубежом. «Мы готовы повернутся в сторону российских производителей фармсубстанций, которые наконец-то стали заметны на рынке, – заявил **Дмитрий Борисов**. – Мы хотим производить качественные российские препараты из хорошей качественной российской субстанции, и я вижу, что все перспективы для этого есть».

При производстве отечественных фармацевтических субстанций немаловажную роль играет процесс взаимодействия бизнес- и научного сообщества. «С распадом СССР и системы отраслевых институтов значительная часть работ по разработке новых субстанций антибиотиков легла на лаборатории предприятия, но поскольку разработка новой молекулы стоит около 1 млрд руб., этой работой сегодня занимаются университеты, которые финансируются из федерального бюджета, – так охарактеризовал нынешнее положение начальник лаборатории химической технологии полусинтетических антибиотиков ОАО «Синтез» **Илья Рабинович**. – Взаимодействие предприятий и вузов, науки и бизнеса позволяет создать единую систему разработки и внедрения в производство новых фармацевтических препаратов. Так, наше сотрудничество с одним из вузов в области производства антиоксидантов привело к производству субстанции, обладающей уникальными свойствами по восстановлению специфических функций головного мозга. В настоящее время по программе «Фарма-2020» мы совместно с Уральским государственным университетом разрабатываем новую субстанцию противодиабетического препарата, которая уже проходит доклинические исследования».

Еще одним субъектом взаимодействия при организации производства субстанций нередко выступает малый бизнес. Опыт сектора малого и среднего бизнеса представила медицинский директор компании «ПЕПТЕК» **Наталья Шилова**: «В 2016 году была поставлена задача вывода на рынок препаратов, превосходящих зарубежные аналоги по действию на заданную биомишень. Но если нет оригинальных субстанций, значит, нет и таких препаратов. В настоящее время происходит регистрация пептидной субстанции бактериального происхождения для использования в онкологическом сегменте».

Возрождением производства российских фармацевтических субстанций на протяжении последних 10 лет занимается «Активный Компонент». «Мы пришли к необходимости локализации малотоннажных и инновационных субстанций, либо недавно вышедших из-под патента, либо тех, которые вновь стали интересны», – пояснила интерес компании к этому направлению коммерческий директор **Алёна Меньшенина**. Создание собственного производства фармацевтических субстанций интересует и «Фармасинтез»: «Мы пришли к выводу, что для производства онкопрепаратов нам будет выгодно построить собственный завод фармсубстанций», – отметил вице-президент по развитию бизнеса **Олег Астафуров**.



Участники круглого стола высоко оценили меры государственной поддержки, которые позволили отечественным компаниям перейти на производство лекарственных форм по стандартам GMP и провести переориентацию производственной политики в сторону организации собственного производства субстанций.

Эффективной работе и успешным переговорам участников и гостей выставки во многом способствовала Биржа деловых контактов – сервис, который создан для помощи в налаживании сотрудничества, поиске новых клиентов и партнеров, обмена знаниями и опытом: до, во время и после мероприятия.

Следующая выставка «IPhEB & CPhI Russia» будет проходить на своей исторической родине – в Санкт-Петербурге 24–26 апреля 2018 г.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ И РОССИЙСКАЯ ФАРМПРОМЫШЛЕННОСТЬ: ПРОДОЛЖЕНИЕ ДИАЛОГА

29 марта 2017 года АРФП совместно с AIPM традиционно провели конференцию, посвященную вопросам государственного регулирования отечественного фармрынка. Представители законодательных и исполнительных органов власти, общественных и научных организаций, деловых кругов России и ЕАЭС обсудили основные экономические вызовы и угрозы развития отрасли, выработали консолидированную позицию для эффективного выполнения государственных программ. Одним из самых обсуждаемых вопросов стала маркировка лекарственных средств.



Первая дискуссионная площадка конференции была посвящена главным трендам современного фармацевтического рынка и затронула целый перечень регуляторных мер, в том числе трехступенчатую конструкцию госзакупок лекарственных средств. «Постановление о «третьем лишнем» в сфере государственных закупок лекарственных средств продолжает показывать свою эффективность: доля отечественных лекарственных препаратов в государственных закупках в 2014 году составляла 19%, сейчас этот показатель достигает 30%. Ежегодно мы видим рост производства лекарств в районе 20% в денежном выражении. Это больше, чем рост всего рынка», – обозначил заместитель директора департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **Алексей Алехин**. По поручению Правительства Российской Федерации Минпромторг России работает над развитием постановления «Об ограничениях и условиях допуска происходящих из иностранных государств лекарственных препаратов, включенных в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, для целей осуществления закупок». Как обозначил заместитель директора департамента ведомства, задача, которую они пытаются решить – подтолкнуть производителей фармацевтических субстанций к развитию своего портфе-

ля, при этом учесть интересы игроков рынка-производителей готовых лекарственных форм.

«Одним из векторов, которые министерство будет поддерживать, является развитие производства фармацевтических субстанций», – подчеркнул **Алексей Алехин**.

Отдельное внимание было уделено возможности участия в госзакупках наравне с действующими производителями субстанций, готовых лекарственных форм предприятий, которые заключили специальный инвестиционный контракт (СПИК). Такое поручение было дано заместителем председателя Правительства Российской Федерации **Аркадием Дворковичем**. «Если производитель готовых лекарственных форм получает возможность со СПИКом участвовать в государственных закупках наравне с производителем полного цикла, который в производстве лекарственного препарата использует отечественную фармацевтическую субстанцию, то это позволит обеспечить конкуренцию в этом сегменте и соответственно снижение цены», – пояснил **Алексей Алехин**.

Генеральный директор АРФП **Виктор Дмитриев** отметил, что производителей субстанций беспокоит вопрос подтверждения подлинности производства субстанций на территории Российской Федерации. Предложения по его урегулированию вместе с другими инициативами экспертного сообщества по совершенствованию обсуждаемого постановления направлены в федеральные органы исполнительной власти.

Участники сессии *«Главные тренды развития современного фармацевтического рынка»* обсудили также вопросы GMP-инспектирования, внедрения автоматизированной системы мониторинга движения лекарственных препаратов от производителя до потребителя. Так, по словам заместителя руководителя Роспотребнадзора **Дмитрия Пархоменко**, в эксперименте в настоящее время на добровольной основе принимают участие более 30 фармацевтических производителей, 7 фармдистрибьюторов, 300 медицинских и аптечных организаций, в том числе аптечные сети федерального и регионального масштаба, в 9 российских субъектах.

Директор ФБУ «ГИЛС и НП» **Владислав Шестаков** рассказал о регуляторных вызовах при гармонизации национальных процедур в рамках создания единого рынка лекарственных средств ЕАЭС: «Инструментом регулирования обращения лекарственных средств на общем рынке ЕАЭС является их регистрация. Она регулирует номенклатуру, позволяет контролировать безопасность, эффективность и качество фармпродукции. Предлагаемые схемы регистрации лекарственных средств в ЕАЭС включают процедуру взаимного признания – последовательную регистрацию продукта в государствах-членах с признанием результатов экспертизы референтного государства. Срок такой регистрации занимает около 300 дней: 210 дней



Владислав Шестаков

в референтном государстве плюс 90 дней в государстве признания. Другим вариантом служит децентрализованная процедура, предполагающая одновременную регистрацию в государствах-членах лекарственного средства, не имеющего регистрации ни в одном государстве-члене, с признанием результатов экспертизы референтного государства. При достижении взаимного согласия эта процедура может быть закончена в срок до 210 дней во всех государствах. В то же время до **31 декабря 2020 г.** сохраняется национальная процедура регистрации. Более того, предусмотрено наличие переходных периодов (для лекарственных препаратов, зарегистрированных до 1 января 2016 года, – 10 лет, и продлится до 31 декабря 2025 года). В этот переходный период заявитель имеет право выбора одной из двух процедур регистрации: по национальному законодательству государства-члена ЕАЭС для обращения лекарственных средств только на его территории или по общим правилам регистрации для обращения лекарственных средств и медицинских изделий на территории ЕАЭС. По истечении переходного периода заявителю необходимо будет привести регистрационные документы в соответствие с едиными требованиями и правилами ЕАЭС». Одним из ключевых моментов в процессе гармонизации национальных процедур спикер отметил признание проведенных испытаний в государствах-членах для целей регистрации (отсутствие необходимости проведения дополнительных испытаний в каждой стране) и результатов инспектирования на территории ЕАЭС. Среди трудностей, которые подстерегают на этом пути, можно выделить следующие:

- Производителям придется нести определенные материальные затраты по переходу на стандарты надлежащих фармацевтических практик, приведение регистрационных досье в соответствие с новыми требованиями. Также необходимо будет проводить все исследования в условиях надлежащих фармацевтических практик ЕАЭС.

- Государственным органам предстоит большая работа по гармонизации законодательства в рамках ЕАЭС, обучение инспекторов, экспертов, участников рынка надлежащим практикам, создание обученного инспектората, вступление в PIC/S, вложения в развитие материальной базы по проведению исследований лекарственных средств.

Для запуска единого рынка лекарственных средств в ЕАЭС необходим целый свод общих правил, в том числе правила надлежащей производственной практики (GMP). «Эти правила во многом соответствуют правилам надлежащей производственной практики, которыми сейчас руководствуются при проверках на территории Российской Федерации. В них могут быть заменены отдельные определения, уточнены или скорректированы отдельные формулировки», – пояснил **Владислав Николаевич**. Среди ключевых отличий в главе о персонале он отметил появление термина «высшее руководство» с описанием его обязанностей и подраздела «Консультанты», где описаны требования к консультантам, наличие более детального описания требований, предъявляемых к ключевому персоналу. В главе о документации, напротив, отсутствует термин «регламент» и описание досье на серию. В главе о производстве приведены технические и организационные меры на мероприятия по предотвращению перекрестной контаминации, указаны требования для обоснования передачи испытаний для исполнения сторонней организацией и необходимый список действий и документов для утверждения и поддержания статуса поставщиков активных фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ. В главе «Контроль качества» определен порядок трансфера (передачи) методик испытаний, а в главе «Претензии, дефекты качества и отзывы продукции» добавлены требования к лицам, ответственным за отзыв и расследование дефектов качества, оценка рисков, которые представляют эти дефекты, расследование и принятие решений, анализ основных причин и CAPA, оценка эффективности мероприятий по отзыву и снижение рисков возникновения дефектов качества. Помимо этого, **Владислав Шестаков** обратил внимание участников конференции на то, что в рамках единого фармацевтического рынка ЕАЭС предусмотрено два варианта проведения фармацевтических инспекций: фармацевтическими инспекторатами одного из государств-членов или совместно фармацевтическим инспекторатами государств-членов. При этом совместные фармацевтические инспекции проводятся в плановом и внеплановом порядке. «Плановые совместные фармацевтические инспекции могут проводиться в рамках сотрудничества и обмена опытом. Совместные внеплановые фармацевтические инспекции проводятся фармацевтическими инспекторатами государств-членов в целях урегулирования разногласий и обеспечения взаимного признания государствами-членами результатов инспектирования производств», – пояснил спикер.

Плановая инспекция проводится по плану фармацевтического инспектората с учетом срока действия сертификата на основании заявки субъекта в сфере обращения лекарственных средств на получение сертификата или продление его действия. При подаче заявки на проведение плановой инспекции инспекция проводится фармацевтическим инспекторатом государства-члена, на территории которого находится инспектируемая производственная площадка. В случае инспекции производственной площадки (организации-производителя нерезидента), находящейся за пределами ЕАЭС, инспектируемый субъект вправе выбрать для ее проведения фармацевтический инспекторат государства-члена.

Внеплановая инспекция проводится фармацевтическим инспекторатом на основании заявления субъекта в сфере обращения лекарственных средств, а также по требованию уполномоченного органа. Такая инспекция, инициированная в рамках регистрационных процедур, проводится фармацевтическим инспекторатом государства, определенного в соответствии с правилами регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения, утвержденными Комиссией.

Повторная (контрольная) инспекция проводится уполномоченным органом (уполномоченной организацией) по результатам ранее проведенной инспекции с целью подтверждения устранения выявленных несоответствий. В случае если инспектируемым субъектом в сфере обращения лекарственных средств представлены документальные свидетельства, подтверждающие выполнение корректирующих и предупреждающих действий, повторная (контрольная) инспекция может не проводиться.

«Для запуска единого рынка лекарственных средств в ЕАЭС необходим целый свод общих правил, в том числе правила надлежащей производственной практики (GMP). При этом важно в реальности отработать конкретные механизмы инспектирования, детализировать практическое применение правил ЕАЭС, выработать наиболее оптимальные и эффективные схемы взаимодействия, которые будут работать на практике. Для этого важен открытый диалог, всестороннее участие, в том числе со стороны фармацевтических производителей. Ведь в конечном итоге самое главное при этом обеспечить потребности рынка, создать комфортную и оптимальную среду для выдачи GMP-сертификатов компаниям-заявителям», – подвел итоги своего выступления директор ФБУ «ГИЛС и НП».

Значимость поднимаемых вопросов подчеркнул исполнительный директор Ассоциации международных фармацевтических производителей **Владимр Шипков**, так как они определяют вектор движения фармацевтического рынка.

Как обозначил **Алексей Алехин**, фармацевтическая отрасль показывает развитие инвестиционного капитала, при этом инвестиции направляются не только на строительство новых производств, но и укрепление медицинской базы, проведение клинических исследований. С 2011 года, за период реализации государственной программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности», 40 млрд руб. было выделено из бюджета, порядка 150 млрд составили вложения частного бизнеса в отрасль.

Одной из самых обсуждаемых тем конференции стал вопрос автоматизированной системы мониторинга движения лекарственных препаратов.

Начальник управления организации государственного контроля качества медицинской продукции Росздравнадзора **Валентина Косенко** в продолжение интервью руководителя Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения **Михаила Мурашко** «Российской газете» по вопросам маркировки отметила, что оптимальной маркировкой на сегодня является выбранный двухмерный штриховой код, которая осуществляет путем нанесения или наклеивания стикеров. Последний вариант допускается только в том случае, если этот стикер нанесен таким образом, что его невозможно отделить от упаковки. В эксперименте, по данным **Валентины Косенко**, уже сегодня участвуют 29 фармацевтических производителей, 7 дистрибьюторов, свыше 300 аптечных организаций из 9 субъектов Российской Федерации: Москвы и Московской области, Санкт-Петербурга, Калужской, Самарской, Смоленской, Нижегородской и Белгородской областей, Республики Башкортостан.



Валентина Косенко

Начальник управления обеспечения контроля оборота товаров ФНС **Ольга Чепурина** познакомила участников конференции с позицией ФНС по вопросу о том, что же стоит понимать под маркировкой. Готовность информационной системы маркировки с точки зрения ее основных пользователей (производителей, дистрибьюторов, аптечных сетей и потребителей), по мнению ФНС, стоит оценивать по степени доступности и понятности механизмов обмена информацией.

Генеральный директор ГК «Фармконтракт» **Тимофей Петров**, представляя варианты оснащения российских фармпроизводителей системами Track & Trace, которые позволяют обеспечить идентификацию, сбор и обмен информацией между участниками всей цепочки поставок, заявил о готовности крупнейшего национального дистрибьютора предоставить 10% скидку на предлагаемые маркировочные линии. Кстати, эти линии во многом позволяют не просто автоматизировать процесс маркировки лекарственного препарата и отследить его путь до конечного потребителя, но и при адаптации ПО с информационной системой, разработанной ФНС, минимизировать влияние человеческого фактора.



Тимофей Петров

Несмотря на разные взгляды, каждый субъект обращения лекарственных средств на российском рынке в 2018 году будет вынужден интегрироваться в процесс маркировки. Именно поэтому для предприятий, не подавших заявку на включение их в пилотный проект, опыт коллег, которые им охотно делятся на подобных мероприятиях, а также привлекательные предложения поставщиков автоматизированных машин сериализации находятся в поле пристального внимания.

III МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ «ФАРМЭВОЛЮЦИЯ»

4 апреля 2017 года в Калуге деловое издание «Ведомости» совместно с правительством Калужской области, Агентством инновационного развития – Центром кластерного развития Калужской области при поддержке Калужского фармацевтического кластера провели форум по вопросам развития фармацевтических кластеров в России, способам повышения их эффективности, разработке и поддержке инновационных лекарственных препаратов. Участники форума обсудили текущую экономическую повестку и бизнес-климат в России. Отличительной чертой форума 2017 года стало торжественное подписание соглашений о партнерстве Калужского фармацевтического кластера с двумя известными игроками российского и международного рынков.



Представители и руководители федеральных государственных структур и региональных органов власти, крупнейших фармацевтических компаний, научно-исследовательских и инновационных бизнес-инкубаторов, дистрибьюторских компаний и аптечных сетей, отраслевых ассоциаций, союзов, фондов, управляющих компаний, а также ведущие аналитики, инвесторы, эксперты и представители СМИ собрались 4 апреля на территории Калужского фармацевтического кластера для обсуждения ключевых вопросов и перспектив развития отрасли.

Открыл мероприятие с приветственным словом губернатор Калужской области **Анатолий Артамонов**, который подчеркнул, что за последние пять лет регион стал драйвером фармацевтической промышленности: «В 2016 году мы получили 37% роста объемов производства. Объединение усилий фармкомпаний в рамках кластера может дать удивительные результаты. Через пять лет мы будем иметь 10–12% доли в общем объеме производства». Более того, в 2017 году в Калужской области планируется открытие двух фармацевтических заводов – завода по производству готовых лекарственных средств «ФАРМСИНТЕЗ» и завода по производству имплантов и изделий медицинского назначения компании «САНАТМЕТАЛ СНГ». Помимо этого, губернатор высоко оценил потенциал фармацевтической отрасли не только в регионе, но и в стране: «В последние годы фармотрасль в нашей стране имеет высокую динамику развития. В частности, на территории Калужской области ведется масштабная исследовательская работа, организовано производство субстанций и готовых лекарственных средств, развивается сфера радиофармацевтики, создан «Парк активных молекул». Сегодня важно усилить взаимодействие всех заинтересованных сторон в проведении научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ. Такое объединение может дать совершенно неожиданные результаты, которые затем будут продолжены в ваших компаниях».

Свое приветствие к организаторам и участникам форума «Фармэволюция – 2017» направил полномочный представитель Президента Российской Федерации в Центральном федеральном округе **Александр Беглов**: «Форум – это эффективная площадка для поиска инновационных моделей развития фармацевтического производства, обсуждения ключевых вопросов и обмена опытом. Не удивительно, что уже на протяжении нескольких лет тема совершенствования фармацевтической отрасли обсуждается на гостеприимной калужской земле. Калужскую область отличает высокий научно-технический потенциал и инвестиционная активность. Благодаря системе государственной поддержки и проводимой с инвесторами работе здесь успешно функционирует кластер фармацевтики, биотехнологий и медицины».

В рамках дискуссионной сессии *«Фармацевтический кластер как инвестиционный драйвер развития отрасли»* директор департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Министерства промышленности и торговли РФ **Ольга Колотилова** рассказала о поддержанных министерством проектах в сфере фармацевтики: «В рамках государственной программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» поддержано более 600 проектов, за время ее реализации выведено на рынок 44 лекарственных препарата из перечня ЖНВЛП. Российская фармацевтическая промышленность в последние 2 года показывает исключительные темпы роста. В 2016 году выведено на рынок 24 российских лекарственных препарата из перечня ЖНВЛП. Эти проекты также поддержаны в рамках данной государственной программы. В теку-

щем году планируется вывести на рынок еще порядка 20 препаратов. Мы в еженедельном режиме проводим совещания с Министерством здравоохранения Российской Федерации по вопросу государственной регистрации лекарственных препаратов, которые были поддержаны в рамках государственной программы». Также **Ольга Николаевна** обратила внимание участников форума на набирающий силы тренд – растущий интерес компаний на российском рынке к производству фармацевтических субстанций: «Половина проектов в фармацевтической отрасли, поддержанных Фондом развития промышленности в прошлом году, связаны с производством субстанций».

По мнению председателя правления «Союза фармацевтических и биомедицинских кластеров России» **Захара Голанта**, эффект государственной программы может в разы повысить внедрение трехступенчатой процедуры госзакупок лекарств: «Третий лишний» – мощнейшая мера, а госпрограмма «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» – одна из самых успешных в Российской Федерации. Мы видим, как отрасль поднялась за последние 5 лет. В Санкт-Петербурге это уже целое новое направление в развитии города, более того, фармотрасль является вытягивающей. Мы в прошлом году увидели, что за фармацевтической отраслью пошла косметическая промышленность, потом пойдет пищевая. Это огромный новый тренд в целом для региона, который влияет на очень многие аспекты жизни». В то же время увеличение экспортных возможностей предприятий **Захар Голант** связывает непосредственно с процессом углубления производства: «Надо четко понимать, что только компетенции в области синтеза химического, биологического, развитии производства субстанций являются основанием для развития экспорта. Тех, кто достиг понимания технологии, действительно обладает особыми компетенциями производства полного цикла, ждут практически все развивающиеся рынки».

Аналитик и экономист Сбербанк КИБ **Сергей Коныгин** представил исследование Сбербанка об основных макроэкономических факторах, влияющих на развитие бизнеса в России. А корпоративный вице-президент в России и странах СНГ компании «Ново Нордиск» **Шебнем Авсар Туна** в продолжение дискуссии о локализованных производствах поделилась опытом локализации компании «Ново Нордиск» в Калуге и рассказала о дальнейших планах.

По итогам сессии состоялось официальное подписание соглашений о сотрудничестве между Калужским фармацевтическим кластером, компанией «Мерк» и ведущим химико-фармацевтическим холдингом России ГК «Фармконтракт».

О возможностях сотрудничества НП «Калужский фармацевтический кластер» и, по сути, единственного игрока на фармацевтическом рынке, предоставляющего «под ключ» весь перечень услуг от идеи проектных, строительно-монтажных работ до ввода объекта в эксплуатацию с проведением квалификационных работ и тестовых испытаний установленных технологических линий для производства российских лекарственных средств различных форм, говорили еще с начала года. Действительно, Калужский фармацевтический кластер за годы своего существования показал серьезный инновационно-исследовательский и индустриальный потенциал фармкомпаний-членов кластера. На сегодняшний день кластер насчитывает 63 предприятия и организации, 38 малых инновационных и проектных компаний. Среди них фармацевтические заводы крупнейших глобальных компаний «АстраЗенека», «Ново Нордиск», «ШТАДА СиАйЭс», «БерлинХеми/Менарини», крупные и средние российские фармкомпании «НИАРМЕДИК ПЛЮС», «Мир-Фарм», «БИОН», Обнинская химико-фармацевтическая компания «ФАРМ-СИНТЕЗ» и «Сфера-Фарм», «ФармВИЛАР», а также ведущие государственные научные центры России в области разработки, производства и применения радиофармпрепаратов (ГНЦ РФ – ФЭИ им. А.И. Лейпунского, НИФХИ им. Л.Я. Карпова; всемирно известный центр ядерной медицины – Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба). Деятельность предприятий Калужского фармацевтического кластера отмечена бронзовым сертификатом «Cluster Excellence», подтверждающим соответствие результатов их деятельности ведущим мировым практикам по группе «Health and medical science».



В свою очередь, ГК «Фармконтракт» первой на рынке применила систему «одного окна» с целью содействия модернизации и ускорению развития отечественной фармпромышленности, консолидировав в структуре одного исполнителя (генерального подрядчика) высококвалифицированные команды, способные оказать содействие в подготовке ТЭО, разработать проектную документацию и построить фармзавод от отдела входного контроля до складских комплексов, удовлетворяющий стандартам GMP, сформировать ТКП, которое будет содержать детализированное описание решения с учетом особенностей технологии производства, помещений (класс чистоты, инженерные коммуникации) и будущих производственных мощностей, задач по объему выпускаемой продукции, её объёмов и требований к качеству. Именно в соответствии с этим ТКП и будет проведено в после-

дующем оснащение фармкомплекса с пусконаладкой установленных производственных линий и валидационных работ. Во многом такое развитие субъектов национального рынка и подтолкнуло их к совместному сотрудничеству.

В рамках подписанного соглашения предусмотрено партнерство в широком диапазоне форматов в области научного развития отрасли и конкретных направлений, на которых специализируются компании, входящие в фармкластер. Помимо этого, предполагается и совместное участие в разработке, создании и обеспечении инновационных, прежде всего импортозамещающих, технологий производства для фармацевтической, химической и биотехнологической отраслей путем инвестиционных, научно-исследовательских и индустриальных работ, программ и специальных проектов. Партнерство рассчитано на пятилетний период с возможностью дальнейшего продления. Более того, такое партнерство позволяет компаниям-членам фармкластера рассчитывать на особые условия, дополнительные преференции и, конечно же, дисконтные программы в части поставок высокотехнологичного оборудования, проработки и оснащения производственных линий фармпредприятий Калужской области.

Напомним, что стратегические соглашения, предусматривающие совместное участие в подготовке технико-экономических обоснований и бизнес-планов, на основе которых в последующем проводятся инвестиционные исследования и НИР и НИОКР, необходимые для анализа и оценки степени рискованности капиталовложений, а также полная подготовка проектной, технологической и иной сопутствующей документации по созданию фармпредприятия по стандартам GMP, для ГК «Фармконтракт» явление не новое. Подобные соглашения заключены с Корпорацией развития Московской области, администрацией Томской области, рядом экспертных организаций и крупнейших отраслевых вузов страны. То же можно сказать и про Калужский фармацевтический кластер. В декабре 2016 года было заключено соглашение между Минэкономразвития России и правительством Калужской области о поддержке развития инновационного территориального кластера «Фармацевтика, биотехнологии и биомедицина» Калужской области.

В рамках сессии *«Новая русская фарма: диковинка или перспективная реальность»* представители компаний-участников Калужского фармацевтического кластера и профильных ассоциаций обсудили пути развития русской фармы, провели дискуссию на тему потенциально перспективных направлений дальнейшего развития для продвижения и выхода на более высокий и успешный уровень, обсудили вопросы, связанные с неприкосновенностью патентов и спросом на лекарственные препараты. Партнер, руководитель группы по работе с компаниями медико-биологических наук и здравоохранения «Делойт» в СНГ **Олег Березин**, представил исследование о приоритетных сценариях развития отрасли в России. В рамках презентации были озвучены ожидания от изменения ключевых финансовых показателей деятельности фармацевтических компаний.

Дискуссионная сессия *«Digital в фармацевтике и медицине»* была посвящена современным принципам работы в отрасли. Руководитель практики по работе с компаниями сферы здравоохранения и фармацевтики компании «КПМГ» в России и СНГ **Виктория Самсонова** представила исследование о глобальных тенденциях развития и проникновения новых технологий в фармацевтику и медицину. Участники поделились видением будущего телемедицины и перехода на современные принципы работы фармкомпаний, обсудили перспективы развития дистанционной торговли, электронного рецепта и подготовку к началу продаж рецептурных препаратов в Интернете, запуск технологии «Track & Trace» и отслеживание препаратов с помощью matrix и QR-кода. Также спикеры уделили внимание вопросу взаимодействия фармацевтических компаний, аптек, дистрибьюторов, инкубаторов, технологических платформ и его влиянию на конечного потребителя.



Выступая на заключительной сессии *«Ценообразование и новые модели закупок»*, генеральный директор компании DSM Group **Сергей Шуляк** представил аналитический обзор динамики емкости фармацевтического рынка и государственных закупок, высказав предположение об умеренном росте рынка в 2017 году.

К дискуссии по видеосвязи присоединилась начальник отдела регулирования цен на лекарственные препараты ФАС России **Дарья Старых**, которая рассказала о проектах, реализованных службой за последние 2 года, и о ближайших планах. Участники обсудили новые системы эффективного взаимодействия государства и бизнеса, инициативы государства, роль Министерства здравоохранения и ФАС, долгосрочный контракт и риск девальвации, организацию льготного лекарственного обеспечения, закупки через дистрибьютора и оценку эффективности препарата, риск-шеринг и market access.

VIII ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «СТРАТЕГИИ ПРОДВИЖЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ТОВАРОВ И БРЕНДОВ»

10 апреля 2017 года в Москве прошла ежегодная конференция, которая собрала на одной площадке более 130 маркетологов и экспертов отрасли, обеспечивающих узнаваемость фармацевтической продукции. Организатором мероприятия выступила компания infor-media Russia. Информационную поддержку конференции осуществлял научно-производственный рецензируемый журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств».





В рамках практической панели *«Новые тренды в продвижении на фармрынке»* практические кейсы гуру маркетинга начали раскрывать с тезиса **Олега Фельдмана** (Ipsos Healthcare): «Новые времена – новые смыслы. Новая реальность для фармы. Сейчас нет связи между состоянием здоровья населения и экономическими показателями. Нет баланса между затратами и эффективностью. Маркетологи могут управлять только жизненным циклом продукта, брендингом, оптимизацией издержек». **Ольга Глазкова** (Alfa Wassermann Russia and CIS) подняла вопрос, нужно ли маркетологу в фарме медицинское образование и какие плюсы оно дает. Спикер подчеркнула, что маркетологу очень важно уметь определять последовательность действий: что нужно делать срочно, а что можно отложить. Также **Ольга Глазкова** проанализировала, где лучше работать маркетологу – в большой или маленькой компании, и разобрала плюсы и минусы крупных компаний и компаний среднего звена. По мнению спикера, компании среднего размера являют собой гармонию бизнеса и человеческого отношения, т.к. дают возможность максимально научиться. В завершение своего доклада спикер дала совет, как правильно подготовить презентацию: коротко и ясно, использовать схемы вместо слов, определить, какие будут финансовые потоки. «Никогда нельзя забывать про оптимизм: есть трудности, но мы знаем, как с ними бороться», – подвела итоги представитель Alfa Wassermann Russia and CIS. **Елена Бачинская** (UCB) рассмотрела глобальные тренды в здравоохранении и отметила, что пациентоориентированный подход улучшает бизнес-результаты. Она поделилась со слушателями инструментами, позволяющими трансформировать информацию в клиническую практику. **Максим Горошков** (Sova Digital) считает, что врачи – отличный инструмент продвижения рецептурных препаратов. Спикер привел статистику, согласно которой 74% врачей используют Интернет по рабочим вопросам, а урологи используют Интернет чаще, чем любые другие врачи. На данный момент существует целый ряд порталов, где легко можно найти врачей. Согласно последним данным врачи заходят в социальные сети далеко не каждый месяц, это стоит учитывать при подготовке рекламной кампании. Но при этом врачи активно используют Интернет: от 1 до 6 ч в день. В заключение своего доклада Максим сделал вывод: врачи любят яркие и интересные проекты, но при этом врачу важна польза от вашего продукта.

После завершения практической панели открылась мастерская маркетинга в фарме. **Евгения Ламина** и **Артем Жаворонков** («НоваМедика») провели мастер-класс *«Тайны и возможности P&L: все, что вы хотели знать об этом, но боялись спросить»*. Спикеры рассмотрели стадии появления нового продукта: исследования и разработка (от 2 до 10 млрд





стоит разработка 1 молекулы), производство (этапы, на которых компания только несет траты) и коммерциализация (стадия, на которой все затраты должны вернуться). Также представители «НоваМедика» рассмотрели схему продвижения препаратов и уточнили, что при разработке маркетинговой стратегии нужно помнить: доходы и расходы меняются неравномерно и период нужно рассматривать не год или два, а 5 лет.

Игорь Климанов («ПрофитМед») и **Евгений Гордеев** (BREFFI) на мастер-классе *«Контент-маркетинг – «король» продвижения в мультиканальной маркетинговой системе»* подняли вопрос развития коммуникаций на фармрынке: «Сейчас конкуренция между контентами», – подчеркнули спикеры. Как успеть повлиять на врача за 5 мин визита? Только высокое качество контента и грамотные методы его донесения позволят пробиться через информационный шум. **Игорь Климанов** подробно рассмотрел стратегию контент-маркетинга: контент-аудит, контент-маркетинговый анализ, постановка целей контент-маркетинга, создание контент-плана.

ников стоит разделить на тех, кто присутствует на работе согласно трудовому кодексу, но не стремится достигать каких-либо результатов, и тех, кто заинтересован в результате. Согласно классификации, представленной спикером, все работники делятся на «победоголиков» (тех, на ком держится весь рабочий процесс), людей, которые находятся в зоне комфорта и пришли не побеждать, а участвовать, и «сачков» (людей, которые на работе находятся вне зоны комфорта). Спикер призвал внимательно следить за балансом сил в коллективе, чтобы достигать поставленных целей.

Татьяна Стародубцева (Battersea Power Marketing RUS) в практической панели *«А кому сейчас легко? Секреты развития брендов в условиях недостатка бюджета»* обратила внимание слушателей на то, что врач не будет тратить своё время, чтобы перевести сложный медицинский язык со множеством терминов на язык простой и доступный пациентам, поэтому информацию о препарате нужно преподносить максимально просто.





В своем мастер-классе *«Психология продавца: когда планы кажутся труднодостижимыми»* **Сергей Белобородов** (Sentiss Rus) провел градацию целей при постановке задач маркетинговой компании: исчислимые, неисчислимые, условно-исчислимые. Также по отношению к работе всех сотруд-

В своем докладе *«Сложности при оценке госпитального рынка»* **Александр Рудин** («Верофарм») напомнил, что дистрибьютор не только логист, а бизнес-партнёр для администратора здравоохранения, который влияет на выбор ТН и формирование документации. **Александр** привел основные источники



цифр рынка: базы данных о продажах, базы данных о торгах, собственные данные о загрузках и открытые источники (вести с полей, слухи и т.д.).

На мастер-классе **Владислава Утенина** *«Эффективные технологии управления», «Тонкости профессиональной коммуникации на фармацевтическом рынке: ошибки, методики формулировки и психология восприятия целевыми аудиториями»* не было свободных мест! Спикер в самом начале мастер-класса призвал работать с тем, что имеешь: конкретный работодатель, сотрудники, препараты.



Также делегаты узнали об особенностях коммуникации: законе 7±1, когда работник может одновременно вести не более 7 проектов/заданий; о том, что одновременно запоминаются только 3 ключевых сообщения и о классических MEMax (психических вирусах, которые работают в бессознательной области и живут в голове сами по себе). Спикер призвал помнить, что только 30% информации остается в голове после первоначального преподнесения, и быть внимательными с мутацией ключевого сообщения, которая может привести к необратимым последствиям.

Дмитрий Орехов («Гильдия Маркетологов») рассмотрел теорему эффективности продвижения лекарственных средств в условиях роста цены на телерекламу. Он разобрал схему принятия решения при покупке и рассказал о мероприятиях по оптимизации маркетинга. При хорошем знании своей торговой марки можно правильно разместить логотип таким образом, что он будет заметен и на упаковке, и в инструкции.

Екатерина Сычёва и **Андрей Черкашов** (PA «РОССТ») в докладе *«Символьная дифференциация в продвижении фармбрендов»* рассмотрели задачи символов в рекламе фармацевтических препаратов: выгодно показать преимущества или создать образ препарата-лидера; сложное показать просто; показать проблему без физиологии; уникально дифференцировать бренд в высококонкурентном мире; уйти от рекламных штампов. В заключении сессии докладчики привели в пример несколько реальных кейсов из практики.

Дмитрий Щуров (Pfizer в России) в мастер-классе *«Эпоха Digital marketing: ожидания, реальность, сложности и пути их преодоления»* отметил, что появляется все больше каналов информации и роль медицинских представителей должна бы падать, однако это не так: представитель управляет потоком информации и регулирует информацию, которая попадает к врачу. Замены медицинскому представителю на данный момент нет, поэтому очень важно через представителя предложить врачу тот контент, который ему интересен.

Мария Русинова («Буарон»), **Наталья Павлова** (Johnson & Johnson) и **Елена Кольцова** («НАНОЛЕК») приняли участие в вечернем дискуссионном клубе *«Что делает фармотрасль для укрепления своей репутации среди населения?»* Спикеры рассказали о программах благотворительности и волонтерских программах, которые проходят в их компаниях. **Наталья Павлова** подчеркнула, что внутрикорпоративные программы все больше входят в повседневную жизнь сотрудников.

Елена Кольцова убеждена, что о таких инициативах можно и нужно говорить больше, чтобы увеличить вовлеченность населения. «Программы социальной ответственности являются инструментом лояльности и дополнительной мотивацией для сотрудников», – заключила **Мария Русинова**.

После завершения деловой программы были подведены итоги конкурса на лучший телевизионный ролик ОТС-препарата. Почетное 1 место заняла компания «Космофарм» с роликом о препарате «Глицин D3». 2 место у «ФармФирмы «Сотекс» и ролика «Амелотекс». А 3 место досталось компании «Сэлвим» с рекламой препарата «Галавит».

Материал подготовлен совместно с компанией infor-media Russia

«АНАЛИТИКА ЭКСПО»

11–13 апреля 2017 года в КВЦ «Сокольники» прошла юбилейная, 15-я Международная выставка лабораторного оборудования и химических реактивов. Самая крупная и главная в России выставка в области аналитической химии – место, где демонстрируется лабораторное оборудование, мебель и материалы для комплексного оснащения различных производственных объектов, научных лабораторий, объектов здравоохранения и государственных учреждений. Каждый год выставка устанавливает своеобразные рекорды. Так, в 2017 году в ней приняли участие 238 компаний из 19 стран мира, которые представили оборудование для аналитических лабораторий самых различных отраслей промышленности. Постоянным золотым спонсором важнейшего отраслевого мероприятия выступил ведущий химико-фармацевтический холдинг России ГК «Фармконтракт», а генеральными информационными партнерами стали отраслевые издания, выпускаемые рекламно-маркетинговым агентством «Фармконтракт Медиа» – ваковский журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» и первый журнал о надлежащей производственной практике в России «Новости GMP».



11 апреля в Москве открылась главная выставка России и СНГ, консолидирующая интересы лаборантов фармацевтической, химической, пищевой, нефтяной промышленности, директоров по контролю качества и руководителей научных центров – всех тех, чья повседневная работа связана с лабораторными исследованиями различных продуктов. Как отмечают организаторы «Аналитики Экспо», ключевыми участниками выставки являются отечественные и зарубежные производители и поставщики лабораторного оборудования и аналитических приборов, лабораторной мебели и посуды, пластика, расходных материалов, химических реактивов. Среди постоянных посетителей мероприятия – специалисты научных и производственных лабораторий, государственных учреждений, здравоохранения и различных отраслей промышленности:

химии, фармацевтики, производства продуктов и напитков, металлургии, экологического мониторинга и многих других. В этом году выставку посетили 6 069 специалистов из 28 стран мира и 65 регионов России. Особый интерес гостей мероприятия привлекла экспозиция крупнейшего национального дистрибьютора технологического и лабораторного оборудования ГК «Фармконтракт». В этом году холдинг представил новую экспозицию «Город производителей», которая не просто позволила гостям мероприятия познакомиться с новинками в области лабораторного оснащения, а открыла возможность получить консультацию от представителей компаний-производителей.

Первый день выставки начался с мастер-класса специалистов Beckman Coulter, с которым крупнейший химико-фармацевтический холдинг России начал сотрудничество только в январе этого года. Однако уже сегодня посетители могли познакомиться со спецификой работы проточного цитофлуориметра **CytoFLEX**, являющегося незаменимым помощником научных сотрудников при исследовании бактерий, пролиферации и повреждения клеток, а также анализе их микрочастиц и иммунофенотипировании субпопуляции клеток. Помимо этого, интерес представителей фармацевтических лабораторий вызвал счетчик частиц в жидкости **HIAC 9703+**, необходимый для оценки качества продуктов, приготавливаемых по USP <788>, и анализатор определения общего органического углерода **QbD 1200**. Поскольку ГК «Фармконтракт» специализируется на реализации проектов «под ключ», инжиниринговое подразделение холдинга при создании комплексов чистых помещений успешно осуществляет кооперацию с представителями Beckman Coulter для определения соответствия чистых помещений стандарту ISO 14644. Для этих целей используется портативный счетчик аэрозольных частиц **MET ONE 3400**.



Что можно было увидеть, кроме новых производителей и хорошо знакомого оборудования?

Представление новинок – отличительная черта каждой выставки. «Аналитика Экспо» не стала исключением. Так, пожалуй, самый известный на рынке производитель аналитического оборудования, прибор которого есть в каждой лаборатории, Agilent Technologies представил для широкой аудитории вышедшую в конце 2016 года систему газовой хроматографии **Intuvo 9000**. Японский производитель высокоточного весового оборудования SHINKO DENSHI Co., Ltd. (бренд VIBRA) впервые показал новинку 2017 года – взрывобезопасные весы серии **FZ**, которые станут оптимальным выбором для лабораторных комплексов со взрывоопасными зонами «1» и «2». Новинки были представлены и для микроволнового синтеза – реактор **Monowave 50** от Anton Paar.

Впервые в выставке приняли участие сотрудники открытого в начале этого года российского представительства немецкого производителя оборудования для контроля качества лекарственных средств ERWEKA. Свое участие российский офис начал с представления таких новинок, как тестеры прочности **Erweka EasyCheck** и **Erweka Multicheck6**.



«Аналитика Экспо» – это не просто обширная выставочная экспозиция самого разнообразного лабораторного оборудования, но и не менее интересная деловая программа, которая начинается с самых первых часов открытия выставочного павильона. «Аналитика Экспо» предоставила специалистам широкие возможности профессионального роста. Организаторами мероприятий деловой программы выступили НП «РОСХИМРЕАКТИВ», Научный совет РАН по аналитической химии, ААЦ «Аналитика», Национальная ассоциация лабораторной, персонализированной и трансляционной медицины, ГК «Фармконтракт», которые ставили своей задачей создать условия для эффективных профессиональных коммуникаций и максимально полно осветить темы, волнующие профессионалов лабораторной диагностики и химического анализа предприятий различных отраслей промышленности, научных и медицинских лабораторий. Только семинар *«Аналитическая экспертиза и современные методы контроля качества лекарственных средств и продуктов питания»*, который традиционно прошел в первый день выставки, посетили порядка 150 специалистов лабораторных центров. С чем связан такой интерес к, казалось бы, рядовому на-



учно-практическому семинару, организованному на площадке выставки лабораторного оборудования и химических реактивов? Как пояснили организаторы, представители ГК «Фармконтракт», многие годы самый большой конференц-зал «Аналитики Экспо» собирал специалистов из R&D-сектора и ОКК или сотрудников научно-исследовательских лабораторий пищевых производств, хотя многие методы контроля качества и фармацевтических продуктов, и продуктов питания схожи: для проведения большинства из них применяются одни и те же приборы. Например, к лабораториям фармацевтической и пищевой промышленности предъявляются схожие требования: по независимости и беспристрастности; по наличию аккредитации в соответствующих органах, ответственных за контроль качества находящейся в обращении на российском рынке продукции; по аттестации на проведение соответствующих видов исследований; по техническим требованиям, которые включают определенный перечень средств испытаний и измерений, набор реактивов; по компетенции (система менеджмента качества). Именно поэтому спикеры семинара часто проводили параллель, говоря о методах исследования в фармацевтической лаборатории ЦФА и лаборатории научно-методических работ, биологических и аналитических исследований ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова». Более того, свой доклад заведующая лабораторией научно-методических работ, биологических и аналитических исследований **Наталья Вострикова** начала с перечисления методов, которые ее сотрудники используют при контроле качества и безопасности пищевой продукции. Среди них присутствуют хорошо знакомые для фармлабораторий методы хроматографии и масс-спектрометрии. «Активно в настоящее время развиваются и внедряются в практику аналитических лабораторий методы масс-спектрометрических исследований, появляются новые источники ионизации. Основными преимуществами хромато-масс-спектрометрии являются: чувствительность; селективность/избирательность; высокая достоверность результатов; простота пробоподготовки; возможность анализа разных классов соединений; возможность библиотечного поиска неизвестных соединений», – подчеркнула спикер, делясь практическими кейсами ВНИИМП им. В.М. Горбатова. В своей работе сотрудники научно-исследовательского института используют такие аналитические приборы, как система экстракции **BUCHI** по методу Сокслета при извлечении жиров, атомно-абсорбционный спектрометр **Agilent 280Z**, различные ВЭЖХ-системы для определения микотоксинов, антибиотиков, гистамина, бензапирена, жиро- и водорастворимых витаминов, консервантов, меланина и многих других аналитов, анализа аминокислотного состава животного белка и состава свободных углеводов в мясе и мясных продуктах в соответствии с требованиями ГОСТ; ВЭЖХ с трехквадрупольным (QQQ) масс-детектором **Agilent 6410** для определения остаточных количеств антибиотиков в продуктах животного происхождения.

Второй день любого конгрессно-выставочного мероприятия всегда отличается наплывом посетителей – 12 апреля на выставку «Аналитика Экспо» пришло порядка 2 000 специалистов из аналитических лабораторий самых различных отраслей промышленности.

Что же интересовало гостей и почему они выбрали второй день?

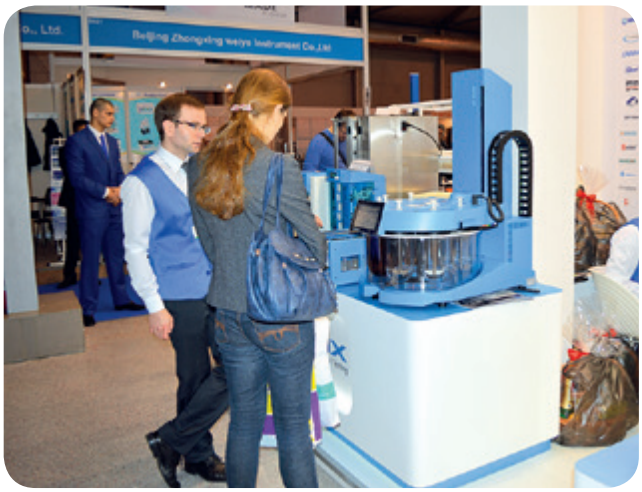
Как отмечает ряд специалистов event-индустрии, во второй день половину посетителей составляют те, кто в первый день отдал предпочтение деловой программе и не успел в деталях рассмотреть представлен-



ные новинки. А посмотреть было на что! Например, ведущий химико-фармацевтический холдинг России ГК «Фармконтракт» представил одну из самых широких (в рамках данной выставки) экспозиций систем растворения швейцарского производителя SOTAX. В частности, для сотрудников R&D- и QC-лабораторий был проведен мастер-класс по тестированию лекарственных форм по методам USP 1, 2, 5 и 6 с помощью тестера **SOTAX AT**. В рамках коллективной экспозиции «Город производителей» запущена ручная система растворения со встроенным термостатом **AT Xtend**™, позволяющая одновременно проводить исследование 8 образцов. В то же время данная модель может гибко комбинироваться с дополнительными модулями Xtend™, что позволит сотрудникам лабораторий автоматизировать процесс сбора и хранения образцов, а также автоматизировать ввод пробы в хроматограф для получения результатов в режиме реального времени. Помимо этого, швейцарский производитель привез для российских лаборантов **16-рядный коллектор фракций C615**, при использовании которого можно быть уверенным в репрезентативности отбора образцов и их хранении в 65 мл пробирках. Также на стенде была представлена ручная система **CE 7smart** с многоканальным поршневым насосом, которая позволяет проводить испытания различных лекарственных форм, даже плохо растворимых и модифицированных, по методу USP 4 («Проточная ячейка»).

Не меньший интерес сотрудники микробиологических лабораторий проявили и к инкубаторам с охлаждением по технологии Пельтье и традиционной системой нагрева **BINDER KT 115**, который уже оснащен новым контроллером с монохромным 5,7-дюймовым монитором, позволяющим осуществлять наглядное управление и задавать программу по дням недели. Также среди микробиологических продуктов от BINDER были представлены термостаты с естественной конвекцией **BD 115**, которые используют как фармацевтические лаборатории, так и микробиологические лаборатории пищевой промышленности, косметологии, химической и микробной аналитики, криминалистики для выращивания микроорганизмов в щадящих условиях или для нагрева при кондиционировании теплочувствительных сред. Замыкал продуктовую линейку BINDER в рамках представленной на коллективной экспозиции микробиологической лаборатории сухожаровой шкаф с естественной конвекцией **ED 115**, с помощью которого осуществляется сушка и стерилизация образцов и материалов любого типа.

Стоит отметить, что микробиологический сектор был представлен не одним производителем: впервые на стенде крупнейшего национального дистрибьютора технологического и аналитического оборудования демонстрировался французский анализатор для идентификации микроорганизмов **VITEK 2 Compact 30**. С



помощью этого анализатора от Biomereux происходит быстрое распознавание и определение чувствительности клинически значимых бактерий к антибиотикам.

Традиционно обширная линейка оборудования была представлена для лабораторий, специализирующихся на химическом синтезе: ротационный испаритель **BUCHI R-300**, который может быть задействован, например, при определении масел и смазок в образцах воды или в процессе пробоподготовки образцов органических веществ, автоматический дистиллятор **K-375** со встроенным титратором и система экстракции по Сокслету **E-812 SOX**, БИК-Фурье-анализатор **NIRFlex N-500**, дигестор **K-439**, представляющий собой первый инфракрасный сжигатель с температурным контролем, скрубер **K-415**, отвечающий за нейтрализацию паров, образующихся при кислотном разложении.

Последний день выставки «Аналитика Экспо» ознаменовался торжественными мероприятиями: ФБУ «РОСТЕСТ-Москва» провело церемонию награждения победителей конкурса на соискание знака качества «За обеспечение высокой точности измерений в аналитической химии», а ведущий химико-фармацевтический холдинг России ГК «Фармконтракт» и российский разработчик электронной системы документооборота фармацевтической системы качества ООО «ЛексФАРМА» подписали соглашение о сотрудничестве. В рамках данного соглашения холдинг, специализирующийся на создании и оснащении фармпредприятий «под ключ», получает эксклюзивные права на реализацию программного продукта «Оптимус-ФАРМА», обеспечивающего внедрение фармацевтической системы качества (ФСК), соответствующей требованиям GMP и имеющей класс GAMP5.

«Включение в портфель ГК «Фармконтракт» программного продукта, содействующего автоматизации системы документооборота на фармацевтическом предприятии, стало завершающим этапом в формировании компетенций инжинирингового подразделения по генеральному подряду, – отметил генеральный директор **Тимофей Петров**. – На сегодняшний день у



холдинга имеется значительное число референсов и еще больше новых проектов, от стадии проектирования до поставки технологического и аналитического оборудования и проведения пуско-наладочных работ для объектов фармрынка. В то же время подготовленный к прохождению государственного аудита на соответствие GMP фармобъект сталкивается с проблемой по управлению регламентирующими и регистрирующими документами, составляющими ядро ФСК. Как выбрать среди многообразия дистрибьюторов ПО и какое ПО позволит проходить все этапы от создания проекта документа до его архивирования для регламентирующих документов, от разработки бланка до достоверной копии записи для регистрирующих документов (записей)? Именно поэтому мы включили в наш портфель российского разработчика, продукт которого внедрен уже на ряде фармпредприятий и прошел испытания представителями российского GMP-инспектората».

«Мы очень рады, что уже в первый год выхода на рынок нашего «Оптимуса» продуктом заинтересовался такой холдинг, как «Фармконтракт». Хочу отметить, что вхождение в эксклюзивный портфель ГК «Фармконтракт» для такого молодого продукта является неплохим стартом. Надеемся, что у нас получится хороший тандем. Специалисты холдинга будут реализовывать продукт, а наши специалисты будут заниматься непосредственным внедрением программы на предприятиях и всеми процессами, которые с этим связаны, например обучением сотрудников предприятий, а также консультациями по внедрению СЭД «Оптимус-ФАРМА». И конечно, работать над новой версией программы, т.к. уже сейчас понятно, что фармпредприятия ожидают от такого продукта, как электронная фармацевтическая система качества», – пояснила генеральный директор ООО «ЛексФАРМА» **Олеся Зарочинская.**





Подводя итоги прошедшей юбилейной выставки, участники и гости отметили, что это событие является одним из ключевых в short-листе под грифом «must visit». Компании-участники встречаются с давними партнерами для демонстрации преимуществ нового оборудования, техническая модернизация которого позволяет решать все более сложные задачи; находят новых клиентов, которых привлекает возможность увидеть «живой» товар, провести сравнение его с аналогами и получить консультации. Гости и посетители выставки имеют уникальную возможность всего лишь в течение одного дня и в рамках одной площадки посетить как минимум 2–3 мастер-класса, получить ответы на постоянно возникающие в повседневной работе вопросы, связанные с прецизионностью исследований и спецификой эксплуатации приборов.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ СЕМИНАР «АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА И СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ»

11 апреля в КВЦ «Сокольники» в рамках юбилейной, 15-й Международной выставки «Аналитика Экспо» научно-производственный рецензируемый журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» при поддержке ведущего химико-фармацевтического холдинга России ГК «Фармконтракт» провел семинар по вопросам экспертизы и контроля качества лекарственных средств и продуктов питания, который посетили порядка 150 специалистов лабораторных центров. Проведение специализированного семинара для сотрудников ОКК и R&D-лабораторий в день открытия выставки уже несколько лет подряд обеспечивает существенный приток посетителей выставки, которые специально приезжают на это событие. В этом году организаторы семинара объединили темы, актуальные для фармацевтической и пищевой промышленности.



Семинар открылся с обзора и обмена опытом лабораторных центров, специализирующихся на различных видах исследований для фармацевтических компаний, по вопросам внедрения и специфики применения на практике стандартов GLP. Директор ООО «ЦФА», главный редактор научно-производственного журнала из перечня ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, *«Разработка и регистрация лекарственных средств»* к.фарм.н. **Игорь Шохин** представил взгляд лаборатории на проблемы сертификации. В частности, спикер поднял такой немаловажный вопрос, как выбор между процессами сертификации по стандарту ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и аккредитации, которую проводит Росаккредитация. Если лаборатория отдает предпочтение последнему пути, она рискует столкнуться с тем, что отсутствие биологических тест-систем может быть расценено как несоответствие стандарту. Кстати, в настоящее время в России порядка 10 аккредитованных лабораторий. Первой была лаборатория биологических испытаний Филиала ИБХ РАН в г. Пущино. При выборе пути прохождения сертификации лабораторный комплекс для получения сертификата о соответствии GLP должен заявить о своем желании пройти проверку в одном из органов по сертификации, который имеет право выбрать по своему предпочтению (географическое положение, статус экспертов и проч.).

Немаловажную роль в процессе сертификации лабораторного комплекса играет вопрос оснащения



Игорь Шохин

оборудованием. В контексте этой темы семинар продолжился презентацией от Agilent Technologies в сфере последних достижений в газовой хроматографии и масс-спектрометрии. Ведущий специалист по хроматографии **Константин Свирский** продемонстрировал возможности новинок американского производителя для фармацевтической отрасли. В частности, гости семинара и все желающие, кто не успел ранее посетить мастер-класс от Agilent Technologies, проходивший в марте, увидели в действии прибор, представляющий собой абсолютно новое слово в газовой хроматографии, – систему газовой хроматографии **Agilent 9000 Intuvo**. Это полностью интегрированное решение, включающее оборудование, расходные материалы, программное обеспечение и услуги, открывает перед пользователем уникальные технологические возможности. Например, герметичное соединение происходит менее чем за 2 мин, а промежуточная оптимизация между циклами – всего за несколько минут. Стоит отметить, что представленное интегрированное решение в настоящее время является вершиной эволюции газовой хроматографии компании, прошедшей этапы от микропроцессорного и электронного контроля потоков, капиллярных технологий до производства тройных квадруполей, а сейчас и интуитивных инновационных систем. Новые системы газовой хроматографии не требуют обрезания колонок, имеют простые соединения без феррул, что позволяет уменьшить количество незапланированных простоев, имеют одноразовый Guard chip и модули потоков Intuvo flow clips, обеспечивающие инновационный тракт пробы и максимальную «чистоту» анализов, а также защиту колонки и ионного источника.

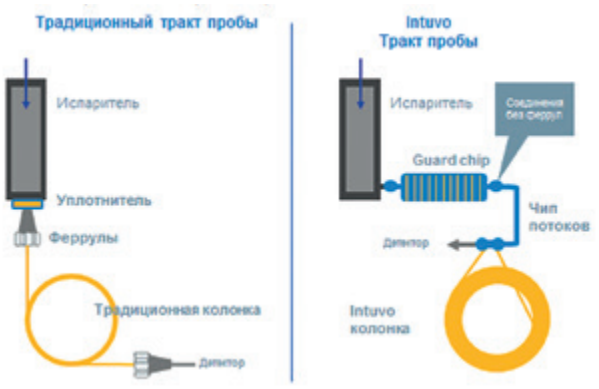


Рисунок 1. Инновационый тракт пробы

Таким образом, **Agilent 9000 Intuvo** существенно упрощает работу лаборантов за счет устранения сложных аспектов технического обслуживания и эксплуатации, которые требуют высокой степени мастерства.

Практический аспект разработки и валидации методик анализа лекарственных средств в GLP-окружении представил заместитель генерального директора по науке и развитию ООО «ЦФА» к.фарм.н. **Юрий Медведев**. Спикер акцентировал внимание участников семинара на том, что в ходе выполнения НИР до вступления в силу приказа Минздрава России № 199 н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» лабораторному центру достаточно было соблюдать инструкции к оборудованию и вести журнал химика-аналитика. С вступлением в силу правил GLP требуется соблюдать все СОПы, вести журналы на хроматографы, весы, pH-метр и другое оборудование, знать и соблюдать рабочие инструкции, составлять планы исследования (и использовать его). С учетом этих требований был проведен ряд исследований, о которых **Юрий Владимирович** детально рассказал в своем докладе: определение антител к комплексу PF4-гепарин в сыворотке крови и валидация методики количественного определения декскетопрофена (S-энантиомера кетопрофена) в плазме крови для целей проведения исследования биоэквивалентности.

Руководитель российского представительства немецкого производителя оборудования для контроля качества лекарственных средств ERWEKA презентовал современные подходы, разработанные специалистами компании для оптимизации работы лабораторных и R&D-центров. Немецкий производитель тестеров для контроля качества лекарственных средств различных форм – единственная компания в мире, выпускающая тестеры растворения по всем 7 методам USP. В портфеле компании представлены как базовые тестеры растворения (**DT 128 ligth**) для ручного отбора проб, так и полуавтоматические оффлайн/онлайн и полностью автоматические системы, позволяющие проводить испытание на растворимость лекарственных форм по методам USP 1 и 2.



Представитель компании познакомил участников семинара *«Аналитическая экспертиза и современные методы контроля качества лекарственных средств и продуктов питания»* и с новинками оборудования, которое пригласил посмотреть вживую на стенде компании. Среди демонстрируемых для отделов контроля качества фармпредприятий тестеров представлены бесшумный и универсальный тестер прочности **MultiCheck 6**, позволяющий определять до 5 параметров таблеток: прочность, массу, диаметр/длину, толщину и ширину облонгов; и новый тестер растворения **Erweka DFZ II**, работающих по методу «Проточная ячейка», который подходит для суппозиториев на липофильной основе.

Специалист по счетчикам и анализаторам частиц Beckman Coulter Life Sciences **Ирина Сахарова** представила решения для контроля качества входного сырья, очищенной воды и готовой лекарственной продукции. «Оборудование Beckman Coulter Life Sciences широко используется на разных этапах производства и контроля качества сырья и растворителей, мониторинга технологических процессов, контроля качества активных фармацевтических ингредиентов и готовой продукции, контроля качества воды», – отметила **Ирина Сергеевна** в начале своего выступления. Затем спикер проиллюстрировала каждый этап производственного контроля примерами: для определения размера частиц в микронном и субмикронном диапазонах при анализе диспергированных образцов в жидкости или порошков в воздухе рекомендуется применять метод лазерной дифракции (ОФС.1.2.1.008.15), который лежит в основе анализатора **LS 13 320**. Для широкого спектра задач по подсчету и определению размера частиц, контроля их однородности по размеру, определения механических включений, контроля качества различных материалов и жидкостей, как правило, используют кондуктометрический метод, с помощью которого происходит разделение частиц, сильно отличающихся от стандартного размера частиц в образце. Идеальным решением этой задачи станет оснащение лабораторного центра анализаторами **Multisizer**. Более того, данный прибор позволит проводить определение невидимых механических включений в лекарственных формах для парентерального применения по ОФС.1.4.2.0007.15 и определять концентрацию микробных клеток в соответствии с ОФС 1.7.2.0001.15. Мониторинг технологических процессов предполагает и определение жизнеспособности клеток. С помощью анализатора **Vi-Cell XR** определить процентное содержание таких клеток можно в течение нескольких минут за счет автоматизации метода определения жизнеспособности клеток по включению трипанового синего.

Завершился семинар обзором возможностей от BINDER в сфере решений для контроля качества готовой продукции на предприятиях фармацевтической промышленности. «Ежегодно BINDER производит более 22 000 единиц оборудования для использования в научных и производственных лабораториях различного профиля», – отметила менеджер по развитию бизнеса в СНГ из BINDER **Раиса Чурикова**. Все оборудование BINDER можно представить в виде трех основных групп: сушильные шкафы, инкубаторы/термостаты, климатические и испытательные камеры, с помощью которых сотрудники микробиологических лабораторий ОКК выращивают микроорганизмы в щадящих условиях, проводят инкубирование теплочувствительных сред и решают широкий спектр других прикладных задач.

Научно-практический семинар *«Аналитическая экспертиза и современные методы контроля качества лекарственных средств и продуктов питания»* снова установил рекорд по посещению. Организаторы связывают популярность серии семинаров, проводимых в рамках крупнейших химико-фармацевтических выставок, с актуальными вопросами, которые выносятся на повестку обсуждения, и форматом проведения семинара, когда теория сопряжена с практикой.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «ЭКСПЕРТИЗА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ» («ЕАЭС – РЕГЛЕК – ЕАЭС – 2017»)

25 апреля 2017 года ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России совместно с Минздравом России провёл научно-практическую конференцию по вопросам экспертизы и регистрации лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза. Представители органов государственной власти, в компетенцию которых входят вопросы обращения лекарственных средств, участвующие в процессе гармонизации российского законодательства со странами-членами ЕАЭС в рамках формирования единого фармацевтического рынка, рассказали о текущем состоянии нормативно-правовой базы в сфере обращения лекарственных средств в ЕАЭС, тенденциях и особенностях переходного периода в регистрации и экспертизе новых лекарственных средств. Помимо этого, на конференции были подробно разобраны требования, которые наднациональные регуляторные органы будут предъявлять к показателям качества различных групп лекарственных средств, а также к проведению доклинических и клинических исследований лекарственных средств.

Пленарное заседание первого официального мероприятия от российских регуляторов началось с обсуждения актуальных вопросов регулирования обращения лекарственных средств в Евразийском экономическом союзе: уровни регулирования, основные положения принятых и разрабатываемых нормативных актов, особенности переходных периодов. Как отметил заместитель начальника отдела координации работ в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий департамента технического регулирования и аккредитации ЕЭК **Дмитрий Щекин**, вынесенные на обсуждение в пленарной части конференции вопросы отражают многогранность работы по созданию единой информационной системы в сфере обращения лекарственных средств, которая ведется сразу по нескольким направлениям (рисунок 1).

Данная система должна быть разработана к октябрю – ноябрю 2017 года, поскольку действующая в настоящее время децентрализованная процедура регистрации лекарственных средств после официального старта работы единого фармацевтического рынка ЕАЭС «работать не сможет». Директор департамента государственного регулирования обращения лекарственных средств Минздрава России **Арсалан Цындымеев** пояснил, что в настоящее время происходит отработка формата стандарта передачи данных: «Планируется, что по окончании работ будет проведен тестовый анализ взаимодействия всех информационных систем пяти стран, и это будут рельсы, по которым тронется поезд. В настоящее время мы ставим перед информатизаторами вопросы, связанные с окончанием работ, со сроками возможного ввода в эксплуатацию этих систем. Информатизация – самая актуальная

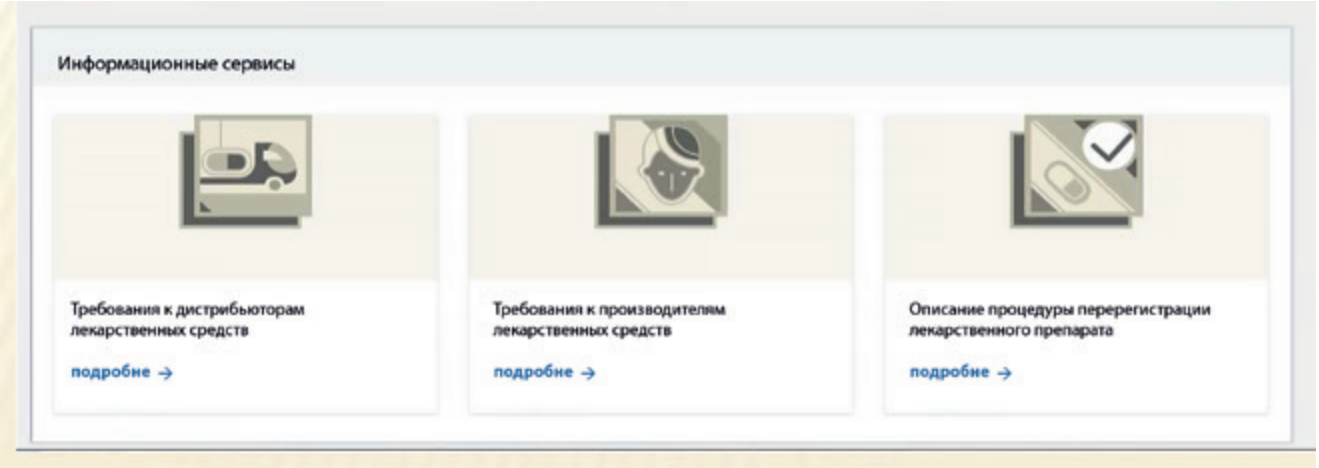


Рисунок 1. **Прототип информационной системы по лекарственным средствам**

задача на сегодняшний день, остальные в основном все решены». Также **Арсалан Гармаевич** представил участникам конференции обзор мирового опыта формирования регионального подхода к регулированию обращения лекарственных средств, который лег в основу формирования ключевых положений ряда документов ЕАЭС для фармацевтического рынка.

ВОЗ описывает регуляторную деятельность в сфере обращения лекарственных средств как деятельность, направленную на совершенствование правового регулирования хозяйственных отношений, а также административных отношений между уполномоченными органами, экспертными учреждениями и субъектами хозяйствования (заявителями, производителями, врачами, пациентами, потребителями), недопущение принятия экономически нецелесообразных и неэффективных регуляторных актов, устранение препятствий для развития хозяйственной деятельности, осуществляемой в рамках, в порядке и способом, которые установлены законами. В этой связи регистрация лекарственных средств является одной из основных регуляторных процедур в сфере обращения лекарственных средств наряду с лицензированием, стандартизацией, контролем качества лекарственных средств и фармаконадзором. При этом структуры ЕАЭС заняли соответствующий региональный уровень формирования подходов к регулированию обращения лекарственных средств в сложившейся и действующей на сегодняшний день географической модели (рисунок 2). Так, международные организации, формирующие подходы к регулированию обращения лекарственных средств, по сути своей являются мировой платформой для регистрации клинических испытаний, разработки норм, стандартов и руководящих принципов по обеспечению качества, рекомендаций и требований к регистрации фармацевтического продукта и гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для человека. А региональные интеграционные объединения призваны в первую очередь обеспечить гармонизацию регулирования обращения лекарственных средств в контексте экономической и политической интеграции, «общих» региональных соглашений, а также в рамках специальных межправительственных соглашений.

С учетом данного факта, при разработке новой региональной модели регулирования обращения лекарственных средств была сформирована схема сходств и различий, на основе которой и были определены ключевые элементы для рынка ЕАЭС (рисунок 3). Так, при подаче (в электронном или бумажном виде) заявления о регистрации предполагается действие двух процедур: децентрализованной (до 210 дней) и взаимного признания (210 дней + n×100). При этом подтверждение регистрации производится однократно и в срок не более 120 дней. В конечном счете нормативно-правовые акты в рамках ЕАЭС должны заменить различающиеся национальные требования государств-членов в сфере обращения лекарственных средств с учетом лучших международных практик.

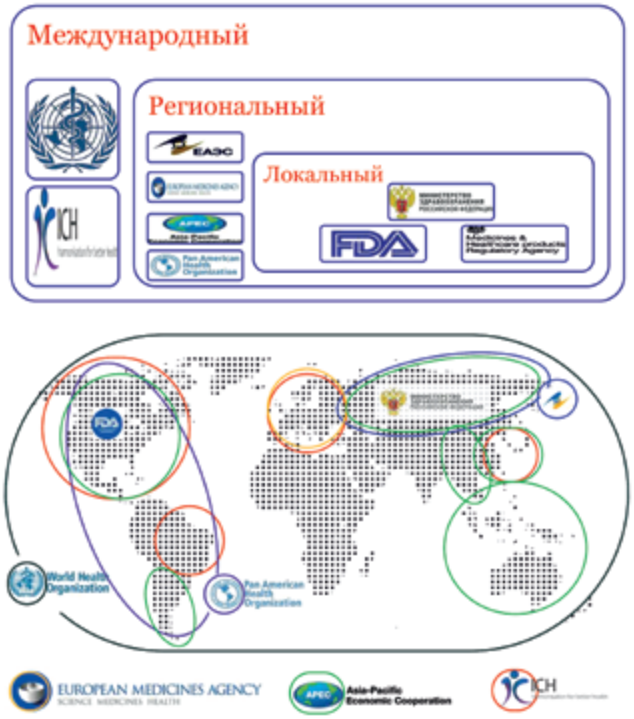


Рисунок 2. Уровни формирования подходов к регулированию обращения лекарственных средств

Что касается вопроса гармонизации государственных фармакопей государств-членов ЕАЭС, то здесь, как пояснил **Арсалан Цындымеев**, требования Фармакопеи ЕАЭС, которая имеет первый уровень приоритетности в процессе гармонизации, должны соблюдаться при обращении лекарственных средств на территории всех государств-членов. В то же время в условиях динамично развивающегося мира и бурного развития технологий для обеспечения надлежащего функционирования общего рынка лекарственных средств следует не реже 1 раза в 5 лет проводить актуализацию Фармакопеи ЕАЭС.

Руководитель Росздравнадзора **Михаил Мурашко** в рамках доклада *«Отдельные аспекты обеспечения качества лекарственных средств»* познакомил участников конференции с итогами работы ведомства за 2016 год, которая позволила выявить и пресечь обращение контрафактных лекарственных средств, тем самым обеспечив защиту прав около 8,5 млн граждан. Так, из обращения было изъято 7 243 018 упаковок недоброкачественных и фальсифицированных лекарственных средств; ограничено обращение 1 149 410 единиц недоброкачественных, фальсифицированных и контрафактных медицинских изделий.

Среди достижений прошлого года **Михаил Альбертович** особо подчеркнул завершение процесса

Сходства	Различия			
	РФ	ЕС	США	ЕАЭС
Форма подачи: *бумажная / электронная* Срок действия первой регистрации: *5 лет* Частота подтверждения регистрации: *однократно*	Виды регистрации (дни)	• Процедура регистрации (130) • Процедура регистрации с учетом ускоренной экспертизы для орфанных, первых трех воспроизведенных и ЛП исключительно для применения несовершеннолетними (80)	• Централизованная (232) • Децентрализованная (300) • Процедура взаимного признания (180)	• Процедура регистрации нового ЛС (180) • Упрощенная процедура регистрации дженериков (180)	• Децентрализованная (210) • Процедура взаимного признания (210+n*100)
	Подтверждение / перерегистрация	60 дней	90 дней		120 дней

Рисунок 3. **Сходства и различия региональных моделей регулирования обращения лекарственных средств**



Рисунок 4. **Количество изъятых серий лекарственных препаратов**

формирования системы контроля за обращением лекарственных средств на всех этапах жизненного цикла: сформированы, утверждены и действуют правила надлежащей лабораторной, клинической и производственной практик, правила надлежащей практики хранения и перевозки лекарственных препаратов для медицинского применения, надлежащей аптечной практики лекарственных препаратов для медицинского применения, порядок осуществления выборочного контроля качества лекарственных средств для медицинского применения. Созданная система выборочного контроля лекарственных средств показала свою эффективность: количество уничтоженных упаковок лекарственных средств, не соответствующих установленным требованиям, в 2016 году достигло 7 243 018, когда за аналогичный период 2015 года оно составляло всего 2 619 448.

Помимо этого, в 2016 году Росздравнадзор завершил создание информационной системы по контролю качества лекарственных средств.

Не обошел вниманием **Михаил Мурашко** и такие актуальные вопросы, как риск-ориентированный подход при осуществлении контрольно-надзорной деятельности и маркировка КИЗ. Среди целей риск-ориентированного подхода руководитель Росздравнадзора выделил снижение количества смертельных случаев по контролируемым видам деятельности в



Рисунок 5. Результативность выборочного контроля качества лекарственных средств (образцов ЛС)

сфере здравоохранения на 2% от уровня 2015 года к 2019 году и в дальнейшем на 1% ежегодно; снижение административных и финансовых издержек граждан и организаций, связанных с контрольно-надзорной деятельностью Росздравнадзора, не менее чем на 10% от уровня 2015 года к 2018 году и в последующем на 3% ежегодно; рост индекса качества администрирования контрольно-надзорных функций. Внедрение данного проекта должно привести к следующим результатам:

- Внедрение риск-ориентированного подхода при осуществлении контрольно-надзорной деятельности Росздравнадзора.
- Разработка и внедрение системы оценки результативности и эффективности контрольно-надзорной деятельности.
- Систематизация, сокращение количества и актуализация обязательных требований по контролируемым видам деятельности в сфере здравоохранения.
- Внедрение системы комплексной профилактики нарушений обязательных требований для юридических лиц и индивидуальных предпринимателей, осуществляющих деятельность в сфере здравоохранения (медицинская деятельность, оборот лекарственных препаратов, оборот медицинских изделий).
- Внедрение эффективных механизмов кадровой политики в деятельности Росздравнадзора по контролируемым видам деятельности в сфере здравоохранения.
- Внедрение системы предупреждения и профилактики коррупционных проявлений в контрольно-надзорной деятельности по контролируемым видам деятельности в сфере здравоохранения.
- Создание и внедрение комплексной модели информационного обеспечения и системы автоматизации контроля (надзора) в сфере здравоохранения.

Темы, поднятые спикерами в рамках пленарного заседания, продолжили обсуждать в рамках параллельных тематических сессий. Так, советник департамента технического регулирования и аккредитации ЕЭК **Анна Кравчук** более детально остановилась на вопросах регистрации лекарственного препарата по процедуре взаимного признания и децентрализованной процедуре (рисунки 6 и 7).

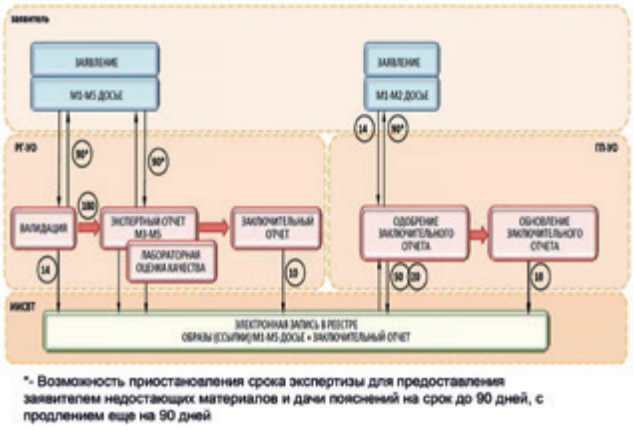


Рисунок 6. Схема регистрации по процедуре взаимного признания

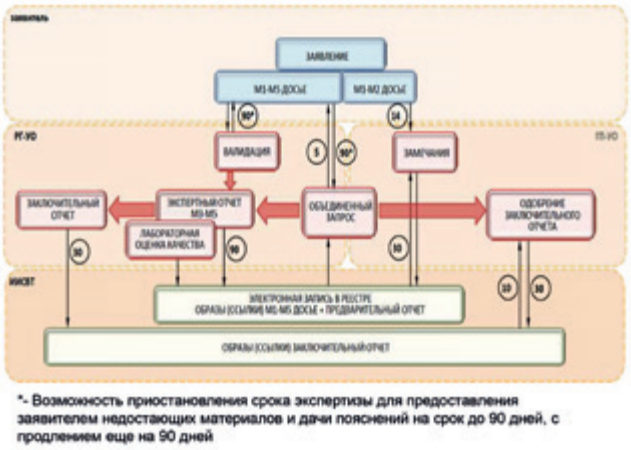


Рисунок 7. Схема регистрации по децентрализованной процедуре

В ходе процедуры взаимного признания и децентрализованной процедуры заявитель самостоятельно выбирает референтное государство и при необходимости государства признания, а референтное государство проводит экспертизу лекарственного препарата, включающую:

- оценку полноты, комплектности и правильности оформления документов регистрационного досье;
- оценку документов и сведений регистрационного досье лекарственного препарата на предмет безопасности, эффективности и качества;
- проведение лабораторных испытаний на соответствие требованиям НД по качеству и воспроизводимости заявленных методик контроля качества;
- инициирование при необходимости внеплановой (в случае выявления фактов, ставящих под сомнение достоверность сведений, представленных заявителем в регистрационном досье в отношении проведенных доклинических (неклинических) и клинических исследований (испытаний) лекарственных средств или производства лекарственного средства, включая производство фармацевтической субстанции или организацию системы фармаконадзора) или плановой фармацевтической инспекции;
- составление экспертного отчета.

Начальник управления организации государственного контроля качества медицинской продукции Росздравнадзора **Валентина Косенко** более детально рассказала о проекте по маркировке КИЗ лекарственных препаратов, о котором на пленарном заседании упоминал руководитель Росздравнадзора **Михаил Мурашко**.

Целями внедрения маркировки лекарственных препаратов контрольными (идентификационными) знаками являются:

- противодействие незаконному производству, ввозу и обороту лекарственных препаратов;
- противодействие недобросовестной конкуренции в сфере оборота лекарственных препаратов;
- стандартизация и унификация процедур учета поставок и распределения лекарственных препаратов, в том числе закупаемых для государственных нужд.

Таким образом, в ходе реализации эксперимента по маркировке должны быть решены такие задачи как:

- определение эффективности и результативности разрабатываемой системы контроля за движением на территории Российской Федерации лекарственных препаратов от производителя (импортера) до конечного потребителя в целом и каждого из участников рынка лекарственных препаратов в отдельности;
- определение изменений, которые необходимо внести в нормативные правовые акты Российской Федерации, регламентирующие сферу обращения лекарственных препаратов, в случае принятия решения о внедрении мониторинга за оборотом отдельных видов лекарственных препаратов;
- определение технических возможностей информационной системы, в которой будет осуществляться информационное обеспечение проведения эксперимента, и необходимости ее дальнейшего развития.

Как пояснила **Валентина Владимировна**, в настоящее время в эксперимент вошли свыше 30 фармацевтических производителей, 7 фармацевтических дистрибьюторов и свыше 300 медицинских и аптечных организаций, в том числе аптечные сети федерального и регионального масштаба (всего 10 субъектов Федерации: Москва, Московская область, Санкт-Петербург, Калужская, Самарская, Смоленская, Нижегородская области, Республика Башкортостан, Новгородская и Белгородская области). При этом «пионерами» эксперимента являются ЗАО «БИОКАД», ООО «Хемофарм», «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.», ООО «Пфайзер», АО «ОРТАТ», ООО «Сердикс», АО «НПК «Катрен», АО «Р-Фарм», ЦВ «Протек», ООО «НЕО-ФАРМ», 2 аптеки ГБУЗ «ЦЛО ДЗМ». По мере проведения эксперимента число участников будет увеличиваться. Предполагается поэтапное распространение эксперимента на все субъекты Российской Федерации, а также на труднодоступные населенные пункты с неустойчивой связью с ресурсами информационной системы.

Исполнительный директор СПФО **Лилия Титова** озвучила проблемы, которые видят участники проекта по маркировке в настоящее время (помимо финансовых):

- Сжатые сроки проведения пилотного проекта, в т.ч. для отработки процедур сериализации и агрегирования, и оценки его результатов.
- До настоящего момента законодательно не определена этапность внедрения маркировки по группам лекарственных препаратов.
- Не ясен до конца механизм участия дистрибьютора при переходе от пилотного проекта на масштабную маркировку: крупный дистрибьютор не может сканировать каждую упаковку на выходе, а может сканировать упаковки на входе только при наличии агрегации.
- Необходимо время для внесения в НД изменений, связанных с корректировкой макета вторичной упаковки лекарственного препарата (при масштабировании проекта в 2018 году).
- Не просчитано реальное время, необходимое для массового оснащения всех участников проекта, производящих лекарственные препараты для российского фармрынка.

РОССИЙСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ФОРУМ

16–17 мая 2017 года в Санкт-Петербурге прошло ежегодное международное мероприятие для руководителей международных и российских производителей, дистрибьюторов и розничных сетей фармацевтической отрасли. Независимая международная конференция в России от Института Адама Смита традиционно предложила гостям интересную программу, составленную на основе тщательного изучения профессиональных мнений и созданную специально для топ-менеджмента ключевых сегментов фармпромышленности. Как отмечают постоянные участники мероприятия, Российский фармацевтический форум – это площадка, на которой обсуждаются передовые идеи, происходит обмен опытом решения актуальных вопросов и взглядами на будущее фармацевтической индустрии России.





Первый день форума открыл доклад директора центра экономики и управления в здравоохранении Московской школы управления «Сколково» **Юрия Крестинского** о возможных путях развития фармацевтического рынка России, в котором были представлены результаты одноименного исследования. Так, в сфере лекарственного обеспечения и фармацевтической промышленности страны было выявлено порядка 80 проблем. Среди проблем в области лекарственного обеспечения была отмечена неэффективность системы государственных закупок: «Только 31% потребляемых лекарств в России обеспечивается за счет государственных средств, при этом средний уровень затрат государственного сектора на лекарственное обеспечение составляет 2400 руб. на человека. Очевидно, что 69% лекарственных средств, потребляемых населением, оплачивается самим пациентом, который принимает решение о выборе препарата на основе маркетинговой активности фармкомпаний. Лекарственное потребление не коррелирует со структурой заболеваний». Проблемы существуют и в сфере государственного регулирования отечественного фармпрома. Например, компании сталкиваются со сложностями при регистрации предельных отпускных цен на лекарственные средства из перечня ЖНВЛП; происходит трансформация законодательства в области R&D, доклинических и клинических исследований и т.д. В то же время в секторе R&D наблюдаются и такие объективные проблемы, как слабая инновационная среда, причиной которой спикер назвал отсутствие стимулирующих механизмов со стороны государственного сектора; не менее слабая инфраструктура НИОКР и доклинической базы, а также фактическое отсутствие до недавнего времени обязательных требований стандартов GLP. Аналогичные проблемы исследователями были обнаружены и в сегменте клинических исследований: отсутствие гармонизации национальных и международных стандартов проведения клинических испытаний, механизмов мотивации CRO для включения в международные клинические испытания, а также недостаточный уровень защиты результатов клинических испытаний как объекта интеллектуальной собственности. Среди регуляторных проблем, с которыми сталкиваются фармпроизводители при регистрации лекарственного препарата на территории Российской Федерации, **Юрий Крестинский** отметил требования проведения клинических испытаний в России и непризнание результатов клинических испытаний лекарственных средств, имеющих международное подтверждение их клинической эффективнос-

ти. Сам процесс регистрации может длиться до двух лет. Не заканчиваются проблемы и на производственном этапе. Здесь среди регуляторных проблем спикер выделил фактически неравные требования внедрения стандартов GMP для всех производителей, медленное лицензирование и проведение аудита производственной площадки на соответствие GMP, отсутствие системы надлежащего контроля качества лекарственных средств в промышленном производстве и механизмов повышения конкурентоспособности отечественных фармпроизводителей на экспортных рынках, офшорный статус местных производителей. В сегменте дистрибьюции и розничных продаж **Юрий Крестинский** выделил одни и те же проблемы: отсутствие надлежащего контроля за качеством лекарственных средств на протяжении всего периода их нахождения в рыночном обороте и отсутствие механизмов, способных предотвратить перепродажу лекарственных средств, закупленных за счет государственного бюджета.



Юрий Крестинский

Обозначенные в рамках открывающего форум ключевого выступления **Юрия Крестинского** проблемы спикеры конференции продолжили обсуждать на специальных сессиях и дискуссиях. В частности, ключевые игроки рынка обменялись мнением о государственных преференциях, которые получают отечественные компании на государственных торгах в рамках постановления Правительства РФ № 1289, и слабой заинтересованности зарубежных фармкомпаний в процессе локализации. Заместитель министра промышленности и торговли Российской Федерации **Сергей Цыб** высоко оценил меры господдержки отечественного производителя: «В 2016 году по сравнению с 2015 годом доля российских препаратов от ВИЧ-инфекции выросла с 23 до 28%, противотуберкулезных препаратов – с 49 до 74%. В стоимостном выражении доля российских препаратов превысила 30%. На сегодня в перечне ЖНВЛП более 81% МНН в готовой лекарственной форме производится российскими компаниями. Поэтому министерство продолжает работу над разработкой новых инструментов поддержки, в том числе для производителей фармсубстанций, – пояснил он действия Минпромторга России. – Сегодня рассматриваются два варианта: первый, когда будут отсекаться заявки, если есть 2 заявки на поставку препаратов из российской субстанции; второй – ценовые преференции для поставщиков препаратов из российских субстанций». В то же время **Сергей Анатольевич** не исключает ряд трудностей, которые могут возникнуть в процессе реализации каждого из вариантов: не всегда можно будет найти двух российских производителей субстанций определенного лекарственного препарата; существует угроза демпинга со стороны других участников. Именно поэтому, по словам **Сергея Цыба,** Минпромторг России ведет активное обсуждение с фармсообществом данных вариантов поддержки и учитывает интересы компаний, которые уже инвестировали в производство готовой лекарственной формы в России. «Нам необходимо найти баланс интересов участников рынка, российского здравоохранения, российской экономики», – заключил представитель Минпрома России.

Не столь оптимистичны производители. Например, генеральный директор «Sanofi Россия» **Наира Адамян** высказала всеобщее опасение участников фармрынка волной протекционизма в России: «Серьезно ведутся разговоры о том, что если нет производства субстанции в России, то ты практически не имеешь права торговать на российском рынке или будешь торговать по неконкурентной цене. Экономические расчеты показывают, что это нецелесообразно не только для глобальной фармы, но и для локальной фармы. Это повод для тревоги».

Солидарен с коллегой из иностранной компании и генеральный директор «Рош-Москва» **Ненад Павлетич:** «Локализация в России дает множество преимуществ иностранным компаниям, но решения о переносе технологий для производства тех или иных инновационных препаратов принимаются штаб-квартирами с большим трудом. Основной вопрос, который на сегодняшний день волнует игроков, – это предсказуемость инновационного развития российского рынка». В то же время иностранные компании готовы выводить на рынок инновационные продукты: «Только в онкологии на сегодняшний день 1,5 тыс.

продуктов находятся на различных стадиях клинических исследований. Следовательно, через 2–3 года на рынок выйдет около 200 инновационных препаратов для лечения онкологических заболеваний. Но вопрос о том, как мы можем сделать их доступными для российских пациентов при условии существования целесообразной системы использования бюджета», – обратил внимание участников отраслевой сессии **Ненад Павлетич**. Он предлагает применять существующие преференции к дифференцированному списку продуктов, поскольку локализовать все инновационные продукты на территории России иностранные компании не смогут.

При позитивной оценке деятельности Минпромторга России по созданию компетенций в фармпроизводстве, включая выпуск субстанций, председатель совета директоров «Р-Фарм» **Алексей Репик** все же с настороженностью относится к протекционистским мерам: «Концепции «третий лишний», «третий лишний плюс» имеют право на жизнь. Это благо для индустрии. Но при одном важном ограничении, если у нас много денег. При нашем ограниченном ресурсе, который мы стараемся растянуть, придется покупать задорого то, что должно стать дешевым». О том, что политика протекционизма должна быть разумной, говорил и президент компании «Активный компонент» **Александр Семёнов**, отмечая, что общегосударственный тренд на импортозамещение стал существенным стимулом для развития отечественной фармацевтической промышленности, что демонстрируют опережающие темпы роста индустрии в последние 3–4 года. Но возможности импортозамещения конечны, поэтому спикер видит настоятельную необходимость в создании дополнительных драйверов роста в области экспортоориентированности, что предполагает существенные вложения в усовершенствование производственной базы. Например, «Активный компонент» запустил собственную инвестиционную программу в рамках которой намерен вложить 2 млрд руб. в строительство фармацевтического завода в Санкт-Петербурге. «С запуском нового производства в 2019-2020 годах объем выпуска фармацевтических субстанций компании увеличится в 2,5 раза – до 80–100 тонн в год, а оборот вырастет в четыре раза – до 4,5 млрд руб. Новый завод компании будет в том числе экспортировать свою продукцию. Мы можем доказать иностранному потребителю, что в состоянии поставлять качественную субстанцию и конкурировать с индийскими, китайскими, европейскими производителями», – подчеркнул **Александр Семёнов**, отметив также, что шансы расширить рынок сбыта на другие страны есть у всех производителей, которые будут инвестировать в развитие как субстанций, так и производства полного цикла.



Алексей Репик

В ходе работы ежегодного майского форума, привлекающего на берега Невы ключевых игроков фармацевтического рынка, заместитель министра промышленности и торговли Российской Федерации **Сергей Цыб** в формате интервью дал разъяснения и относительно такого инструмента стимулирования развития отрасли, как СПИК. В рамках данного механизма в качестве мер поддержки инвестора рассматривается предоставление статуса российского продукта, единственного поставщика, налоговых преференций.

«Считаем, что статус единственного поставщика мы будем предоставлять тем компаниям, которые выпускают готовые лекарственные формы и в своих инвестиционных планах ставят задачу обеспечить производство полного цикла данного препарата на территории Российской Федерации, включая синтез субстанций», – обозначил позицию Министерства промышленности и торговли РФ **Сергей Цыб**. Также замминистра отметил, что на сегодняшний день в министерство поступило всего 7 заявок от фармацевтических компаний на заключение СПИК. Первые СПИКи в фармацевтической отрасли будут заключены после формирования необходимой нормативной базы на региональном уровне в разрезе федерального закона о промышленной политике.

В ближайшее время также будет выработано решение по дополнительным мерам поддержки производства субстанций в рамках закупок для обеспечения государственных и муниципальных нужд. Эта инициатива активно обсуждается при участии экспертного сообщества. В настоящее время рассматриваются несколько вариантов преференций компаниям, имеющим производство полного цикла или использующим фармацевтические субстанции российского производства, в том числе в виде ценовой преференции: «Будем формировать законодательное поле таким образом, чтобы поддерживать компании, которые разрабатывают собственные препараты на территории России, включая субстанции, в том числе синтезируют субстанции для препаратов, которые уже широко известны», – обозначил **Сергей Цыб**, отметив, что это будет сбалансированное решение, направленное на

технологическое развитие, создание новых компетенций в стране с точки зрения разработки и производства лекарственных средств и учитывающее важность сохранения объемов инвестиций, возможностей, которые имеют компании, выпускающие готовые лекарственные формы.

Отвечая на вопрос о статусе российского продукта, **Сергей Анатольевич** обратил внимание участников форума, что в постановление Правительства РФ № 719 «О критериях отнесения промышленной продукции к промышленной продукции, не имеющей аналогов, произведенных в Российской Федерации» планируется внесение изменений, которые позволят дать четкое определение статуса российского продукта: по каким направлениям в зависимости от выбора технологий, группы лекарственных препаратов и проч. Минпромторг России намерен оперативно провести такую работу совместно с Министерством здравоохранения Российской Федерации и готов принимать предложения по совершенствованию документа.

Стоит отметить, что буквально на следующий день после выступления **Сергея Цыба** премьер-министр Российской Федерации **Дмитрий Медведев** подписал постановление «О подтверждении производства промышленной продукции на территории Российской Федерации и внесении изменений в постановление Правительства Российской Федерации от 17 июля 2015 г. № 719». Данное постановление закрепляет критерии отнесения продукции к российскому производству:

- наличие СПИК, заключенного инвестором и Российской Федерацией или Российской Федерацией и ее субъектом или муниципальным образованием в целях создания, модернизации, освоения производства промышленной продукции и содержащего обязательство инвестора и привлеченного инвестором лица по поэтапному выполнению (со дня начала производства промышленной продукции инвестором или привлеченным инвестором лицом, но не позднее чем по истечении 3 лет с указанной даты) требований к промышленной продукции, предъявляемых в целях ее отнесения к продукции, произведенной на территории Российской Федерации;
- наличие акта экспертизы ТПП РФ о соответствии производимой промышленной продукции требованиям согласно приложению к данному постановлению Правительства Российской Федерации;
- наличие сертификата о происхождении товара (продукции), по которому Российская Федерация является страной происхождения товара (продукции), выдаваемого уполномоченным органом (организацией) государства-участника Соглашения, в случае отсутствия производимой промышленной продукции в приложении к постановлению Правительства Российской Федерации от 17 июля 2015 г. № 719 «О критериях отнесения промышленной продукции к промышленной продукции, не имеющей аналогов, произведенных в Российской Федерации».

Стоит также отметить, что постановление Правительства РФ предусматривает переходный период для производителей, которые получили в Минпромторге России документы об отнесении их товара к промышленной продукции, не имеющей аналогов, произведенной в Российской Федерации, а также документы о подтверждении производства промышленной продукции на территории Российской Федерации, до вступления в силу данного постановления. Этот переходный период определяется для каждого производителя индивидуально, что обусловлено сроком окончания действия выданных документов.

Помимо этого, в постановлении прописаны основные требования, которым должны удовлетворять заявления о выдаче заключения о подтверждении производства промышленной продукции на территории Российской Федерации, подаваемые производителем в Минпромторг России:

- наименование заявителя;
- ИНН, ОГРН или ОГНИП;
- адрес местонахождения;
- наименование производимой промышленной продукции и ее коды в соответствии с Общероссийским классификатором продукции по видам экономической деятельности ОК 034-2014 (КПЕС 2008), а также коды Единой товарной номенклатуры внешнеэкономической деятельности ЕАЭС;
- сведения о наличии документов, указанных в критериях подтверждения производства промышленной продукции на территории Российской Федерации, утвержденных постановлением Правительства РФ.

Подавая заявление в Минпромторг, компании следует проверить полноту пакета документов на предмет наличия заверенных руководителем компании:

- копий учредительных документов или копии свидетельства о государственной регистрации физического лица в качестве индивидуального предпринимателя;
- копий документов, указанных в критериях подтверждения производства промышленной продукции на территории Российской Федерации, утвержденных постановлением Правительства РФ;
- справки, содержащей информацию о функциональных, технических, эксплуатационных и качественных характеристиках производимой за-

явителем промышленной продукции; о товарных знаках, знаках обслуживания, фирменных наименованиях, патентах, полезных моделях, промышленных образцах заявителя промышленной продукции.

Получив данный пакет документов, Минпромторг России в течение 5 рабочих дней осуществляет проверку полноты и достоверности изложенных в них сведений, их соответствия положениям утвержденных правил и выдает заключение либо мотивированный отказ. В случае положительного решения заявитель (компания-производитель) становится правообладателем заключения о производстве российской продукции. Это заключение действует в течение 1 года с даты выдачи.

О чем еще говорили представители профильных органов государственной власти в сессии интервью и чем запомнилась вторая половина первого дня форума?

Помимо **Сергея Цыба**, в серии интервью Российского фармацевтического форума приняли участие член комитета Государственной Думы Российской Федерации по охране здоровья **Александр Петров**, который рассказал, что фармацевтический рынок остается одним из самых коррупционных, хотя многие законопроекты и направлены на решение этой проблемы; директор департамента по обращению лекарств и медицинских изделий Минздрава России **Елена Максимкина**, сообщившая об обновлении перечня ЖНВЛП 1 раз в год и подчеркнувшая, что заявки на включение препарата будут рассматриваться с января по октябрь текущего года. «Согласно действующему постановлению правительства заявки на включение в перечни лекарств своего препарата компании должны внести до 31 марта. Затем с апреля по октябрь комиссия Минздрава по формированию перечней передает решение в правительство, которое перед началом нового года выпускает соответствующее постановление. Сейчас есть проект поправок, которые предлагают увеличить срок рассмотрения заявок, то есть начать их рассматривать с февраля. Таким образом, у комиссии будет больше времени на более тщательное рассмотрение заявок», – сообщила спикер. Завершилась серия интервью выступлением начальника управления контроля социальной сферы и торговли ФАС России **Тимофея Нижегородцева**. **Тимофей Витальевич** отметил существенные изменения российского фармрынка за последние 10 лет: «Раньше на российском рынке, отличавшемся неразвитой регуляторикой, фармкомпаниям можно было практически все с точки зрения недобросовестных практик: создавать искусственные монополии, ограничивать доступ на рынок конкурентов. В последние десять лет взаимозаменяемость лекарственных препаратов стала частью российского законодательства и плана действий Минздрава и Минпрома России. Расследования обоснованности цен на лекарственные препараты ведутся с использованием индикативного метода, в основе которого также лежат принципы взаимозаменяемости аналогичных лекарственных препаратов. Кроме того, сегодня ФАС России имеет доступ к верифицированным источникам данных о цене на лекарства по всему миру. Количество этих источников растёт, что существенно сокращает возможности манипулирования ценами на лекарственные препараты». В то же время представитель ФАС отметил неутешительную картину по применению практики взаимозаменяемости лекарственных препаратов в регионах, дав ей определение как архаичной.

Первый день Российского фармацевтического форума был не только богат интересными докладами, но и отмечен торжественными подписаниями соглашений о стратегических партнерствах. Фонд «Сколково» и международная биофармацевтическая компания «АстраЗенека» договорились о сотрудничестве в научно-исследовательской и образовательной деятельности на территории Российской Федерации. Как отметила генеральный директор компании «АстраЗенека, Россия и Евразия» **Ирина Панарина**, в настоящий момент «АстраЗенека» изучает разработки компаний-резидентов «Сколково» в области онкологии. «Быть лидерами в науке – важнейший приоритет для «АстраЗенека». Работая в России уже не первый десяток лет, мы стремимся внести максимальный вклад в развитие локальных научно-исследовательских проектов. Мы рады иметь такого партнера, как «Сколково», который полностью разделяет наши ценности и мыслит инновационно. Уверена, что расширение направлений нашей совместной работы откроет новые перспективы», – прокомментировала сотрудничество с фондом **Ирина Панарина**. Вице-президент, исполнительный директор кластера биомедицинских технологий Фонда «Сколково» **Кирилл Каем** отметил, что подписанный меморандум – это следующий шаг в развитии стратегического партнерства с компанией «АстраЗенека»: «Речь идет о совместной работе между одним из лидеров мирового фармацевтического рынка и не-



сколькими стартапами «Сколково» в таких областях, как биоинформатика, разработка лекарственных средств. Особое внимание уделяется содействию разработкам инновационных методов лечения социально значимых заболеваний. Также мы договорились о поддержке образовательных инициатив, ориентированных на молодых российских специалистов». Партнерство в области онкологии стороны планируют продолжить в рамках совместного проекта по разработке инновационной платформы математического моделирования, позволяющей спрогнозировать терапевтический потенциал комбинаций новых онкологических препаратов и предсказать конечные точки результатов клинических исследований «АстраЗенеки» в сфере иммуноонкологии, реализуемых на территории России.

Завершился первый день форума сессией, посвященной первым итогам действия единого фармацевтического рынка ЕАЭС.

Второй день конференции был построен в формате параллельных фокус-сессий. Специальная сессия и дискуссия *«Промежуточные результаты внедрения системы маркировки и мониторинга движения лекарственных препаратов от производителя до потребителя»* привлекла широкое внимание в силу распространения накануне форума в ряде СМИ информации о дефиците импортных лекарственных препаратов из-за ведения обязательной маркировки. В преддверии выступления начальника управления организации государственного контроля качества медицинской продукции Росздравнадзора **Валентины Косенко** на **Российском фармацевтическом форуме** на портале ведомства появилось сообщение о том, что данная информация является недостоверной. Стандарты национальной системы маркировки в России не отличаются от европейских: в ходе реализации пилотного проекта по маркировке используются международные стандарты [в частности, ISO standards 16022 (Data Matrix) для носителя данных (контрольного (идентификационного) знака) и GS1 для идентификации продукции]. Опасения относительно того, что «зарубежные коллеги могут не успеть перестроиться на новые правила» необоснованы. «Ассоциации европейского бизнеса должно быть хорошо известно, что на территории ЕС с 9 февраля 2019 года вступает в силу делегированный нормативный акт (ЕС) 2016/161 от 2 октября 2015 г., в котором в качестве стандарта уникального идентификатора принят штрих-код Data Matrix, пригодный для машинного считывания, с функцией распознавания и коррекции ошибок эквивалентной или выше, чем у Data Matrix ECC200 [стандарт Международной организации по стандартизации / Международной электротехнической комиссии (ISO/IEC) 16022:2006]. Таким образом, используемые на территории Российской Федерации стандарты не отличаются от европейских и зарубежным коллегам не нужно перестраиваться под них, перестраиваться необходимо под требования ЕС», – указано на портале Росздравнадзора.

Утверждение о том, что «маркировки отличаются тем, что в российской есть информация о цене препарата и ТН ВЭД», также не соответствует действительности:

1) в идентификаторе нет информации о цене препарата (она может подгружаться);

2) в соответствии с делегированным нормативным актом (ЕС) 2016/161 уникальный идентификатор (Data Matrix) должен содержать 5 элементов (групп данных). При этом третья группа данных – это национальный номер возмещения (national reimbursement number) или другой национальный номер, идентифицирующий медицинский продукт. Российский идентификатор также содержит 5 групп данных, и ТН ВЭД в третьей группе – это и есть «другой национальный номер, идентифицирующий медицинский продукт».

Кроме того, ТН ВЭД позволяет системе маркировки определить, что перед ней именно лекарственный препарат, а не другой товар. Это технический вопрос, и он полностью соответствует требованиям в рамках ЕС.

Об этом же говорила и **Валентина Владимировна** в своем докладе на специальной дискуссионной сессии, развенчивая опасения юридических и консалтинговых фирм. Во избежание подобных инсинуаций начальник управления организации государственного контроля качества медицинской продукции Росздравнадзора пригласила всех заинтересованных участников фармацевтического рынка принять активное участие в рабочей группе и в серии вебинаров, запускаемых Росздравнадзором **с 22 мая 2017 г.**

Валентина Косенко рассказала участникам сессии и о проходящем межведомственное согласование проекте федерального закона «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в целях создания системы мониторинга движения лекарственных препаратов для медицинского применения». Этот проект предусматривает:

- нанесение контрольного (идентификационного) знака на упаковку лекарственного препарата для медицинского применения для целей ее идентификации;
- внесение информации о лекарственных препаратах для медицинского применения в систему мониторинга движения лекарственных препаратов. Обеспечение внесения этой информации становится обязанностью всех юридических лиц и индивидуальных предпринимателей, осуществляю-

щих производство, хранение, ввоз в Российскую Федерацию, отпуск, реализацию, передачу и уничтожение лекарственных препаратов для медицинского применения.

Представители компаний-участниц пилотного проекта по маркировке поделились своим опытом внедрения систем Track & Trace на производственных линиях, а директор по экономике здравоохранения «Р-Фарм» **Александр Быков** представил образец наносимого на препарат Герцептин® двумерного кода DataMatrix.



Однако не все так однозначно и гладко в вопросах маркировки. Например, директор департамента внешних связей STADA **Иван Глушков** предостерег членов рабочей группы Росздравнадзора по информационному сопровождению эксперимента от последствий, которые получили участники эксперимента «Платон», и обратил внимание участников сессии на ограниченность временного периода в вопросе подготовки фармпроизводителей к технологическому перевооружению и созданию соответствующей технологической базы для большинства из них. В продолжение данного выступления генеральный директор ГК «Фармконтракт» **Тимофей Петров** добавил, что крупнейший национальный дистрибьютор технологического и лабораторного оборудования расширил портфель маркировочных машин, которые могут заинтересовать не только участников пилотного проекта, но и фармпроизводителей с довольно скромным бюджетом, присматривающихся к предложениям рынка и готовящихся к внедрению закона о маркировке для всех субъектов обращения лекарственных средств.

Не меньший интерес участников форума вызвала и сессия от Минпромторга России и ФБУ «ГИЛС и НП», в ходе которой представители российского GMP-инспектората рассказали о текущем состоянии и степени готовности фармпроизводителей к аудиту, поделились информацией о том, какие несоответствия являются наиболее типичными и вызывают нарекания со стороны инспекторов.



Тимофей Петров

В рамках специальной фокус-сессии *«Как использовать Big Data в фарме?»* представители биофармацевтических компаний обсудили сложности по поиску производственных площадок для выпуска небольшой партии лекарственных средств. Директор по науке кластера биомедицинских технологий фонда «Сколково» **Эльмира Сафарова** среди сложностей, с которыми сталкиваются резиденты кластеров отметила поиск «производственной площадки, которая произведет небольшую партию лекарств для проведения клинических исследований. В других странах для этого достаточно выйти в интернет и выбрать компанию». Генеральный директор компании «Генериум» **Дмитрий Кудлай** обратил внимание участников сессии на тот аспект, что при разрешении регистрации препаратов после II фазы клинических исследований (в том случае, когда речь идет о прорывном лечении каких-либо заболеваний) можно ожидать ускорения процесса вывода лекарственных средств на рынок. Более того, поручение о разработке соответствующего законопроекта было сформулировано еще 2 года назад.

Российский фармацевтический форум от Института Адама Смита – это крупнейшее специализированное мероприятие, которое ежегодно собирает порядка 600 топ-менеджеров и руководителей профильных министерств на одной площадке для обсуждения глобальных тенденций развития фармацевтического сектора. Это место живых дискуссий и дебатов, в ходе которых вырабатываются оптимальные решения самых острых проблем текущего года. Именно поэтому форум продолжает удерживать первые места в рейтинге событий, обязательных к посещению.

ОБУЧЕНИЕ ПЕРСОНАЛА НА ФАРМПРОИЗВОДСТВЕ. ПОВЫШЕНИЕ КВАЛИФИКАЦИИ СОТРУДНИКОВ

Сегодня на рынке наблюдается тенденция к локализации производственных площадок зарубежных производителей лекарственных средств на территории Российской Федерации (ежегодно открывается до 7 новых производств), что сказывается на росте производственных вакансий: в 2016 году он составил 18% по сравнению с аналогичным периодом 2015 года. Этот тренд усиливает проблему кадрового дефицита персонала, которая неизменно сохраняется в фармотрасли. Федеральное бюджетное учреждение «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации провело исследование рынка труда фармацевтической отрасли, ключевой темой которого стало обучение и развитие персонала на фоне существующей проблематики.

Целью исследования рынка труда в фармацевтической отрасли стало выявление наиболее оптимальных форм обучения персонала на фармпроизводстве и определение самых востребованных форм повышения квалификации сотрудников. Для этого ФБУ «ГИЛС и НП» провел количественный опрос 95 фармпредприятий, расположенных на территории Российской Федерации, среди которых 18% имеют иностранный капитал, а 82% – российский.

Портрет респондентов

В опросе ФБУ «ГИЛС и НП» принимали участие специалисты, менеджеры различного уровня, руководители отделов и подразделений фармкомпаний, отвечающих за обучение, контроль качества и производство, и, конечно же, специалисты из HR департаментов.



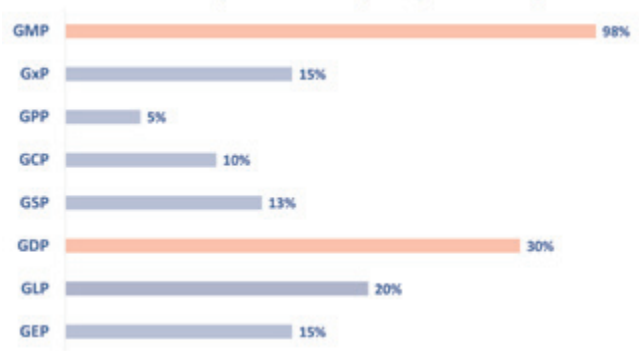
Среди специалистов, наиболее заинтересованных в повышении квалификации, можно выделить сотрудников отдела обеспечения качества, работников производственных цехов, специалистов по валидации и технологов. В меньшей степени интерес к участию в курсах повышения квалификации проявляют биотехнологи и вирусологи, менеджеры проектов разработки и трансфера технологий, специалисты производства радиофармпрепаратов, специалисты отделов регистрации и маркетинга, специалисты службы главного инженера.



По уровню персонала эта картина выглядит следующим образом:



Следует отметить, что на большинстве предприятий обучение проводится по ключевым практикам GxP.



Как организовано это обучение? Большинство компаний (78%) для этого привлекают сторонние организации. При этом средний бюджет на обучение одного сотрудника составляет 30 000 руб. в год. А количество внешних обучений в среднем составляет от 1 до 5.



Среди используемых форм обучения наиболее популярны вебинары и лекции преподавателей (физических лиц), привлечение экспертов практиков и тренинги.



В соответствии с предпочтениям к формам обучения распределилась и оценка их эффективности:



Несмотря на то что организацией обучения на предприятии сотрудники удовлетворены не полностью (частичную удовлетворенность отметили только 58% респондентов, в то время как 20% оценивают ее как неудовлетворительную), при оценке полезности таких мероприятий наблюдается заинтересованность сотрудников в обучении – всего лишь 3% не видят в таких мероприятиях никакого толка.

При оценке кадрового потенциала 80% респондентов указали наличие такой проблемы на своем предприятии. В то же время у 71% нет даже стратегии по преодолению кадрового «голода». При этом 46% респондентов отметили, что повышение квалификации сотрудника не является дополнительным аргументом при назначении на более высокую позицию или увеличении уровня заработной платы.

Таким образом, опираясь на результаты проведенного исследования, специалисты ФБУ «ГИЛС и НП» пришли к следующим выводам. Наибольшая потребность в обучении существует среди специалистов обеспечения качества (70%); специалистов, ответственных за валидацию, и работников служб производства (по 60% соответственно). По уровню позиции самая высокая потребность в обучении у ответственного персонала (руководителей производства, руководителей подразделений контроля качества, уполномоченных лиц). Самой актуальной надлежащей практикой, по которой проводится обучение на предприятиях, сегодня остается GMP. Порядка 80% предприятий привлекают внешних провайдеров для организации обучения. Средний бюджет на обучение одного сотрудника – 30 000 руб. в год. Наиболее распространенные формы обучения – вебинары (98%) и семинары (95%) преподавателей для физических лиц, а также привлечение экспертов-практиков (95%), которые, по оценке респондентов, обладают наибольшей эффективностью (63% поставили оценку «отлично»).

В целом существует зона роста для совершенствования процесса организации обучения на предприятиях: об этом говорит частичная удовлетворенность респондентов по направлению оценки обучения (58%).

В отрасли существует серьезная нехватка профессиональных кадров, что отразили 80% респондентов. При этом только лишь 29% имеют четкую стратегию по преодолению кадрового дефицита.

Международная выставка оборудования, сырья
и технологий для фармацевтического производства

International exhibition of equipment, raw materials
and technologies for pharmaceutical production

ufi Approved Event

pharmtech & ingredients



Организатор / Organised by

ITE

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

При поддержке / Supported by

СПФО

pharmtech-expo.ru

УДК 615.4

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИОННАЯ СИСТЕМА КАК ИНСТРУМЕНТ РАЗРАБОТКИ ДИЗАЙНА И ТЕХНОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

Н.Б. Демина[1]*

Резюме. В статье приведен анализ и систематизация подходов к обоснованию технологии лекарственных форм в зависимости от принадлежности фармацевтической субстанции (ФС) к определенному классу бифармацевтической классификационной системы (БКС). Растворимость и абсорбция, заложенные в основу БКС, являются важнейшими свойствами фармацевтических субстанций и должны служить факторами обоснования рецептур и технологий эффективных и безопасных лекарственных препаратов. В работе приведен обзор современных технологий улучшения биофармацевтических характеристик лекарственных субстанций, принадлежащих к различным классам БКС. Показано, что при создании лекарственных форм плохо растворимых ФС для повышения их биофармацевтических характеристик целесообразно использовать технологии повышения растворимости, для субстанций III и IV класса – повышения абсорбции. Описаны примеры дизайна лекарственных форм успешных лекарственных препаратов, выпускаемых фармацевтической промышленностью.

Ключевые слова: биофармацевтическая классификационная система, дизайн лекарственной формы, технология лекарственных форм, фармацевтическая разработка.

BIOPHARMACEUTICAL CLASSIFICATIOM SYSTEM AS A TOOL FOR THE DEVELOPMENT OF DRUG FORMULATIONS AND THEIR DESIGNS

N.B. Demina[1]*

Abstract. The article analyzes and systematizes approaches to justification of drug formulation technology, depending on the API`s biopharmaceutical classification system (BCS). The solubility and absorption inherent to BCS are the most important characteristic of pharmaceutical substances and should be the factor of rational justification of formulations and technologies for safe medicines. Article shows the overview of modern biopharmaceutical technology for improving the characteristics of API, which are belongs to different classes of BCS. Were shown that during the development of dosage forms with poorly soluble APIs is better to use technology solubility enhancement, for substances of IIIrd and IVth classes – needs to increase absorption. Article describes the design of dosage form of successful medicinal products.

Keywords: biopharmaceutical classification system, design of dosage form, technology of dosage forms, pharmaceutical development.

1 – ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8

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

* адресат для переписки:
E-mail: diomina.nb@gmail.com
Тел.: 8 (495) 609 14 00

ВВЕДЕНИЕ

За десятилетия биофармацевтических исследований накоплено значительное количество новых знаний, которые сегодня, в XXI веке, успешно применяются в разных направлениях фармацевтической науки и практики. Эти новые знания послужили толчком к развитию индустрии современных вспомогательных веществ, новых поколений лекарственных форм, новых требований к лекарственным препаратам и методам их оценки [1]. Принципы биофармации буквально насквозь пронизывают актуальные в настоящее время документы, например ICH Q8 Pharmaceutical Development (Part I, Part II), отражающий этапы, наполнение, логику и требования к фармацевтической разработке.

Первоначально в фокусе внимания биофармацевтических исследований было определение и изучение влияния на эффективность лекарственных препаратов фармацевтических факторов, таких как путь введения, состав, вид и технология лекарственной формы, физико-химические характеристики лекарственных субстанций; они сегодня хорошо известны [2] и не требуют пояснений. Опираясь на них, ученые выделили основные биофармацевтические свойства фармацевтических субстанций, имеющие значение для создания эффективных и безопасных лекарственных препаратов. Это растворимость, оптическая изомерия, полиморфизм, кристаллличность, размеры частиц, стабильность и ряд других. Все эти свойства для каждой субстанции следует рассматривать во взаимосвязи, одна-

ко признанными лидерами по силе влияния на биодоступность являются растворимость и проницаемость, именно они заложены в основу биофармацевтической классификационной системы.

БКС была предложена профессором Amidon с соавт. в 1995 г. и принята FDA в 2001 г. в качестве рекомендаций для промышленности по разработке теста «Растворение», позднее эту классификацию стали применять для прогнозирования биодоступности субстанции, для обоснования процедуры «биовейвер» [3–7]. Однако эти направления не отражают полного значения БКС, сегодня оно гораздо шире.

В настоящее время БКС стала одним из основных векторов в проведении фармацевтической разработки и служит, помимо названных выше, еще и технологическим задачам. Знание принадлежности фармацевтической субстанции к тому или иному классу БКС делает эту классификацию важным инструментом в процедуре обоснования состава, дизайна и технологии лекарственной формы с желаемыми биофармацевтическими характеристиками, к которым в первую очередь относится профиль высвобождения.

Изучая и обобщая опыт технологических исследований последних десятилетий, технологическое значение БКС можно представить следующим образом.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СУБСТАНЦИИ I КЛАССА

С высокой растворимостью и высокой проницаемостью, быстро высвобождаются из лекарственной формы и абсорбируются. При введении таких лекарственных средств вероятность достижения пиковых концентраций в биожидкостях, превышающих терапевтические и отвечающих за наличие побочных эффектов, высока. Поэтому лекарственная форма, призванная обеспечивать терапевтическую эффективность и безопасность препарата, должна демонстрировать сглаженный, пролонгированный профиль высвобождения. В первую очередь при разработке лекарственной формы для этих субстанций целесообразно применение технологий, обеспечивающих замедление высвобождения.

Примерами таких технологий могут служить следующие.

- *Переведение субстанции из аморфного состояния в кристаллическое.*
- *Создание суспензий в случае жидких лекарственных форм.*

Получение соединений включения, например с циклодекстринами, которые в жидкой среде будут постепенно диссоциировать на индивидуальные молекулы, существенно замедляя растворение легкорастворимой субстанции [8]. В настоящее время разработаны способы получения соединений включения, некоторые имеют промышленное значение. Например, по этой технологии получают препараты в форме лиофилизатов для приготовления инфузий: «Эдекс» (Schwarz Pharma AG, Германия) и «Вазапростан» (BAYER SCHERING PHARMA AG, Германия) (МНН: альпростадил), «Вифенд» (PFIZER PGM, Франция) (МНН: вориконазол), «Кипролис» (Amgen Europe B.V., Нидерланды) (МНН: карфилзомиб) [9–12] и ряд других. Однако, как и многие другие технологии, эта имеет ограничения [8, 13].

Параметры молекулы-гостя ограничены размерами полости циклодекстрина, которые хорошо известны: так, молекулярная масса фармацевтической субстанции должна составлять от 100 до 400. Нецелесообразно применение субстанций с высокой дозой. Следует учесть, что дозировка субстанции в лекарственной форме существенно возрастет из-за применения олигомерного носителя, например молекулярная масса γ-циклодекстрина превышает 1000 Да (1297,14). В случае жидких лекарственных форм из-за низкой растворимости самих циклодекстринов зачастую фармацевтическая субстанция не может быть введена в лекарственную форму в нужной концентрации. Из-за нефротоксичности кристаллических циклодекстринов, не подвергающихся метаболизму, у пациентов с умеренным или тяжелым нарушением функции почек может наблюдаться кумуляция носителя. Циклодекстрины и их производные являются главным образом кристаллическими твердыми продуктами, и, несмотря на образование водорастворимых комплексов, возможно их концентрирование в почечной ткани, сопровождающееся образованием кристалла, вызывающего некротическое повреждение клеток [10].

В связи с этим в последние годы в распоряжении технологов появились модифицированные путем гидроксиалкилирования, алкилирования и сульфоалкилирования циклодекстрины, обладающие лучшей растворимостью по сравнению с нативными. Например, растворимость гидроксипропил-бета-циклодекстрина составляет 65% при 25 °С. Они безопасны и рекомендуются для перорального, офтальмологического, парентерального и местного применения [5].

- *Получение матричных лекарственных форм*: таблеток, гранул, пеллет, гелей. Основным фактором успешной разработки лекарственного препарата с матричной структурой является соответствие вида и количества матрицеобразующего ингредиента растворимости и абсорбции фармацевтической субстанции. В определенных пределах варьирование профиля высвобождения возможно с помощью технологических факторов, таких как вспомогательные веще-

ства, способ введения полимера в лекарственную форму, давление прессования, размеры частиц полимера, размеры лекарственной формы и другие [14].

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СУБСТАНЦИИ II КЛАССА

Несмотря на высокую проницаемость, характеризуются низкой растворимостью, которая является для них основным фактором, лимитирующим всасывание [3–7]. Вследствие этого субстанции 2 класса могут демонстрировать недостаточную биодоступность, для улучшения терапевтической эффективности таких субстанций разработаны разнообразные технологии повышения как растворимости, так и скорости растворения.

- *Микронизация* с целью получения частиц микронных и субмикронных размеров, проводится с помощью лиофильной сушки, сушки распылением, технологий, основанных на применении сверхкритических флюидов. Последние позволяют получить продукт с заданным распределением частиц по размерам, определенной формы, кристалличности, морфологией поверхности [15, 16].

Влияние микронизации наглядно демонстрируют лекарственные формы глибенкламида – одного из самых популярных, изученных и надежных сахароснижающих лекарственных средств. Традиционные лекарственные формы глибенкламида вызывают медленное и постепенно нарастающее наступление сахароснижающего эффекта, связанное с низкой биодоступностью, которая в обычных таблетках по 5 мг составляет 29–69%. Биодоступность микронизированной формы приближается к 100%. Широко известный препарат «Манинил» («Берлин Хеми АГ»/«Менарини Групп») содержит глибенкламид в микронизированной форме, полное высвобождение действующего вещества происходит в течение 5 мин после растворения таблетки, а терапевтическая концентрация в крови достигается в течение 15–30 мин. Благодаря высокой биодоступности суточную дозу «Манинила» можно уменьшить на 30–40% по сравнению с приемом обычных таблеток глибенкламида [17]!

- *Аморфизация частиц субстанции*.
- *Получение сокристаллов*. Это направление модификации фармацевтических субстанций в настоящее время активно развивается за рубежом. В 2013 г. FDA издала регуляторный документ, содержащий дефиниции термина, согласно которым к сокристаллам относятся кристаллы, имеющие в узлах кристаллической решетки молекулы двух и более веществ. Как правило, это молекулы фармацевтической субстанции и вспомогательного вещества / вспомогательных веществ. Расположение молекул строго определено, они находятся в стехиометрическом соотношении, однако к сокристаллам не относят сольваты и соли. Индивидуальные компоненты сокристаллов при комнатной температуре твердые. Сокристаллы образуются за счет водородных, вандерваальсовых и π-связей (за счет перекрывания ρ-атомных орбиталей), но не за счет ионных сил. В результате фармакологическое действие субстанции в сокристалле не меняется, а меняются растворимость, скорость растворения, гигроскопичность, стабильность, плотность; сокристаллы подвержены полиморфизму. Получают сокристаллы медленной кристаллизацией из раствора при испарении растворителя, сублимацией, совместным плавлением и другими технологическими методами [18–21].
- *Получение твердых дисперсий*, представляющих собой двух- или многокомпонентные системы, включающие лекарственное вещество и носитель, содержащие высокодиспергированную твердую фазу лекарственного вещества или его твердые растворы в матрице носителя с возможным частичным образованием комплексов переменного состава с материалом носителя описано в работах [22–24].
- *Солюбилизация*, как самый простой в технологическом плане способ повышения растворимости веществ, не требующий специальной технологической переработки субстанции, основанный на том, что в состав лекарственной формы вводят солюбилизирующие агенты, образующие водорастворимые структуры с лекарственными веществами. Обычно осуществляется с помощью ПАВ, имеющих ГЛБ выше 15: твин-80, ПЭГ, ПЭО, ПВП, полоксамеры, кремофоры. С помощью солюбилизации растворимость фармацевтической субстанции может быть повышена на 20–50%. Так, например, согласно [25] добавление полоксамера 188 увеличило высвобождение ибупрофена из капсул через 60 мин с 45% приблизительно до 100%. В последние годы в качестве солюбилизатора успешно исследуется Soluplus®, представляющий собой матричный полимер, состоящий из полиэтиленгликоля-6000, винилкапролактама и винилацетата. Этот полимер разработан для солюбилизации плохо растворимых фармацевтических субстанций и подходит для экструзии горячего расплава. Однако его можно успешно применять в обычных процессах с целью использования его солюбилизационных свойств [26–28].

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СУБСТАНЦИИ III КЛАССА

Эти субстанции имеют высокую растворимость и низкую проницаемость, которая для них является регулирующим фактором биодоступности [3]. В состав таких лекарственных препаратов целесообразно включение *вспомогательных веществ*, способных повысить абсорбцию, например ПАВ. Повысить поступление лекарственного средства в организм можно ее включением в **системы доставки лекарств**, способные проникать через биомембраны, например в липосомы [29], мицеллы и другие структуры.

- С целью повышения абсорбции разрабатываются мукоадгезивные лекарственные формы, основной концепцией создания которых является тезис о том, что длительная экспозиция лекарственной формы на слизистой, которая рассматривается в качестве барьера абсорбции, способствует полному высвобождению лекарственного средства [30]. Биоадгезивные вспомогательные вещества – обычно набухающие гидрофильные полимеры, которые, как утверждают, взаимодействуют с гликопротеинами в слое слизи путем проникновения повисших концов цепи полимера в слой слизи, электростатических взаимодействий, взаимодействий функциональных групп. К биоадгезивным полимерам относят: натрийкарбоксиметилцеллюлозу, карбопол 934Р, ГПМЦ, сополимеры винилпирролидона и винилацетата, полиметилметакрилата, альгинат натрия, желатин, пектин, хитозан и др.

Для субстанций с низкой проницаемостью в ряде случаев предпочтительно применение мелких лекарственных форм, например вместо таблеток – пеллет или микрокапсул, которые имеют большую удельную поверхность, и в случае если они выполнены из мукоадгезивных материалов, контакт со слизистой им будет обеспечен, а следовательно, возможно и повышение абсорбции из такой лекарственной формы.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СУБСТАНЦИИ IV КЛАССА

Данные субстанции с низкой растворимостью и низкой проницаемостью, с одной стороны, представляют проблемы из-за низкой биодоступности при пероральном пути введения, но с другой – чрезвычайно актуальны для медикаментозной терапии из-за высокой эффективности. Из всех лекарственных средств, существующих сегодня на рынке, 30% относятся ко II классу БКС и 10% – к IV классу. Среди новых разработок доля таких субстанций IV класса еще больше – до 20% [31].

Для повышения биодоступности субстанций с низкими параметрами растворимости и проницаемости целесообразно применение любых технологий, направленных на повышение биодоступности и терапевтической эффективности. Наглядным примером может служить препарат Калетра Meltrex®, содержащий ингибиторы протеазы вируса иммунодефицита человека лопинавир и ритонавир, относящиеся к IV классу БКС. Биодоступность таблетированной формы, полученной по стандартной технологии, составляла 10%, препарат давал целый букет побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта и других систем организма. С целью повышения биодоступности разработаны мягкие капсулы, в которых активная субстанция находится в гидрофобном растворе, как правило, невысокой концентрации. Мягкие капсулы Калетра® необходимо принимать по 6 единиц лекарственной формы в день и хранить в холодильнике, что не совсем удобно ни для потребителя, ни для логистики. Попытка увеличения количеств действующих веществ в растворе оказалась безуспешной: при хранении происходила рекристаллизация. Наиболее успешным оказался препарат Калетра Meltrex®, представляющий собой таблетированный экструдат, полученный экструзией расплава, позволившей решить проблему чрезвычайно низкой растворимости и абсорбции лопинавира и ритонавира, существенно повысив их биодоступность и снизив частоту побочных эффектов. В качестве основного носителя фармацевтической субстанции использован полимер коповидон (сополимер винилпирролидона и винилацетата 3:2), в лекарственной форме его содержание составляет 65–75 %. Для снижения температуры стеклования и повышения высвобождения в состав лекарственного препарата введено ПАВ – сорбитана монолаурат. Следует отметить, что температура стеклования композиции ниже, чем у многих полимеров, и выше комнатной температуры, в результате субстанции остаются активными и лекарственная форма стабильна при комнатной температуре. Биодоступность препарата на 18% выше биодоступности капсулированной формы, а частота проявления побочных эффектов снизилась: у 78% пациентов пропала диарея или другие проблемы с желудочно-кишечным трактом, появление тошноты снизилось с 27% до 5% [32–34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевым моментом успешной разработки лекарственного препарата, обоснования оптимальной лекарственной формы, способной раскрыть в полной мере фармакологическое действие препарата, является научное обоснование использованных материалов и технологий, соответствующих растворимости и абсорбции лекарственного вещества, в целях обеспечения желаемого профиля его высвобождения. БКС, основанная на важнейших свойствах фармацевтических

субстанций – растворимости и абсорбции, является инструментом для обоснования дизайна и технологии лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.Б. Демина. Биофармация – путь к созданию инновационных лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 8–13.
2. Антонина Ивановна Тенцова: эпоха в фармации / Под ред. Н.Д. Бунятян, Н.Б. Деминой, Г.С. Киселевой, И.И. Краснюка, И.А. Самылиной, И.П. Рудаковой, С.Н. Егоровой. – М.: ГБОУ ВПО ПМГМУ. 2014. 152 с.
3. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms / MD: U.S. Department of Health and Human Services. FDA. Center for Drug Evaluation and Research. Rockville. 1997.
4. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. И.Е. Шохина. – М.: Перо. 2015. 320 с.: ил. С. 37–40.
5. Г.В. Раменская, А.Ю. Савченко, И.Е. Шохин, М.А. Котлова, Ю.И. Кулинич, Г.Ф. Василенко, В.Г. Кукес. Биофармацевтическая классификационная система жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств // Фармация. 2011. № 5. С. 3–11.
6. А.А. Свистунов, Г.В. Раменская, И.Е. Шохин. Испытание «Растворение» в фармацевтической практике. Современные подходы, концепции и биофармацевтические аспекты // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. 2011. № 11. С. 79.
7. И.Е. Шохин, Ю.И. Кулинич, Г.В. Раменская, В.Г. Кукес. Важнейшие биофармацевтические свойства лекарственных веществ на стадии абсорбции в жкт (обзор) / Химико-фармацевтический журнал. 2011. Т. 45. № 7.
8. Э. Блуэ. Нативные и модифицированные циклодекстрины KLEPTOSE®: многофункциональные вспомогательные вещества для молекулярной инкапсуляции // Фармацевтическая отрасль. 2011. № 6(29). С. 42–45.
9. Фармацевтический индекс РФ. Вазапростан. URL: http://www.pharmindex.ru/vazaprostan.html (дата обращения 19.01.17).
10. Вифенд // Видаль. Справочник лекарственных средств. URL: https://www.vidal.ru/drugs/vfend__3232. (дата обращения 19.01.17).
11. PHARMA + Справочник лекарств. Эдекс. URL: http://pharma-com.ru/edeks-edex-instruktsiya-po-primeneniyu-protivopokazaniya-i-sostav/ (дата обращения 19.01.17).
12. Кипролис // Лекарственный справочник ГЭОТАР. URL: http://www.lsgeotar.ru/kiprolis-4074.html#pokazaniya (дата обращения 19.01.17).
13. Патент RU2113442C1 / Ж. Стелла Валентино, Р. Раевски. - Опубл. 20.06.98. URL: https://patents.google.com/patent/RU2113442C1/ru (дата обращения 19.01.17).
14. Н.Б. Демина. Современные тенденции развития технологии матричных лекарственных форм с модифицированным высвобождением// Химико-фармацевтический журнал. 2016. Т. 50. № 7. С. 74–80.
15. Д.Ю. Залепугин, Н.А. Тилькунова, И.В. Чернышова. Использование сверхкритических флюидов для получения нано- и микроформ фармацевтических субстанций // СКФ: Теория и Практика. 2008. Т. 3. № 1. С. 5–23.
16. В.Н. Баграташвили, А.М. Егоров, Л.И. Кротова, А.В. Миронов, В.Я. Панченко, О.О. Паренаго, В.К. Попов, И.А. Ревельский, П.С. Тимашев, С.И. Цыпина. СКФ-микронизация фармацевтической субстанции рисперидон // СКФ: Теория и Практика. 2011. Т. 6. № 4. С. 88–101.
17. В.И. Панькив. Место глибенкламида в диалектике современной сахароснижающей терапии с позиций безопасности и кардиопротекции // Международный эндокринологический журнал. 2013. № 2(50). URL: http://www.mif-ua.com/archive/article/35706 (дата обращения 19.01.17).
18. Guidance for Industry. Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). April 2013. CMC.
19. B.S. Sekhon. Pharmaceutical co-crystals – a review // ARS Pharmaceutica. 2009. V. 50 № 2. P. 99–117.
20. S. Mirza, I. Miroshnyk, J. Heinämäki, O. Antikainen, J. Rantanen, P. Vuorela, H. Vuorela, J. Yliruusi. Crystal Morphology Engineering of Pharmaceutical Solids: Tabletting Performance Enhancement // AAPS PharmSciTech. 2009. V. 10(1). P. 113–119. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663677/ (дата обращения 19.01.17).
21. Е.А. Лосев. Исследование кристаллических фаз, образующихся в системах «глицин – карбоновая кислота» и «серин – карбоновая кислота»: дисс. … к.х.н. – Новосибирск. 2014. 116 с.
22. И.И. Краснюк (мл.), А.В. Беляцкая, И.И. Краснюк, О.И. Степанова, Л.В. Овсянникова, В.В. Грих, Т.М. Алленова, Е.Б. Одинцова. Перспективы применения твердых дисперсий с поливинилпирролидоном в медицине и фармации // Фармация. 2016. № 6. С. 7–11.
23. I.I. Krasnyuk, L.V. Ovsyannikova, O.I. Nikulina, A.V. Belyatskaya, Y.Y. Kharitonov, V.V. Grikh, L.A. Korol', Y.A. Obidchenko, A.N. Vorob'ev. Solubility of Diclofenac Acid Form from Solid Dispersions // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2015. V. 48. № 11. P. 733–737.
24. А.А. Теслев. К вопросу применения твердых дисперсных систем для улучшения биофармацевтических характеристик лекарственных средств // Фармацевтические технологии и упаковка. 2014. 32. С. 18–21.
25. Kolliphor P 188 micro, Kolliphor P 407 micro. Technical information. BASF. May 2013.
26. С.А. Золотов, Н.Б. Демина, Г.Ф. Василенко, М.С. Демин. Перспективы разработки инновационной лекарственной формы даруновира этанолата // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4(17). С. 40–44.
27. Н.Б. Демина А. Надер, М.Н. Анурова, В.В. Смирнов, А.И. Бардаков, И.И. Краснюк. Высвобождение биологически активных соединений экстракта имбиря из капсул // Фармация. 2016. Т. 65. № 4. С. 42–44.
28. Soluplus®.Technical information. BASF. May 2010.
29. Е.В. Санарова, А.В. Ланцова, Н.А. Оборотова. Липосомальные системы доставки лекарственных веществ: свойства и технологические особенности получения // Биофармацевтический журнал. 2014. Т. 6. № 4. С. 3–13.
30. Е.А. Киржанова, В.В. Хуторянский, Н.Г. Балабушевич, А.В. Харенко, Н.Б. Демина. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 3. С. 66–82
31. Таблетка вместо инъекции / Корпорация «Эвоник», Германия // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 4(5). С. 156–160.
32. I. Ofotokun, S.K. Chuck, B. Schmotzer, K.L. O'Neil. Formulation preference, tolerability and quality of life assessment following a switch from lopinavir/ritonavir soft gel capsule to tablet in human immunodeficiency virus-infected patients // AIDS Research and Therapy 2009. № 6(1). P. 29.
33. S. Schrader, S.K. Chuck, L.W. Rahn, P. Parekh, K.G. Emrich. Significant improvements in self-reported gastrointestinal tolerability, quality of life, patient satisfaction, and adherence with lopinavir/ritonavir tablet formulation compared with soft gel capsules // AIDS Res Ther. 2008. № 5. P. 21.
34. А.В. Старыгин, О.А. Козырев, Б.Е. Толкачев. Meltrex – инновационная технология производства новой лекарственной формы препарата для антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции // Инфекционные болезни. Новости. Лечение. Обучение. 2014. № 2. С. 107–111.

ИНТЕГРИРОВАННОЕ РЕШЕНИЕ ПО ПОЛУЧЕНИЮ **АФИ** ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ТВЁРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ОТ **ГК "ФАРМКОНТРАКТ"**

Термостат ICS i-Temp ci 90e

Обеспечивает контроль температуры в реакторе в диапазоне +20...+90С. В качестве теплоносителя используется вода под давлением. Обладает малым внутренним объемом и высокой мощностью нагрева/охлаждения, что позволяет поддерживать температуру с высокой точностью и быстро компенсировать температурные эффекты процесса.

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.

Реакторная система Patent (Венгрия) объёмом 100 л.

Материал - нержавеющая сталь. Обеспечивает проведение химической реакции при повышенной температурой, в том числе в режиме кипячения растворителя, позволяет проводить контролируемую загрузку при помощи мерных ёмкостей и насоса, а также удалять излишки растворителя после окончания процесса методом прямой

Чиллер Julabo FLW7006

Обеспечивает 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.

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 «мёртвого объёма» с большим проходным диаметром для удобства выгрузки образовавшейся суспензии.



Горизонтальная фильтрующая центрифуга Heinkel H 1000 P

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

Вакуумно-сушильный шкаф Binder vdl 115.

Позволяет проводить эффективную осушку порошкообразных АФИ. В комплекте вакуумный мембранный насос, система улавливания паров. Полностью гладкая внутреняя поверхность из нержавеющей стали AISI316L позволяет легко проводить очистку после окончания работы.

Вихревая мельница FPS ProMill 12

Мельница обеспечивает прецизионный размол полученного порошка АФИ до размеров порядка 50-100 мкм. Конструкция обеспечивает наилучшие значения тонины помола. Полностью соответствует требованиям фармацевтических стандартов для обоурдования, применяемого для измельчения. Управление процессом осуществляется при помощи PLC-системы управления.

CIP/SIP-станция Inoxpa

Обеспечивает эффективную очистку всех аппаратов технологической цепочки. Имеет 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.



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 661.122

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПАРАЦЕТАМОЛА

А.П. Беляев[1]*, В.П. Рубец[2], В.В. Антипов[2]

Резюме. Исследована возможность получения парацетамола ромбической модификации методом калориметрии. Исследования включали в себя технологические эксперименты, оптическую микроскопию, дифференциальную сканирующую калориметрию, рентгенографию и инфракрасную спектроскопию. Установлено, что в результате циклического воздействия температуры кристаллы парацетамола модифицируются в кристаллы ромбической сингонии, обладающие по сравнению с моноклинной кристаллической структурой повышенными технологическими параметрами. Представлены микрофотографии, рентгенограммы, кривые дифференциальной сканирующей спектроскопии и спектры поглощения.

Ключевые слова: парацетамол, модификация кристаллической структуры, калориметрия.

CALORIMETRIC OBTAINING OF PHARMACEUTICAL FORM OF PARACETOMOL

A.P. Belyaev[1]*, V.P. Rubets[2], V.V. Antipov[2]

Abstract. The possibility of formation of paracetamol of orthorhombic modification by the method of calorimetry is studied. The studies include technological experiments, optical microscopy, differential scanning calorimetry, X-ray diffraction and IR spectroscopy. It is found that in the result of temperature cycling the crystals of paracetamol are modified in the crystals of orthorhombic syngony. Microphotographs, X-ray diffraction patterns, differential scanning spectroscopy curves and absorption spectra are presented.

Keywords: paracetamol, modification of crystal structure, calorimetry.

1 – Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

2 – Санкт-Петербургский технологический институт (технический университет), 190013, Санкт-Петербург, Россия, Московский проспект, д. 26

1 – Department of Physical and Colloidal Chemistry. Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, lit. A, 14, Professor Popov str., Saint Petersburg, 197376, Russia

2 – Department of Analytical Chemistry. Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University), 26, Moscovskiy pr., Saint Petersburg, 190013. Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: Alexei.Belyaev@pharminnotech.com
Тел.: 8 (812) 499 39 00 доб. 41–40

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные препараты, продаваемые сегодня на рынке, приблизительно 85% случаев принимаются перорально [1]. В действии таких лекарственных препаратов растворимость играет существенную роль, так как максимальная скорость пассивного транспорта препарата через биологические мембраны зависит от проницаемости мембраны и концентрации раствора (растворимости). Принимая во внимание также то, что 40% выпускающихся лекарственных субстанций классифицируются как практически нерастворимые [1], актуальность исследований методов повышения растворимости становится очевидной.

Для повышения растворимости лекарств используют различные физико-химические подходы: уменьшение размеров частиц, модификацию кристаллической структуры, получение твердых дисперсий лекарственных веществ с наполнителями и т.д.

В настоящей работе представлены результаты исследования возможности модификации кристаллов парацетамола при циклическом воздействии температуры, способствующей повышению растворимости.

Парацетамол [N-(4-гидроксифенил)ацетамид], популярный анальгетик и антипиретик группы анилидов, может кристаллизоваться в трех различных полиморфных формах, известных как формы I, II и III [2]. Практическое значение имеют только две первые. Форма I, молекулярный кристалл моноклинной модификации, является стабильной при естественных условиях. Однако она характеризуется низкой технологичностью, ей присущи сыпучесть, плохое смачивание и плохое растворение. Форма II, молекулярный кристалл ромбической модификации, легко подвергается пластической деформации, подходит для прямого прессования и хорошо растворяется [3–18].

Ниже приводятся результаты исследования циклического воздействия температуры на молекулярные кристаллы парацетамола формы I, позволяющего модифицировать кристаллы формы I в формуII.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного вещества использовался порошок кристаллов парацетамола моноклинной сингонии, изготовленный «Аньцу Лу-

ань Фармасьютикал Ко. Лтд.», Китай (соответствует ФС 000313; ГФ XII, часть 1, с. 160). Модификация кристаллов осуществлялась путем вакуумного испарения порошка из специального кварцевого реактора, эксклюзивно изготавливаемого авторами настоящей работы [19], при температуре 420 К с последующей конденсацией пара при комнатной температуре на медной подложке [18]. Толщина образцов составляла ~1000 мкм. Вакуум поддерживался на уровне ~10^{-3} Па. Затем образцы помещались в специально изготовленный калориметр (аналог DSC-2) в атмосферу азота и циклически нагревались – охлаждались при скорости 10 К/мин. Температурная шкала калибровалась по точкам плавления льда (273,1 К) и индия (429,7 К), а шкала теплового потока – по теплоемкости лейкосапфира. Измерения проводились в области температур 290–390 К. Вес образцов не превышал 3 мг.

Рентгенофазовый анализ проводился на автоматизированном рентгеновском дифрактометре ДРОН-4 [прибор для проведения рентгеноструктурных исследований (ЛНПО «Буревестник», Россия)] с источником Cu-K_α-излучения. Спектры обрабатывались в программе Crystallographic Search-Match v. 2.0.3.1 Oxford Crysystems. При расшифровке использовалась стандартная база данных PDF-2.

Поглощение пленок изучали с использованием ИК-фурье-спектрометра ALPHA (Bruker, Германия)).

Морфология поверхности исследовалась на оптическом микроскопе МБС-10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение процесса модификации кристаллов парацетамола строилось на основе микроскопических, тепловых, рентгенофазовых и спектральных исследований. Исследовались как свежеприготовленные образцы, так и образцы, подвергнутые после синтеза нескольким циклам «нагрев – охлаждение».

Микрофотографию свежеприготовленного образца демонстрирует рисунок 1а. Образец представлял собой гелеобразную липкую систему, плотно сцепленную с подложкой. После трех циклов «нагрев – охлаждение» образец белел и затвердевал (рисунок 1б). Изменения морфологии сопровождались изменениями кристаллической структуры. Об этом свидетельствуют данные рентгенофазового анализа (рисунок 2). Свежеприготовленный образец имел кристаллическую структуру, соответствующую моноклинной сингонии (форма I, рисунок 2б), а после трех циклов «нагрев – охлаждение» структура становилась ромбической (форма II, рисунок 2а).

Перекристаллизацию формы I в форму II при проведении сложных циклов «нагревание – охлаждение» со стекловидной массой парацетамола наблюдали авторы [1, 5, 16]. Процесс сопровождался возникновением экзотермических пиков на кри-

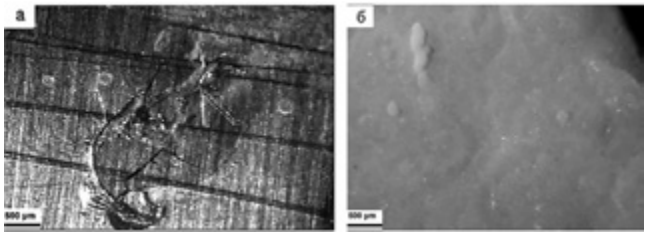


Рисунок 1. Микрофотографии образцов парацетамола: а – до модификации; б – после модификации

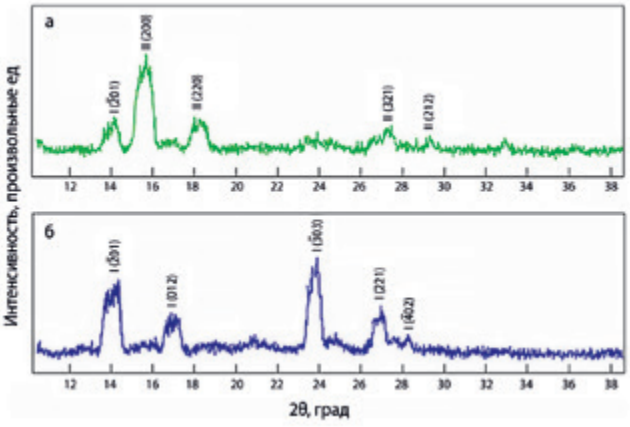


Рисунок 2. Спектр дифракции рентгеновских лучей свежеприготовленного (б) и модифицированного (а) образца парацетамола

вых дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) при T_{max}=340–349 К.

Результаты коррелируют с данными тепловых исследований наших модельных объектов. На рисунке 3 приведены типичные кривые дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), полученные при нагревании (сплошные линии) и охлаждении (пунктир-

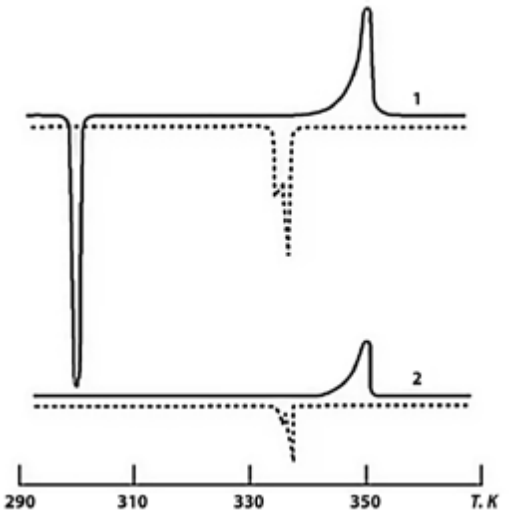


Рисунок 3. Кривые ДСК, полученные при нагревании (сплошные линии) и охлаждении (пунктирные линии) образца парацетамола, снятые при первом (1) и втором (2) циклах «нагрев – охлаждение»

ные линии) образца парацетамола на разных стадиях его жизни. Кривая 1 снята непосредственно при синтезе образца с последующим после синтеза нагреванием (охлаждением); кривая 2 соответствует второму циклу нагревания и охлаждения. На кривых там же, где и у авторов [1, 5, 16], видны экзотермические и эндотермические пики.

О фазовых превращениях, происходящих в процессе циклов «нагрев – охлаждение», свидетельствуют также исследования поглощения (рисунок 4). Кривая 1, снятая сразу после синтеза образца, отличается от кривой 2, отснятой после трех циклов «нагрев – охлаждение». Формы I и II связаны явлением полиморфизма поэтому фундаментальные черты спектров практически одинаковы (химическая структура является одинаковой для всех форм). Тем не менее различие наблюдается в амидных валентных колебаниях. Поэтому спектр формы II смещается в сторону высоких частот [1].

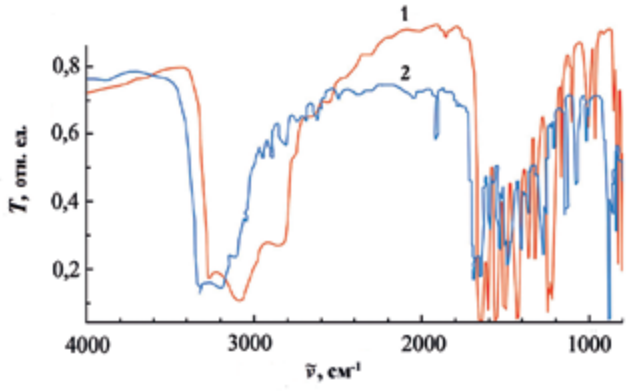


Рисунок 4. Спектр поглощения свежеприготовленного (кривая 1) и модифицированного (кривая 2) образца парацетамола

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Калориметрическая модификация молекулярных кристаллов парацетамола моноклинной сингонии позволяет получать кристаллы ромбической сингонии, обладающие по сравнению с моноклинной кристаллической структурой повышенными технологическими параметрами. Такие кристаллы легко подвергаются пластической деформации, подходят для прямого прессования и хорошо растворяются.

Результаты, представленные в настоящей работе, свидетельствуют о возможности успешного применения циклического воздействия температуры на лекарственные субстанции с целью создания высокоэффективных лекарственных средств; демонстрируют возможности еще одного физико-химического способа повышения технологических параметров лекарственных веществ, в первую очередь веществ, обладающих свойством полиморфизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.В. Душкин, Л.П. Сунцова, С.С. Халиков. Механохимическая технология для повышения растворимости лекарственных веществ // Фундаментальные исследования. 2013. № 1–2. С. 448–457.
2. M. Haisa, S. Kashino, H. Maeda. The orthorhombic form of p-hydroxyacetanilide // Acta Crystallogr. B Struct. Sci. 1974. V. 30. № 10. P. 2510–2512.
3. J.B. Nanubolu, J.C. Burley. Investigating the recrystallization behavior of amorphous paracetamol by variable temperature raman studies and surface raman mapping // Molecular pharmaceutics. 2012. V. 9. № 6. P. 1544–1558.
4. F. Sun, B. Xu, Y. Zhang, S. Dai, X. Shi, Y. Qiao. Latent variable modeling to analyze the effects of process parameters on the dissolution of paracetamol tablet // Bioengineered. 2017. V. 8. № 1. P. 61–70.
5. M.L. Myrick, M. Baranowski, L.T.M. Profeta. An experiment in physical chemistry: Polymorphism and phase stability in acetaminophen (paracetamol) // Journal of Chemical Education. 2010. V. 87. № 8. P. 842–844.
6. T. Delmas, U.V. Shah, M.M. Roberts, D.R. Williams, J.Y.Y. Heng. Crystallisation of the orthorhombic form of acetaminophen: Combined effect of surface topography and chemistry // Powder Technology. 2013. V. 236. P. 24–29.
7. M.A. Perrin, H. Elmaleh, L. Zaske, M.A. Neumann. Crystal structure determination of elusive paracetamol form III // Chemical Communication. 2009. № 22. P. 3181–3183.
8. M.S. Anuar, B.J. Briscoe. Detrimental consequences of the paracetamol tablet elastic relaxation during ejection // Drug development and pharmacy. 2010. V. 36. № 8. P. 972–979.
9. R. Picciochi, H.P. Diogo, D.A. Minas, M.E. Piedade. Thermochemistry of paracetamol // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2010. V. 100. № 2. P. 391–401.
10. G.Di. Profio, S. Tucci, E. Curcio, E. Drioli. Controlling polymorphism with membrane-based crystallizers: Application to form I and II of paracetamol // Chem.Mater. 2007. V. 19. № 10. P. 2386–2388.
11. J.S. Capes, R.E. Cameron. Contact line crystallization to obtainmetastable polymorphs // Cryst. Growth Des. 2006. V. 7. № 1. P. 108–112.
12. L.H. Thomas, C. Wales, L. Zhao, C.C. Wilson. Paracetamol form II: an elusive polymorph through facilemulticomponent crystallization routes // Cryst. Growth Des. 2011. V. 11. № 5. P. 1450–1452.
13. C.P. Price, A.L. Grzesiak, A.J. Matzger. Crystalline polymorph selection and discovery with polymer heteronucle // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. № 15. P. 5512–5517.
14. K. Chadwick, A. Myerson, B. Trout. Polymorphic control by heterogeneous nucleation a new method for selecting crystalline substrates // Cryst. Eng. Comm. 2011. V. 13. № 22. P. 6625–6627.
15. M. Lang, A.L. Grzesiak, A.J. Matzger. The use of polymer heteronuclei for crystalline polymorph selection // J. Am. Chem. Soc. 2002. V. 124. № 50. P. 14834–14835.
16. M.A. Mikhailenko. Growth of large single crystals of the orthorombic paracetamol // J. Cryst. Growth. 2004. V. 265. P. 616–618.
17. P. Di. Martino, P. Conflan, M. Drache, J.P. Huvenne, A.M. Guyot-Hermann. Preparation and physical characterization of forms II and III of paracetamol // J. Therm. Anal. Calorim. 1997. V. 48. № 3. P. 447–458.
18. F. Giordano, A. Rossi1, R. Bettinil, A. Savioli, A. Gazzaniga, Cs. Novák. // Thermal behavior of paracetamol polymeric excipients mixtures // J. Thermal Analysis and Colorimetry. 2002. V. 68. P. 575–590.
19. A.P. Belyaev, V.P. Rubets, V.V. Antipov. Influence of the Nature of a Condensate Material on Formation of an Ensemble of Islands during Crychemical Synthesis from the Vapor Phase // Semiconductors. 2013. V. 47. № 1. P. 13–15.
20. А.П. Беляев, В.П. Рубец, В.В. Антипов Вертикальный рост кристаллов сульфида кадмия на подложке из кремния // Журнал физической химии. 2017. Т. 91. № 2. С. 345–348.

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 615.01

ИССЛЕДОВАНИЕ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МИКРОЭМУЛЬСИОННОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ИНСУЛИНА

Е.Г. Кузнецова[1]*, В.А. Рыжикова[1], Л.А. Саломатина[1], В.И. Севастьянов[1]

Резюме. Статья посвящена исследованию характеристических свойств микроэмульсионной композиции, используемой при изготовлении трансдермальной терапевтической системы (ТТС) инсулина. Определен тип микроэмульсии «вода в масле» и исследована ее стабильность. Инструментальными методами оценены такие параметры, как показатель преломления, вязкость и размер частиц. Найдены условия высвобождения инсулина из микроэмульсии, позволяющие обеспечить выход гормона в объем в количестве более 95% от заявленного. При исследовании ТТС, содержащей микроэмульсию с инсулином, показано, что диффузия лекарственного вещества *in vitro* через неконсервированную кожу кролика составляет примерно 1 Ед/час, что соответствует скорости секреции гормона поджелудочной железой здорового человека.

Ключевые слова: микроэмульсия, размер частиц, высвобождение, жидкостная хроматография, инсулин.

STUDY OF CHARACTERISTIC PARAMETERS OF THE MICROEMULSION COMPOSITION FOR TRANSDERMAL INSULIN DELIVERY

E.G. Kuznetsova[1]*, V.A. Ryzhikova[1], L.A. Salomatina[1], V.I. Sevastianov[1]

Abstract. The article is about the study of the characteristic properties of a microemulsion composition for insulin transdermal therapeutic system (TTS). The type of microemulsion "water in oil" was determined and its stability was investigated. Instrumental methods have been used to evaluate parameters such as refractive index, viscosity and particle size. The conditions for the release of insulin from the microemulsion have been found, which make it possible to ensure the release of the hormone into a volume more than 95% of the claimed amount. *In vitro* study hormone diffusion from TDS containing a microemulsion with insulin through the native rabbit skin was ~1 U/h. It corresponds to hormone rate secretion by the pancreas of a healthy person.

Keywords: microemulsion, particle size, release, liquid chromatography, insulin.

1 – ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123182, Россия, г. Москва, ул. Щукинская, 1

1 – Academician V. I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Healthcare, 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: kuzeugenia@gmail.com
Тел.: 8 (499) 193 86 62

ВВЕДЕНИЕ

Микроэмульсии различного состава активно применяются в косметической и фармацевтической промышленности [1, 2]. В последнее время возрос интерес к микроэмульсиям как к матрицам лекарственных веществ (ЛВ) при чрескожной доставке.

Микроэмульсии представляют собой стабильные коллоидные дисперсии [3, 4], как правило состоящие из воды и масла, стабилизированные поверхностно-активными веществами (ПАВ) и в ряде случаев сорастворителями [1, 4–7]. Они бывают простые (масло/вода, вода/масло) и сложные (масло/вода/масло, вода/масло/вода). Микроэмульсии могут быть получены путем самопроизвольного эмульгирования [4], а также диспергирования с использованием различных аппаратов [8–10].

Использование микроэмульсий в составе трансдермальных терапевтических систем позволяет увеличить «загрузку» лекарственного средства за счет того, что амфифильная поверхность раздела двух несмешивающихся жидкостей, которыми образована микроэмульсия, обеспечивает дополнительную область для растворения ЛВ [3, 4, 7, 11].

Ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав масляной фазы микроэмульсии, разжижают липидные слои кожи, тем самым повышая её проницаемость [1, 12]. К тому же использование микроэмульсионных композиций позволяет одновременно включать в одну ТТС как липофильные, так и гидрофильные ЛВ.

Состав и соотношение компонентов микроэмульсионной композиции подбирается в зависимости от свойств основного лекарственного вещества [4], а также необходимых характеристических параметров микроэмульсии: размер частиц дисперсной фазы, стабильность, вязкость, показатель преломления, профиль высвобождения ЛВ *in vitro* и другие [13, 14].

Целью данной работы является исследование характеристических параметров микроэмульсионной композиции, содержащей инсулин, для трансдермальной системы доставки гормона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В таблице 1 приведены стадии изготовления микроэмульсионной композиции с инсулином (МКИ) и перечень необходимых реагентов и оборудования.

Водная фаза эмульсии (pH 8,2) представляет собой разбавленное в соотношении 1:10 водное извлечение коры дуба, приготовленное в соответствии с инструкцией к растительному сырью, с добавлением гидрокарбоната натрия. В качестве активного вещества в водную фазу микроэмульсионной композиции вводили инсулин при комнатной температуре.

Для создания масляной фазы в 10%-й раствор α-токоферола ацетата в масле абрикосовых ядер при 60 °С и постоянном перемешивании (150 об/мин) вводили липофильный эмульгатор Nikkol Decaglyn PR-20 и активатор чрескожного переноса докузатнатриевую соль. Этот активатор успешно применялся нами ранее при создании микроэмульсионных композиций для ТТС различных ЛВ [15, 16].

Эмульгирование осуществляли при комнатной температуре при помощи диспергатора. Установив необходимую скорость вращающегося элемента (~10000 об/мин), водную фазу постепенно вносили в масляную до полного смешения фаз, которое оценивали визуально по отсутствию масляных и водных капель.

Были исследованы следующие параметры МКИ: коллоидная стабильность, тип эмульсии, вязкость, показатель преломления, размер частиц и количество инсулина, высвобождаемого из микроэмульсии.

Перечень исследуемых характеристических параметров полученной МКИ и оборудование, необходимое для их определения, представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Характеристические параметры МКИ и оборудование

Исследуемый параметр	Оборудование
Коллоидная стабильность (ГОСТ 29188.3-91)	– мультицентрифуга СМ-6 М (ELMI, Латвия)
Вязкость	– вибровискозиметр SV-1A (AND, Япония)
Показатель преломления	– рефрактометр Refracto 30GS (Mettler Toledo, Германия)
Размер частиц	– анализатор дисперсий LUMiSizer (LUM, Германия)
Высвобождение ЛВ из микроэмульсии	– водяная баня Lauda AL12 (Lauda, Германия); – термостатируемый шейкер ES-20/60 (BioSan, Латвия); – ультразвуковая ванна Elmasonic S 60 H (ELMA, Германия)
Диффузия *in vitro* через неконсервированную кожу кролика	– анализатор диффузии лекарственных препаратов HDT 1000 (Copley Scientific Ltd., Великобритания); – спектрофотометр UV-2600 (Shimadzu, Япония)

Определение стабильности МКИ проводили согласно ГОСТ 29188.3-91 «Изделия косметические. Методы определения стабильности эмульсии» [17].

Таблица 1.

Стадии изготовления микроэмульсионной композиции, сырье и оборудование

Стадии изготовления микроэмульсии	Сырье	Оборудование
Изготовление водной фазы: – *взвешивание компонентов;* – *приготовление водного извлечения коры дуба;* – *растворение вспомогательных и лекарственных веществ*	– инсулин человеческий (**I0908-250MG,** Sigma-Aldrich, США); – кора дуба измельченная (АО «Красногорсклексредства», Россия, срок годности: июль 2018); – вода очищенная (ФС 42-2620-97); – гидрокарбонат натрия (31437-1KG-R, Sigma-Aldrich, США).	– весы аналитические GH-200 (AND, Япония); – водяная баня Lauda AL12 (Lauda, Германия); – автоматические пипетки Biohit (Финляндия); – мешалка магнитная без нагрева (IKA, Германия); – pH-метр Orion 310 (Orion, Италия).
Изготовление масляной фазы: – *взвешивание компонентов;* – *растворение вспомогательных веществ*	– α-токоферола ацетат (12C02768, BASF SE, Германия); – масло абрикосовых ядер (CAS 72869-69-3, Desert Whale Jojoba Company Ltd., США); – эмульгатор Nikkol Decaglyn PR-20 (CAS 29894-35-7, Nikko Chemicals Co., Ltd, Япония); – докузатнатриевая соль (D4422-50G, Sigma, США).	– стеклянный реактор для приготовления микроэмульсионной композиции; – ультратермостат CC3-105A (Huber, Германия); – мешалка с приводом EURO-ST P CV (IKA, Германия).
Смешивание фаз эмульсии	– водная фаза; – масляная фаза.	– диспергатор T 18 basic Ultra-Turrax (IKA-Werke Gmbh&Co.Kg, Германия).

Метод основан на разделении эмульсии на водную и жировую фазы под действием центробежной силы.

В соответствии с ГОСТ 29188.3-91 можно говорить о коллоидной стабильности исследуемой эмульсии в том случае, если после центрифугирования в соответствующих условиях в пробирках наблюдается не более одной капли водной фазы или слой масляной фазы не более 0,5 см [17].

Для определения типа эмульсии был использован метод разбавления. Для испытания определенный объем эмульсии смешивали с входящими в ее состав жидкостями [18].

В нашем случае в первую пробирку помещали дистиллированную воду, а во вторую пробирку – 10%-й раствор α-токоферола ацетата в масле абрикосовых ядер. Затем в каждую пробирку вносили определенный объем микроэмульсии инсулина и встряхивали. Диспергирование микроэмульсионной композиции в той или иной жидкости оценивали визуально.

Этот же эксперимент повторяли на предметных стеклах: на два предметных стекла помещали по капле исследуемого образца эмульсии, на них наносили по капле дистиллированной воды и 10%-го раствора α-токоферола ацетата в масле абрикосовых ядер. Смешение определяли визуально.

Вывод о принадлежности к тому или иному типу эмульсии делали на основании того, с каким растворителем смешивается образец: прямой считают ту эмульсию, которая смешивается с водой, и, соответственно, обратной – ту, что смешивается с маслом.

Измерение вязкости образца МКИ проводили на вибровискозиметре согласно инструкции к прибору, предварительно проведя калибровку. Поскольку для измерения используется вибрационный метод, при котором плотность образца влияет на значение вязкости, размерность отражаемого на дисплее значения выражена в (м)Па·с·г/см^3. Для получения динамической вязкости измеренное значение следует разделить на величину плотности образца.

Показатель преломления образца эмульсии измеряли на портативном рефрактометре, помещая аликвоту образца в измерительную ячейку в соответствии с руководством к прибору.

Определение размеров частиц МКИ проводили при исследовании седиментации при центрифугировании образца на анализаторе дисперсий LUMiSizer в инфракрасном свете (865 нм) при 25 °С. В анализаторе используется технология STEP, которая позволяет непрерывно измерять интенсивность прошедшего через образец света как функцию от времени и расстояния относительно центра вращения. Источники света, расположенные параллельно плоскости образца, позволяют просветить всю кювету. Свет, прошедший сквозь кювету, регистрируется тысячами датчиков, размещенных линейно вдоль всего образца, с микроскопическим разрешением (рисунок 1). Таким образом, спектр пропускания света снимается непрерывно по всей длине кюветы.

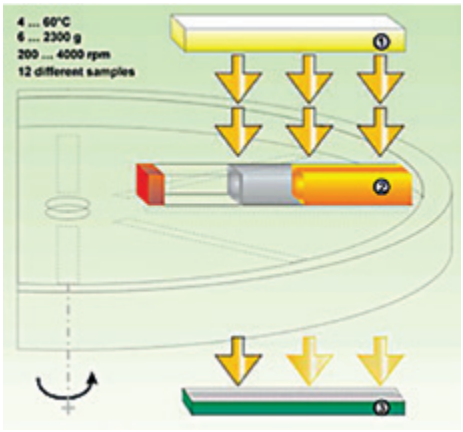


Рисунок 1. Схема прохождения света через кювету в анализаторе дисперсий LUMiSizer (1 – источник света, 2 – кювета с образцом, 3 – детектор) [19]

Профили прохождения света записывали каждые 600 секунд при скорости вращения ротора 4000 об/мин, световой фактор был выбран равным 3.

Для определения количества инсулина, высвобождающегося из микроэмульсии в объем, был выбран метод экстрагирования. Для разрушения микроэмульсионной композиции было исследовано несколько вариантов среды высвобождения с различным содержанием растворителей, а также были применены различные физические способы воздействия. В качестве среды растворения использовали 95%-й этиловый спирт (ООО «РОСБИО», Россия), разбавленный очищенной водой в различном соотношении, с добавлением поверхностно-активных веществ (TWEEN-20, Sigma-Aldrich, США; TWEEN-80, Sigma-Aldrich, США) и без них. В качестве физических воздействий применяли термостатирование, встряхивание и ультразвуковые волны (УЗВ).

Количественное определение инсулина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity (Agilent, США). Перед проведением хроматографического исследования аликвоту образца центрифугировали 15 минут при 13000 об/мин для отделения прозрачного надосадочного слоя.

Использовали колонки из нержавеющей стали Supelco Discovery, 250×4,6 мм, с фазой С18 с размером частиц 5 мкм. Подвижная фаза состоит из аце-

тонитрила для ВЭЖХ (Sigma-Aldrich, США) и 0,1%-го раствора трифторуксусной кислоты (Merck, Германия) в воде. Хроматографию проводили при комнатной температуре в градиентном режиме: 0 мин – 20:80; 11 мин – 60:40; 16 мин – 20:80 – с УФ-детектированием при λ=245,4 нм. Скорость потока – 1 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Время удерживания инсулина составило около 7,7 мин, общее время хроматографирования – 16 мин.

Обработку хроматограмм осуществляли с помощью системы программного обеспечения Agilent ChemStation (Agilent, США), версия A.01.05.

Количество инсулина, перешедшего в раствор, рассчитывали с помощью стандартного пакета программ Microsoft Office 2007 по калибровочной кривой зависимости площади пиков инсулина на хроматограмме от концентрации калибровочных растворов инсулина (рисунок 2). Коэффициенты регрессионного уравнения калибровочной прямой S=a·C+b имели значение: a=3,4; b=–1,0; коэффициент корреляции R=1,0.

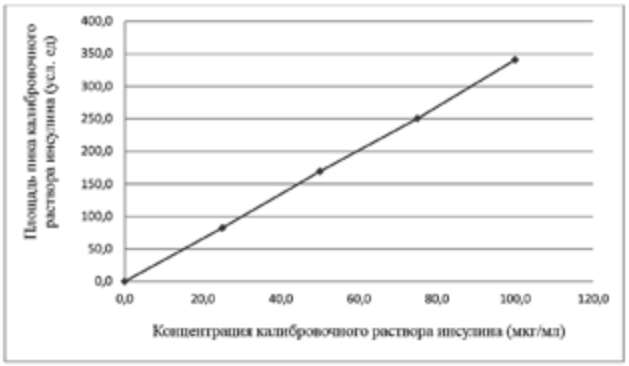


Рисунок 2. Калибровочная прямая зависимости площади пиков калибровочных растворов инсулина от концентрации

Изучение диффузии инсулина *in vitro* через неконсервированную кожу кролика из ТТС с микроэмульсионной композицией проводили в диффузионных ячейках Франца при непрерывном перемешивании при 32 °С на анализаторе диффузии. Растворы инсулина исследовали на спектрофотометре. Для отделения спектра поглощения инсулина от спектров поглощения собственных белков кожи была использована методика мечения инсулина флуоресцеина изотиоцианатом (Sigma, США) [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование характеристических свойств МКИ является важным этапом при разработке ТТС.

Функциональные свойства микроэмульсионной композиции с лекарственным веществом зависят от типа эмульсии, ее стабильности и размера частиц.

Тип эмульсии

Возможность чрескожного переноса различных ЛВ напрямую зависит от их гидрофильно-липофильных свойств. Проницаемость рогового слоя обусловлена в основном проницаемостью липидного матрикса, заполняющего промежутки между корнеоцитами. Поэтому для увеличения трансдермального проникновения инсулина, обладающего гидрофильными свойствами, было важно разработать микроэмульсию обратного типа «вода в масле».

Результаты разбавления образцов микроэмульсии с инсулином дистиллированной водой и 10%-м масляным раствором α-токоферола ацетата в объеме растворителя и на предметном стекле представлены на рисунках 3 и 4 соответственно.

Как видно на рисунке 3а, при внесении капли эмульсии в объем дистиллированной воды и последующем встряхивании смешения не произошло – капля эмульсии распределилась по поверхности воды, тогда как капля эмульсии после встряхивания в пробирке с масляным раствором (рисунок 4а) равномерно диспергировалась в объеме.

Аналогичная картина наблюдается при разбавлении капли МКИ на предметном стекле. При нанесении

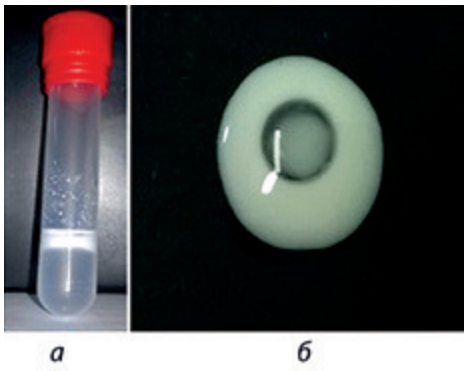


Рисунок 3. Разбавление микроэмульсии дистиллированной водой

а – в объеме; б – на предметном стекле

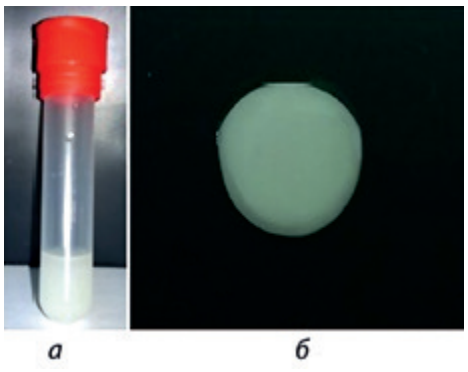


Рисунок 4. Разбавление микроэмульсии 10%-м масляным раствором α-токоферола ацетата

а – в объеме; б – на предметном стекле

капли дистиллированной воды видны четкие границы несмешивающихся жидкостей (рисунок 3б). И напротив, капля масляного раствора равномерно распределяется в объеме эмульсии без видимых границ (рисунок 4б).

Результаты исследования микроэмульсии методом разбавления в объеме и на предметном стекле свидетельствуют о том, что приготовленная композиция представляет собой эмульсию обратного типа «вода в масле».

Размер частиц

Средний диаметр частиц микроэмульсии обычно составляет менее 10 мкм. Такие микроэмульсии могут успешно выполнять роль активаторов переноса ЛВ через кожу.

На рисунке 5 показаны профили пропускания прошедшего света через образец микроэмульсии по длине пробирки в течение 24 часов. Нижний, красный профиль соответствует началу процесса расслоения, зеленые линии – профили конца процесса расслоения. Из рисунка видно, что расслоение происходит вверху (слой масла) и на дне пробирки (слой воды).

На рисунке 6 представлено распределение частиц микроэмульсии по размерам.

Согласно данным эксперимента средний размер частиц микроэмульсионной композиции с инсулином составляет 2,18±0,06 мкм. Такой размер частиц микроэмульсии позволяет использовать ее в качестве матрицы ЛВ в ТТС.

Коллоидная стабильность

Важным показателем для характеристики эмульсий является их устойчивость (стабильность), то есть способность не разрушаться и не разделяться на

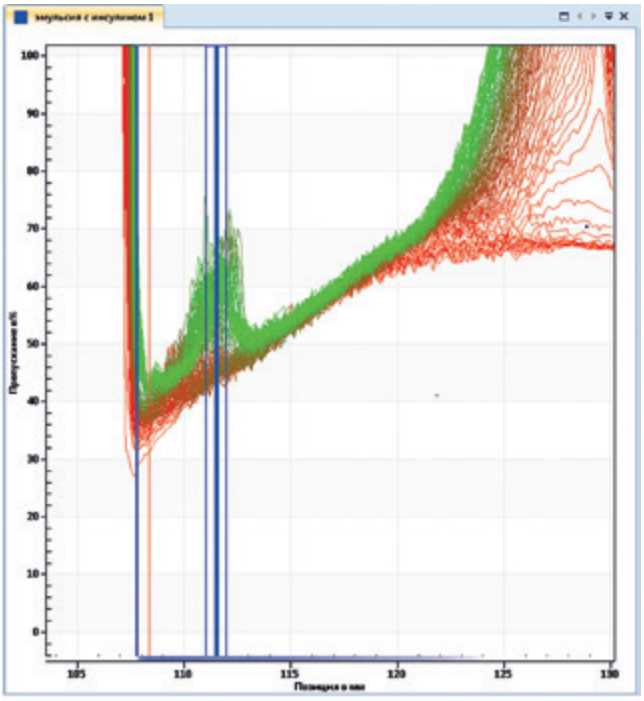


Рисунок 5. Профили процесса расслоения микроэмульсии с инсулином

отдельные фазы в течение определенного времени, достаточного для дальнейших технологических операций.

При исследовании коллоидной стабильности микроэмульсионной композиции с инсулином было показано, что при центрифугировании в условиях, описанных в ГОСТ 29188.3-91, масляная фаза не отделяется, а на дне пробирки наблюдается только капля водной фазы, что допустимо по условиям теста. Таким образом, полученные результаты подтверждают стабильность МКИ в соответствии с требованиями ГОСТ 29188.3-91.

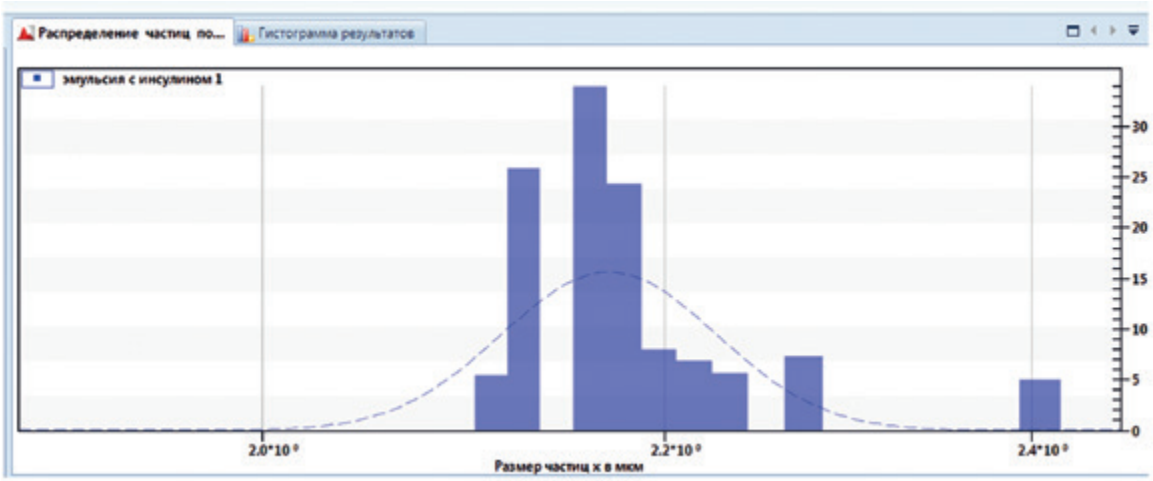


Рисунок 6. Распределение частиц микроэмульсии по размерам

Измерение вязкости и показателя преломления может использоваться как наиболее простой и быстрый способ оценки качества получаемой микроэмульсии.

Вязкость и показатель преломления

Вязкость коллоидных систем связана с их дисперсностью, поэтому, зная вязкость микроэмульсии с необходимой дисперсностью, можно контролировать ее качество. Также для контроля качества микроэмульсии при изготовлении ТТС можно использовать значение показателя преломления.

Значение вязкости микроэмульсионной композиции с инсулином составило 563±20 мПа·с·г/см^3 при t=22,5 °С.

Измеренный показатель преломления образцов МКИ при t=22,7 °С составил 1,40±0,14.

Высвобождение инсулина из микроэмульсионной композиции в объем

Результаты количественного определения инсулина (в процентах от заявленного количества), полученные при варьировании условий разрушения МКИ, представлены в таблице 3. Количество инсулина, заложенное в микроэмульсию при ее изготовлении, составило 4,59±0,69 мг.

Таблица 3.

Количество инсулина, высвободившегося в объем при различных условиях экстрагирования

Среда высвобождения и тип механического воздействия		Количество инсулина, % (n=3)
Термостатирование (2 ч); вода : 95% этиловый спирт	90:10	71,9±0,7
	80:20	83,5±1,5
	70:30	79,6±2,0
	50:50	86,7±0,2
	30:70	85,2±1,3
Вода : 95% этиловый спирт в соотношении 50:50; встряхивание + термостатирование (19 ч)		86,3±1,1
Вода : 95% этиловый спирт в соотношении 50:50; встряхивание + термостатирование (19 ч); УЗВ (10 мин)		91,9±0,9
Вода : 95% этиловый спирт в соотношении 50:50 + 1% TWEEN-20; термостатирование при t=30±2 °С (2 ч); УЗВ (10 мин)		96,7±0,7
Вода : 95% этиловый спирт в соотношении 50:50 + 1% TWEEN-80; термостатирование при t=30±2 °С (2 ч); УЗВ (10 мин)		91,7±1,7

Анализ результатов, полученных при исследовании образцов среды высвобождения методом ВЭЖХ, показал, что прямая взаимосвязь между концентрацией полярного растворителя в составе экстрагента и количеством высвободившегося в объем инсулина не наблюдается. При отсутствии какого-либо механического воздействия наибольшее количество инсулина отмечается в образцах, полученных при высвобождении в смесь вода : 95% этиловый спирт в соотношении 50:50, и составляет 86,7±0,2%. Непрерывное встряхивание образцов в указанной смеси на протяжении 19 ч не повлияло на количество извлекаемого ЛВ. Однако последующая обработка образцов ультразвуком на протяжении 10 минут способствовала увеличению высвобождения гормона до 91,9%.

Выявлено, что внесение в среду высвобождения детергента TWEEN-20 с последующей ультразвуковой обработкой приводит к увеличению количества инсулина, высвобождающегося из микроэмульсии, в то время как добавление TWEEN-80 усилению высвобождения не способствует. Таким образом, при использовании в качестве экстрагента смеси вода : 95% этиловый спирт в соотношении 50:50 с добавлением 1% TWEEN-20 и воздействием ультразвука из аликвоты микроэмульсии удалось извлечь 96,9% от заявленного количества ЛВ.

Такой состав среды высвобождения был предложен для контроля качества микроэмульсии при дальнейших исследованиях.

Исследования ТТС с микроэмульсионной композицией инсулина in vitro

Для подтверждения возможности использования МКИ в качестве матрицы в трансдермальных терапевтических системах были проведены эксперименты *in vitro* по исследованию диффузии инсулина через неконсервированную кожу кролика. Микроэмульсия в составе одной ТТС (10 см^2) содержала 100 Ед гормона. Результаты экспериментов показали, что средняя скорость диффузии инсулина из ТТС составляет примерно 1 Ед/час (n=15), что соответствует скорости секреции гормона поджелудочной железой здорового человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы проведено исследование характеристических параметров микроэмульсионной композиции, содержащей инсулин, для трансдермальной системы доставки гормона.

Подтверждена ее коллоидная стабильность.

Методом разбавления доказано, что изготовленная микроэмульсия относится к обратному типу «вода в масле».

Для оперативной оценки качества изготовленной микроэмульсии выбраны и определены такие параметры, как вязкость и показатель преломления. Измеренное при t=22,5 °С значение вязкости исследуемых образцов микроэмульсии было равно 563±20 мПа·с·г/см^3, а показатель преломления при t=22,7 °С – 1,4±0,14.

Средний размер частиц микроэмульсии составил 2,18±0,06 мкм.

Выбраны условия разрушения микроэмульсии с инсулином, которые обеспечивают экстракцию более 95% ЛВ в среду высвобождения. Данная методика может быть использована при количественном определении инсулина в ТТС.

При исследовании ТТС, содержащей микроэмульсию с инсулином, показано, что скорость диффузии гормона *in vitro* через неконсервированную кожу кролика примерно составляет 1 Ед/ч, что соответствует скорости секреции гормона поджелудочной железой здорового человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Kogan, N.Garti. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles // Adv. Colloid. Interface Sci. 2006. № 16. P. 123–126.
2. P. Boonme. Applications of microemulsions in cosmetics // J. Cosmet. Dermatol. 2007. № 6(4). P. 223–228.
3. L.B. Lopes. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions // Pharmaceutics. 2014. № 6(1). P. 52–77.
4. Chi-Te Huang, Ming-Jun Tsai, Yu-Hsuan Lin, Yaw-Sya Fu, Yaw-Bin Huang et al. Effect of microemulsions on transdermal delivery of citalopram: optimization studies using mixture design and response surface methodology // Int J Nanomedicine. 2013. № 8. P. 229.
5. A. Azeem, Z.I. Khan et al. Microemulsions as a surrogate carrier for dermal drug delivery // Drug Dev Ind Pharm. 2009. № 35(5). P. 525–547.
6. P. Santos, A.C. Watkinson, J. Hadgraft, M.E. Lane. Application of microemulsions in dermal and transdermal drug delivery // Skin Pharmacol Physiol. 2008. № 21(5). P. 246–59.
7. Li-Na Shen, Yong-Tai Zhang, Qin Wang, Ling Xu, Nian-Ping Feng. Preparation and evaluation of microemulsion-based transdermal delivery of total flavone of rhizoma arisaematis // Int. J. Nanomedicine. 2014. № 9. P. 3453–3464.
8. Патент РФ №2445151. Установка для эмульгирования и экстракции / Е.П. Гребенников, А.И. Климов, Н.О. Порошин. – Заявл. 05.08.10; опубл. 20.03.12; Бюл. № 8.
9. Патент РФ № 2357789. Способ эмульгирования жидких компонентов и устройство для его осуществления / А.В. Власов, Т.А. Ефремова, В.В. Власов; патентообладатель НОАНО «Балаковский институт бизнеса и управления». – Заявл. 21.05.07; опубл. 10.06.09; Бюл. № 16.
10. Патент РФ № 2441694. Агрегат для получения эмульсий / А.И. Зайцев, А.Е. Лебедев и др.; патентообладатель ГОУ ВПО «Ярославский государственный технический университет». – Заявл. 01.07.10; опубл. 10.02.12; Бюл. № 4.
11. S. Heuschkel, A. Goebel, R.H. Neubert. Microemulsions-modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery // J. Pharm. Sci. 2008. № 97(2). P. 603–631.
12. A. Cichewicz, C. Pacleb, A. Connors, M.A. Hass, L.B. Lopes. Cutaneous delivery of α-tocopherol and lipoic acid using microemulsions: influence of composition and charge // J. Pharm. Pharmacol. 2013. № 65(6). P. 817–826.
13. К.В. Алексеев, К.Г. Турчинская, Е.В. Блынская, Н.В. Тихонова. Технология самоэмульгирующихся систем доставки лекарственных веществ // Вестник новых медицинских технологий. 2014. Т. 21. № 1. С.128–133.
14. M. Lapteva, Y.N. Kalia. Microstructured bicontinuous phase formulations: their characterization and application in dermal and transdermal drug delivery // Expert Opin Drug Deliv. 2013. № 10(8). P. 1043–1059.
15. V.A. Ryzhikova, A.A. Tikhobayeva, L.A. Salomatina, S.V. Kursakov, E.G. Kuznetsova, O.M. Kuryleva, V.I. Sevastianov. Effect or the transfer activator on functional properties of the bromocain matrix transdermal therapeutic systems // Inorganic materials: applied research. 2014. V. 5. № 5. P. 498–503.
16. Патент РФ № 2481822. Микроэмульсионные композиции для создания трансдермальных и трансмукозальных форм фармацевтических средств и косметических препаратов и способ их получения / В.И. Севастьянов, Л.А. Саломатина, Е.Г. Кузнецова, А.А. Тихобаева; патентообладатель Институт медико-биологических исследований и технологий. – Заявл. 21.02.12; опубл. 20.05.13; Бюл. № 14.
17. ГОСТ 29188.3-91. Изделия косметические. Методы определения стабильности эмульсии.
18. К.И. Евстратова. Физическая и коллоидная химия. – М.: Высшая школа. 1990. 453 с.
19. Т. Sobisch, A. Uhl. Стабильность эмульсий и дозирование деэмульгатора. URL: https://tirit.org/articles/mills_03.php (дата обращения 15.03.2017).
20. В.И. Севастьянов, Л.А. Саломатина, Е.Г. Кузнецова, О.М. Собко, В.И. Шумаков. Матричные и резервуарные трансдермальные терапевтические системы инсулина на основе нетканых и полимерных материалов // Перспективные материалы. 2004. № 4. С. 44–48.



Вибровискозиметр AND SV-1A

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!

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

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ

С.А. Кедик[1,2], В.В. Суслов[1,2]*, И.П. Седишев[1,2], Т.Т.Т. Нгуен[1], Е.А. Шняк[1,2]

Резюме. В обзоре литературы представлены сведения о нестероидных противовоспалительных препаратах и различных подходах к созданию лекарственных форм с модифицированным высвобождением нестероидных противовоспалительных средств. Рассмотрены биологически совместимые полимеры синтетического и природного происхождения, применяемые в качестве носителей лекарственных средств. Обсуждены различные методы, используемые для получения полимерных микрочастиц и лекарственных форм нестероидных противовоспалительных средств на их основе. Приведена характеристика готовых микрочастиц с инкапсулированными в них нестероидными противовоспалительными средствами.

Ключевые слова: нестероидные противовоспалительные средства, полимерные микрочастицы, модифицированное высвобождение.

DOSAGE FORMS OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY PHARMACEUTICAL SUBSTANCE FOR CONTROLLED RELEASE

S.A. Kedik[1,2], V.V. Suslov[1,2]*, I.P. Sedishev[1,2], T.T.T. Nguen[1], E.A. Shnyak[1,2]

Abstract. This review is about nonsteroidal anti-inflammatory drugs and different approaches to development of pharmaceutical forms for controlled nonsteroidal anti-inflammatory drug release. Natural and synthetic biocompatible polymers used as drug carriers were considered. Different methods used for production of polymeric microparticles and formulations of nonsteroidal anti-inflammatory agents based on them were discussed. Characterization of microparticles with encapsulated nonsteroidal anti-inflammatory agents was given.

Keywords: nonsteroidal anti-inflammatory drug, polymeric microparticles, controlled release.

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

2 – ЗАО «Институт фармацевтических технологий», 121353, Россия, г. Москва, Сколковское ш., д. 21/32

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

2 – ZAO «Institute of pharmaceutical technologies», 21/32, Skolkovskoe shosse, Moscow, 121353, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: suslov@ipt.ru.com

ВВЕДЕНИЕ

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) – один из наиболее часто используемых в медицинской практике видов лекарственных средств. Они характеризуются противовоспалительным, жаропонижающим и обезболивающим эффектом.

Несмотря на разнообразие химических структур, все НПВП обладают сходным терапевтическим действием: они вызывают уменьшение отека, обезболивание, ослабление гипертемии облегчение лихорадочного состояния. Спектр заболеваний, при которых используются НПВП, чрезвычайно широк. Он включает ревматические заболевания (ревматоидный артрит, анкилозирующий спондиллит, подагра и т.д.), боли различного генеза (невралгии, миалгии, головные и зубные боли, боли при первичной дисменорее и др.), ишемическую болезнь сердца [1, 2] и другие заболевания. Использование НПВП в большинстве случаев улучшает качество жизни больных с такими заболеваниями.

Вместе с тем частое применение НПВП сопровождается побочными эффектами и осложнениями. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что их применение чаще всего приводит к нарушениям деятельности желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [3]. Установлены основные звенья патогенеза и механизм повреждающего действия НПВП на желудок и 12-перстную кишку [4, 5].

Установлено, что неблагоприятные эффекты, возникающие при применении НПВП, зависят прежде всего от дозы. Во многих случаях имеют место достаточно тяжелые последствия, связанные с возможностью перфорации язвы и желудочно-кишечными кровотечениями, вплоть до летального исхода. Такие осложнения существенно ограничивают использование НПВП.

Одним из способов улучшения фармакокинетических параметров НПВП является применение пролонгированных форм (ретард). В настоящее время доступны пероральные лекарственные формы (ЛФ) с пролонгированным

высвобождением, например с энтеросолюбильным покрытием. Такие ЛФ представляют собой двухслойные таблетки, из которых активное вещество высвобождается в течение 12–24 ч. Однако ни новые формы с регулируемым высвобождением, ни тем более традиционные формы, при использовании которых происходит более резкий выброс препарата, не обеспечивают эффективную доставку лекарственного средства и характеризуются высоким потенциалом желудочно-кишечного раздражения [6].

Более перспективным является создание новых лекарственных форм НПВП с модифицированным высвобождением, которые позволят повысить терапевтическую эффективность, переносимость и безопасность лекарственной терапии [7].

Имеются апробированные подходы к созданию новых систем доставки лекарственных средств, которые вполне могут быть реализованы и для НПВВ [8, 9], например использование полимерных микрочастиц, которые позволяют регулировать процессы поступления лекарственного вещества в организм на молекулярном уровне [10, 11].

В связи с этим целью обзора является обобщение информации о лекарственных формах нестероидных противовоспалительных средств с модифицированным высвобождением.

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ СИСТЕМ ДОСТАВКИ НПВС НА ОСНОВЕ МИКРОЧАСТИЦ

Системы доставки лекарственных средств (ЛС) на основе микрочастиц имеют ряд преимуществ. В частности, они обеспечивают постоянный и длительный терапевтический эффект, который позволяет снизить частоту применения и тем самым улучшает соблюдение режима применения лекарственных препаратов пациентом [12], что повышает эффективность лечения и снижает частоту и интенсивность побочных эффектов [13, 14]. При этом терапевтическая эффективность зависит от скорости деградации микрочастиц и высвобождения ЛС из них и, таким образом, напрямую зависит от морфологии частиц [11, 15].

W.M. Vaughn и сотр. [8] показали, что микрочастицы с инкапсулированными НПВВ снижают токсические и раздражающие эффекты на ЖКТ, оказывают длительный лечебный эффект и усиливают его в сравнении с традиционными ЛФ. Применение микрочастиц для перорального введения обеспечивает регулируемое высвобождение ЛС, что в большинстве случаев устраняет раздражение ЖКТ или по крайней мере позволяет его уменьшить. Кроме того, данная система доставки позволяет более равномерно распределить частицы в ЖКТ, что приводит к более полной и равномерной абсорбции лекарственного средства и уменьшает локальное раздражение по сравнению со стандартными ЛФ (например, нераспадающимися полимерными матричными таблетками) [8, 16, 17]. При этом пероральное введение микрочастиц не сопровождается нежелательным накоплением полимерного материала в кишечнике.

В то же время пациенты сталкиваются с недостатками систем доставки НПВВ на основе микрочастиц. Такие лекарственные формы не следует дробить или жевать, так как любое нарушение целостности может привести к потере свойств микрочастиц с модифицированным высвобождением. Не следует забывать о дистальных токсичных проявлениях ЛФ НПВВ с модифицированным высвобождением и с энтеросолюбильным покрытием, которые могут проявляться при смещении участка воспаления из желудка в тонкую кишку, где повреждения могут оставаться бессимптомными, пока не возникнут более серьезные проблемы [18].

ПОЛИМЕРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОЧАСТИЦ С НПВС

В качестве носителей лекарственных средств в настоящее время используют природные и синтетические биоразлагаемые полимеры. Природные полимеры, например белки и полисахариды, являются естественными продуктами жизнедеятельности живых организмов, они безопасны, легко доступны и относительно недороги. Преимуществами синтетических биоразлагаемых полимеров являются высокая чистота, возможность получать стандартизованные продукты с требуемыми свойствами (молекулярная масса, мономерный состав, концевые группы и т.д.).

Характер высвобождения НПВВ из микрочастиц зависит от кристалличности, гидрофобности, мономерного состава и молекулярной массы (ММ) синтетических полимеров [19–22], в качестве которых чаще всего используют алифатические сложные полиэфиры, такие как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, сополимеры молочной и гликолевой кислот, поли-ε-капролактон [23–25]. Безопасность таких полимеров определяется их способностью к биоразложению на нетоксичные продукты при контакте с биологическими средами после введения в организм [26]. Инкапсулирование различных НПВВ и других ЛВ в полимерные микрочастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (СМГК) позволяет получить пролонгированный терапевтический эффект и свести к минимуму их побочные эффекты.

Одним из природных полимеров, применяемых в качестве материала для получения микрочастиц, со-

держащих НПВС, является альбумин [27, 28]. Скорость высвобождения ЛС из таких микрочастиц и скорость, с которой микрочастицы разлагаются в организме, зависят от степени их сшивки. Сшивку осуществляют путем тепловой денатурации альбумина или использования химических сшивающих агентов, таких как формальдегид или глутаральдегид.

Также для получения полимерных частиц применяют целлюлозоподобный, положительно заряженный и мукоадгезивный полисахарид – хитозан, который обладает ранозаживляющим, противоязвенным действием. Использование хитозана в составе пероральных лекарственных форм позволяет удерживать ЛС в ЖКТ за счет его мукоадгезивных свойств, что продлевает время прохождения ЛС через ЖКТ и способствует улучшению биодоступности [29–32].

Ниже приводятся методы получения микрочастиц на основе природных и синтетических полимеров и их комбинаций, нашедшие применение в качестве носителей НПВП.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОЧАСТИЦ С НПВС

Микрокапсулирование – технология, позволяющая включать твердые частицы, жидкости или газы внутрь одного или нескольких полимерных покрытий. Существует ряд методов микрокапсулирования ЛС, таких как метод экстракции/испарения растворителя, распылительная сушка, разделение фаз (коацервация), полимеризация и др. Вместе с тем методы, используемые для получения микрочастиц, должны обеспечивать высокую степень включения лекарственного средства, получение частиц контролируемых размеров (нано- или микрометровых). Средний размер полученных микрочастиц может контролироваться путем изменения условий процесса, и полученные микрочастицы должны высвобождать лекарственное средство в течение длительного времени. Для парентеральных препаратов уменьшение размера частиц позволит свести к минимуму раздражение в месте инъекции. Полученные микрочастицы должны быть стабильными при хранении [11, 33, 34].

Метод распылительной сушки

В сравнении с другими методами распылительная сушка имеет ряд преимуществ. Этот метод показывает высокую воспроизводимость, он проходит в относительно мягких условиях, позволяет контролировать размер частиц, меньше зависит от растворимости ЛС и полимера. Также преимуществом метода является возможность его осуществления в виде непрерывного процесса [11, 35].

Микрочастицы на основе смеси полимеров, содержащие инкапсулированный кетопрофен, были получены методом распылительной сушки. Для этого раствор смеси кетопрофена и двух полимеров (ацетобутират целлюлозы и поли-ε-капролактон), взятых в различных соотношениях, распыляли в потоке горячего воздуха с образованием микрочастиц. Полученные микрочастицы имели средний размер частиц от 5 мкм до 100 мкм и степень включения ЛС до 94% [36].

Своего рода модификацией этого метода можно считать покрытие в кипящем слое. С его помощью были получены микрокапсулы для перорального применения, содержащие диклофенак натрия. Микрокапсулы состояли из ядра карбоната кальция, размер которого составлял 32–44 мкм, слоя активного вещества (диклофенак натрия), гидроксипропилцеллюлозы и полиэтиленгликоля-6000, первого слоя – полимера эудрагит L30D и второго слоя – полимера эудрагит RS30D. Благодаря первому слою полимера уменьшается растворимость диклофенака натрия в микрокапсуле, которая способствует увеличению периода высвобождения лекарственного средства. Это позволило уменьшить количество полимера эудрагит RS30D, необходимого для того, чтобы продлить высвобождение лекарственного средства. Результатом стало снижение размера микрокапсул до 91 мкм и достижение содержания лекарственного средства до 29% [37].

Главными недостатками метода распылительной сушки являются значительная потеря продукта, чаще в результате прилипания частиц к внутренним стенкам оборудования, и образование больших агрегатов из частиц из-за наличия в них остаточного растворителя. Еще одним недостатком метода является необходимость нагревания, что не позволяет инкапсулировать легколетучие жидкости и накладывает ограничение на микрокапсулирование термолабильных веществ [11].

Метод одностадийного эмульгирования с последующей экстракцией/испарением растворителя

Метод одностадийного эмульгирования с последующей экстракцией/испарением растворителя используют главным образом для инкапсулирования гидрофобных ЛС путем образования эмульсии типа «масло/вода» (рисунок 1). Полимер растворяют в несмешивающемся с водой летучем органическом растворителе, затем в полученном растворе растворяют или суспендируют ЛВ. Полученную смесь диспергируют в большом объеме воды в присутствии эмульгатора. Органический растворитель удаляют из эмульсии либо испарением, либо экстракцией в большом количестве воды, в результате образуются микрочастицы. Следует отметить, что морфология микрочастиц опре-

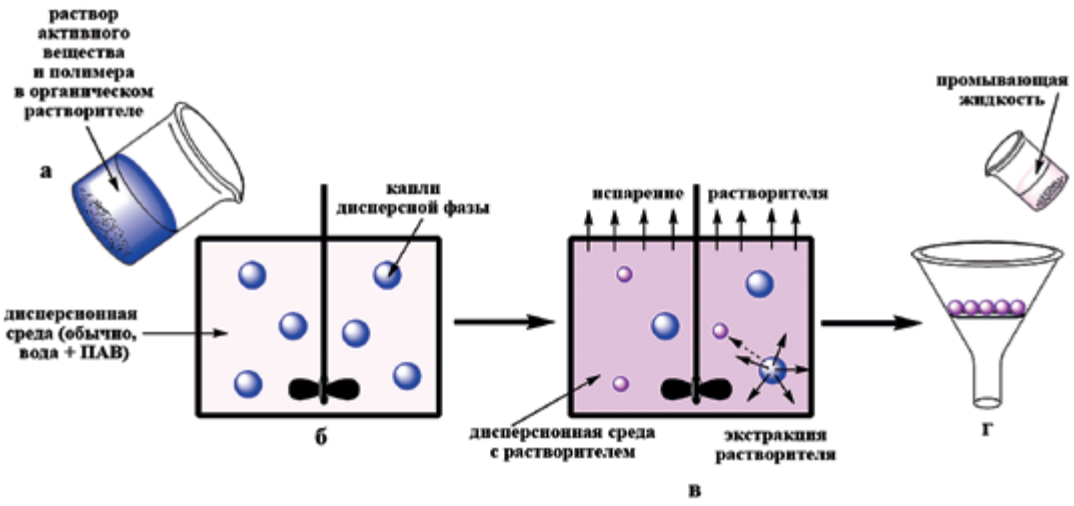


Рисунок 1. Формирование микросфер путем эмульгирования органического раствора гидрофобного лекарственного средства и полимера в водной среде с последующей экстракцией/испарением растворителя [11]

деляется скоростью испарения, температурой среды, растворимостью используемого полимера и растворителя [11, 38–40].

Рассматриваемый метод нашел применение для получения микрочастиц с инкапсулированными индометацином, ибупрофеном, кетопрофеном. Для этого полимер и лекарственное средство растворяли в несмешивающемся с водой органическом растворителе. Полученный раствор эмульгировали в водном 0,25 мас.% растворе поливинилового спирта. Полученную эмульсию типа «масло/вода» выдерживали при перемешивании в течение 90 минут при комнатной температуре и при атмосферном давлении. Сформировавшиеся микрочастицы отделяли фильтрованием, промывали водой и высушивали. Полученные микрочастицы имели степень включения ЛС от 80% до 90% для индометацина, от 60% до 75% для ибупрофена и от 52% до 64% для кетопрофена [41].

С целью увеличения времени пребывания кетопрофена в толстой кишке были получены флотирующие микросферы. Для этого раствор кетопрофена и полимера в смеси этанола и дихлорметана, взятых в объемном соотношении 1:1, эмульгировали в 0,2% растворе лаурилсульфата натрия при перемешивании пропеллерной мешалкой (150 об/мин). Полученные частицы имели средний размер частиц 500 мкм [42].

Метод эмульгирования/сшивания

Метод эмульгирования/сшивания является относительно простым и применимым для получения микрочастиц, содержащих инкапсулированные НПВВ. В методе используется минеральное или растительное масла в качестве масляной фазы, водный раствор полимера и лекарственного средства в качестве водной фазы. Формирование микрочастиц осуществляется в результате сшивания полимера путем воздействия на него химического агента или температуры. За счет изменения вязкости масляной фазы, концентрации сшивающего агента, продолжительности сшивки и т.д. можно изменять скорость высвобождения и содержание лекарственного средства в микрочастицах [43, 44]. С использованием данного метода были получены микрочастицы на основе желатина, содержащие инкапсулированный кеторолака трометамин, для интраназальной системы доставки ЛС. Для получения микрочастиц лекарственное средство диспергировали в водном растворе желатина и полученную смесь эмульгировали в жидком парафине. После обработки эмульсии глутаровым альдегидом происходило образование микрочастиц со степенью включения от 25 до 47% [21].

Аналогично были получены микрочастицы на основе хитозана, содержащие диклофенак натрия. При получении микрочастиц сшивание осуществляли под действием глутарового альдегида, серной кислоты и температуры. Полученные микрочастицы были сферическими и имели гладкую поверхность и средний размер от 40 до 230 мкм. Сшивание хитозана происходило во всех случаях по свободной аминогруппе. Кристалличность полимера увеличивалась после сшивания. Содержание лекарственного средства в микрочастицах составило 28–30% – для микрочастиц, сшитых серной кислотой; 23–29% – для микрочастиц, сшитых глутаровым альдегидом, и 15–23% для микрочастиц, полученных термосшиванием. Самое медленное высвобождение диклофенака из микрочастиц, помещенных в буферный раствор с pH 7,4, наблюдалось для частиц, полученных с помощью глутарового альдегида, – 42% за 500 мин, а самое быст-

рое составило 81% для микрочастиц, сшитых серной кислотой [45].

S.T. Mathew и соавторы [46] описали получение микрочастиц на основе чистого альбумина, содержащих инкапсулированный кеторолак, методом эмульгирования/сшивания. Полученные частицы имели средний размер до 40 мкм, а степень включения кеторолака при их получении составляла 20–60%. Для полученных микрочастиц было характерно двухфазное высвобождение лекарственного вещества, включающее начальное быстрое высвобождение с последующим пролонгированным высвобождением в течение 24 ч.

Микрочастицы, содержащие индометацин, на основе хитозана также были получены методом эмульгирования/сшивания. Исследовали влияние состава на степень включения индометацина в микрочастицах и профиль высвобождения ЛС из них. Результаты показали, что соотношение индометацин/хитозан и количество сшивающего агента оказывают наибольшее влияние на характеристики микрочастиц. При соотношении ЛС/полимер 1:2 степень включения достигала 65%, а при соотношении 2:1 – 92%. Около 67% индометацина высвобождалось в течение 300–400 мин при соотношении ЛС/полимер, равном от 1,5:1 до 1:1,5, и концентрации сшивающего агента от 1,1 до 2,2 мг/мл [47].

Метод двойного эмульгирования

Метод двойного эмульгирования нашел применение для получения микрочастиц на основе хитозана с кетопрофеном и индометацином. При этом в зависимости от полимеров и лекарственных веществ использовали различные типы двойных эмульсий. Эмульсия «масло/вода/масло» была использована в случае микрочастиц, содержащих кетопрофен, эмульсия «вода/масло/вода» – для микрочастиц с индометацином [48, 49]

Метод коацервации

Метод простой коацервации состоит в фазовом разделении раствора полимера посредством добавления органического осадителя. ЛС изначально диспергируют или растворяют в растворе полимера. Затем добавляют осадитель, например силиконовое масло, для извлечения органического растворителя из раствора полимера, тем самым вызывая осаждение полимера. Осадитель затем удаляют добавлением второго летучего растворителя, такого как гептан или петролейный эфир, который способствует затвердеванию микрочастиц. Микрочастицы собирают и сушат после удаления избытка растворителя. В качестве осадителей часто используют силиконовое масло, растительное масло, легкий жидкий парафин, низкомолекулярный полибутадиен. Скорость добавления осадителя влияет на скорость извлечения растворителя; размер частиц и степень включения ЛС в полимерные матрицы, а также характеристики микрочастиц определяются молекулярной массой полимера, вязкостью осадителя, концентрацией полимера. Главным недостатком этого метода является высокая вероятность образования больших агрегатов.

Обращение фаз разбавленных растворов полимеров в узком интервале концентраций с оптимальным соотношением растворителя и осадителя приводит к спонтанному образованию наночастиц или микрочастиц, которые имеют большой потенциал для использования в качестве систем доставки ЛС. Процесс микрокапсулирования с обращением фаз отличается от существующих методов инкапсулирования тем, что он почти мгновенный. Размер полученных частиц определяется вязкостью полимера, а не скоростью перемешивания первичной эмульсии, как в традиционных методах микрокапсулирования.

Комплексная (сложная) коацервация отличается от простой коацервации лишь тем, что разделение фаз происходит за счет взаимодействия катионов и анионов (чаще всего поликатинов с полианионами), что и приводит к образованию новой фазы в системе. Этим методом были получены микрочастицы на основе смеси полимеров альгинат/хитозан с инкапсулированным диклофенаком натрия. Раствор, содержащий 25 мас.% диклофенака натрия, добавляли в 1,2 мас.% водный раствор альгината натрия и перемешивали до полного растворения веществ. Полученный раствор добавляли по каплям к раствору, содержащему катион Ca^{2+} или Al^{3+} и хитозан в уксусной кислоте. Образовавшиеся микрочастицы оставляли в исходном растворе в течение 24 часов для формирования геля. Микрочастицы отделяли фильтрованием. Полученные микрочастицы имели средний размер в диапазоне от 2 до 4 мкм и степень включения 98%. Высвобождение диклофенака натрия из микрочастиц было минимальным при низких значениях pH раствора хитозана, в то время как при повышении pH до 6,4 и 7,2 оно проходило в течение нескольких минут. Отношением альгинат/хитозан и природой катиона контролировали скорость высвобождения ЛС [50].

Микрочастицы с контролируемым высвобождением на основе комбинации полимеров яичный альбумин/хитозан, содержащие индометацин в качестве модельного ЛС, были успешно получены методом коацервации. Взаимодействие между отрицательно заряженными молекулами яичного альбумина в фосфатном буфере (pH 7,2) или растворе гидроксида натрия и положительно заряженными молекулам хитозана, растворенного в разбавленной уксусной кислоте, с образованием нерастворимого осадка являлось необходимым условием для формирования микрочастиц [51].

Метод кристаллизации из расплава

Метод кристаллизации из расплава относительно прост в реализации и позволяет получать достаточно чистые микрочастицы без вспомогательных веществ, растворителей и дополнительной обработки. Всё это делает данный метод весьма привлекательным. Однако следует отметить, метод исключает использование термолабильных лекарственных средств и полимерных материалов.

Данным методом были получены микрочастицы на основе поли-ε-капролактона, содержащие инкапсулированный индометацин. Поверхность полученных частиц была модифицирована желатином и хитозаном. Все полученные микрочастицы имели сферическую форму независимо от типа материала, использованного для покрытия. Микрочастицы с модифицированной поверхностью имели размер, близкий к размеру немодифицированных микрочастиц. Степень включения индометацина находилась в диапазоне 8,65–8,81% для немодифицированных микрочастиц и 8,22–8,68% для микрочастиц с покрытием из хитозана или желатина. Высвобождение индометацина из модифицированных микрочастиц характеризовалось двумя экспоненциальными профилями: в первой фазе 80% ЛС высвобождалось в течение 4 ч, во второй фазе около 20% – в течение последующих 24 ч [52].

Разновидностью указанного метода является вариант, когда расплавление и диспергирование смеси полимера и лекарственного вещества проводится в горячей воде, а формирование микрочастиц осуществляется после ее остывания. Такой подход неприменим для инкапсулирования гидрофильных веществ и веществ, неустойчивых к гидролизу.

На примере микрочастиц, содержащих ибупрофен, было изучено влияние скорости перемешивания и способа охлаждения на размер частиц. Было показано, что оба эти параметра независимо друг от друга влияют на размер частиц, а их варьирование позволяет получать частицы со средним размером от 180 мкм до 1000 мкм [53]. Так, с увеличением скорости перемешивания средний размер частиц снижался, и если при скорости 600 об/мин средний размер частиц составлял от 710 до 1000 мкм, то при 1300 об/мин – от 180 до 200 мкм. В то же время при быстром охлаждении водной среды эмульгирования расплава средний размер частиц составлял 300–600 мкм, а при медленном – от 500 до 1000 мкм.

В таблице 1 приведены примеры получения микрочастиц, которые ранее в силу тех или иных причин не были упомянуты в тексте обзора, но могут представлять интерес в качестве дополнительной информации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несоблюдение пациентом правил приема НПВП, имеющих краткое время полувыведения, и проявление серьезных побочных эффектов со стороны ЖКТ при длительном их применении и высокой дозировке обуславливают необходимость разработки лекарственной формы с модифицированным высвобождением ЛС, характеризующейся измененным механизмом и характером высвобождения активного вещества.

Благодаря модифицированному высвобождению ЛС и широкому диапазону производственных технологий полимерные микрочастицы являются предпочтительными по сравнению с другими системами доставки ЛС. Приведенные в обзоре данные позволяют оценить перспективы создания новых лекарственных форм НПВВ и выбрать наиболее рациональный метод их приготовления.

ЛИТЕРАТУРА

1. A.A. Mansour. Cox-2 specific inhibitors (COXIBS) crisis // Basrah Journal of Surgery. 2003. V.9. P. 138-143.
2. T. Ramasamyab, H.B. Ruttalac, S. Shanmugamd, S.K. Umadevi. Eudragit-coated aceclofenac-loaded pectin microspheres in chronopharmacological treatment of rheumatoid arthritis // Drug Delivery. 2013. V. 20. P. 65–77.
3. C. Sostres, C.J. Gargallo, M.T. Arroyo, A. Lanas. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract // Best Practice Research Clinical Gastroenterology. 2010. V. 24. P. 121–132.
4. A.H.A. Hassanein, M.A.E. Abdelrahim, A.S.A. Said, R.R.S. Hussein, M. Abuseif. The incidence of upper gastrointestinal complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs in elderly patients // Medicine Science. 2014. V. 3. P. 1032–1045.
5. J.F. Fries, C.A. Williams, D.A. Bloch. The relative toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs // Arthritis Rheum. 1991. V. 34. P. 1353–1357.
6. A.H. El-Kamel, M.S. Sokar, S.S. Al Gamal, V.F. Naggar. Preparation and evaluation of ketoprofen floating oral delivery system // Int.J.Pharm. 2001. V. 220. P. 13–21.
7. М.Ю. Леонова, Ю.Б. Белоусов. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением и системы доставки лекарств. — М.: Литтерра, 2011. 655 с.
8. Patent US № 6217911. Sustained release non-steroidal, anti-inflammatory and lidocaine PLGA microspheres / W.M. Vaughn, J.E. van Hamont, J.A. Setterstrom.
9. P. Del Gaudio, P. Russo, M.R. Lauro, P. Colombo, P. Rita. Encapsulation of ketoprofen and ketoprofen lysinate by prilling for controlled drug release // AAPS Pharm.Sci.Tech. 2009. V. 10. P. 1178–1185.
10. К.В. Алексеев, Е.В. Блынская, С.А. Кедик. Фармацевтическая нанотехнология: учебное пособие. – М.: Институт фармацевтических технологий. 2012. 542 с.
11. Е.С. Жаворонок, С.А. Кедик, А.В. Панов, Е.А. Петрова, В.В. Суслов. Полимерные микрочастицы для медицины и биологии: учеб. пособие. – М.: ИФТ, 2014. 480 с.

Таблица 1.

Некоторые полимеры и методы, используемые для получения микросфер, содержащих НПВВ, и их применение

ЛС	Методы микрокапсулирования	Полимеры	Цель/применение	
Аспирин	Испарение растворителя	Этилцеллюлоза	Модифицированное высвобождение	[54]
	Одинарное эмульгирование/испарение растворителя	Этилцеллюлоза	Модифицированное высвобождение	[55]
	Распылительная сушка	Гидрогенизированное соевое масло	Контролируемое высвобождение	[56]
Диклофенак	Кристаллизация из расплава	Моностеарат глицерина, стеариловая кислота	Пролонгированное высвобождение	[57]
	Одинарное эмульгирование/испарение растворителя	Полимер молочной кислоты, сополимер молочной и гликолевой кислот	Модифицированное высвобождение	[58, 59]
	Двойное эмульгирование со стабилизатором	Поли-δ-валеролактон	Пролонгированное высвобождение	[60]
	Полимеризация	Альбумин	Модифицированное высвобождение	[61]
Диклофенак натрия	Фазовое разделение – коацервация с использованием циклогексана	Этилцеллюлоза	Контролируемое высвобождение	[62]
	Фазовое разделение – коацервация с использованием толуола и петролейного эфира	Этилцеллюлоза	Контролируемое высвобождение	[63]
	Эмульгирование – сшивание с использованием глутаральдегида и серной кислоты в качестве сшивающих агентов	Эудрагит	Контролируемое высвобождение	[64]
	Одинарное эмульгирование	Альгинат, эудрагит NE30D, эудрагит RS 30D	Контролируемое высвобождение	[65]
	Испарение растворителя	Эудрагит RL	Пролонгированное высвобождение	[66]
	Распылительная сушка	Эудрагит RS 30D, L-30D-55	Пролонгированное высвобождение суспензии	[67]
	Фазовое разделение – коацервация	Этилцеллюлоза	Модифицированное высвобождение	[68]
	Испарение растворителя	Эудрагит RL	Пролонгированное высвобождение	[69]
Дифлунизал	Метод диффузии растворителя и распылительная сушка	Эудрагит RS 100	Пролонгированное высвобождение	[70]
Ибупрофен	Испарение растворителя	Эудрагит (R) RS 100	Модифицированное высвобождение	[71]
	Испарение растворителя	Полистирол	Модифицированное высвобождение	[72]
	Коацервация фазового разделения с использованием сульфата натрия	Фталат гидроксипропилметилцеллюлозы	Пролонгированное высвобождение	[73]
	Метод эмульгирования с дальнейшей диффузией растворителя	Эудрагит RS 100, эудрагит RL 100	Пролонгированное высвобождение	[74]
	Метод кристаллизации из расплава	Карнаубский воск	Модифицированное высвобождение	[75]
	Одинарное эмульгирование	Полистирол, этилцеллюлоза	Модифицированное высвобождение	[76]
Индометацин	Коацервация	Желатин	Пролонгированное высвобождение	[77]
	Коацервация	Этилцеллюлоза	Пролонгированное высвобождение	[78]
	Распылительная сушка	Гидроксипропилметилцеллюлоза, поливиниловый спирт, гидроксипропилцеллюлоза	Быстрое растворение	[79]
	Испарение растворителя	Метокси-полиэтиленгликоль/поли-ε-капролактон	Парентеральное пролонгированное высвобождение	[81]
	Коацервация	Хитозан	Перорально	[82]

Окончание табл. 1

ЛС	Методы микрокапсулирования	Полимеры	Цель/применение	
Кетопрофен	Сложный модифицированный метод эмульгирования	Ацетат-бутират целлюлозы, полистирол	Контролируемое высвобождение	[83]
	Распылительная сушка	Эудрагит S и L, фталат ацетата целлюлозы, целлюлозы ацетат-тримеллитат, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетат гидроксиметилцеллюлозы	Гастрорезистентные микрокапсулы с пролонгированным высвобождением	[84]
	Распылительная сушка	Целлюлозы ацетат-тримеллитат, этилцеллюлоза	Пролонгированное высвобождение	[85]
	Эмульгирование/испарение растворителя	Эудрагит RS	Пролонгированное высвобождение	[86]
	Эмульгирование/испарение растворителя	Эудрагит RS, эудрагит RS-RL, эудрагит RL	Модифицированное высвобождение	[87]
	Метод «dry-in-oil»	Этилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, полиэтиленгликоль	Модифицированное высвобождение	[88]
Кеторолака трометамин	Коацервация	Эудрагит RS 100	Пролонгированное высвобождение	[89]
	Эмульгирование/испарение растворителя	Альбумин	Контролируемое высвобождение	[90]
	Коацервация	Полимолочная кислота	Пролонгированное высвобождение	[91]
Напросен	Метод соосаждения	Эудрагит L100-55	Таблетки пролонгированного высвобождения	[92]
	Эмульгирование/испарение растворителя	Сополимер молочной и гликолевой кислот	Внутрисуставно	[93]

12. Long acting injections and implants / Ed. by C.W. Wright, D.J. Burgess. – N.Y.: Springer, 2012. 458 p.
13. Microincapsulation. Methods and industrial applications / Ed. by S. Benita. – N.Y.: Taylor and Francis, 2006. 756 p.
14. В.А. Лившиц, А.П. Бонарцев, А.Л. Иорданский, Е.А. Иванов, Т.А. Махина, В.Л. Мышкина, Г.А Бонарцева. Микросферы из поли-3-гидроксибутирата для пролонгированного высвобождения лекарственных веществ // Высокомолекулярные соединения, Сер. А. 2009. Т. 51. № 7. С. 1243–1251.
15. Е.А. Петрова. Разработка состава и технологии получения инъекционной лекарственной формы налтрексона с модифированным высвобождением: Дисс. ... канд. фарм. наук. – М. 2014. 147 с.
16. P. Singh , V.K. Chaudhari, P.K. Verma, A.K. Singh, V.K. Yadav. Multiunit floating drug delivery system a significant tool for the treatment of peptic ulcer disease // Int. J Pharm. Sci. Res. 2015. V. 6. P. 1351–1362.
17. J. Sjoegren, L.F. Prescott, W.S. Nimmoe. Rate Control in Drug Therapy – Edinburgh: Churchill Livingstone, 1985. P. 38-47.
18. F. Castelli, B. Conti, D.E. Maccarrone, U. Conte, G. Puglisi. Comparative study of 'in vitro' release of anti-inflammatory drugs from polylactide-co-glycolide microspheres // Int. J. Pharm. 1998. V. 176. P. 85–98.
19. К.В. Алексеев, И. А. Грицкова, С. А. Кедик. Полимеры для фармацевтической технологии: учебное пособие. – М. 2011. 511 с.
20. M.N. Ranjha, H. Khan, S. Naseem. Encapsulation and characterization of controlled release flurbiprofen loaded microspheres using beeswax as an encapsulating agent // J Mater Sci: Mater Med. 2010. V. 21. P. 1621–1630.
21. C. Sankar, B. Mishra. Development and in vitro evaluations of gelatin A microspheres of ketorolac tromethamine for intranasal administration // Acta Pharm. 2003. V. 53. P. 101–110.
22. S.K. Noveen Kumar Reddy, V.R. Ravi Kumar, R. Revathi, V. Ganesan. Preparation and evaluation of ethyl cellulose microspheres of ibuprofen for sustained drug delivery // Int. J Pharm. Res. 2010. V. 2. Is. 8. A. 019
23. С.А. Кедик, Е.С. Жаворонок, И.П. Седишев, А.В. Панов, В.В. Суслов, Е.А. Петрова, М.Д. Сапельников, Д.О. Шаталов, Д.В. Ерёмин. 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.
24. W.B. Liechty, D.R. Kryscio, B.V. Slaughter, N.A. Peppas. Polymers for drug delivery systems // Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng. 2010. V. 1. P. 149–173.
25. T. Ramasamy, S.K. Noveenkumar reddy, V.R. Ravi Kumar, R. Revathi, V. Ganesan. Eudragit-coated aceclofenac-loaded pectin microspheres in and on cell membrane molecular models // Biophysical Chem. 2010. V. 147. P. 53–58.
26. В.И. Севастьянов, М.П. Кирпичников. Биосовместимые материалы. – М.: Медицинское информационное агентство. 2011. 408 с.
27. B.K. Nanjwade, H.M. Bechra, G.K. Derkar, F.V. Manvi, V.K. Nanjwade. Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems // Eur. J Pharm. Sci. 2009. V. 38. P. 185–196.
28. A.V.R. Urs, K. Kavitha, G.N. Sockan. Albumin microspheres: an unique system as drug delivery carriers for non steroidal anti-inflammatory drugs

(nsaids) // Int. J Pharm. Sci. Rev. Res. 2010. V. 5. Issue 2. P. 2799–2813.

29. R. Abdeen, N. Salahuddin. Modified chitosan-clay nanocomposite as a drug delivery system intercalation and in vitro release of ibuprofen // Hindawi Publishing Corporation J Chem. 2013. P. 9.

30. S. Abd El-Rasoul, M.M. Ahmed. Chitosan polymer as a coat of calcium alginate microcapsules loaded by non-steroidal antiinflammatory drug. // Bull. Pharm. Sci., Assiut Univ. 2010. V. 33. P. 179–186.

31. J. Shaji, V. Jain, S. Lodha. Chitosan: a novel pharmaceutical excipient // Int. J Pharm. Applied Sci. 2010. V. 1. P. 50–53.

32. J.H. Hamman. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. // Mar. Drugs. 2010. V. 8. P. 1305–1322.

33. Е.А. Петрова, С.А. Кедик, К.В. Алексеев, Е.В. Блынская, А.В. Панов, В.В. Суслов, Н.В.Тихонова. Оценка эффективности метода двойного эмульгирования при получении микросфер налтрексона на основе сополимера молочной и гликолевой кислот // Вестник МИТХТ. 2013. Т. 8. № 2. С. 58–63.

34. A. Verma, A. Tripathi, S.A. Saraf, S. Saraf. Fabrication and evaluation of sustained release microspheres of ketorolac tromethamine // Int. J Pharm. and Pharm. Sci. 2010. V. 2. Suppl. 4.

35. C. Nagda, N.P. Chotai, U. Patel, S. Patel, T. Soni, P. Patel, L. Hingorani. Preparation and characterization of spray-dried mucoadhesive microspheres of aceclofenac // Drug Devel. Ind. Pharm. 2009. V. 35. P. 1155–1166.

36. P. Giunchedi, B. Conti, L. Maggi, U. Conte. Cellulose acetate butyrate and polycaprolactone for ketoprofen spray-dried microsphere preparation // J Microencapsul. 1994. V. 11. P. 381–393.

37. H. Ichikawa, Y. Fukumori, C.M. Adeyeye. Design of prolonged-release microcapsules containing diclofenac sodium for oral suspensions and their preparation by the Wurster process // Int. J Pharm. 1997. V. 156. P. 39–48.

38. Е.А. Петрова, С.А. Кедик, К.В. Алексеев, Е.В. Блынская, А.В. Панов, В.В. Суслов, Н.В. Тихонова. Изучение параметров микроинкапсулирования при получении пролонгированной формы налтрексона // Хим. фарм. ж. 2014. Т. 48. № 1. С. 50–53.

39. A.K. Dhamankar, J.V. Manwar, D.D. Kumbhar. The novel formulation design of O/W microemulsion of ketoprofen for improving transdermal absorption // Int. J Pharm.Tech. Res. 2009. V. 1. P. 1449–1457.

40. T.T.T. Нгуен, С.А. Кедик, В.В. Суслов, Е.А. Шняк, Е.В. Ворфоломеева, Е.В. Никонорова. Разработка метода получения полимерных микросфер, содержащих иммобилизованный диклофенак // Тонкие хим. технологии. 2015. Т.10. № 4. С. 27–31.

41. R. Bodmeier, H. Chen. Preparation and characterization of microspheres containing the anti-inflammatory agents, indomethacin, ibuprofen, and ketoprofen // J Controlled Release. 1989. V. 10. P. 167–175.

42. M. Najmuddin, S.S. Asgar ali, V. Patel, T. Khan. Formulation and in vitro evaluation of floating microspheres of ketoprofen prepared by emulsion solvent diffusion method // Int. J Appl. Pharm. 2010. V. 2. P. 1–15.

43. A.K. Saha, S.D. Ray. Effect of cross-linked biodegradable polymers on sustained release of sodium diclofenac-loaded microspheres // Brazilian J Pharm. Sci. 2013. V. 49. P. 873–888.

44. N.G. Raghavendra Rao, U. Kulkarni, A. Deshmukh, D.K. Suresh. Preparation and characterization of ionotropic cross-linked chitosan microparticles for controlled release of aceclofenac // Int. J Pharm. Sci. Drug Res. 2010. V. 2. P. 107–111.

45. S.G. Kumbar, A.R. Kulkarni, M. Aminabhavi. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent // J Microencapsul. 2002. V. 19. P. 173–180.

46. S.T. Mathew, S.G. Devi, K.V Sandhya. Formulation and evaluation of ketorolac tromethamine-loaded albumin microspheres for potential intramuscular administration // AAPS Pharm.Sci.Tech. 2007. V. 8. P. 100–108.

47. A. Aggarwal, S. Kaur, F.K. Tiwary, S. Gupta. Chitosan microspheres prepared by an aqueous process: release of indomethacin // J Microencapsul. 2001. V. 18. P. 819–823.

48. F. Pavanetto, P. Perugini, B. Conti, T. Modena, I. Genta. Evaluation of process parameters involved in chitosan microsphere preparation by the o/w/o multiple emulsion method // J Microencapsul. 1996. V. 130. P. 679–880.

49. M.S. Roy, B.K. Gupta. Indomethacin-loaded microspheres: design and preparation by a multiple-emulsification technique and their in vitro evaluation // Pharm. Res. 1992. V. 9. P. 1132–1136.

50. M.L. Gonzalez-Rodriguez, M.A. Holgado, C. Sanchez-Lafuente, A.M. Rabasco, A. Fini. Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release // Int. J Pharm. 2002. V. 232. P. 225–234.

51. M.A. Bayomi. Aqueous preparation and evaluation of albumin-chitosan microspheres containing indomethacin // Drug Dev. Ind. Pharm. 2004. V. 30. P. 329–339.

52. W.J. Lin, W.W. Kang. Comparison of chitosan and gelatin coated microparticles: prepared by hot-melt method. // J Microencapsul. 2003. V. 20. P. 169–177.

53. B. Devrim, A. Bozkir, K. Canefe. Formulation and evaluation of reconstitutable suspensions containing ibuprofen-loaded Eudragit microspheres //.Acta Pol. Pharm. 2011. V. 68. P. 593–599.

54. C.Y. Yang, S.Y. Tsay, R.C.C. Tsiang. An enhanced process for ethyl cellulose microcapsules by solvent evaporation in an O/W emulsion // J Microencapsul. 2000. V. 17. P. 269–277.

55. C.Y. Yang, S.Y. Tsay, R.C.C. Tsiang. Encapsulating aspirin into a surfactant-free ethyl cellulose microsphere using non-toxic solvents by emulsion solvent evaporation technique // J Microencapsul. 2001. V. 18. P. 223–236.

56. Q.Y. Guo, L.W. Chan, P.W.S. Heng. Investigation of the release of aspirin from spray-congealed micro-pellets // J Microencapsul. 2005. V. 22. P. 245–251.

57. V.D. Vilivalam, C.M. Adeyeye. Development and evaluation of controlled-release diclofenac microspheres and tabletted microspheres // J Microencapsul. 1994. V. 11. P. 455-470.

58. S.Y. Lin, K.S. Chen, H.H. Teng, M.J. Li. In vitro degradation and dissolution behaviours of microspheres prepared by three low molecular weight polyesters // J Microencapsul. 2000. V. 17. P. 577–586.

59. T.T. Нгуен Тхи, С.А. Кедик, В.В. Суслов, Е.А. Шняк, Е.В. Ворфоломеева, Е.В. Никонорова. Разработка метода получения полимерных микросфер, содержащих иммобилизованный диклофенак // Тонкие химические технологии. 2015. Т. 10. № 1. С. 56–59.

60. K.M. Manjanna, B. Shivakumar, T.M. Pramod Kumar. Microencapsulation: an acclaimed novel drug-delivery system for nsaids in arthritis // J Digital Library. 2010. V. 27. P. 509–545.

61. M. Tuncay, S. Calis, H.S. Kas, M.T. Ercan, I. Peksoy, A.A. Hincal. In vitro and in vivo evaluation of diclofenac sodium loaded albumin microspheres // J Microencapsul. 2000. V. 17. P. 145–155.

62. C. Sajeev, G. Vinay, R. Archna, R.N. Saha. Oral controlled release formulation of diclofenac sodium by microencapsulation with ethyl cellulose // J Microencapsul. 2002. V. 19. P. 753–760.

63. M. Eltayeb, E. Stride, M. Edirisinghe. Preparation, characterization and release kinetics of ethylcellulose nanoparticles encapsulating ethylvanillin as a model functional component // J Func. Foods. 2015. V. 14. P. 726–735.

64. P. Sipos, I. Csóka, S. Srčič, K.a Pintye-Hódi, I. Erős. Influence of preparation conditions on the properties of Eudragit microspheres produced by a double emulsion method // J Drug Devel. Res. 2005. V. 64. P. 41–54.

65. A.G.E. Rsoy, S.C. Evlk. Sustained release properties of alginate microspheres and tabletted microspheres of diclofenac sodium // J Microencapsul. 2000. V. 17. P. 565–575.

66. P.M. Satturwar, P.M. Mandaogade, A.K. Dorle. A novel method for preparation of Eudragit RL microcapsules // J Microencapsul. 2002. V. 19. P. 407–413.

67. M.C. Adeyeye, E. Mwangi, B. Katondo, A. Jain, H. Ichikawa, Y. Fukumori. Dissolution stability studies of suspensions of prolonged-release diclofenac microcapsules prepared by the Wurster process: I. Eudragit-based formulation and possible drug-excipient interaction // J Microencapsul. 2005. V. 22. P. 333–342.

68. M.E. Palomo, M.P. Ballesteros, P. Frutos. Solvent and plasticizer influences on ethylcellulose-microcapsules // J Microencapsul. 1996. V. 13. P. 307–318.

69. S.S. Biju, S. Saisivam, N.S.M.G. Rajan, P.R. Mishra. Dual coated erodible microcapsules for modified release of diclofenac sodium // Eur. J Pharm. Biopharm. 2004. V. 58. P. 61–67.

70. R. Pignatello, D. Amico, S. Chiechio, C. Spadaro, G. Puglisi, P. Giunchedi. Preparation and analgesic activity of Eudragit RS100® microparticles containing diflunisal // Drug Delivery. 2001. V. 8. P. 35–45.

71. D. Perumal. Microencapsulation of ibuprofen and Eudragit RS 100 by the emulsion solvent diffusion technique // Int. J Pharm. 2001. V. 218. P. 1–11.

72. S. Tamilvanan, B. Sa. Effect of production variables on the physical characteristics of ibuprofen-loaded polystyrene microparticles // J Microencapsul. 1999. V. 16. P. 411–418.

73. G. Weiβ, A. Knoch, A. Laicher, F. Stanislaus, R. Daniels. Simple coacervation of hydroxypropyl methylcellulose phthalate (HPMCP) II. Microencapsulation of ibuprofen // Int. J Pharm. 1995. V. 124. P. 97–105.

74. R. Pignatello, C. Bucolo, P. Ferrara, A. Maltese, A. Puleo, G. Puglisi. Eudragit RS100® nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen // Eur. J Pharm. Sci. 2002. V. 16. P. 53–61.

75. E.S. Ghaly, S. Sepulveda. In vitro evaluation of sustained release ibuprofen microspheres // P R Health Sci. J. 1996. V. 15. P. 97–100.

76. M. Saravanan, K. Bhaskar, G. Srinivasa Rao, M.D. Dhanaraju. Ibuprofen-loaded ethylcellulose/polystyrene microspheres: an approach to get prolonged drug release with reduced burst effect and low ethylcellulose content // J Microencapsul. 2003. V. 20. P. 289–302.

77. S. Tirkkonen, L. Turakka, P. Paronen. Microencapsulation of indomethacin by gelatin-acacia complex coacervation in the presence of surfactants // J Microencapsul. 1994. V. 11. P. 615–626.

78. S. Tirkkonen, P. Paronen. Release of indomethacin from tabletted ethylcellulose microcapsules // Int. J Pharm. 1993. – V. 92. P. 55–62.

79. D. Ermis, A. Yuksel. Preparation of spray-dried microspheres of indomethacin and examination of the effects of coating on dissolution rates // J Microencapsul. 1999. V. 16. P. 315–324.

80. I.L. Gyun Shin, S.Y. Kim, Y.M. Lee, C.S. Cho, Y.K. Sung. Methoxy poly(ethylene glycol)/ε-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin: I. Preparation and characterization // J Contr. Release. 1998. V. 51. P. 1–11.

81. W. Tiyaboonchai1, G.C. Ritthidej. Development of indomethacin sustained release microcapsules using chitosan-carboxymethylcellulose complex coacervation // J Sci. Technol. 2003. V. 25. P. 245–254.

82. T. A. Ahmed, B. M. Aljaeid. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery // Drug Design Develop. Therapy. 2016. V. 10. P. 483–494.

83. El-Gibaly, S.M. Safwat, M.O. Ahmed. Microencapsulation of ketoprofen using w/o/w complex emulsion technique // J Microencapsul. 1996. V. 13. P. 67–87.

84. G.F. Palmieri, G. Bonacucina, P.D. Martino, S. Martelli. Gastro-resistant microspheres containing ketoprofen. // J Microencapsul. – 2002. V. 19. P. 111–119.

85. P. Giunchedi, M.L. Torre, L. Maggi, B. Conti, U. Conte. Cellulose acetate trimellitate ethylcellulose blends for non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) microspheres // J Microencapsul. 1996. V. 13. P. 89–98.

86. T. Mateović-Rojnik, R. Frlan, M. Bogataj, P. Bukovec, A. Mrhar. Effect of preparation temperature in solvent evaporation process on Eudragit RS microsphere properties // Chem. Pharm. Bull. 2005. V. 53. P. 143–146.

87. S. Goto, M. Kawata, M. Nakamura, K. Maekawa, T. Aoyama. Eudragit RS and RL (acrylic resins) microcapsules as pH insensitive and sustained release preparations of ketoprofen // J Microencapsul. 1986. V. 3. P. 293–304.

88. T. Yamada, H. Onishi, Y. Machida. In vitro and in vivo evaluation of sustained release chitosan-coated ketoprofen microparticles // Yakugaku Zasshi. 2001. V. 121. P. 239–245.

89. V.R. Sinha, R.V. Kumar, G. Singh. Ketorolac tromethamine formulations: an overview // Expert Opinion Drug Delivery. 2009. V. 6. P. 961–975.

90. T.M. Sam, D.S. Gayathri, V.V. Prasanth, B. Vinod. Characterization and pharmacokinetic evaluation of gamma sterilized ketorolac tromethamine loaded albumin microspheres for intramuscular administration // Current Drug Delivery. 2013. V. 10. P. 158–166.

91. S. Bhaskaran, M. Sanmathi. Poly(lactic acid) microspheres of ketorolac tromethamine for parenteral controlled drug delivery system // Indian J Pharm. Sci. 2001. V. 40. P. 538–545.

92. H. Wu, M.A. Khan. Quality-by-design: an integrated process analytical technology approach to determine the nucleation and growth mechanisms during a dynamic pharmaceutical coprecipitation process // J Pharm. Sci. 2011. V. 100. P. 1969–1986.

93. Y. Javadzadeh, F. Ahadi, S. Davaran, G. Mohammadi, A. Sabzevari, K. Adibkia. Preparation and physicochemical characterization of naproxen–PLGA nanoparticles // Coll. Surfaces B: Biointerfaces. 2010. V. 81. – P. 498–502.

УДК 615.012; 615.33; 615.453.6

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ ТАБЛЕТОК ДЛЯ РАССАСЫВАНИЯ С АЗИТРОМИЦИНОМ

Т.А. Панкрушева[1], И.Н. Маравина[1]*, О.А. Медведева[1], М.С. Чекмарева[1]

Резюме. Представлены экспериментальные данные по разработке состава и технологии таблеток для рассасывания с азитромицином. Показано изучение вкусовых качеств таблеточных смесей, получение на их основе гранулятов для производства таблеток. Исследованы антимикробные свойства гранулятов с целью изучения стабильности антибиотика при использовании влажного гранулирования в технологии таблетирования. Определены основные технологические характеристики гранулятов, получены таблетки методом прессования и изучены показатели их качества.

Ключевые слова: азитромицин, вспомогательные вещества, грануляция, антимикробная активность, таблетки для рассасывания.

STUDIES OF THE DEVELOPMENT OF ORO-DISPERSIBLE TABLETS WITH AZITHROMYCIN

T.A. Pankrusheva[1], I.N. Maravina[1]*, O.A. Medvedeva[1], M.S. Chekmareva[1]

Abstract. Experimental data on the development of composition and technology of oro-dispersible tablets with azithromycin. There is shown the study of sweet taste of the tablets masses, the production of tablets on the basis of their granulates. Antimicrobial properties of the tablet granulates are investigated for studying of the antibiotic stability, when azithromycin is used in wet granulation tableting technology. Identifies the main technological characteristics of the granulates, the tablets are produced by compression and indicators of quality are studied.

Keywords: azithromycin, excipients, granulation, antimicrobial activity, oro-dispersible tablets.

1 – ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 305041, Россия, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3

1 – Kursk State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 3, Karl Marks str., Kursk, 305041, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционно-воспалительные заболевания полости рта и глотки (фарингит, глоссит, тонзиллит и гингивит) относятся к наиболее частым причинам обращения людей молодого, трудоспособного возраста и детей к участковым терапевтам, оториноларингологам и педиатрам.

Инфекции верхних дыхательных путей и лор-органов потенциально опасны в отношении развития серьезных осложнений и летальных исходов. Так, тонзиллиты и фарингиты могут вызывать как тяжелые регионарные осложнения, требующие экстренных хирургических вмешательств (паратонзиллярные, боковоглоточные и заглоточные абсцессы и др.), так и системные – ревматизм, гломерулонефрит, васкулиты и др. [1, 2].

Поэтому профилактика и лечение указанных заболеваний остаются в настоящее время актуальными вопросами. Среди лекарственных средств, используемых в их терапии, достаточно широко назначаются лекарственные формы местного воздействия на очаг патологии. Фармацевтическая промышленность выпускает разнообразные лекарственные формы «от боли в горле» – спреи, аэрозоли, растворы для полоскания и др. Но самыми удобными в использовании по праву считаются таблетки для рассасывания в полости рта, которые обрели большую популярность [3, 4].

Терапевтическое действие рассасывающихся таблеток обусловлено тем, что за счет адсорбции слизистыми оболочками лекарственных веществ и их накопления в мягких тканях создается высокая концентрация действующего вещества, которая поддерживается в течение длительного времени и обеспечивает необходимый бактерицидный или бактериостатический эффект лекарственного препарата в местах локализации возбудителя. Таблетки не только быстро купируют симптомы возникающей патологии, но и останавливают прогрессирование воспалительного процесса, который и является причиной всей клинической картины болезни.

Таблетки для рассасывания в ротовой полости разрабатываются с учетом приятных органолептических свойств. В их состав, кроме действующих веществ, вводят такие вкусовые компоненты, как подсластители, ароматизаторы, фруктово-ягодные концентраты и эссенции, способные корригировать вкус лекарственной формы и придавать ей приятный запах [4, 5].

В качестве активных компонентов, обусловливающих фармакотерапевтический эффект, в составе таблеток для рассасывания часто используют как антисептические вещества (гексэтидин, бензалкония хлорид, дихлорбензиловый спирт с амилметакрезолом, амбазон, цетилпиридиния хлорид), так и антибиотики (грамицидин, фузафунгин, тиротрицин) [2, 6].

В качестве объекта исследования при разработке рассасывающихся таблеток использовали антибиотик азитромицин (группа азалидов, класс макролидов), обладающий широким спектром противомикробного действия. В зависимости от концентрации он проявляет бактериостатическое или бактерицидное действие, активен в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных штаммов микроорганизмов, анаэробных, внутриклеточных и атипичных возбудителей. В настоящее время выпускаются лекарственные формы азитромицина для энтерального и парентерального применения. Однако, как отмечено выше, комплексная терапия инфекционно-воспалительных заболеваний ротовой полости включает использование лекарственных средств в форме препаратов локального действия [7–10].

В связи с изложенным целью исследований явилась разработка состава и технологии таблеток с азитромицином для рассасывания. Основные этапы эксперимента включали обоснование оптимального состава, разработку технологии и оценку качества таблеток по технологическим показателям.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали субстанцию азитромицина [Alembic Ltd., Индия, серия 1602001909, 2016 (EP)]. При разработке технологии таблеток использовали вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению, применению в пищевой промышленности и отвечающие требованиям соответствующих НД (с нормированием содержания основного вещества, токсических элементов, тяжелых металлов, радионуклидов, пестицидов и микробиологической чистоты): ксилит (ТУ 9197-009-72315488-2011, Россия), сорбит (ТУ 9197-008-72315488-2010, Россия), фруктозу (ТУ 9197-010-72315488-2011, Россия), крахмал картофельный (ГОСТ 53876-2010, Россия), желатин (ГОСТ 11293-89, Россия), полиэтиленоксид низкомолекулярный 400 (ФС 42-1242-96, Россия). Процесс гранулирования осуществляли на лабораторном оборудовании миксер-гранулятор SMG-3 (Китай).

Такие технологические характеристики гранулятов, как сыпучесть, угол естественного откоса оценивали на электронном тестере для измерения сыпучести гранулированного материала Erweka GTB (Германия), насыпную плотность определяли на приборе SVM 121 (Erweka, Германия), фракционный (гранулометрический) состав гранулятов – на установке для ситового анализа – вибросите Cisa RT 200N (Испания). Влагосодержание полученных гранулятов исследовали на анализаторе влажности OHAUS MB-35 (температура – 105±1 °С; точность измерения – 0,01%).



Тестер насыпной плотности SVM 121, Erweka

Прессование таблеток осуществляли на однопуансонном таблеточном прессе TDP-1,5T (Китай). Диаметр матрицы – 10 мм.

Оценку качества таблеток проводили в соответствии с требованиями ГФ XIII изд., определяя однородность массы дозированных лекарственных форм (ОФС.1.4.2.0009.15), распадаемость (ОФС.1.4.2.0013.15) на приборе ZT-320m (Erweka, Германия), механические характеристики: истираемость (ОФС.1.4.2.0004.15) – на приборе TAR 120 (Erweka, Германия), прочность на раздавливание (ОФС.1.4.2.0011.15) – на приборе TBH 125 (Erweka, Германия).



Тестер распадаемости ZT-320m, Erweka

Антимикробную активность определяли в отношении факультативно аэробных микроорганизмов методом диффузии в агар на плотной питательной сре-



Тестер истираемости/ ломкости TAR 120, Erweka



Тестер прочности таблеток TBH 125, Erweka

де путем анализа зон угнетения роста тест-штаммов микроорганизмов. В испытании участвовали все модельные образцы гранулятов, из каждого готовили водно-спиртовой раствор. Точную навеску гранулята, содержащую 0,125 г азитромицина, растворяли в 2 мл спирта этилового 95%, объем раствора доводили водой очищенной до 10 мл. Испытуемый раствор помещали в специально подготовленные лунки питательной среды, засеянной тест-штаммами микроорганизмов. В качестве растворов сравнения использовали водно-спиртовой раствор азитромицина и чистый растворитель (спирт этиловый 95% – 2 мл, вода очищенная – до 10 мл).

Биоцидную активность изучали в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10702) и грамотрицательных (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) микроорганизмов, рекомендованных Государственной фармакопеей XIII изд.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дозировку антибиотика в разрабатываемой лекарственной форме рассчитывали исходя из общеустановленной средней терапевтической дозы для взрослых, разделенной на четыре приема, что составило 125 мг азитромицина на одну таблетку.

Учитывая горький вкус антибиотика и его дозировку, выбор вспомогательных веществ для изготовления таблеток обосновывали функциями наполнителя и корригента, в качестве которых использовали ксилит, сорбит и фруктозу [12].

Для оценки органолептических характеристик разрабатываемой лекарственной формы изучали вкусовые показатели ксилита, фруктозы, сорбита и их комбинаций «ксилит – фруктоза» и «сорбит – фруктоза» по десятибалльной системе числового индекса вкуса, характеризующего его эмоциональное восприятие, и числового индекса основного вкуса, указывающего на силу ощущений [13].

Органолептическая оценка испытуемых корригентов проводилась группой лиц – добровольцев в количестве 20 человек. Из полученных данных был выведен индекс вкуса как среднее арифметическое от всех показаний для лиц, участвующих в испытаниях. Чем больше числовой индекс испытуемых веществ, тем выше маскирующий потенциал корригента.

Результаты исследований приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Оценка вкусовых качеств наполнителей

Наполнитель-корригент	Числовой индекс вкуса	Метрологические характеристики
Ксилит	6,8	$S=0,4$; $S_X=0,2$; $x\pm\Delta x=6,8\pm0,7$ $E=10,4\%$
Фруктоза	7,8	$S=0,4$; $S_X=0,2$; $x\pm\Delta x=7,8\pm0,6$ $E=8,07\%$
Сорбит	7,0	$S=0,2$; $S_X=0,1$; $x\pm\Delta x=7,0\pm0,4$ $E=5,5\%$
Ксилит – фруктоза	8,2	$S=0,5$; $S_X=0,2$; $x\pm\Delta x=8,2\pm0,8$ $E=9,9\%$
Сорбит – фруктоза	8,6	$S=0,6$; $S_X=0,3$; $x\pm\Delta x=8,6\pm1,1$ $E=12,1\%$

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что наилучшими вкусовыми качествами обладают композиции «ксилит – фруктоза» и «сорбит – фруктоза».

Дальнейшие исследования были связаны с разработкой состава и технологии гранулятов. На данном этапе выбрали традиционный способ влажного гранулирования. За основу были взяты композиции «азитромицин – ксилит – фруктоза» и «азитромицин – сорбит – фруктоза», к которым добавляли гранулирующие жидкости. При выборе связующих веществ руководствовались таким критерием, как обеспечение наибольшей продолжительности рассасывания таблеток в ротовой полости и оптимального проявления терапевтического эффекта лекарственного вещества. Для чего в качестве гранулирующих жидкостей использовали 10% раствор желатина, 10% крахмальный клейстер и полиэтиленоксид-400 [14]. 10% раствор желатина и крахмальный клейстер готовили по массе. 5 г желатина в фарфоровой чашке смешивали с 20 мл воды очищенной и оставляли на 30 мин для набухания, затем добавляли 25 мл воды и нагревали до полного растворения желатина. Крахмальный клейстер готовили следующим образом: взвесь 5 г крахмала в 10 мл воды очищенной добавляли в 35 мл кипящей воды, при перемешивании доводили до кипения. Использовали растворы в теплом виде однократно. Для каждой се-

рии гранулятов готовили свежие растворы желатина и клейстер.

Грануляты получали на лабораторном миксере-грануляторе, где порошки смешивали в течение 2 мин до получения однородной массы при скорости вращения мешалки 50 об/мин, затем добавляли связующие вещества и полученную массу гранулировали в течение 5 мин при скорости вращения разбивающего устройства 290 об/мин. Влажные гранулы сушили в сушильном шкафу при температуре 60±2 °С в течение 35–40 мин, затем протирали вручную через сито с размером отверстий 1,0±0,07 мм. Полученный гранулят опудривали магния стеаратом из расчета 1% от массы гранулята, упаковывали в полиэтиленовые пакеты и изучали его технологические свойства.

Всего было исследовано 6 гранулятов, составы которых представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Исследуемые грануляты азитромицина

№ гранулята	Компонент модельной смеси, г						
	Азитромицин	Ксилит	Сорбит	Фруктоза	10% р-р крахмала	10% р-р желатина	Полиэтиленоксид-400
1	25,0	31,90	–	31,90	11,20	–	–
2	25,0	–	31,80	31,80	11,40	–	–
3	25,0	31,35	–	31,35	–	12,30	–
4	25,0	–	31,30	31,30	–	12,40	–
5	25,0	32,10	–	32,10	–	–	10,80
6	25,0	–	32,15	32,15	–	–	10,70

Известно, что большинство антибиотиков в присутствии влаги могут частично или полностью терять свою активность. Кроме того, при получении таблеток, особенно методом влажного гранулирования, антибиотик может взаимодействовать с металлическими частями используемых аппаратов. Поэтому важным этапом исследований явилось определение антимикробной активности полученных гранулятов с целью изучения ее сохранности у азитромицина.

Результаты шести параллельных испытаний представлены в таблицах 3 и 4.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наибольшую антимикробную активность проявляют грануляты составов 3 и 5.

Таким образом, проведенные микробиологические испытания подтвердили возможность использования влажной грануляции для производства таблеток азитромицина для рассасывания.

У исследуемых гранулятов были изучены технологические показатели, характеризующие их качество: фракционный состав, насыпная плотность, сыпучесть, угол естественного откоса и влагосодержание [15]. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 3.

Антимикробная активность гранулятов с азитромицином в отношении грамположительных микроорганизмов

Номер исследуемого образца гранулята	Зоны задержки роста микроорганизмов (мм)	
	Staphylococcus aureus АТСС 25923	*Bacillus cereus* АТСС 10702
1	25,0±0,56	24,0±0,24
2	25,0±0,73	25,6±0,26
3	30,1±0,16	28,3±0,57
4	26,0±0,84	26,0±0,12
5	30,0±0,24	27,3±0,81
6	25,0±0,25	25,6±0,63
Водно-спиртовой раствор азитромицина (контроль)	27,1±0,17	28,6±0,24
Растворитель (контроль)	8,4**±0,1**6	9,2**±0,**21

Таблица 4.

Антимикробная активность гранулятов с азитромицином в отношении грамотрицательных микроорганизмов

Номер исследуемого образца гранулята	Зоны задержки роста микроорганизмов (мм)		
	Escherichia coli АТСС 25992	*Proteus vulgaris* АТСС 4636	*Pseudomonas aeruginosa* АТСС 27853
1	20,0±0,63	15,0±0,37	17,6±0,57
2	18,3±0,28	11,0±0,16	18,3±0,62
3	22,0±0,17	20,1±0,18	19,0±0,18
4	16,3±0,21	7,0±0,42	16,3±0,14
5	20,0±0,18	19,1±0,46	19,1±0,27
6	19,3±0,17	6,0±0,16	16,6±0,21
Водно-спиртовой раствор азитромицина (контроль)	19,6±0,23	18,0±0,18	17,1±0,27
Растворитель (контроль)	6,8±0,18	5,3±0,11	5,9±0,14

Таблица 5.

Характеристики гранулята с азитромицином

Технологические характеристики	Результаты определения	
	гранулят № 3	гранулят № 5
Фракционный состав (%): фракции размером от 1до 2 мм – « – от 0,5 до 1мм – « – менее 0,5 мм	 64,5±0,1 23,7±0,4 11,8±0,2	 63,4±0,3 24,5±0,2 12,1±0,5
Насыпная плотность, кг/м^3	0,628±0,09	0,594±0,11
Сыпучесть, г/с	8,6±0,2	7,7±0,3
Угол естественного откоса, град	27,7±1,8	28,3±1,2
Влагосодержание, %	3,3±0,1	3,7±0,2

Результаты определения реологических свойств гранулятов позволяют оценить полученные характеристики как удовлетворительные.

Дальнейшим этапом работы было изготовление таблеток двух составов: состав № 1 (азитромицина 0,125 г, ксилита 0,156 г, фруктозы 0,156 г, раствора желатина 10% 0,61 г, магния стеарата 0,005 г) и состав № 2 (азитромицина 0,125 г, ксилита 0,156 г, фруктозы 0,156 г, полиэтиленоксида-400 0,54 г, магния стеарата 0,005 г). Таблетки получали методом прессования на однопуансонном таблеточном прессе TDP-1,5T (Китай). Данная модель таблеточного пресса не регистрирует давление прессования, поэтому изготавливали несколько серий таблеток по 20 штук в каждой, увеличивая давление прессования от серии к серии и получая таблетки, отвечающие требованиям на истираемость (ОФС 1.4.2.0004.15) и прочность на раздавливание (ОФС 1.4.2.0011.15).

Оценку качества полученных таблеток осуществляли согласно требованиям общей фармакопейной статьи (ОФС.1.4.1.0015.15) Государственной фармакопеи XIII изд. по следующим показателям: описание, однородность массы дозированных лекарственных форм, распадаемость, истираемость и прочность на раздавливание [11]. Результаты определения представлены в таблице 6. Разработка количественного определения азитромицина в изучаемых таблетках, а также испытание «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» является следующим этапом работы.

Таблица 6.

Оценка качества таблеток с азитромицином

Показатели качества		**Результаты определения таблеток состава:**	
		№ 1	**№ 2**
Описание		**Таблетки белого цвета с гладкой блестящей поверхностью, ровными краями, с фаской и риской. Диаметр таблетки 10±0,5мм, высота 3,5±0,2мм**	
Однородность массы	Средняя масса таблеток, г	0,523	0,564
	Отклонение в массе, не более %	2,7	2,8
Распадаемость, с		471,6±7,2	326,7±0,3
Истираемость, %		99,6±0,3	98,3±0,7
Прочность на раздавливание, Н		122±3,5	87±4,2

Из данных таблицы видно, что исследуемые таблетки соответствуют требованиям, предъявляемым к их качеству по изучаемым технологическим показателям. Таблетки состава № 1 распадаются медленнее, что позволяет судить об их длительном рассасывании в ротовой полости, в связи с чем в дальнейших исследованиях будут использованы таблетки указанного состава.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного эксперимента позволили обосновать, разработать и предложить состав и лабораторную технологию таблеток для рассасывания, содержащих азитромицин. Данная технология производства таблеток для рассасывания позволяет полностью сохранить антимикробные свойства антибиотика, что подтверждено экспериментально.

ЛИТЕРАТУРА

1. Б.С. Белов. Инфекции верхних дыхательных путей и ЛОР-органов. Рациональная антимикробная фармакотерапия / Под ред. В.П. Яковлева, С.В. Яковлева. – М., 2003. С. 208–243.
2. Ю.В. Лучшева, Г.Н. Изотова. Местная терапия при фарингите // РМЖ. 2011. № 6. С. 420.
3. Т.А. Гречуха, М.Г. Галицкая. Лечение боли в горле у детей старше 5 лет // Педиатрическая фармакология. 2013. Т. 10. № 5. С. 101–103.
4. Г.С. Мальцев. Боль в горле – патогенетическая терапия // Российская оториноларингология. 2015. № 6(79). С. 106–109.
5. S.I. Benrimoj, J.H. Langford, H.D. Homan. Efficacy and safety of the anti-inflammatory throat lozenge flurbiprofen 8.75 mg in the treatment of sore throat // Fund. Clin. Pharmacol. 1994. V. 43. № 4. P. 141–144.
6. В.В. Вишняков. Возможности использования антисептических препаратов при лечении пациентов с воспалительными заболеваниями глотки // Лечащий врач. 2011. № 9. С. 24–29.
7. Е.А. Ушкалова. Азитромицин при инфекциях верхних дыхательных путей и лор-органов // Фарматека. 2006. № 16. С. 35–38.
8. М.В. Пчелинцев. Клинико-фармакологические особенности азитромицина как основа эффективности коротких курсов антибактериальной терапии // Лечащий врач. 2015. № 10. С. 28–37.
9. А.В. Веселов, Р.С. Козлов. Азитромицин: современные аспекты клинического применения // Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия. 2006. Т. 8. № 1. С. 18–32.
10. Н.В. Стуров, Е.А. Ушкалова. Эффективность и безопасность азитромицина при лечении инфекций верхних дыхательных путей // Фарматека. 2008. № 4. С. 61–64.
11. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. – М.: НЦЭСМП, 2015.
12. А.В. Кузнецов, А.А. Кузнецов. Корригенты вкуса в производстве лекарственных препаратов // Фармация. 2011. № 2. С. 53–56.
13. М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина. Проблемы коррекции органолептических свойств лекарственных препаратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4. С. 64–73.
14. А.В. Кузнецов. Выбор увлажнителя при изготовлении таблеток с использованием предварительного гранулирования // Фармация. 2002. № 6. С. 27–29.
15. Н.Б. Демина, М.Н. Анурова, Т. Асфура. Разработка рецептуры и технологии таблеток с экстрактом босвеллии // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 4. С. 12–22.

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 615.453

ЖЕВАТЕЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ РЕЗИНКА КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ (ОБЗОР)

Н.Л. Соловьёва[1], М.С. Сокуренко[1,2]*

Резюме. Жевательные лекарственные резинки (ЖЛР) являются альтернативой твердым лекарственным формам для перорального применения. В Фармакопее США представлена статья на никотинсодержащую жевательную резинку. Монография этой лекарственной формы имеется в Белорусской и Европейской Фармакопеях. В статье представлен анализ литературы о применении ЖЛР в качестве системы доставки лекарств, о вспомогательных веществах для изготовления ЖЛР, а также рассмотрены схемы производства лекарственных жевательных резинок и оценка их качества.

Ключевые слова: жевательная лекарственная резинка, система доставки лекарств, биодоступность, технология получения жевательной лекарственной резинки, тест «Растворение» для жевательной лекарственной резинки.

MEDICINAL CHEWING GUM AS A PROMISING DRUG DELIVERY SYSTEM (REVIEW)

N.L. Solovieva[1], M.S. Sokurenko[1,2]*

Abstract. Medicated chewing gum (MCG) are an alternative to solid dosage forms for oral use. In the Pharmacopoeia of the United States submitted an article on chewing gum of nicotine. A monograph of this drug form is available in Belarusian and European Pharmacopoeias. The article presents the analysis of the literature on the use MCG as delivery system of drugs, excipients for the manufacture of MCG, as well as the schemes for the production of medicinal chewing gum and tests of their quality.

Keywords: medicated chewing gum, delivery system of drugs, bioavailability, manufacturing technology of medicated chewing gum, method Dissolution test for medicated chewing gums.

1 – ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8.

2 – ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», 109240, Россия, г. Москва, Устьинский проезд, 2/14

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

2 – Scientific Research Institute of Nutrition, 2/14, Ustinskiy proezd, Moscow, 109240, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: sokmary@mail.ru
Тел.: 8 (495) 698 53 60

ВВЕДЕНИЕ

Правильно подобранная система доставки лекарственного средства (ЛС) имеет решающее значение в лечении заболеваний. В качестве доставки ЛС жевательная лекарственная резинка (ЖЛР) имеет ряд преимуществ. В первую очередь это связано с тем, что многие ЛС метаболизируются в кишечнике и печени, а применение их в форме ЖЛР позволяет избежать эффекта первого прохода, при котором лекарственные препараты претерпевают изменения до попадания в системный кровоток [1]. Это позволяет осуществить более быструю доставку и лучшую биодоступность ЛС, а также позволяет назначать его в составе жевательной резинки в меньшей дозе, чем в составе других пероральных форм [2]. История успеха никотиновой жевательной резинки в 1980-х годах привела к общему признанию жевательной резинки в качестве системы доставки лекарственных препаратов [3]. Всасывание через слизистую оболочку полости рта может также привести к более быстрому началу действия вещества, поскольку богатое кровоснабжение слизистой полости рта способствует прямому поступлению веществ в системный кровоток [4, 5].

Использование ЛС в форме ЖЛР позволяет повысить биодоступность для плохо растворимых лекарственных средств путем облегчения их солюбилизации в слюне перед глотанием [6, 42]. Преимущества ЖЛР очевидны: они находят применение при локальной доставке ЛС, при лечении воспалительных заболеваний слизистой ротовой полости, снижая риск раздражения слизистой оболочки желудка и др. Для лечения заболеваний полости рта важно достигнуть терапевтического уровня концентрации ЛС в слюне, для этого были разработаны различные лекарственные формы, такие как оральный гель и ополаскиватели для полости рта. Жевательная резинка как лекарственная форма является перспективной для лечения заболеваний ротовой области: действующие вещества высвобождаются во время жевания, обеспечивая высокий уровень действую-

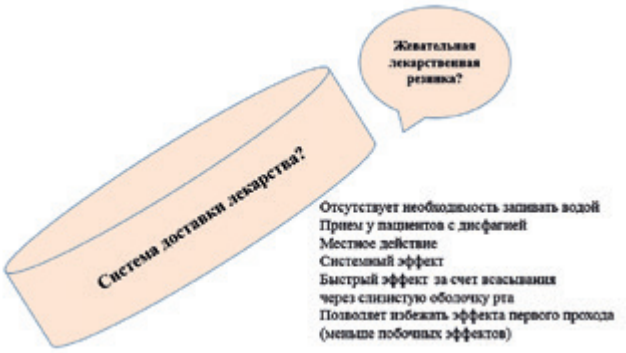


Рисунок 1. ЖЛР как система доставки лекарств

щего вещества для получения местного эффекта в полости рта [7].

Прием ЛС в виде ЖЛР является предпочтительным для детей и подростков из-за ее привлекательных вкусов и внешнего вида [8]. Эмпирические данные показывают, что люди, жующие жевательную резинку, более бодры и внимательны, жевание резинки снимает напряжение [9].

ЖЛР описывается в Европейской Фармакопее как твердая дозированная форма с основой, состоящей главным образом из резины, предназначенная для жевания, но не проглатывания [10]. ЖЛР может содержать одно или несколько активных субстанций, которые высвобождаются при жевании. В результате растворения или диспергирования активных соединений в слюне ЖЛР может быть использована для лечения заболеваний полости рта, а также оказывать лечебное действие за счет системной доставки через слизистую ротовой полости или желудочно-кишечный тракт.

К недостаткам ЖЛР следует отнести уменьшение дозировки ЛС при жевании вследствие разбавления слюной, различные профили высвобождения ЛС из-за различий в стиле жевания, аллергические реакции на подсластители, напряжение в челюстях, которое может вызвать расстройство височно-нижнечелюстного сустава, также ее не рекомендуют давать маленьким детям [11–14]. Примеры использования ЛС в форме ЖЛР представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Лекарственные средства в форме ЖЛР

	Показания к применению	**Лекарственное средство**
1	Укачивание (морская болезнь)	Дифенгидрамин [15] Дименгидринат [16] Имбирь [17]
2	Болеутоляющее	Аспирин [18]
3	Противогрибковое	Миконазол [19]
4	Отказ от курения	Никотин [3, 20]
5	Антибактериальное	Хлоргексидин [21,22]

ЖЛР представляет собой смесь активной фармацевтической субстанции и жевательной основы (вспомогательных компонентов), которая делится на две части – растворимую и нерастворимую (гуммиоснова). Перечень вспомогательных веществ представлен в таблице 2.

Часть жевательной основы, которая не растворяется при жевании, представлена смесью натуральных смол, латекса, пчелиного воска и других веществ [29].

Эластомеры представляют собой полимеры с высокой эластичностью, что делает ЖЛР гибкой в отношении разрыва или трещин. Природные и синтетические эластомеры представляют собой два различных типа материалов. Эластомеры обеспечивают резинистость, когезивные свойства гуммиосновы, которые варьируют в зависимости от химической структуры ингредиентов и их взаимодействия с другими ингредиентами [8, 30, 31]. Эмульгаторы предназначены для создания однородных эмульсий из несмешивающихся, нерастворимых веществ, а также придают жевательной резинке пластичность [8, 30, 32, 33]. Пластификаторы делают текстуру жевательной резинки пластичной, уменьшают хрупкость [8, 24, 33]. Пластификаторы эластомеров меняют плотность основы жевательной резинки. Текстураторы обеспечивают необходимую текстуру и облегчает смешивание компонентов и другие этапы обработки [8, 24, 33]. Резина, используемая в производстве жевательных резинок, применяется как в качестве эластомерного пластификатора, так и в качестве связующего агента между эластомерами и текстуризаторами [8, 24, 33]. Подсластители обеспечивают сладкий, приятный вкус. Жидкие подсластители, такие как кукурузный сироп, гидрогенизированный крахмал, сорбит, играют роль влагоудерживающего агента, обеспечивая свежесть жевательной резинки. Они также выступают в качестве пластификатора, смягчающего или связующего агента. Интенсивные искусственные подсластители также обеспечивают сладость, и они менее калорийны [8, 24, 25]. Ароматизирующие агенты обеспечивают аромат и могут выступать в качестве средств, маскирующих вкус горьких ЛС [8, 25]. Красители придают необходимый цвет жевательной резинке [8]. Антиоксиданты предотвращают рост микроорганизмов путем ингибирования окисления [8, 24]. Для снижения адгезии компонентов гуммиосновы в состав массы жевательной резинки вводят вспомогательные вещества, которые предотвращают слипание компонентов, снижают разрушение жевательной резинки при жевании и прилипание к зубам [34, 35]. Для улучшения сыпучести при таблетировании в состав вводят лубриканты, которые препятствуют слеживанию смеси, а также обеспечивают регидратацию жевательной резинки [25, 36, 37].

Таблица 2.

Вспомогательные вещества в производстве жевательной резинки [23–28]

	Наименование вспомогательных веществ	Примеры
1	Подсластители сахара	Сахароза, декстроза, мальтоза, декстрин, фруктоза, кукурузный сироп
2	Заменители сахара	Сорбитол, маннитол, мальтитол
3	Синтетические некалорийные сахарозаменители	Сукралоза, аспартам, сахарин, калия ацесульфам
4	Ароматизаторы	Эссенциальные масла, синтетические ароматизаторы, смеси (масло цитрусовых, фруктовые эссенции, мятное, гвоздичное, анисовое масла)
5	Пластификаторы	Глицерин, лецитин, сорбитол, гидрогенизированые крахмалы, кукурузный сироп, масло какао, жирные кислоты (пальмитиновая, стеариновая и др), глицерина моностеарат, глицерина триацетат
6	Эмульгаторы	Моно-, ди-, тристеарила ацетаты и др.
7	Красители	Натуральные экстракты овощей и фруктов, титана оксид
8	Антиоксиданты	Аскорбиновая кислота, токоферол, бутилгидрокситолуол
9	Вещества, препятствующие слипанию	альфа-целлюлоза, растительные белки, мальтодекстрин
10	Антислеживающие агенты	Кремния диоксид, стеараты магния, кальция
11	Натуральные (природные) эластомеры	Копченый или жидкий латекс и гваюла, натуральные смолы, такие как джелутонг (jelutong), лечи каспи (lechi caspi), перилло (perillo), сорва (sorva), массарандуба балата (massaranduba balata), шоколодная массарандуба (massaranduba chocolate), нисперо (nispero), розидинха (rosidinha), чикл (chicle), гуттаперча (gutta percha), гутта-катаиу (gutta kataiu), нигергутта (nigergutta), туну (tunu), чилт (chilte), чикуибул (chiquibul), гуттахангканг (gutta hang kang)
12	Синтетические эластомеры	Полиизобутилен, изобутилен-изопреновые сополимеры (бутилкаучук), обычные стирол-бутадиеновые сополимеры, полиизопрен и их комбинации
13	Эластомерные пластификаторы	Терпеновые смолы, производные альфа-пинена, бета-пинена и/или d-лимонена. Глицерин и пентаэритритоловые эфиры канифолей и модифицированные канифоли, такие как гидрогенизированные, димеризированные и полимеризованные канифоли
14	Текстураторы	Магния и кальция карбонаты, титана оксид, тальк, полимеры целлюлозы, моно- ди-, трифосфаты кальция

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЖЛР

Существует несколько способов получения жевательной резинки.

Метод плавления предполагает расплавление основы жевательной резинки при температуре около 60 °С, а затем введение других ингредиентов, таких как сахар, глицерин, подсластители, ароматизаторы, которые добавляют при перемешивании при 40 °С с последующим охлаждением и формированием пластин жевательной резинки в соответствии с заданными размерами [25, 38]. Следует отметить: данный метод ограничивает применение термолабильных фармацевтических субстанций, что связано с повышенной температурой, используемой при плавлении латексных компонентов. Получение высоковязкой массы и введение в нее лекарственного препарата может привести к нарушению точности дозирования. Также данная технология требует особых условий производства, что приводит к удорожанию процесса получения ЖЛР.

Другой метод получения жевательной резинки заключается в том, что гуммиоснову охлаждают до температуры, при которой она становится достаточно хрупкой и ломкой и сохраняется таковой в течение последующей стадии измельчения. Температура, необходимая для охлаждения, частично определяется составом гуммиосновы и легко определяется эмпирически путем наблюдения свойств охлаждаемой композиции жевательной резинки. Как правило, температура охлаждаемой смеси около –15 °С или ниже. Среди различных охлаждающих жидкостей, таких как жидкий азот, использование твердого диоксида углерода (сухой лед) является предпочтительным, поскольку он может дать низкие температуры, такие как –78,5 °С, легко возгоняется при нагревании смеси, не поглощается в композиции жевательной резинки и не оставляет каких-либо остатков, которые могут быть нежелательными или потенциально опасными. Охлажденный состав затем измельчают до получения мельчайших частиц. Вспомогательные вещества, улучшающие технологические свойства массы, и активные субстанции вводят после удаления охлаждающего агента, смесь таблетируют в соответствии с заданными параметрами [25].

Метод прямого прессования является предпочтительным по отношению к другим технологиям, поскольку он подразумевает смешение готовых вспомогательных веществ и активных фармацевтических субстанций без вспомогательных технологических процессов, таких как нагревание, измельчение, грануляция. Кроме того, он позволяет использовать термолабильные субстанции и субстанции, склонные к гидролизу. В настоящее время на рынке имеются готовые смеси для производства

жевательных резинок. В этом случае технология получения ЖЛР заключается в перемешивании готовой основы, состоящей из вспомогательных веществ и активной субстанции.

Как и в каждом технологическом процессе, в данной технологии имеются свои тонкости и особенности, заключающиеся в правильном подборе лубрикантов, ароматизаторов, подсластителей, способов их введения, а также условий и параметров таблетирования. На рынке представлены готовые смеси для производства жевательных резинок методом прямого прессования Pharmagum® (SPI Pharma, США) [39] и Health in gum® (Cafosa, Испания) [40]. С химической точки зрения это смесь полиолов (сорбита/ксилита/маннитола) и сахара с резиновой основой, пластификаторами и другими добавками, улучшающими технологические свойства смеси. Они хорошо подходят для производства жевательных резинок с активными субстанциями, чувствительными к температуре или гидролизу.

В Государственной фармакопее XIII издания отсутствует статья о жевательной лекарственной резинке. Она упоминается только в перечне лекарственных форм, относящихся к мягким формам. В Европейской Фармакопее [7] и Белорусской Фармакопее [41] даётся определение этой лекарственной формы и описаны показатели качества, которым должна соответствовать жевательная лекарственная резинка (однородность массы, однородность дозирования, однородность содержания, испытание «Растворение», которое проводят на аппарате типа «Жевательная машина» (Chewing Machine) [10]) (рисунок 2).

Испытание проводится для определения скорости растворения активных веществ из жевательной резинки. Принцип определения состоит в том, что высвобождение активного вещества из жевательной лекарственной резинки определяют путем механического разминания пластины жевательной резинки, помещенной в небольшую камеру, моделирующую процесс жевания, с определённым объёмом буферного раствора. Прибор, моделирующий процесс жевания, состоит из камеры объёмом около 40 мл, в которой жевательная резинка подвергается имитации жевания при помощи двух горизонтальных поршней; поршни двигаются одновременно с постоянной скоростью. По окончании имитации процесса жевания поршни могут поворачиваться вокруг своей оси в противоположных направлениях относительно друг друга. Таким образом, жевательная резинка подвергается имитации процесса максимального разжёвывания. Третий, вертикальный поршень («язык») двига-

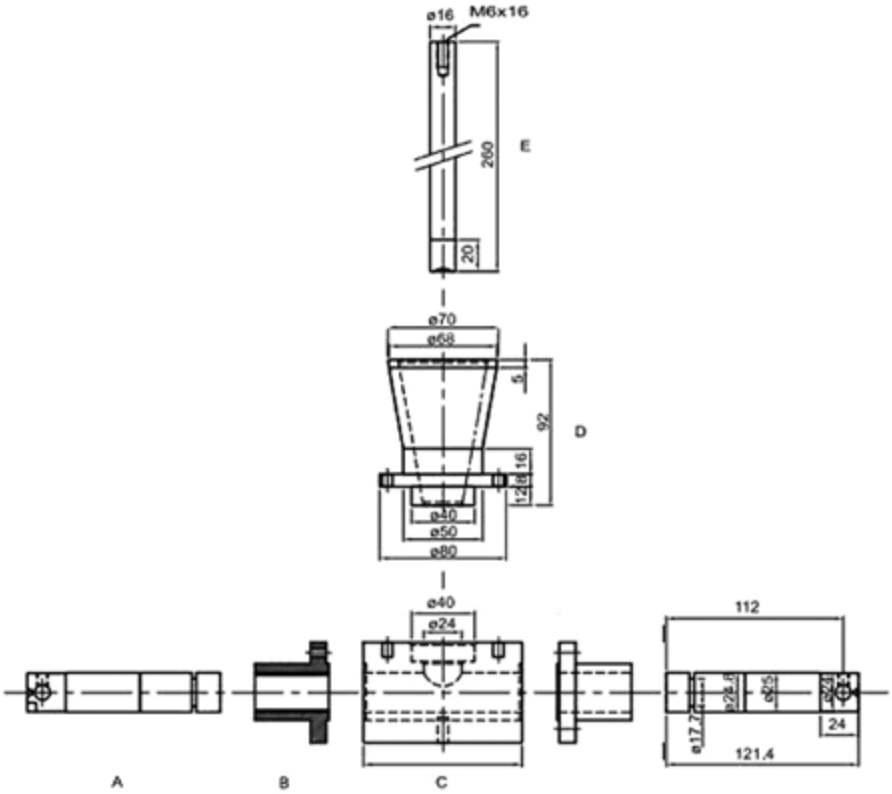


Рисунок 2. Жевательная камера и поршни [10]:

A – горизонтальный поршень; B – направляющая; C – жевательная камера; D – воронка; E – вертикальный поршень; секция F-F; секция G-G

ется в противоположном направлении относительно движений горизонтальных поршней и обеспечивает правильное местоположение пластины жевательной резинки в процессе имитации жевания. Поршни приводятся в движение сжатым воздухом, при этом обеспечивается согласованность движений поршней. Через заданный интервал времени удаляют остатки резинки из резервуара и отбирают пробу среды для определения количества высвобождаемого активного вещества. Скорость процесса жевания обычно составляет 60 циклов в минуту [10, 41].

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ В ЖЛР

Как было сказано выше, ЖЛР уже нашло применение в медицине: в стоматологии, при производстве препаратов от укачивания и избавления от табачной зависимости.

В американском журнале о периодонтологии были опубликованы результаты двойного слепого рандомизированного исследования лечения гингивита при помощи ЖЛР с экстрактом эвкалипта. Наблюдались статистически значимые улучшения по сравнению с группой, принимавшей плацебо [43].

Сейчас широко используются препараты на основе полифенольных соединений, оказывающих широкий спектр различных фармакологических эффектов. В журнале «Oral Rehabilitation» были опубликованы результаты исследований оливкового масла, содержащего от 200 до 1000 мг/кг полифенолов (в зависимости от сорта оливы), ксилит и бетаин, при лечении ксеростомии (сухости во рту). При этом в качестве лекарственной формы были использованы зубные пасты, гели, спреи, жидкости для ополаскивания полости рта, содержащие вышеназванные вещества. Результаты, полученные через неделю после начала эксперимента, продемонстрировали улучшение качества жизни пациентов с ксеростомией, связанное с увеличением скорости поступления потока слюны [44]. В 2016 году были проведены исследования ЖЛР с кверцетином. Вначале *in vivo* проверяли антибактериальную активность против штаммов *Streptococcus mutans* и процентное высвобождение, затем исследования продолжили на добровольцах, у которых брали на анализ слюну. Кроме того, было проведено второе клиническое испытание для более тщательной проверки антибактериальной способности ЖЛР с кверцетином против штаммов *S. mutans* после 14 дней ежедневного потребления. Анализ высвобождения показал, что более эффективное высвобождение кверцетина происходит в первые минуты жевания и не изменяет значения pH слюны. На седьмой день эксперимента результаты показали значительное снижение штаммов *S. mutans*, что свидетельствует об эффективности использования данного вида лекарственной формы с кверцетином [45].

Таким образом, можно предположить, что полифенольные соединения, обладающие противовоспалительным, антибактериальным противовоспалительным действием, такие как кверцетин, катехины, ресвератрол, гидрокситирозол и др., являются перспективными для создания новой лекарственной формы – жевательной лекарственной резинки – и применения в стоматологической и других областях медицины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Можно сделать вывод, что использование ЖЛР в качестве эффективного средства доставки лекарств, несомненно, является перспективным. Здесь остается еще много вопросов, требующих изучения и решения. ЖЛР еще предстоит утвердиться на нашем рынке и завоевать признание и популярность пациентов. Включение ЖЛР как лекарственной формы в фармакопеи разных стран говорит о том, что эта ЛФ соответствует стандартам высокого качества фармацевтической промышленности. ЖЛР является альтернативой уже известным дозированным лекарственным формам, применяемым для лечения заболеваний полости рта, таких как бактериальные и грибковые инфекции, воспалительные заболевания, которые требуют длительного периода высвобождения лекарственного средства в ротовую полость. Также ЖЛР может быть использована для системной доставки лекарственного средства, когда необходимо быстрое начало действия лекарственного вещества (при укачивании, тошноте, боли, аллергии). Вспомогательные вещества, такие как эластомеры, пластификаторы, наполнители, играют важную роль в обеспечении качества и терапевтической эффективности любой лекарственной формы, в том числе и ЖЛР, а использование таких методов повышения биодоступности активных фармацевтических субстанций, как комплексообразование, микрокапсулирование, позволяет увеличить их растворимость, стабильность, а также маскировать вкус горьких лекарств.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Semwal, D.K. Semwal, R.Badoli. Chewing gum: A Novel Approach for Drug Delivery // The J. of Applied Research. 2010. V. 10, № 3. P. 124–132.
2. T. Imfeld, Chewing gum – Facts and Fiction: a Review of Gum-Chewing and oral health // Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 1999. V. 10. P. 405–419.
3. R.E. Malcolm, R.W. Sillett, J.A.M. Turner, K.P. Ball. The use of nicotine chewing gum as an aid to stopping smoking // Psychopharmacology. 1980. V. 70(3). P. 295–296

4. M.R. Rassing. Specialized oral mucosal drug delivery systems: chewing gum // Drugs and the pharmaceutical sciences. 1996. V. 74. P. 319–357.
5. N.L. Rhodus, M.J. Schuh. Effects of pilocarpine on salivary flow in patients with Sjogren's syndrome // Oral Surge Oral Med Oral Pathol. 1991. V. 72. P. 545–549.
6. Patent US № 6592850B2. Sildenafil chewing gum formulations and methods of using the same / C.B. Gmunder, W. Li, R. Ream et al.
7. A. Itthagarun, S.H. Wei. Chewing gum and saliva in oral health // J Clin Dent 1997. V. 8. P. 159–162.
8. R. Asija, S. Patel, S. Asija. Oral dosages forms: Medicine containing chewing gum: A review // J Drug Delivery Ther. 2012. V. 2. P. 90–95.
9. A.P. Smith, M. Woods. Effects of chewing gum on the stress and work of university students. // Appetite. 2012. V. 58. P. 1037–1040.
10. European Pharmacopoeia. 7th ed. P. 289–290.
11. N. Madan, A. Rathnam. Chewing gums for optimal health // Chron Young Sci. 2011. V. 2. P. 7.
12. A.S. Surana. Chewing gum: A friendly oral mucosal drug delivery system // Int J Pharm Sci Rev Res. 2010. V. 4. P. 68–71.
13. Patent US № 6.322.828. Process for Manufacturing a Pharmaceutical Chewing Gum / N.K. Athanikar, S.A. Gubler.
14. Chewing Gum Facts. URL: http://www.chewinggumfacts.com/ (дата обращения: 02.02.2017).
15. F. Mehta, C. Kartikayen, P. Trivedi. Formulation and characterization of medicated chewing gum delivery of diphenhydramine hydrochloride // Pharmacia Sin. 2011. V. 2. P. 182–193.
16. F. Mehta, P. Trivedi. Formulation and texture characterization of medicated chewing gum delivery of dimenhydrinate hydrochloride // Pharmacia Lett. 2011. V. 2. P. 129–140.
17. A. Aslani, A. Ghannadi, F. Rostami. Design, formulation and evaluation of Ginger chewing gum // Adv Biomed Res. 2015. V. 5. P. 130.
18. Wikipedia, the free encyclopedia. Aspirin Oral Gum-Aspergum. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Aspergum (дата обращения 01.02.2017).
19. J.L. Rindum, P. Holmstrup, M. Pedersen, M.R. Rassing, K. Stoltze. Miconazole chewing gum for treatment of chronic oral candidosis // Eur J Oral Sci. 1993. V. 101. P. 386–390.
20. A. Aslani, S. Rafiei. Design, formulation and evaluation of nicotine chewing gum // Adv Biomed Res. 2012. V. 1. P. 57.
21. T. Imfeld. Chlorhexidine-containing chewing gum // Schweiz monatsschrz ahmed. 2006. V.116(5). P. 476–483.
22. A.J. Smith, J. Moran, L.V. Dangler, R.S. Leight, M. Addy. The efficacy of an anti-gingivitis chewing gum // J. Clin. Periodontol. 1996. V. 23. P. 19–23.
23. Patent US № 4.931.294. Environmentally Stable Chewing Gum Composition Containing Xylitol / M.M. Patel, M.A. Reed, R.J. Yatka. 1990.
24. V.D. Nagasamy, P.S. Toprani, S. Mukherejee, K. Tulasi. Medicated chewing gums – A review // Int J Pharm Sci. 2014. V. 4. P. 581–586.
25. A.G. Gadhavi, B.N. Patel, D.M. Patel, C.N. Patel. Medicated chewing gum – A 21st century drug delivery system // Int J Pharm Sci Res. 2011. V. 2. P. 1961–1974.
26. K. Sameja, V. Raval, H. Asodiya, D. Patadiya. Chewing gum: A modern approach to oral mucosal drug delivery // Int J Pharm Res Dev. 2011. V. 4. P. 1–16.
27. Patent US № 12/449.622. Chewing Gum Composition / T. Cosgrove, A.H. Erol, M.G. Voss. 2008.
28. B. Gavaskar, D. Venkataramana, Y.M. Rao. Medicated chewing gum: A novel approach to improve patient compliance // Int J Res Pharm Biomed Sci. 2011. V. 2. P. 23–32.
29. How products are made. URL: http://www.madehow.com/Volume-1/Chewing-Gum.html (дата обращения 01.02.2017)
30. S.B. Bumrela, R.N. Kane, S.P. Dhat. Medicated chewing gum: A new reformulation technique // Pharma news. 2005. V. 3. P. 1.
31. Du Pont. URL: http://www.dupont.com/products-and-services/plastics-polymers-resins/elastomers.html (дата обращения 05.02.2017).
32. Alsiano. URL: http://www.alsiano.com/Industries/Pharma.aspx (дата обращения 03.02.2017).
33. Patent US № 4,931,294. Environmentally Stable Chewing Gum Composition Containing Xylitol / M.M. Patel, M.A. Reed, R.J. Yatka. 1990.
34. K. Sameja, V. Raval, H. Asodiya, D. Patadiya. Chewing gum: A modern approach to oral mucosal drug delivery // Int J Pharm Res Dev. 2011. V. 4. P. 1–16.
35. Patent US № 12/449.622. Chewing Gum Composition / T. Cosgrove, A.H. Erol, M.G. Voss. 2008.
36. B. Gavaskar, D. Venkataramana, Y.M. Rao. Medicated chewing gum: A novel approach to improve patient compliance // Int J Res Pharm Biomed Sci. 2011. V. 2. P. 23–32.
37. E. Ortega-Rivas, P. Juliano, H. Yan. Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality // Springer. 2006. P. 342.
38. Aslani A, Rostami F. Medicated chewing gum, a novel drug delivery system // Journal of Research in Medical Sciences. 2015. V. 20(4). P. 403–411.
39. SPI Pharma™. URL: https://www.spipharma.com/applications/orally-disintegrating-technology-oral-drug-delivery (дата обращения 04.02.2017).
40. Health In Gum – Directly compressible gum by Cafosa. URL: http://www.healthingum.com/technology.asp (дата обращения 03.02.2017).
41. Государственная фармакопея Республики Беларусь, 2006 г. – Минск, 2006. 1345 с.
42. Fertin Pharma. URL: http://fertin.com/expertise/gum/taste-and-texture (дата обращения 02.02.2017)
43. H. Nagata, Y. Inagaki, M. Tanaka, M. Ojima, K. Kataoka, M. Kuboniwa, N. Nishida, K. Shimizu, K. Osawa, S. Shizukuishi. Effect of Eucalyptus Extract Chewing Gum on Periodontal Health: A Double-Masked, Randomized Trial // Journal of Periodontology. 2008. V. 79. № 8. P. 1378–1385.
44. J.A. Ship, J.A. McCutcheon, S. Spivakovsky, A.R. Kerr. Safety and effectiveness of topical dry mouth products containing olive oil, betaine, and xylitol in reducing xerostomia for polypharmacy-induced dry mouth Safety and effectiveness of topical dry mouth products containing olive oil, betaine, and xylitol in reducing xerostomia for polypharmacy-induced dry mouth // Oral Rehabil. 2007. V. 34(10). P. 724.
45. G.F. Ferrazzano, T. Cantile, M. Coda, B. Alcidi, G. Sangianantoni, A. Ingenito, M.D. Stasio, M.G. Volpe. In Vivo Release Kinetics and Antibacterial Activity of Novel Polyphenols-Enriched Chewing Gums // Molecules, 2016. V. 21(8). P. 1008.

УДК 615.4

АССОРТИМЕНТ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРАНСМУКОЗАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ (АССОРТИМЕНТ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПЛЕНОК)

Н.В. Шестаков[1]*, С.О. Лосенкова[2], Е.В. Закалюкина[1], Э.Ф.Степанова[3]

Резюме. В настоящее время одним из перспективных способов приема лекарственных средств являются быстрорастворимые лекарственные формы (в частности, лекарственные пленки), которые имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционными лекарственными формами. В обзоре рассмотрены классификация быстрорастворимых пленок и их применение, представлен ассортимент трансмукозальных лекарственных форм.

Ключевые слова: трансмукозальная доставка, трансмукозальные лекарственные пленки.

RANGE AND CHARACTERISTICS TRANSMUCOSAL DOSAGE FORMS

N.V. Shestakov[1]*, S.O. Losenkova[2], E.V. Zakalyukin[1], E.F. Stepanova[3]

Abstract. Currently, one of the promising methods of taking medications are instant formulations (in particular, medicinal films), which have a number of advantages over traditional dosage forms. In addition, the classification of rapidly dissolving films and their application are considered, and an assortment of transmucosal dosage forms is presented.

Keywords: transmucosally shipping, transmucosally drug films.

1 – ФГУП «Московский эндокринный завод», 109052, Россия, г. Москва, ул. Новохохловская, д. 25

2 – ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, 214019, Россия, г. Смоленск, ул. Крупской, д. 28

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

1 – Moscow Endocrine Plant, 25, Novokhokhlovskaya str., Moscow, 109052, Russia

2 – Smolensk State Medical University, 28, Krupskaya str., Smolensk, 214019, Russia

3 – Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Medical University, 11, pr. Kalinina, Pyatigorsk, Stavropol, 357532, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время основной спектр фармацевтических исследований направлен на поиск новых лекарственных средств и совершенствование уже существующих лекарственных форм и создание систем доставки лекарственных средств. Одной из перспективных лекарственных форм являются лекарственные пленки, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционными лекарственными формами.

Быстрорастворимые пленки являются перспективной лекарственной формой для ЛС различных фармацевтических групп. В мире уже насчитывается большое количество наименований препаратов в виде быстрорастворимых пленок, например лоратадин, фолиевая кислота (Hughes Medical Corp., США), ондансетрон (Setofilm производства BioAlliance Pharma. Европа), мидазолама малеат (Oral Film производства Aoxing Pharmaceutical, Китай), при этом с каждым годом объем данного сектора увеличивается.

Лекарственные плёнки (ЛП) представляют собой полимерную эластичную пластинку овальной или прямоугольной формы с равными краями и плоской поверхностью разного размера и разной толщины. ЛП, содержащие биологически активные соединения растительного происхождения, получили неофициальное название фитоплёнки (ФП), являющиеся разновидностью трансдермальных терапевтических систем (ТТС) [1]. Фитоплёнки представляют собой гидрофильные системы, которые при контакте с водой (или биологической жидкостью) поглощают её в определённом количестве, что приводит к растворению БАВ (биологически активных веществ). Отличаются от синтетических полимерных терапевтических систем тем, что ФП изготавливают в виде матричных ТТС на носителях природного происхождения (желатин, коллаген, альгинат натрия, агар-агар и др.), что делает их более безопасными и совместимыми с живым организмом. Известно, что организм более восприимчив к растительным веществам, чем к синтетическим соединениям. Однако традиционные препараты из растений не всегда полностью отвечают требованиям современной практичес-

кой медицины. Эта проблема решается путем создания целого ряда пролонгированных ТТС в виде фитоплёнок с разноплановым терапевтическим и профилактическим эффектом. Трансдермальное введение фармацевтической субстанции из плёнок через кожу или слизистую оболочку позволяет свести к минимуму вариабельность терапевтического воздействия, уменьшить эффект предсистемного метаболизма в печени, исключить возможность передозировки. ЛП относятся к безопасным лекарственным формам (ЛФ), так как практически вся доза ЛВ находится вне организма и лишь контактирует с ним, они могут легко удаляться в случае необходимости и дают возможность увеличивать дозу путём нанесения дополнительной «единицы» плёнки [2].

Лекарственные плёнки, как правило, не содержат адгезивного слоя, а их сцепление с наносимой поверхностью происходит за счёт адгезионных свойств матрицы-носителя, в то время как традиционные макромолекулярные ТТС выпускают в виде пластырей или лент с обязательным наличием адгезивного (клейкого) слоя.

Фитоплёнки представляют собой тонкие липкие пластинки различных размеров с извлечениями из ЛРС, введёнными в состав плёнкообразователей. Пленки предназначены для оказания местного или резорбтивного воздействия и представляют собой матричные ТТС.

Фитоплёнки классифицируют следующим образом.

1. По конструктивным особенностям:
   1.1. ФП монослойные (монолитные);
   1.2. ФП бислойные (многослойные).
2. По числу лекарственных компонентов:
   2.1. однокомпонентные ФП;
   2.2. многокомпонентные.
3. По поведению в очаге патологии:
   3.1. биодеструктируемые (рассасывающиеся):
      3.1.1. биодеградируемые;
      3.1.2. биоэродируемые;
   3.2. небиодеструктируемые (требующие извлечения, удаления).
4. По области их применения (по месту их назначения):
   4.1. стоматологические;
   4.2. офтальмологические;
   4.3. оториноларингологические (интраназальные);
   4.4. дерматологические (в т.ч. хирургические);
   4.5. гинекологические (вагинальные);
   4.6. антиангинальные.

По *дисперсологической классификации* лекарственные ФП можно отнести к связно-дисперсным системам с твёрдой дисперсионной средой и дисперсной фазой [3].

С *позиции механизма пролонгирования* (поддерживающего и повторного действия) ФП относят к ЛФ поддерживающего действия (sustained release) [4]. Такой механизм пролонгирования целесообразен для ФП с антимикробными ЛС. Для ФП тонизирующего, стимулирующего действия более приемлем механизм повторного действия (repeat release).

Биодеградируемые ФП отличаются от биоэродируемых характером растворения. Если деструкция ТТС идёт за счёт эрозии поверхности, то её называют биоэродируемой. Если же внешняя среда быстро проникает в полимер и деструкция протекает во всём объёме полимера, то в этом случае имеют дело с биодеградируемой ТТС.

Перспективным методом аппликационного воздействия действующего вещества на слизистую оболочку полости рта и ткани зуба является использование плёночных покрытий на основе плёнкообразующих носителей различного происхождения. Применение лекарственных плёнок способствует сокращению сроков лечения различных заболеваний слизистой оболочки полости рта [5–7].

Плёнкообразующие носители стоматологических лекарственных пленок (СЛП) не должны оказывать раздражающего действия, должны обеспечивать надлежащую степень и направленность перехода ЛС из матрицы в слизистую ротовой полости за счёт своих физико-химических свойств, а также характеризоваться микробиологической стабильностью. В качестве основы для СЛП используют различные полимеры, коллаген, желатин, полисахариды, пектины, альгинаты, ПВП (поливинилпирролидон), ПВС (поливиниловый спирт) в различных сочетаниях и концентрациях. В настоящее время СЛП изготавливают как в условиях малосерийного производства (на базе аптек), так и на фармпредприятиях. Это СЛП на желатиновой основе, содержащие фитопрепараты ЛРС (лекарственное растительное сырье): траву зверобоя, кору дуба, цветки календулы, чагу, кору чайного дерева, хлорофиллипт и др. [7].

Фитоплёнки с экстрактами из корневищ родиолы розовой, травы эхинацеи пурпурной, плодов расторопши пятнистой, листьев шалфея лекарственного, почек некоторых видов тополя, цветков лаванды колосовой также предназначены для нанесения на слизистую оболочку полости рта и на кожу [6].

Разработаны составы и технология плёнок с натрия фторидом и фитокомплексами астрагала эспарцетного, коры берёзы, которые успешно прошли апробацию при лечении кариеса зубов [13].

СЛП «Виватон» на основе полисахаридов растительного происхождения содержат полиэкстракт «Виватон», в состав которого входят 27 видов ЛРС. СЛП обладают противовоспалительной активностью, про-

тивоотёчным и эпителизирующим эффектом, обеспечивают направленность, пролонгированность действия, точность дозирования, стабильность БАВ, удобство и комфортность приёма [2].

В комплексной терапии многих стоматологических заболеваний важное место принадлежит средствам растительного происхождения, которые оказывают противовоспалительное действие, способствуют очищению ран от некротических тканей, стимулируют их заживление. На основе натрия альгината разработаны ФП для лечения и профилактики: пародонтоза, воспаления слизистой оболочки рта. Это ФП с экстрактом прополиса («Пропэкс»), настойкой календулы, ротоканом, с экстрактом шалфея, душицы, коры ивы, экстрактом и соком алоэ, ромазуланом, сальвином.

Одним из наиболее эффективных и широко используемых в стоматологии способов обезболивания при проведении малотравматических манипуляций является аппликационная анестезия. Традиционно применяемые для этих целей мази не решают полностью проблемы снятия боли из-за невозможности точного дозирования анестезирующего средства [8].

Разработан состав биорастворимых СЛП анестезирующего, антимикробного, противовоспалительного действия с соком каланхоэ и тримекаином. Установлено, что оптимальной матрицей-носителем, обеспечивающей наиболее полную и достаточно равномерную степень высвобождения тримекаина, является натрийкарбоксиметилцеллюлоза (NaКМЦ). Данные СЛП обеспечивают необходимый анестезирующий эффект, что позволяет рекомендовать их для локального обезболивания при кратковременном вмешательстве. Использование СЛП с тримекаином при комплексном лечении гингивитов, пародонтитов различной степени тяжести способствовало сокращению сроков лечения [4].

Поскольку при заболеваниях пародонта преобладает смешанная аэробно-анаэробная микрофлора, целесообразно включить в полимерные плёнки антибиотик широкого спектра действия и лекарственное средство, проявляющее высокую активность в отношении анаэробных микроорганизмов и простейших. В КГМУ (Курский государственный медицинский университет) изготовлены стоматологические плёнки с гентамицина сульфатом и метронидазолом методом испарения растворителя, проведена их стандартизация и клинико-лабораторные исследования. Оптимальное содержание гентамицина сульфата – 3 мг/см^2, метронидазола – 5 мг/см^2. Исследованы 4 состава с добавлением в качестве вспомогательных веществ ПВС, ОПМЦ, сахарина (корригент).

Плёнки применяли для лечения афтозных стоматитов и с целью предупреждения послеоперационных осложнений 1 раз в сутки в течение 5 дней вместо внутримышечного введения гентамицина по 0,08 в течение 5 дней, что позволило сократить расход ЛС, снизить их токсичность, обеспечить пролонгированность действия и высокую терапевтическую активность [9].

Бишофит – средство природного происхождения, оказывающее противовоспалительный, обезболивающий эффекты, содержит микро- и макроэлементы [10]. Стоматологические плёнки с бишофитом – новая лекарственная форма препарата магния, обладающая вышеперечисленными фармакологическими эффектами [1].

Также разработаны состав и технология СЛП с бишофитом и метронидазолом. Бишофит выбран в качестве одонтотропного средства, обеспечивающего комплексное воздействие на ткани пародонта, в концентрации 4%. Для снижения кариесогенной флоры полости рта в состав плёнок введён метронидазол, обладающий высокой активностью в отношении широкого спектра бактерий и простейших. Основное влияние на эффективность действия ЛВ в плёнках оказывает выбор оптимального плёнкообразователя. Установлено, что оптимальной матрицей-носителем, обеспечивающей наибольшую степень высвобождения бишофита и метронидазола, является метилцеллюлоза (пластификатор – глицерин) [11].

В стоматологической практике для лечения эрозий, афт применяют коллагеновые ЛП с различными ЛС, в частности с кортикостериодными препаратами, димедролом, анестезином. Плёнка фиксируется к эрозии и оказывает противовоспалительный, противоаллергический эффекты в течение 40–45 минут, после чего растворяется. В течение этого периода времени эрозия, афта становится изолированной, что весьма важно при лечении такой группы заболеваний.

Разработаны и исследованы биорастворимые лекарственные плёнки (БЛП) для использования в детской стоматологической практике, в состав которых входят производные целлюлозы, желатина, альгинат натрия. В качестве действующих веществ используются не только обезболивающие средства, но и средства, оказывающие противовоспалительный, противовирусный, гемостатический, кератопластический эффекты: фурацилин 0,1 г, тримекаин 2,0 г, аминокапроновая кислота 5,0 г, солкосерил 5,0 г. Экспериментальные и клинические исследования БЛП выявили их преимущества: безболезненность, атравматичность, пролонгированность, точность дозировки, комфортность, целенаправленность действия, сокращение сроков лечения, возможность использования в домашних условиях, широкий диапазон заболеваний начального отдела жизненно важной системы питания во все физиологические периоды детства – перед широко используемыми в настоящее время ЛФ, такими как гели, мази [12].

В эксперименте установлен высокий противовоспалительный эффект плёночной формы препарата «Салсоколлин» на модели хронического генерализованного пародонтита [9].

Разработан состав и технология биорастворимых ЛП анестезирующего действия на основе анилокаина. В состав плёнок также введён антимикробный препарат широкого спектра действия диоксидин. Изучены плёнкообразующие свойства полимеров природного

и синтетического происхождения как отечественного, так и импортного производства в различных концентрациях: производных целлюлозы (NaKМЦ, бланоза 7MF и бланоза 7M8SF, Натросол 250 HX-Pharm и 250 G-Pharm), Na альгината, агар-агара, желатина, полимера биорастворимого. Изучены пластифицирующие свойства глицерина, лимонной кислоты, ПЭО-400. Кинетика высвобождения ЛС характеризуется самым высоким значением константы растворения у композиции на основе Натросола [13].

Применение адгезивной плёнки «Диплен-Дента» (с фосфатом клиндомицина) в комплексном назначении с гелевой формой «Радогель-П», содержащей пихтовую живицу или прополис, повышает эффективность лечения хронического пародонтита лёгкой и средней степени тяжести [14].

Терапевтическая эффективность плёнок зависит во многом от рационально выбранной технологии и способа введения фармацевтических субстанций в состав плёнок. Для реминерализации дентина и цемента корня при обнажении шейки зубов разработаны ЛП, которые могут быть использованы в качестве лечебной прокладки. В состав входят соли кальция, фосфорной кислоты, повышающие кислотоустойчивость эмали, способствующие отложению заместительного дентина и оказывающие противовоспалительное действие. Фторид-ион является катализатором процесса реминерализации и повышает неспецифическую резистентность организма [7].

Защищены патентами СЛП, обладающие реминерализующими, противовоспалительными, антисептическими свойствами, в состав которых входят кальция глюконат, метилурацил, фурацилин и другие препараты.

В комплексном лечении заболеваний тканей пародонта и слизистой оболочки полости рта широко применяются препараты, стимулирующие метаболические процессы, в частности метилурацил. Разработаны состав, технология и методики анализа СЛП полифункционального действия на полимерной основе с включением в них сока каланхоэ, метилурацила и левомицетина. Концентрацию препаратов определяли в СЛП исходя из дозы для местного применения, поэтому в качестве терапевтической дозы для СЛП была избрана концентрация левомицетина 1%, метилурацила – 2%, сока каланхоэ – 10%. СЛП приготовлены методом полива. В качестве полимерной матрицы выбраны 10% раствор ПВС, 3% гель МЦ и 5% гель Na-КМЦ с пластификатором глицерином в количестве 2,5%. Оптимальной матрицей оказался раствор ПВС [15].

Перспективными для местного применения в стоматологии являются не только полимерные плёнки, но и пасты, гели, твёрдые дисперсные системы (ТДС), обеспечивающие равномерное нанесение на слизистую оболочку ЛВ, гранулы в пародонтальных карманах, стоматологические лаки (клеи), фиксирующиеся на слизистой в течение двух-трёх часов [16].

Следующим видом пленок являются дерматологические, используемые для лечения таких заболеваний, как лишай, псориаз, и гнойно-воспалительных процессов. Получены результаты эффективного комплексного лечения красного плоского лишая препаратами чаги: раствором сухого экстракта и фитоплёнками на его основе. Основным действующим БАВ чаги считается водорастворимый, интенсивно окрашенный хромогенный комплекс, образованный из химически активных фенольных альдегидов, полифенолов, оксикарбоновых кислот и их кетонов. В качестве плёнкообразователя использованы метилцеллюлоза (МЦ), желатин и различные сочетания МЦ и желатина. Составы пластифицированы глицерином. Для увеличения скорости проникновения хромогенного комплекса введён диметилсульфоксид (ДМСО) и арабиногалактан (АГ). АГ – полисахарид, содержащийся в лиственнице. Он может служить целенаправленным носителем для доставки диагностических и терапевтических агентов к определённым клеткам. АГ оказывает заметное гастропротекторное и антимикробное действие. Наиболее оптимальным является состав: МЦ – 2,0; желатина – 4,0; АГ – 0,8; ДМСО – 0,16; глицерина – 2,4; витамина А – 1,0; чаги экстракта сухого – 2,0; воды очищенной – до 100 мл.

Псориаз представляет собой пролиферативное заболевание эпидермиса, связанное со значительными нарушениями дифференцировки кератиноцитов и образованием псориатических бляшек. В России ведётся разработка состава и технологии растворимых полимерных плёнок и многокомпонентной мази, обладающих многофакторным и пролонгированным действием на псориатические бляшки.

В качестве действующих веществ дерматологических лекарственных пленок (ДЛП) предложены даларгин (синтетический нейропептид), димедрол (противогистаминный препарат) и ретинола ацетат (антинеопластический и антикератинизирующий эффекты). В качестве вспомогательных веществ использованы плёнкообразователи МЦ, NaKМц, ПВС, пластификатор глицерин, солюбилизатор ПЭО-400, ПАВ, твин-80.

В дерматологической практике для первичной обработки ожоговой поверхности нашли широкое применение ДЛП, содержащие фурацилин, анестезин, а в качестве плёнкообразователя – поливинилпирролидон (ПВП). Входящий в состав ПВП позволяет увеличить проницаемость плёнки для ЛВ и обеспечить достаточно медленное его растворение под действием ожогового экссудата.

Для пролонгации эффекта при местном применении ДЛП в качестве матрицы используют поливиниловый спирт (ПВС) с молекулярной массой 40000 (плёнки дерматологические с клонидином и тербутамином). Для лечения гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей разработаны ЛП на ПВП с иммобилизованным рихлокампом 12%. ЛП обладают широким спектром противомикробной активности в отношении возбудителей гнойной хирургической инфекции.

Применение ЛП приводит к сокращению сроков заживления ран.

Предложены ЛП на основе коллагена с облепиховым маслом для лечения различных заболеваний кожи. Отмечено усиление пролиферации клеток под влиянием коллагена и активизация процессов биосинтеза под влиянием облепихового масла, что обеспечивает суммарный стимулирующий эффект и ускорение процесса заживления ран.

В качестве ЛФ для наружного применения предложены адгезивные ЛП, состоящие из защитного слоя бумаги, удаляемого в момент применения, подложки (полиэтилен или нетканый материал) и адгезивного слоя (полиакриловый сополимер), включающего действующее вещество в количестве 0,1–0,15 мг на 1 $см^3$ плёнки (ЛП сукцифиллина и бензокаина). Примером такой лекарственной формы является согревающий комплекс [17]. На сегодняшний день разработана технология получения согревающего комплекса в виде ЛФ, содержащей увлажняющий и согревающий слои. Увлажняющий слой содержит полиакрилат натрия, КМЦ, желатин, глицерин, воду. Согревающий слой содержит смесь ментола, камфоры, тимола, мятного масла и метилсалицилата.

Для лечения дерматологических заболеваний разработаны ЛП, содержащие химиотерапевтические препараты. Перспективным направлением в фармации является создание лекарственных средств для лечения злокачественных новообразований слизистых оболочек. Разработаны состав и технология полимерных плёнок с доксорубицином для местного лечения раковых опухолей слизистых оболочек. Содержание доксорубицина в плёнках – 0,14 мг/$см^2$, основа – оксипропилметилцеллюлоза. Плёнки стабильны в течение 12 месяцев хранения при температуре 4±2 °С [17].

Особый интерес представляют раневые покрытия плёночного типа, в частности из поливинилового спирта, достоинством которых является пластичность, обеспечивающая хорошее моделирование повязки на раневой поверхности. В том случае, если плёнки прозрачны, представляется возможность осуществлять визуальный контроль за состоянием раны. На кинетику десорбции из них антимикробных веществ влияет сродство ЛВ к полимеру-носителю. Из плёнок, содержащих йод, катапол или диоксидин, при проведении теста «Растворение» в модельных условиях (среда растворения – 0,9% раствор натрия хлорида, температура среды растворения – 20±2 °С) диоксидин выделяется быстрее других антимикробных веществ: к концу суточной экспозиции в плёнке остаётся примерно 20% антисептика. Показано, что степень выделения антимикробного вещества из поливинилспиртовых плёнок уменьшается с увеличением его молекулярной массы и степени набухания плёнки, поэтому для пролонгирования десорбции используют полимерное антимикробное вещество – диметилбензилалкиламмониевую соль сополимера кротоновой кислоты с винилпирролидоном. Введение в состав плёнки набухающего полимера – карбоксиметилцеллюлозы – также замедляет десорбцию ЛВ (трихопола, йода, леворина), но в то же время снижает её прочность [18].

Разработан и исследован состав аппликационных ЛФ в виде самофиксирующихся плёнок на основе природных биополимеров, обладающих антимикробным и ранозаживляющим действием. Зостерин – сухой экстракт травы зостеры морской. Этот биополимер представляет собой полисахарид из остатков галактуроновых кислот. Плёнкообразователь – коллаген, пластификатор – глицерин медицинский, пенетратор – димексид [19].

Для лечения инфекционных заболеваний кожи и слизистой оболочки разработаны составы и технология плёнки на полимерной основе с синтетическим противомикробным препаратом широкого спектра биоцидного действия – офлоксацином. Физико-химические и биофармацевтические исследования показали, что оптимальным полимером является натрийкарбоксиметилцеллюлоза. Для улучшения биофармацевтических показателей в состав плёнок вводили ПАВ – твин-80, а с целью обеспечения микробиологической стабильности в процессе их хранения – смесь консервантов нипагин и нипазол в соотношении 3:1. Плёнки сохраняли свою фармакологическую активность в течение 12 месяцев хранения (срок наблюдения) [8].

Актуальной проблемой современной ринологии является недостаточная эффективность лечения травматического ринита, развивающегося после операций в результате раздражения слизистой оболочки полости носа. С целью профилактики послеоперационных инфекционных осложнений используется обработка полости носа раствором мирамистина на тампонах. Однако введение тампонов на длительный срок приводит к дополнительной травматизации слизистой оболочки. Для ликвидации отрицательного влияния на мерцательный эпителий предложено применение мирамистина в биорастворимых полимерных плёнках с содержанием действующего вещества 0,5 мг/$см^2$. Учитывая влияние вспомогательных веществ на лечебный эффект плёнок, были использованы водорастворимые производные целлюлозы: МЦ и ОПМЦ (оксипропилметилцеллюлоза) марки Methocel 65 Hg-50. Установлена несовместимость мирамистина с Na-КМц. Плёнки стабильны в течение 12 месяцев (срок наблюдения) [9].

При хирургических вмешательствах в ЛОР органы используются также биорастворимые полимерные плёнки с дикаином, обеспечивающие локализацию и пролонгированность действия ЛВ, точность дозирования, уменьшение токсичности. Дополнительное введение эфедрина гидрохлорида в состав плёнок с дикаином способствует снижению случаев проявления побочных эффектов ЛП. В качестве плёнкообразователя используют оксипропилметилцеллюлозу (ОПМЦ). Установлено, что применение ЛП способствует увеличению продолжительности анестезии в два раза по сравнению с растворами.

Разработаны биорастворимые плёнки для лечения ринитов, в состав которых вводят сульфацил натрия, мезатон, диазепам, димедрол [2].

В настоящее время также разработаны лекарственные пленки системного действия. Для предупреждения приступов стенокардии рекомендуется применение антиангинальных лекарственных пленок с нитроглицерином (тринитролонг) в виде аппликации на слизистую оболочку десны.

Проведены исследования по разработке нового лекарственного препарата с ибупрофеном в виде быстрорастворимой трансбуккальной пленки. Результаты изучения биодоступности препарата показали быстроту всасывания ибупрофена через слизистую ротовой полости в течение первых 30 мин после приема пленки [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лекарственные плёнки как иммобилизованные препараты преимущественно для местного применения выгодно отличаются длительностью действия в организме от традиционных лекарственных форм – полосканий, орошений, смазываний, суппозиториев.

Плёнки позволяют значительно уменьшить дозы и расход лекарственных веществ, так как наносятся непосредственно на зону патологии или максимально близко к ней, и лекарственное вещество высвобождается в заданном месте. Малые дозы снижают вероятность проявления токсических и побочных действий лекарственных веществ.

По данным Государственного реестра лекарственных средств, в России в 2016 году зарегистрированы пленки глазные с тауфоном, пленки для наклеивания на десну с нитроглицерином (тринитролонг), а также пленки, диспергируемые в полости рта, с силденафилом.

При трансмукозальном введении лекарственное средство всасывается в вены слизистой оболочки ротовой полости и далее последовательно поступает в верхнюю полую вену, правые отделы сердца и малый круг кровообращения. После этого лекарство доставляется в левые отделы сердца и с артериальной кровью поступает к органам-мишеням. К преимуществам лекарственных пленок можно отнести портативность, удобство администрирования, точное дозирование, повышенную степень биологической безопасности. Особо актуально их использование в педиатрии, у пожилых людей и у людей, которые имеют трудности при глотании.

Таким образом, проведенный анализ в области разработки трансмукозальных лекарственных форм позволяет сделать вывод о недостаточном ассортименте лекарственных пленок. Производство лекарственных пленок различных составов является современным направлением в фармацевтической технологии, позволяющим расширить ассортимент выпускаемой отечественной продукции для применения её в том числе в педиатрической и гериатрической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. П.Г. Мизина, В.А. Курикин, В.В. Косарев и др. // Патент РФ № 2155071. Способ получения лекарственной фитопленки. Выд. 27.08.2000 г.
2. Т.Ф. Маринина, Л.Н. Савченко, Ю.Г. Пшуков и др. Лекарственные пленки: Учебное пособие. – Пятигорск, 2003. 44 с.
3. П.Г. Мизина, В.А. Быков. Чрескожное введение лекарственных средств: современные аппликационные лекарственные формы: Учебное пособие. Самара, 2004. 124 с.
4. M.R. Baichwal, S.G. Deshpande, P.K. Singh, P. Venkitachalam. Studies onpolymeric films for transdermal use // Jnd. J. Pharm. Sci. 1988. V. 50. № 3. P. 153–156.
5. П.Г. Мизина, С.Н. Бабкин и др. Исследование токсичности лекарственных фитопленок // Человек и лекарство: Тез. докл. 4 Рос. нац. конгр. 8–12 апр. 1997. М., 1997. С. 84.
6. П.Г. Мизина, Н.П. Гурина и др. Лекарственные фитопленки – рациональная лекарственная форма // Человек и лекарство: Тез. докл. 4 Рос. нац. конгр. 8–12 апр. 1997г. М., 1997. С. 331.
7. П.Г. Мизина. Фитопленки в фармации и медицине / П.Г. Мизина // Фармация. 2002. № 5–6. С. 38–40.
8. Лекарственные средства, применяемые в стоматологии (Х формулярная система). – Новая аптека. Нормативнаяе документы. 2002. № 9. С. 82–96.
9. Л.Н. Ерофеева, Н.Д. Афонина и др. Пленки с мирамистином для профилактики и лечения травматического ринита // Достижения, проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики: Матер. регион. научно – практич. конф. (с международ. участием), посвященный 40-летию фармац. факультета КГМУ / Под. ред. А.И. Лазарева. – Курск: КГМУ, 2006. С. 158–161.
10. А.А. Спасов. Магний в медицинской практике / А.А. Спасов. – Волгоград: ООО «Отрон», 2000. 272 с.
11. Государственный реестр лекарственных средств. http://www.grls.rosminzdrav.ru (дата обращения 19.04.2017).
12. Е.Ю. Симановская, Л.Н. Олешко, Г.И. Олешко Использование биорастворимых лекарственных пленок в детской стоматологической практике // Рациональное использование лекарств: Матер. Росс. науч. – практич. конф. (10-12 марта 2004 года, Пермь). Пермь, 2004. С. 274–276.
13. С.О. Лосенкова, А.В. Крикова Лекарственные пленки. Учебно-методическое пособие. – Смоленск: СГМА, 2007.
14. Полимеры в фармации // Под ред. А.И. Тенцовой и М.Т. Алюшина. М: Медицина, 1985. 250 с.
15. Т.Ф. Маринина, Л.Н. Савченко и др. Исследование по созданию стоматологических лекарственных пленок с левомицитином и метилурацилом // Разработка, исследования и маркетинг новой фармацевтической продукции: Матер. 61-й межрегион. конф. по фармации и фармакологии: сб. науч. тр. Пятигорск, 2006. С. 114–116.
16. В.И. Погорелов, Т.Ф. Маринина, Л.Н. Савченко и др. Основные принципы разработки стоматологических лекарственных форм // Разработка, исследования и маркетинг новой фармацевтической продукции: Матер. 58-й межрегион. конф. по фармации и фармакологии: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2003. С. 148–150.
17. Е.Н. Карпенко, Л.Н. Ерофеева и др. Разработка полимерных лекарственных пленок с доксорубицином // Фармация. 2006. С. 18–21.
18. Т.Н. Юданова, И.В. Решетов Современные раневые покрытия: получение и свойства (обзор) // Химико – фармац. журнал. Т. 40. № 2. 2006. С. 24–31.
19. М.Б. Умерзакова, Ж.К. Мустафина, Г.И. Бойко, Б.А. Жубанов и др. Полимерные лекарственные пленки с пилокарпином и витаминами // Хим. – фарм. ж. 1999. Т. 33. № 3. С. 49–50.
20. М.Б. Сапожникова, Ю.А. Обидченко и др. Исследование биодоступности ибупрофена в виде быстрорастворимой трансбуккальной пленки // Фармация. 2014. № 5. С. 47–50.

УДК 615.4

КЕТОПРОФЕН: ПРИМЕНЕНИЕ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ

А.В. Беляцкая[1]*, И.И. Краснюк (мл.)[1], И.И. Краснюк[1], Т.Е. Мачикина[1], Ю.А. Коростелева[1], О.И. Степанова[1], И.М. Кашликова[1], Ю.В. Сковпень[2], А.Н. Воробьёв[3]

Резюме. Кетопрофен – действующее вещество, не утратившее актуальности в современной медицине и фармации. В статье приведены аспекты его применения. Рассмотрены перспективы создания новых лекарственных форм, содержащих кетопрофен. Описана возможность создания быстрорастворимых лекарственных форм, содержащих твердые дисперсии кетопрофена.

Ключевые слова: кетопрофен, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), твердые дисперсии, растворимость.

KETOPROFEN: APPLICATION AND DOSAGE FORMS

A.V. Belyatskaya[1]*, I.I. Krasnyuk (jr.)[1], I.I. Krasnyuk[1], T.E. Machikina[1], Yu.A. Korosteleva[1], O.I. Stepanova[1], I.M. Kashlikova[1], Y.V. Skovpen[2], A.N. Vorob'yov[3]

Abstract. Ketoprofen is a medicinal substance that has not lost its relevance in modern medicine and pharmacy. The article describes the aspects of its application. The prospects of creating new dosage forms containing ketoprofen are considered. The possibility of creating effervescent dosage forms containing solid dispersions of ketoprofen is described.

Keywords: ketoprofen, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), solid dispersion, the solubility.

1 – ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

2 – Rancho BioSciences, USA, 16955 Via Del Campo Suite 220, San Diego CA 92127

3 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

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

2 – Rancho BioSciences, 6955 Via Del Campo Suite 220, San Diego CA 92127, USA

3 – Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) на протяжении многих лет остаются наиболее популярными в клинических рекомендациях и протоколах ведения пациентов с болью во всех странах, а сама группа препаратов – самой назначаемой в клинической практике [1].

Кетопрофен – широко применяемый в современной медицинской терапии представитель группы НПВС, обладающий высокой анальгетической, противовоспалительной и жаропонижающей активностью [2, 3].

Впервые кетопрофен был синтезирован в 1967 году в лаборатории французской фармацевтической компании Rhône-Poulenc, в 1999 году объединенной с Hoechst AG для создания компании Aventis, а с 2015 года являющейся частью Sanofi. В 1971 году его признали «молекулой года», а начиная с 1973 года стали активно внедрять в клиническую практику во Франции и Великобритании. В настоящее время кетопрофен широко применяется более чем в 80 странах мира, в том числе и в России [4, 5].

По химической структуре кетопрофен (2RS)-2-(3-бензоилфенил)пропановая кислота является производным арилпропионовой кислоты, обладающей сильными кислотными свойствами (pK=3-5), а также высокой липофильностью, обуславливающей легкость проникновения лекарственного средства через гематоэнцефалический барьер [3]. В молекуле кетопрофена карбоксильная и бензольная группы по отношению к бензольному кольцу находятся в анти-положении [7].

Кетопрофен представляет собой рацемическую смесь энантиомеров, в которой фармакологическая активность связана с S-энантиомером; у R–изомера способность ингибировать циклооксигеназу намного ниже [2]. По физическим свойствам кетопрофен – белый или почти белый порошок, без запаха, негигроскопичен; легко растворим в спирте, хлороформе, ацетоне, эфи-

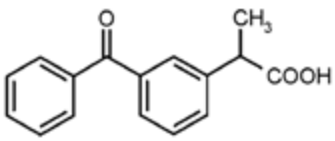


Рисунок 1. Кетопрофен (Ketoprofenum) $C_{16}H_{14}O_3$, М. м. 254,28 г/моль [6]

ре, бензоле и сильных щелочах, но практически нерастворим в воде, что в некоторой степени ограничивает возможности его применения в фармацевтической технологии. Температура плавления субстанции находится в интервале от 94 °С до 97 °С. Хранят кетопрофен в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С. Для определения подлинности используется ИК-спектроскопия и УФ-спектрофотометрия (максимум поглощения при 258 нм) [8, 9].

В медицине также используется лизиновая соль кетопрофена (ЛСК), представляющая собой (2RS)-2-(3-бензоилфенил)пропановую кислоту в виде соли с L-лизином, с молекулярной массой 400,47. Солификация кетопрофена лизиновой аминокислотой позволяет улучшить фармакологические характеристики молекулы. ЛСК обладает большей растворимостью, чем кетопрофен, что способствует ускоренной и более полной абсорбции активного вещества [1, 2].

Механизм действия кетопрофена и ЛСК связан с неселективным ингибированием активности двух изоформ циклооксигеназы (ЦОГ-1 и ЦОГ-2), что нарушает образование простагландинов E_2 и I_2 из арахидоновой кислоты, путем синтеза нестабильных циклических эндопероксидов [2, 10, 11].

Простагландины являются медиаторами воспаления, повышают чувствительность болевых рецепторов к гистамину и брадикинину, а также стимулируют процессы терморегуляции в гипоталамусе, тем самым повышая температуру тела [10].

Выраженное анальгезирующее действие кетопрофена и ЛСК осуществляется двумя механизмами: периферическим (опосредованно, через подавление синтеза простагландинов) и центральным (обусловленным ингибированием синтеза простагландинов в центральной и периферической нервной системе, а также действием на биологическую активность других нейротропных субстанций, играющих ключевую роль в высвобождении медиаторов боли в спинном мозге [6, 12].

Кроме того, соединения кетопрофена обладают антибрадикининовой активностью, стабилизируют лизосомальные мембраны и задерживают высвобождение из них ферментов, способствующих разрушению тканей при хроническом воспалении. Подавляют агрегацию тромбоцитов, снижают выделение цитокинов и тормозят активность нейтрофилов [7, 11].

До 99% кетопрофена связывается с белками плазмы, преимущественно с альбумином. Кетопрофен легко проникает через гистогематические барьеры и распределяется в тканях и органах, а также в синовиальной жидкости и соединительной ткани. Хотя концентрация кетопрофена в синовиальной жидкости несколько ниже, чем в плазме, она более стабильна (сохраняется до 30 часов). Кетопрофен в основном метаболизируется в печени, где он подвергается глюкуронизации с образованием сложных эфиров с глюкуроновой кислотой. Период полувыведения составляет 6,5 часов. Метаболиты выводятся в основном с мочой (до 76% в течение 24 часов). С калом выводится менее 1%. Препарат практически не накапливается в организме [1].

Кетопрофен нашел широкое системное применение при воспалительных и дегенеративных заболеваниях опорно-двигательного препарата (артроз, остеохондроз, ревматоидный артрит) [13], купировании болевого синдрома в посттравматический и послеоперационный период, при ишиалгии, радикулите и почечных коликах, а также часто используется в гинекологической, стоматологической и онкологической практике [11, 14]. Как наружное средство кетопрофен используется при болезненных воспалительных поражениях кожи и суставов, при спортивных травмах сухожилий, связок и мышц [3, 15]. В виде растворов кетопрофен используется в стоматологии при симптоматическом лечении воспалительных процессов полости рта, глотки и гортани [14].

В то же время кетопрофен не рекомендован людям, страдающим обостренной язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, язвенным колитом, пептической язвой, печеночной и почечной недостаточностью, гемофилией и болезнью Крона. Дерматологическое применение не рекомендовано при экземах, нарушениях целостности кожи или при наличии на болезненном участке инфицированной ссадины [9].

Исследование, посвященное сравнению эффективности перорального введения кетопрофена с действием ибупрофена и диклофенака, проведенное в ревматологическом отделении университетской больницы им. L. Sacco (Милан, Италия), показало, что эффективность перорального введения кетопрофена для облегчения умеренно сильной боли и улучшения функционального состояния и общего состояния была значительно выше, чем эффективность ибупрофена и диклофенака [16].

В ходе сравнительного исследования эффективности ненаркотических анальгетиков (метамизол натрия) и НПВС (ЛСК, диклофенак натрия, кеторолак и

лорноксикам) в лечении болевого синдрома в условиях скоропомощного этапа оказания медицинской помощи оцененивалась обезболивающая эффективность и безопасность при скелетно-мышечной посттравматической боли и почечной колике. Высокую эффективность вне зависимости от генеза болевого синдрома продемонстрировали ЛСК, лорноксикам и кеторолак. Однако, по мнению автора, наибольшим анальгетическим потенциалом по сравнению с метамизолом натрия обладает именно ЛСК [1].

На данный момент в Российской Федерации зарегистрированы 8 наименований фармацевтической субстанции кетопрофен. Из них 4 производятся в Китае на предприятиях «Хуанши Шиксинь Фармасьютикал Ко., Лтд.», «Жеджианг Джиужоу Фармасьютикал Ко., Лтд.», «Хубей Сюньда Фармасьютикал Ко., Лтд.», «Сучжоу Чжицзюнь Ваньцин Фармасьютикал Ко., Лтд.». Две субстанции кетопрофена производятся в Германии («Санофи-Авентис Дойчланд ГмбХ», «Вируд ГмбХ»), а также по одной субстанции – в Италии и в России («Симс Сочьета Итальяна Медичинали Скандиччи С.Р.Л.» и ОАО «Синтез» соответственно) [17].

На данный момент на российском фармацевтическом рынке широко представлен ассортимент различных лекарственных форм (ЛФ) кетопрофена: раствор для внутривенного и внутримышечного введения, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения – для парентерального введения; суппозитории ректальные, гели, кремы и аэрозоли – для наружного применения; капсулы и таблетки – для внутреннего применения [6, 9, 12, 17]. В РФ зарегистрированы более 15 торговых наименований препаратов кетопрофена: «Аркетал Ромфарм», «Артрум», «Быструмгель», «Быструмкапс», «Валусал», «Кетонал», «Кетонал Дуо», «Кетопрофен», «Кетопрофен Врамед», «Кетопрофен МВ», «Кетопрофен органика», «Кетопрофен-Эском», «Фастум», «Феброфид», «Фламакс», «Фламакс Форте», «Флексен» – и 2 торговых наименования препаратов ЛСК – «Артрозилен» и «ОКИ». Лизиновая соль кетопрофена является действующим веществом (ДВ) лекарственных препаратов (ЛП), выпускаемых в виде следующих ЛФ: гранулы для приготовления раствора для внутреннего применения, раствор для местного применения, аэрозоль, гель, суппозитории ректальные, раствор для внутривенного и внутримышечного введения.

Большая часть ЛП кетопрофена выпускаются предприятиями, расположенными на территории РФ: ООО «Озон», ОАО «Биохимик», ООО «Атолл», ЗАО «Вертекс», ООО «Эллара», ЗАО «ФП «Оболенское», «Лабораториос Лесви С.Л.», ОАО «Органика», ЗАО «ФармФирма «Сотекс», ЗАО «Фармпроект», ОАО «Биосинтез», ЗАО «Вертекс», ОАО «Татхимфармпрепараты», ОАО «Синтез», ОАО «НПК «Эском», ОАО «Акрихин ХФК», ЗАО «Биоком».

Импортные препараты кетопрофена производятся в Казахстане (АО «Химфарм»), Республике Беларусь (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов»), Латвии (АО «Гриндекс»), Болгарии («Ветпром АД», АО «Софарма»), Румынии («К.О. Ромфарм Компани С.Р.Л.»), Словении («Лек д.д.», «Салютас Фарма ГмбХ»), Польше («Медана фарма ТЕРПОЛЬ Груп»), Македонии («Реплек фарм»), Италии («А. Менарини Мэнюфекчеринг Лоджистикс энд Сервисиз С.р.Л», «Италфармако С.п.А.»), Германии («А. Менарини Мэнюфекчеринг Лоджистикс энд Сервисиз С.р.Л») и др. [9, 17]. Препараты ЛСК импортируются в РФ из Италии («Домре фармасьютик», «Институт де Ангели С.р.Л.», «Абиоген фарма» и др).

На современном Российском фармацевтическом рынке присутствуют различные ЛФ кетопрофена для внутреннего и наружного применения. Парентеральные ЛФ представлены раствором для внутривенного и внутримышечного введения с дозировкой 50 мг/1 мл в ампулах по 2 мл (N. 5, 10, 25 или 50) и лиофилизатом для приготовления раствора для внутримышечного введения с дозировкой 100 мг в ампуле (N. 6 в комплекте с растворителем). Выпускаются ЛФ кетопрофена для внутреннего применения, такие как: таблетки, 100 мг (N. 20); таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 100 мг (N. 20, 30, 50); таблетки пролонгированного действия, 150 мг (N. 10, 20, 30); таблетки с модифицированным высвобождением, 150 мг (N. 20); капсулы, 50 мг (N. 20, 25, 30 и 50); капсулы с модифицированным высвобождением, 150 мг (N. 20, 30); капсулы пролонгированного действия, 200 мг (N. 20). Широко представлены ЛФ кетопрофена для наружного применения: суппозитории ректальные, 100 мг (N. 5, 10 и 12); гель для наружного применения 2,5% [тубы по 30, 40, 50 и 100 г; контейнер полипропиленовый, 100 г, с дозирующим устройством (диспенсером)]; 5% гель и крем в тубах по 30 и 50 г [6, 9, 12].

ЛСК выпускается в следующих ЛФ: раствор для внутривенного и внутримышечного введения с дозировкой 80 мг/1 мл в ампулах по 2 мл (N. 6); капсулы, 320 мг (N. 10); гранулы для приготовления раствора для приема внутрь с дозировкой 80 мг/2 г (пакетики N. 12 или 20); раствор для местного применения, 16 мг/ 1 мл (флакон объёмом 150 мл с мерным стаканчиком); аэрозоль для наружного применения 15% (баллон 25 г с насадкой-распылителем и защитным колпачком); суппозитории ректальные для взрослых с дозировкой 160 мг (N. 10) и с дозировкой 60 мг (N. 10) – для детей; гель для наружного применения 5% в тубах по 30 и 50 г [9, 12].

Сроки годности ЛП, содержащих в качестве ДВ кетопрофен, различаются в зависимости от фирмы-производителя и вида ЛФ: лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения – 3 года; раствор для внутривенного и внутримышечного вве-

дения – от 3 до 5 лет; таблетки и капсулы – от 2 до 5 лет; суппозитории – от 3 до 5 лет; гели – от 2 до 5 лет; крем 5% – 5 лет. Препараты ЛСК имеют следующие сроки годности: раствор для внутривенного и внутримышечного введения – 2 года; капсулы – 3 года; гранулы для приготовления раствора для приема внутрь и раствор для местного применения и аэрозоль – 2 года; суппозитории – от 3 до 5 лет; гель – 3 года [6, 9, 12].

В РФ производят: раствор для внутривенного и внутримышечного введения; таблетки; таблетки, покрытые пленочной оболочкой; таблетки пролонгированного действия; таблетки с модифицированным высвобождением; капсулы; суппозитории; гели 2,5% и 5%. Также вышеприведенные ЛФ импортируются в Россию из других стран. Например: раствор для внутривенного и внутримышечного введения (Казахстан, Болгария, Румыния, Словения); таблетки, покрытые оболочкой (Словения, Македония); таблетки пролонгированного действия (Словения); капсулы (Италия, Македония, Словения); суппозитории (Словения, Италия); гели (Республика Беларусь, Латвия, Болгария, Польша, Словения, Италия). Только зарубежными производителями представлены такие ЛФ кетопрофена, как лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения (Италия); капсулы с модифицированным высвобождением (Словения); капсулы пролонгированного действия (Словения, Польша); крем (Германия). Спрей кетопрофена в настоящее время не представлен на отечественном рынке, так как истек срок его государственной регистрации. Препараты ЛСК импортируются в РФ из Италии [9, 12].

Все ЛФ кетопрофена и его лизиновой соли для парентерального и перорального применения отпускаются из аптеки по рецепту врача, а ЛФ для наружного применения – без рецепта [6, 9].

Препараты кетопрофена применяют инъекционно, перорально, ректально и местно. Парентерально кетопрофен назначают (взрослым) внутримышечно по 100 мг 1–2 раза в сутки. Максимальная суточная доза составляет 200 мг. Препарат не следует вводить более 2–3 дней, в случае необходимости продолжения лечения рекомендуется далее применять другие ЛФ кетопрофена. В условиях стационара кетопрофен может быть введен внутривенно в виде инфузии (в качестве растворителя может быть использован физиологический раствор, раствор Рингера, раствор глюкозы). Следует использовать минимальную эффективную дозу минимально возможным коротким курсом.

Таблетки кетопрофена, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, капсулы назначают по 1 таблетке/капсуле 2 раза в день. Таблетки и капсулы пролонгированного действия, таблетки и капсулы с модифицированным высвобождением назначают по 1 таблетке 1 раз в день. Максимальная доза кетопрофена для взрослых составляет 200 мг/сут. ЛФ для перорального приема должны проглатываться целиком во время или после еды, их необходимо запивать водой или молоком (объем жидкости должен быть не менее 100 мл).

Пероральные препараты кетопрофена можно сочетать с применением ректальных суппозиториев. Обычно назначают по 1 суппозиторию (100 мг) ректально 1–2 раза в день.

Мягкие ЛФ кетопрофена используются при симптоматической терапии болезненных и воспалительных процессов различного происхождения. Так, гели с концентрацией ДВ 2,5% и 5% наносят в небольшом количестве (3–5 см) тонким слоем на кожу воспаленного или болезненного участка тела 1–2 раза в сутки и осторожно втирают. Для 2,5% геля дозировка должна быть подобрана в соответствии с площадью пораженного участка: 5 см геля соответствуют 100 мг кетопрофена, 10 см – 200 мг кетопрофена. 5% гель взрослым и детям с 12 лет наносят в небольшом количестве (3–5 см) 2–3 раза в сутки тонким слоем, с последующим длительным и осторожным втиранием в воспаленные или болезненные участки тела. Детям с 6 до 12 лет наносят не более 1–2 см геля не чаще 2 раз в сутки. Продолжительность курса лечения не должна превышать 14 дней без консультации врача. 5% крем наносят в небольшом количестве (примерно 3–5 см) легкими втирающими движениями тонким слоем на кожу воспаленного или болезненного участка тела 2–3 раза в день. Продолжительность курса лечения без консультации врача не должна превышать 14 дней [9, 12, 18]. При накожных аппликациях происходит медленное постепенное трансдермальное всасывание кетопрофена, что обеспечивает поддержание его концентрации в воспаленных тканях в пределах терапевтического уровня в течение длительного времени. Кетопрофен хорошо проникает в синовиальную жидкость и соединительную ткань [19].

Несмотря на большую популярность среди врачей и населения, препараты кетопрофена имеют ряд побочных эффектов. Как и все НПВС, кетопрофен вызывает запор, диарею, тошноту, дисфункции печени, изъязвление слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки. Это связано с угнетением синтеза простагландинов E_2 и I_2, которые обладают гастропротекторным действием. Также из-за изменения фильтрации в почечных клубочках нарушаются функции почек. При наружном применении могут наблюдаться аллергические реакции в виде зуда, а также экземы и крапивницы [14, 20, 21]. ЛСК по сравнению с кетопрофеном реже вызывает побочные эффекты со стороны ЖКТ (благодаря тому, что обладает нейтральной величиной pH и, соответственно, оказывает меньшее раздражающее действие на слизистую желудка) [9, 12].

Необходимо отметить, что, несмотря на то что с момента синтеза кетопрофена прошло уже почти 50 лет, интерес к нему разработчиков новых ЛП по-прежнему велик [23]. Так, по данным Gita Chawla с соавторами, в период с 2004 по 2016 год было опубликовано более пятидесяти отчетов, касающихся химической модификации кетопрофена с целью уменьшения его ульцерогенных свойств, а также улучшения его растворимости и фармакодинамического профиля [24].

Возможность введения кетопрофена в новые ЛФ, повышение его растворимости, маскировка органолептических свойств являются предметом многочисленных исследований.

Отечественными учеными разработана и запатентована композиция, содержащая в качестве ДВ кетопрофен, а в качестве вспомогательных веществ – пропиленгликоль, воду, цетиловый спирт, полиэтиленоксид-1500 и глицерин. Композиция выполнена в виде мази и обеспечивает увеличение биодоступности кетопрофена и усиление его фармакологического действия [25]. Описано использование комплекса β-циклодекстрина с кетопрофеном с целью расширения терапевтического потенциала назначаемого лечения [26].

Ещё одно изобретение касается твердой ЛФ, состоящей из кетопрофена, смеси лактозы с поливинилпирролидоном двух типов – растворимым и нерастворимым, коллоидного диоксида кремния, стеариновой кислоты и/или ее соли, крахмала картофельного. Данный состав обеспечивает хорошую распадаемость и прочность таблеток, а также их быстрое растворение [27].

Группа ученых фирмы BASF предложила получение твердых, вспененных ЛП, содержащих различные НПВС (в частности кетопрофен) и термопластичный полимер, представляющий собой гомополимер или сополимер N-винилпирролидона. Полученные вспененные препараты быстро растворяются за счет равномерно диспергированного в полимерной матрице ЛВ и обеспечивают, таким образом, его быстрое выделение [28].

Описано получение быстрорастворимых фармацевтических композиций в виде пероральных лиофилизатов (пероральных распадающихся таблеток), состоящих из матрицы (содержащей леван), несущей фармацевтически активный ингредиент (кетопрофен), которая быстро разрушается при контакте с водным раствором или со слюной [29].

Ещё одно изобретение описывает твердую ЛФ в виде распадающейся пероральной пленки, содержащей пищевой щелочной агент (выбранный из группы, включающей гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид магния, гидроксид калия и их смеси); фармацевтически эффективное количество активного кетопрофена и по меньшей мере один водорастворимый пленкообразующий полимер. Заявленная композиция обеспечивает доставку эффективной дозы фармацевтически активного кетопрофена в ротовую полость без ощущения горького вкуса и без раздражения ротовой полости и слизистой оболочки гортани [30].

Однако низкая растворимость кетопрофена в воде ограничивает возможность введения его в такие быстрорастворимые ЛФ, как шипучие таблетки и гранулы.

Одним из эффективных приемов повышения растворимости и биодоступности лекарственных веществ считается метод получения твердых дисперсий (ТД). ТД – это би- или многокомпонентные системы, состоящие из ЛВ и носителя, представляющие собой высокодиспергированную твердую фазу ЛВ или молекулярно-дисперсные твердые растворы с частичным образованием комплексов переменного состава с материалом носителя [31, 32].

Использование данного технологического приема позволяет получать ЛП с оптимальной терапевтической активностью путем оптимизации высвобождения ЛВ за счет повышения растворимости и скорости растворения (и, как следствие, снижение доз ЛВ и их побочных эффектов на организм) [33]. Метод является несложным в исполнении, экономичным и универсальным [34]. Описаны результаты применения данного метода ранее при получении твердых ЛФ других ДВ, таких как анестезин, стрептоцид, сульфадиметоксин, ампициллина тригидрат, рифампицин, синтомицин, эритромицин, фурацилин, фуросемид, индометацин, нимесулид, ибупрофен, парацетамол, эторикоксиб и т.д. [31, 34, 35].

В литературе отсутствует информация о получении и исследовании быстрорастворимых (шипучих) ЛФ на основе ТД с кетопрофеном.

На базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) проводятся исследования возможности повышения растворимости кетопрофена в воде методом ТД с использованием различных полимеров с последующим включением их в состав быстрорастворимых твердых ЛФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование метода твердых дисперсий с целью повышения растворимости и разработка состава и технологии ЛФ с повышенной биодоступностью кетопрофена на основе его ТД, характеризуемых сниженными нежелательными эффектами на организм, является актуальной проблемой современной фармацевтической науки.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.В. Наумов. Методологическое обоснование применения инъекционной формы лизиновой соли кетопрофена в терапии боли при оказании скорой медицинской помощи // Эффективная фармакотерапия. 2013. № 32. С. 74–82.
2. П. Сарци-Путтини, Ф. Атцени, Л. Ланата и др. Боль и кетопрофен: какова его роль в клинической практике? // РМЖ. 2012. № 5. С. 259–264.
3. Н.В. Чичасова, Г.Р. Имаметдинова. Место кетопрофена в клинической практике // Consilium Medicum. 2015. № 9. С. 133–138.
4. С.С. Вершинин, И.И. Хабибуллина, П.С. Коньшин и др. Синтез кетопрофена // Башкирский химический журнал. 2006. № 1. С. 74–77.
5. S. Rençber, S.Y. Karavana, M. Özyatici. Bioavailability File: KETOPROFEN // Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009. № 34. P. 203–216.
6. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая Волна, 2016. 1216 с.
7. В.Н. Леонова. Обоснование состава и стандартизация лекарственного препарата, содержащего кетопрофен и глюкозамина сульфат: дисс. … канд. фарм. наук: 15.00.02. – Пятигорск. 2009. 140 с.
8. European Pharmacopoeia. 8 th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2014. V. 2. P. 2569.
9. Регистр лекарственных средств России: РЛС. URL: https://www.rlsnet.ru (дата обращения 13.04.2017).
10. Р. Н. Аляутдин. Фармакология. Ultra light: учеб. пособие. – М.: ГЭОТАР-Медиа. 2016. 592 с.
11. Р.М. Балабанова, Н.В. Чичасова, Е.И. Шмидт. Имеет ли преимущества кетопрофена лизиновая соль в купировании боли при ревматических заболеваниях // Поликлиника. 2011. № 3. С. 128–131.
12. Vidal. Справочник лекарственных средств. URL: https://www.vidal.ru (дата обращения 13.04.2017).
13. И.Е Шохин, Г.В. Раменская, Ю.И. Кулинич и др. Кинетика растворения и биофармацевтические свойства лекарственных средств кетопрофена // Фармация. 2010. № 8. С. 22–25.
14. А.Е. Каратеев, Е.Л. Насонов, Н.Н. Яхно. Клинические рекомендации. Рациональное применение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) в клинической практике // Современная ревматология. 2015. № 1. С. 4–23.
15. В.Г. Барскова, А.Е. Ильина. Место локальной терапии в ревматологии. В фокусе – гель кетопрофен // Современная ревматология. 2008. № 3. С. 74–77.
16. P. Sarzi-Puttini, F. Atzeni, L. Lanata et al. Efficacy of ketoprofen vs. ibuprofen and diclofenac: a systematic review of the literature and meta-analysis // Clin Exp Rheumatol. 2013. № 31(5). P. 731–738.
17. Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx (дата обращения 13.04.2017).
18. S. Coaccioli. Ketoprofen 2.5% gel: a clinical overview // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2011. № 15. P. 943–949.
19. Патент РФ № 2238722. Фармацевтическая композиция с обезболивающим и противовоспалительным действием / Патентообладатель ОАО «Химико-фармацевтический комбинат «Акрихин». – № 2003118713/15; заявл. 25.06.03; опубл. 27.10.04.
20. О.В. Котова. Преимущества локальной терапии в противовоспалительной и обезболивающей терапии // Consilium Medicum. 2014. № 2. С. 74-77.
21. V. Sardana, J. Burzynski, P. Zalzal. Safety and efficacy of topical ketoprofen in transfersome gel in knee osteoarthritis: A systematic review // Musculoskeletal Care. 2016. Oct 24.
22. I.E. Shohin, J.I. Kulinich, G.V. Ramenskaya et al. Evaluation of in vitro equivalence for drugs containing BCS class II compound ketorrofen // Dissolution Technologies. 2011. Т. 18. № 1. С. 26–29.
23. I.E. Shohin, J.I. Kulinich, G.V. Ramenskaya et al. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: ketoprofen // Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012. Т. 101. № 10. С. 3593–3603.
24. G. Chawla, C. Ranjan, A. Siddiqui et al. Chemical Modifications of Ketoprofen (NSAID) In Search Of Better Lead Compounds: A Review of Literature From 2004-2016 // Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry. 2017. V. 16.
25. Патент РФ № 2404760. Композиция – лекарственная форма нестероидного противовоспалительного средства кетопрофена для наружного применения / Е.Н. Вергейчик, О.Д. Губанов, Л.Б. Губанова. – Заявл. 07.04.09; опубл. 27.11.10. Бюл. № 33.
26. Патент РФ № 2464042. Клатратный комплекс β-циклодекстрина с производным 5-гидрокси-4-аминометил-1-циклогексил(или циклогептил)-3-алкоксикарбонилиндола, способ его получения (варианты), фармацевтическая композиция и лекарственное средство / И.В. Воробьёв, В.В. Хомиченок, В.К. Подгородниченко и др. – Заявл. 31.03.11; опубл. 20.10.12. Бюл. № 29.
27. Патент РФ № 2353352. Твердая лекарственная форма, обладающая противовоспалительной, анальгезирующей, жаропонижающей активностью, и способ её получения / Патентообладатель ЗАО «БИОКОМ». – № 2007143334/15; заявл. 23.11.20; опубл. 27.04.09. Бюл. № 12.
28. Патент РФ № 2200004. Твердые частично или полностью вспененные препараты активного начала / Й. Брайтенбах, Х. Баумгартль; патентообладатель «БАСФ Акциенгезелльшафт». – № 99107556/14; заявл. 21.08.97; опубл. 10.03.03. Бюл. № 7.
29. Патент РФ № 2566269. Быстрорастворимая фармацевтическая композиция / Ш. Упта, В. Ахуджа, Т. Ганджикар и др. – Опубл. 20.10.15. Бюл. № 29.
30. Патент РФ № 2437657. Твердая лекарственная форма, содержащая активный агент с маскированным вкусом / А.М. Шобель, Ш. Вангала; патентообладатель «Новартис АГ». – Заявл. 15.03.07; опубл. 27.12.11. Бюл. № 36.
31. И.И. Краснюк (мл.), А.В. Беляцкая, И.И. Краснюк и др. Перспективы применения твердых дисперсий с поливинилпирролидоном в медицине и фармации // Фармация. 2016. № 6. С. 7–11.
32. Л.В. Овсянникова, И.И. Краснюк (мл.), А.В. Беляцкая и др. Роль твердых дисперсий с полимерами в изменении оптических свойств растворов и кристаллического строения диклофенака // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. № 12. С. 59–60.
33. И.И. Краснюк. Влияние твердых дисперсий на растворимость антибиотиков // Хим.-фарм. журнал. 2009. Т. 43. № 4. С. 48–50.
34. M. Reza Siahi-Shadbad, S. Ghanbarzadeh, M. Barzegar-Jalali et al. Development and Characterization of Solid Dispersion for Dissolution Improvement of Furosemide // Adv. Farm. Bjull. 2014. № 4. P. 391–399.
35. И.И. Краснюк, Л.В. Овсянникова, О.И. Степанова и др. Применение твердых дисперсий с нестероидными противовоспалительными средствами в фармации // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 2(15). С. 40–44.

УДК 66.091.2

ОПТИМИЗАЦИЯ ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА СУБСТАНЦИЙ КРЕМНИЙСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИОЛОВ

А.А. Бойко[1]*, С.В. Морданов[2], Т.Г. Хонина[1], О.Н. Чупахин[1]

Резюме. На примере создания опытно-промышленной технологии производства субстанции лекарственного средства «Силативит» оптимизирован процесс проведения синтеза кремнийсодержащих производных глицерина состава $Si(O_3C_3H7)_4 \cdot 6C_3H_8O_3$. Главным критерием оптимизации являлось сокращение временных и энергетических затрат на проведение синтеза, представляющего собой гетерофазную реакцию алкоголиза исходного алкоксисилана полиолом. Оптимизация была проведена по таким показателям процесса, как температурный режим, режим удаления легколетучего продукта реакции, режим смешения реакционной массы и тип используемого перемешивающего устройства.

Ключевые слова: переэтерификация силанов, кремнийсодержащие производные полиолов, катализ, вычислительная гидродинамика.

OPTIMIZATION OF EXPERIMENTAL INDUSTRIAL TECHNOLOGY OF SILICON-CONTAINING DERIVATIVES OF POLYOL SUBSTANCES PRODUCTION

A.A. Boyko[1], S.V. Mordanov[2], T.G. Khonina[1], O.N. Chupahin[1]

Abstract. The process of the synthesis of silicon-containing glycerol derivatives of $Si(C_3H_7O_3)_4 \cdot 6C_3H_8O_3$ composition was optimized on the example of creation of the experimental industrial technology of the drug substance «Silativit» production. The main criterion of optimization was reducing a time and energy expenditure on carrying out the synthesis, representing heterophase reaction of alcoholysis of initial alkoxysilane by polyol. Optimization was performed on such indicators of process as temperature condition, the mode of removal of an easily volatile product of reaction, the mode of mixture of reactionary weight and type of the used mixing device.

Keywords: transesterification of silanes, silicon derivatives of polyols, catalysis, computational hydrodynamics.

1 – ФГБУН Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, 620137, Россия, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской, д. 22 / ул. Академическая, д. 20

2 – Химико-технологический институт Уральского федерального университета, кафедра «Машины и аппараты химических производств», 620078, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 28

1 – I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis of Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, b. 22, Sophia Kovalevskaya str. / b. 20, Academicheskaya str., Ekaterinburg, 620137, Russia

2 – Chemical Engineering Institute of the Ural Federal University, Department of «Machinery and equipment of chemical plants», b. 28, Mira str., Ekaterinburg, 620078, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: aaboyko@list.ru
Тел.: 8 (343) 362 34 85

ВВЕДЕНИЕ

За последние десять лет в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН была разработана серия биологически активных элементсодержащих производных полиолов и мягких лекарственных форм на их основе. Наиболее широко изучены и апробированы кремнийсодержащие производные полиолов. Прежде всего это относится к глицеролатам кремния в избытке глицерина состава $Si(O_3C_3H_7)_4 \cdot 6C_3H_8O_3$, являющимся ключевым полупродуктом в производстве лекарственного средства «Силативит». Глицеролаты указанного состава обладают репаративным, регенерирующим, транскутанным и противовоспалительным действием и могут использоваться в качестве биологически активной гидрофильной основы для целого ряда мягких лекарственных форм: от классических лекарственных гелей и линиментов до суппозиториев и трансдермальных терапевтических систем [1].

Ключевым условием успешного внедрения мягких лекарственных форм в медицинскую практику наряду с высокой терапевтической эффективностью является их конкурентоспособная цена, которая напрямую зависит от стоимости используемых при её производстве субстанций.

В основе синтеза глицеролатов кремния состава $Si(O_3C_3H_7)_4 \cdot 6C_3H_8O_3$ лежит обратимая реакция переэтерификации двух несмешивающихся между собой жидкостей – исходного тетраэтоксисилана многоатомным спиртом глицерином [2]. Данная реакция протекает в избытке глицерина по следующему уравнению:

$$Si(OEt)_4 + 10C_3H_8O_3 \leftrightarrow$$
$$\leftrightarrow Si(O_3C_3H_7)_4 \cdot 6C_3H_8O_3 + 4EtOH \uparrow \quad (1)$$

Указанный процесс на этапе лабораторного синтеза был оптимизирован по таким параметрам, как выбор оптимального температурного режима проведения реакции (110 °С); определение оптимального избытка глицерина для проведения переэтерификации (4-мольный избыток глицерина в процессе переэтерификации с последующим добавлением 2 молей глицерина к продукту); выбор оптимального катализатора [$Ti(OBu)_4$] [3].

На этапе масштабирования процесса в условиях опытно-промышленного производства ввиду изменения геометрии и объёма используемого оборудования возникла необходимость решения следующих задач:

– выбор типа перемешивающего устройства;

– выбор режима (скорости) смешения реакционной массы;

– определение режима удаления образующегося этилового спирта.

Таким образом, целью данной работы явилась оптимизация опытно-промышленной технологии синтеза глицеролатов кремния состава $Si(O_3C_3H_7)_4 \cdot 6C_3H_8O_3$ по критерию сокращения временных и энергетических затрат.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опытно-промышленный синтез глицеролатов кремния состава $Si(O_3C_3H_7)_4 \cdot 6C_3H_8O_3$ осуществляли на производственном участке технологической лаборатории Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН.

Используемое сырьё

– Тетраэтоксисилан (ч.д.а., ТУ 6-09-11-2153-94);

– глицерин (ос.ч., ГОСТ 6259-75);

– предварительно очищенный перегонкой в вакууме тетрабутоксититан (тех., ТУ 6-09-2738-89).

Используемое оборудование

Синтез проводили на универсальном синтетическом комплексе Minipilot 10 (BuchiGlassUster, Швейцария), имеющем следующие характеристики:

– материал в контакте со средой: боросиликатное стекло 3.3, PFA, PTFE, PEEK;

– рабочий объём реактора: 10 литров. Реактор оборудован рубашкой, термопарой Pt100, донным сливом, верхнеприводным перемешивающим устройством с возможностью регулирования скорости вращения вала перемешиваюшего устройства, сменным комплектом перемешивающих элементов;

– обвязка реактора: мерная градуированная ёмкость объёмом 1 л, загрузочные люки и штуцеры на крышке реактора, система охлаждения паров легколетучих веществ и сбора конденсата.

Удаление остаточного количества этилового спирта из реакционной массы проводили на тонкоплёночном испарителе TFE50-04J (Asahi, Япония). Для обогрева и охлаждения реактора и тонкоплёночного испарителя использовались циркуляционные термостаты FPW55-SL-150C (Julabo, Германия).

Описание процесса синтеза

Проводили шесть различных опытно-промышленных синтезов в трёх повторениях каждый. Общим для всех синтезов являлось одинаковое мольное (1 моль $Si(OEt)_4$ / 8 моль $C_3H_8O_3$) и массовое (1,96 кг $Si(OEt)_4$ / 6,73 кг $C_3H_8O_3$) соотношение исходных компонентов, температура реакционной массы 110±2 °С и использование в качестве катализатора реакции переэтерификации тетрабутоксититана $Ti(OBu)_4$ в мольном соотношении 0,06 моль $Ti(OBu)_4$ / 1 моль исходного алкоксисилана. Различия касались типа перемешивающего устройства (пропеллер или якорь) и скорости вращения вала перемешивающего устройства (240, 300, 400 об/мин).

Нижняя выбранная граница скорости вращения вала 240 об/мин обусловлена тем, что при этой скорости применительно к использованному оборудованию достигалось полное и равномерное диспергирование исходных реагентов, тетраэтоксисилана и глицерина, которые являются жидкостями. Верхняя выбранная граница скорости вращения вала 400 об/мин была определена экспериментально и обусловлена тем, что при большей скорости вращения вала происходило чрезмерное разбрызгивание реакционной массы и создавалась дополнительная нагрузка на вал перемешивающего устройства.

Синтез глицеролатов кремния состава $Si(O_3C_3H_7)_4 \cdot 6C_3H_8O_3$ проводили по следующей схеме:

– внесение в реактор глицерина, установление скорости вращения вала перемешивающего устройства 50±5 об/мин;

– внесение в реактор смеси тетраэтоксисилана с катализатором со скоростью 20–25 мл/мин (общее время внесения смеси 1,5–2,0 ч);

– постепенный нагрев реакционной массы до температуры 110±2 °С и увеличение скорости вала перемешивающего устройства до заданных параметров;

– выдержка реакционной массы при температуре 110±2 °С и активном перемешивании, удаление образующегося этилового спирта путем отгонки при атмосферном давлении;

– после удаления большей части теоретического объема этилового спирта при атмосферном давлении охлаждение реакционной массы до 60 °С и удаление остатка этилового спирта на тонкоплёночном испарителе.

Учёт отогнанного этилового спирта вели количественно. Общее время проведения процесса определяли по времени завершения удаления этилового спирта.

Контроль качества глицеролатов кремния состава $Si(O_3C_3H_7)_4 \cdot 6C_3H_8O_3$ проводили по таким показателям качества, как элементный состав, совпадение полос поглощения ИК-спектра образца с полосами поглощения на ИК-спектре стандартного образца, показателю преломления.

Моделирование процесса смешения реакционной массы

Выбор наиболее эффективного типа перемешивающего устройства и режима смешения реакционной массы проводили с применением методов и средств вычислительной гидродинамики, основным приложением которых является описание механики сплошных сред. Моделирование с использованием методов и средств вычислительной гидродинамики широко распространено в зарубежной практике проектирования и модернизации технологического оборудования, так как позволяет при относительно малых материальных и временных затратах определить оптимальные параметры конструкции и гидродинамические режимы работы химических реакторов. В частности, опыт расчета оптимальных геометрических параметров и технологических режимов работы химических реакторов и массообменного оборудования методами такого моделирования представлен в работах [4–8].

Для моделирования процесса перемешивания реакционной массы использовали применяемое в вычислительной гидродинамике программное обеспечение ANSYS Fluent (ver. 14.5), ANSYS Inc., США, в основе которого лежит описание модели смеси [9, 10].

Данная модель представляет собой уравнения Навье – Стокса с усредненными по объемным долям компонентов смеси плотностью, вязкостью и скоростью. Усреднение свойств многокомпонентного потока проводится следующим образом:

$$\rho_m = \sum_{\varphi=1}^{n} \alpha_\varphi \rho_\varphi , \quad (2)$$

$$\mu_m = \sum_{\varphi=1}^{n} \alpha_\varphi \mu_\varphi , \quad (3)$$

$$\vec{u}_m = \frac{\sum_{\varphi=1}^{n} \alpha_\varphi \rho_\varphi \vec{u}_\varphi}{\rho_m}, \quad (4)$$

где ρ – плотность, кг/м^3; μ – вязкость, Па · с; α – объемная доля; *u* – скорость течения, м/с; *m* – индекс величин, усредненных по объемным долям компонентов дисперсной системы; φ – индекс величин, относящихся к компоненту дисперсной системы (глицерину или тетраэтоксисилану).

Уравнение неразрывности для модели смеси из *n* компонентов имеет при этом следующий вид:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho_m) + div(\rho_m \vec{u}_m) = \dot{m}, \quad (5)$$

$$\sum_{\varphi=1}^{n} \alpha_\varphi = 1, , \quad (6)$$

где $\dot{m}$ – поток массы (расход), кг/(м^3 · с).

Уравнение сохранения импульса (количества движения) вдоль декартовой оси *i* для смеси может быть получено как сумма уравнений для всех фаз [9, 10]:

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho_m u_{mi}) + \left[(\rho_m u_{mj}) \frac{\partial u_{mi}}{\partial x_j} - \sum_{\varphi=1}^{n} (\alpha_\varphi \rho_\varphi u_{dr_j \varphi}) \frac{\partial u_{dr_i \varphi}}{\partial x_j} \right] =$$

$$= -\frac{dp}{dx_i} + \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\mu_m \left(\frac{\partial u_{mj}}{\partial x_i} + \frac{\partial u_{mi}}{\partial x_j} - \frac{2}{3} \delta_{ij} \frac{\partial u_{mi}}{\partial x_i} \right) \right] +$$

$$+ \rho_m g_i + S_{mi} , \quad (7)$$

$$u_{dr\varphi i} = u_{\varphi i} - u_{mi} , \quad (8)$$

где *i*, *j* – индексы продольного и поперечного направлений течения; *t* – время, с; *x* – координата, м; δ_{ij} – метрический тензор в декартовых координатах; *g* – ускорение силы тяжести, м/с^2; S_m – источник количества движения, Н/м^3.

Для моделирования турбулентных пульсаций технологических потоков в аппаратном комплексе программного обеспечения применяется стандартная *k*-ε-модель турбулентности Лаундера и Сполдинга [11–14]. При использовании *k*-ε-модели система уравнений Навье – Стокса дополняется двумя уравнениями переноса (9, 10) удельной турбулентной кинетической энергии *k*, Дж/кг (м^2/с^2), и диссипации данной энергии ε, Дж/(кг·с) (м^2/с^3).

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho_m k) + \frac{\partial}{\partial x_i}(\rho_m k u_{mi}) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu_m + \frac{\mu_t}{\sigma_k} \right) \frac{\partial k}{\partial x_j} \right] +$$

$$+ G_k + G_b - \rho_m \varepsilon, \quad (9)$$

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho_m \varepsilon) + \frac{\partial}{\partial x_i}(\rho_m \varepsilon u_{mi}) =$$

$$= \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu_m + \frac{\mu_t}{\sigma_\varepsilon} \right) \frac{\partial \varepsilon}{\partial x_j} \right] + C_{1\varepsilon} (G_k + C_{3\varepsilon} G_b) - C_{2\varepsilon} \rho_m \frac{\varepsilon^2}{k}, \quad (10)$$

где

$$G_k = \mu_t S^2, \quad (11)$$

$$G_b = -\frac{1}{\rho_m}\left(\frac{\partial \rho_m}{\partial T}\right)_p g_i \frac{\mu_t}{Pr_t}\frac{\partial T}{\partial x_i}, \quad (12)$$

$$S \equiv \sqrt{2S_{ij}S_{ij}}, \quad (13)$$

$$S_{ij} = \frac{1}{2}\left(\frac{\partial u_{mj}}{\partial x_i} + \frac{\partial u_{mi}}{\partial x_j}\right), \quad (14)$$

$$\mu_t = \rho_m C_\mu \frac{k^2}{\varepsilon}. \quad (15)$$

Значения модельных констант для расчетов при помощи программного обеспечения ANSYS Fluent принимались по данным Маршалл и Баккера [11]:

$C_{1\varepsilon}$=1,44, $C_{2\varepsilon}$=1,92, $C_{3\varepsilon}$=0,09, σ_k=1,0, σ_ε=1,3, Pr_t=0,85.

Также проводили модельный расчет полезной мощности перемешивания, классическое инженерное решение которого связано с использованием чисто эмпирических данных. Для снижения зависимости от эмпирических данных и расчета мощности перемешивания на основе результатов численного моделирования по уравнениям (2–15) использовали методику [12]. В соответствии с методикой [12] расчет полезной мощности перемешивания *N* проводился путем интегрирования полученных в результате численного моделирования значений удельного крутящего момента по рабочей поверхности перемешивающего устройства:

$$N = \frac{2\pi n}{60}\int_0^S \frac{\rho_{mi} u_{mi}^2}{2}\sqrt{x_i^2 + y_i^2}\, dS, \quad (16)$$

где *x*, *y* – координаты поверхности мешалки относительно оси вращения вала, м; *n* – частота вращения вала мешалки, об/мин.

Для оценки эффективности перемешивания использовали значение абсолютной неусредненности плотности реакционной массы Δρ, кг/м^3:

$$\Delta\rho = \rho_{max} - \rho_{min}, \quad (17)$$

где ρ_{max}, ρ_{min} – соответственно максимальная и минимальная плотности реакционной смеси во всем расчетном объеме реактора, кг/м^3.

Использование в качестве критерия оценки абсолютной неусредненности плотности реакционной массы в данном случае было оправданно, так как плотности исходных реагентов, глицерина и тетраэтоксисилана, отличались в 1,35 раза (330 кг/м^3 в абсолютном выражении при плотности глицерина 1260 кг/м^3 и плотности тетераэтоксисилана 930 кг/м^3).

Энергетическая эффективность процесса оценивалась по совокупности времени усреднения плотности реакционной смеси и значению крутящего момента на валу мешалки. Расчет для всех рассмотренных вариантов проводился до получения установившейся картины распределения фаз в объеме перемешивания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведения экспериментальных опытно-промышленных синтезов глицеролатов кремния состава $Si(O_3C_3H_7)_4 \cdot 6C_3H_8O_3$ были получены следующие результаты.

Таблица 1.

Время проведения опытно-промышленного синтеза глицеролатов кремния, ч

Тип перемешивающего устройства	Скорость вращения вала перемешивающего устройства		
	240 об/мин	300 об/мин	400 об/мин
Пропеллер	42	42	42
Якорь	8	8	8

Экспериментальные данные указывают на то, что применительно к рассматриваемому синтезу использование якорного типа перемешивающего устройства взамен пропеллерного позволяет сократить общее время проведения процесса с 42 до 8 часов. При этом достаточной скоростью перемешивания реакционной массы является значение 240 об/мин. Увеличение скорости перемешивания до 400 об/мин не оказало никакого влияния на скорость проведения синтеза. С учетом того, что исходные компоненты реакционной смеси являются несмешивающимися в нормальных условиях между собой жидкостями, ключевым фактором, обеспечивающим протекание реакции, является обеспечение полного и равномерного диспергирования компонентов реакционной массы

Экспериментальным путем также удалось установить, что применительно к используемой системе оборудования целесообразно удаление 70% образующегося этилового спирта проводить при атмосферном давлении. Оставшиеся 30% образующегося этилового спирта возможно удалять на тонкоплёночном испарителе.

Поскольку проведение реальных опытно-промышленных синтезов предполагает значительные финансовые и временные затраты, с применением программного обеспечения ANSYS Fluent было проведено моделирование процесса смешения компонентов реакционной смеси. В модели была рассмотрена задача смешения исходных реагентов, тетраэтоксисилана (плотностью 930 кг/м^3, вязкостью $7 \cdot 10^{-4}$ Па · с) и глицерина (плотностью 1260 кг/м^3, вязкостью

0,945 Па · с), в мольном соотношении 1 к 8. Изменения характеристик компонентов реакционной массы с учетом их нагрева и изменения количественного соотношения в ходе протекания реакции не учитывались. При этом в модели процесса в начальный момент времени перемешивания тяжелая фаза (глицерин) находилась на дне аппарата.

Геометрические размеры реактора, его внутренних элементов, перемешивающих устройств измерялись фактически по реальным габаритам и далее учитывались в программном обеспечении при обработке данных. Эффекты деформации поверхности реакционной массы, связанные с образованием центральной воронки при перемешивании, не учитывались. Геометрическая модель для обоих рассмотренных вариантов конструкции перемешивающего устройства представлена на рисунке 1.

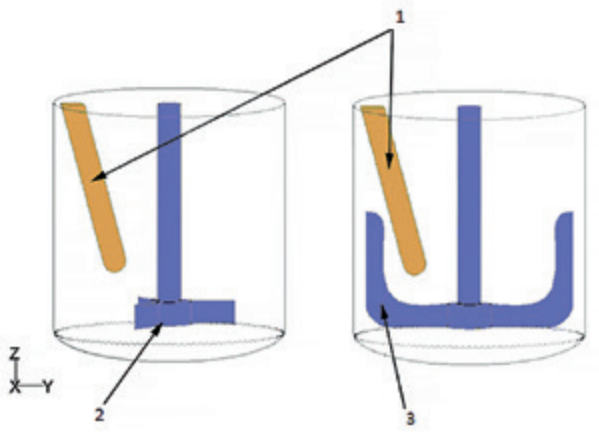


Рисунок 1. Геометрическая модель реактора Minipilot 10:

1 – гильза термопары; 2 – пропеллерная мешалка; 3 – якорная мешалка

Для обоих вариантов конструкции перемешивающего устройства были рассмотрены скоростные режимы работы 240, 300, 400 об/мин. Скоростные режимы были приняты с учетом рекомендаций справочной литературы [13].

При выборе конструкции и режима работы перемешивающего устройства необходимо было достичь выполнения следующих условий:

1. Максимально полного увеличения той доли объема реактора, в которой смешение компонентов протекает наиболее интенсивно.
2. интенсификации циркуляции исходных реагентов, то есть обеспечения их равномерного распределения по реакционной зоне.
3. обеспечения эффективного смещения химического равновесия реакции в сторону целевого продукта за счет усиления осевой циркуляции компонентов реакционной среды в реакторе, в итоге приводящей к ускорению отвода легколетучих продуктов реакции (паров этилового спирта) из реакционной зоны.
4. Снижения удельного энергопотребления как за счет снижения затрат мощности на перемешивание, так и за счет снижения продолжительности синтеза. При достижении данного условия также снижаются и расходы на поддержание температуры теплоносителя, подаваемого в рубашку реактора.

Таким образом, выбор конструкции и режима работы перемешивающего устройства должен был обеспечить максимальную полноту протекания реакции при минимальном времени синтеза и минимальных энергетических затратах.

Корректный выбор режима работы перемешивающего устройства для опытно-промышленного реактора осложнялся его относительно небольшими габаритами. Классическая справочная литература по перемешиванию [14] ориентирована в первую очередь на промышленные реакторы, объём которых не менее 0,16 м^3. Аналитическое масштабирование процессов перемешивания в таких случаях крайне затруднительно, так как процессы перемешивания не поддаются корректному описанию методами теории подобия [15]. Классические инженерные методики расчета механических перемешивающих устройств оперируют чисто эмпирическими коэффициентами и статистическими зависимостями, действующими зачастую в достаточно узких диапазонах.

Использование методов и средств вычислительной гидродинамики позволило решить задачу с максимальным приближением к реальной геометрии оборудования, то есть в данном случае удалось уйти от необходимости использования экспериментальных масштабных факторов и коэффициентов.

Путем обработки исходных данных о компонентах реакционной смеси и моделирования процесса смешения были получены расчетные значения, коррелирующие с результатами практических экспериментов.

На рисунках 2 и 3, полученных в результате обработки данных с использованием программного обеспечения ANSYS FLUENT, показаны линии течения реакционной массы для скорости вращения вала перемешивающего устройства 240 об/мин. На модельных рисунках четко видна та область реактора, где смешение компонентов осуществляется наиболее интенсивно.

Для пропеллерной мешалки (рисунок 2) область интенсивного перемешивания занимает лишь малую часть объема реактора, при этом осевое перемешивание крайне слабое. Фактически можно говорить о том, что при использовании пропеллерной мешалки

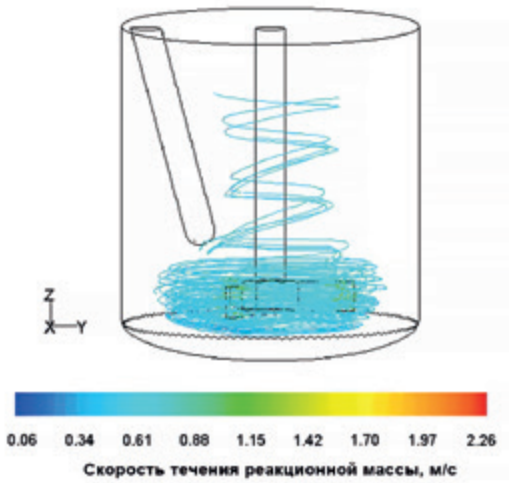


Рисунок 2. Линии течения реакционной массы в аппарате с пропеллерной мешалкой при скорости 240 об/мин

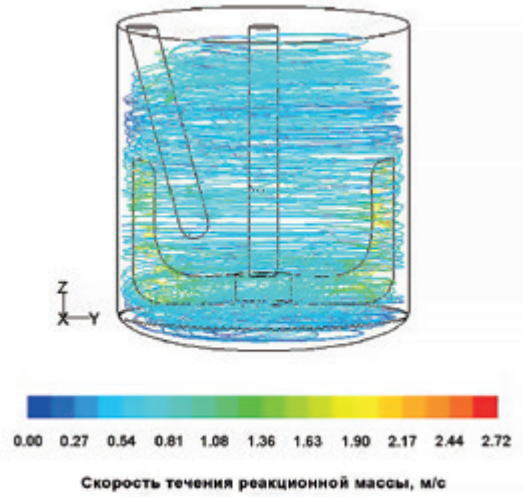


Рисунок 3. Линии течения реакционной массы в аппарате с якорной мешалкой при скорости 240 об/мин

реакция протекает только в 1/8–1/10 объема реактора. Остальной объем представляет собой застойную зону.

Для якорной мешалки наблюдается качественно иная картина движения компонентов реакционной смеси (рисунок 3). В этом случае интенсивное перемешивание происходит практически во всем объеме реактора как в радиальном, так и в осевом направлении.

Также стоит отметить тот факт, что в описываемой модели в реакторе с якорной мешалкой практически полное усреднение плотности реакционной массы ($\Delta\rho$ = 6 кг/м^3) наступало за 15–20 мин перемешивания. Через час перемешивания в аппарате с якорной мешалкой неусредненность плотности реакционной массы практически достигла нуля. В то же время в реакторе с пропеллерной мешалкой усреднения плотности реакционной массы за весь рассмотренный в модели временной интервал так и не наступило. Через 60 мин перемешивания максимальная неусредненность плотности составила около 180 кг/м^3.

На рисунках 4 и 5 представлена динамика снижения неусредненности плотности реакционной массы в аппаратах с пропеллерной и якорной мешалками при скорости вращения 240 об/мин.

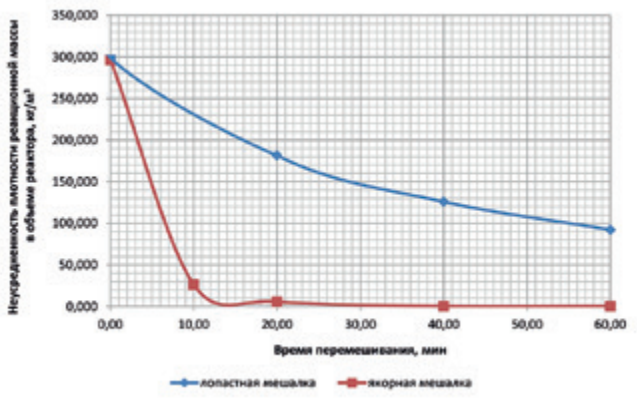


Рисунок 4. Динамика снижения расчетной неусредненности плотности реакционной массы при скорости 240 об/мин

Расчетная мощность, затрачиваемая на перемешивание якорной мешалкой, на рассмотренном временном интервале выше потребляемой мощности для пропеллерной мешалки в среднем в 4,9 раза. Однако с учетом продолжительности смешения полные затраты электроэнергии на смешение 1 кг реакционной смеси в случае применения якорной мешалки будут ниже, чем при применении пропеллерной мешалки, примерно в 1,2 раза.

Увеличение при моделировании скорости вращения вала перемешивающего устройства при существенном росте энергетических затрат на перемешивание не показало существенного ускорения снижения неусредненности реакционной смеси. Кроме того, дальнейшее повышение скорости связано с риском развития центральной воронки до состояния, которое может негативно сказаться на устойчивости вала мешалки. В связи с этим для дальнейших экспериментальных синтезов подобных смесей может быть рекомендован скоростной режим работы перемешивающего устройства 240 об/мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные работы по моделированию и оптимизации синтеза глицеролатов кремния состава $Si(O_3C_3H_7)_4 \cdot 6C_3H_8O_3$ позволили установить оптимальные параметры проведения опытно-промышленного синтеза:

– температура реакционной массы – 110±2 °С;

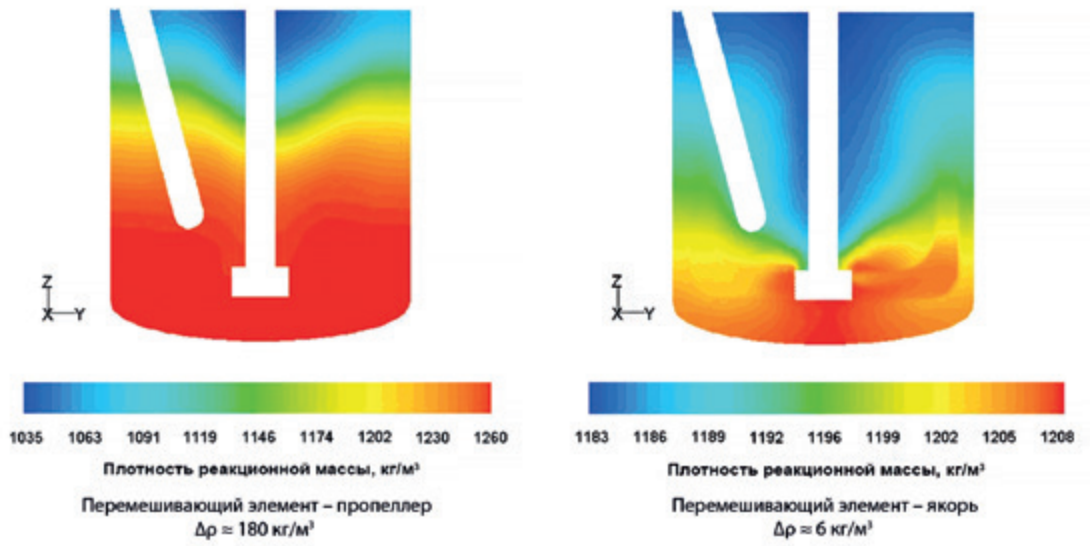


Рисунок 5. Изменение максимального различия плотностей в объёме перемешивания при скорости 240 об/мин

– удаление образующегося этилового спирта по следующей схеме: 70% от теоретического объёма образующегося спирта удалять при атмосферном давлении, оставшиеся 30% удалять из реакционной массы путём её передачи на тонкоплёночный испаритель при остаточном давлении в системе порядка 50 мм рт. ст.;

– режим смешения реакционной массы при скорости вращения вала перемешивающего устройства 240 об/мин, перемешивающий элемент типа «якорь».

Применение современных программ, базирующихся на методах и средствах вычислительной гидродинамики, значительно сокращает временные и трудовые затраты при выборе конструкции и режима работы перемешивающих устройств. Полученные результаты коррелируют с экспериментальными данными и подтверждают пригодность данного подхода к моделированию процесса производства субстанций кремнийсодержащих производных полиолов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т.Г. Бояковская, Т.Г. Хонина, Л.П. Ларионов, Е.В. Филиппова, Е.В. Шадрина. Кремнийорганический глицерогидрогель как новая основа лекарственных и косметических средств // Новые материалы для медицины: кол. монография / НИСО УрО РАН. – Екатеринбург, 2006. С. 108–134.
2. Т.Г. Хонина, О.Н. Чупахин, Л.П. Ларионов, Т.Г Бояковская, А.Л. Суворов, Е.В. Шадрина. Синтез, токсичность и трансдермальная проницаемость глицератов кремния и гидрогелей на их основе // Химико-фармацевтический журнал. 2008. № 11. С. 5–9.
3. А.А. Бойко, С.В. Морданов, Т.Г. Хонина, О.Н. Чупахин. Технологические аспекты производства субстанций кремнийсодержащих производных полиолов // Всероссийская конференция «Органический синтез: химия и технология». Екатеринбург. 2012. У6.
4. M. Ahsan. Computational fluid dynamics (CFD) prediction of mass fraction profiles of gas oil and gasoline in fluid catalytic cracking (FCC) riser // Ain Shams Engineering Journal. 2012. № 3. P. 403–409.
5. J.-Z. Luo, Y. Luo, G.-W. Chu, M. Arowo, Y. Xiang, B.-C. Sun, J.-F. Chen. Micromixing efficiency of a novel helical tube reactor: CFD prediction and experimental characterization // Chemical Engineering Science. 2016. № 155. P. 386–396.
6. C. Abagnale, M.C. Cameretti, R. De Robbio, R. Tuccillo. CFD Study of a MGT Combustor supplied with Syngas // Energy Procedia. 2016. № 101. P. 933–940.
7. L. Khamar, K. Samrane. The use of the CFD for the hydrodynamic flow diagnostic and study in a Phosphoric Acid Reactor // Procedia Engineering. 2016. № 138. P. 369–377.
8. J. van Walsem, S.W. Verbruggen, B. Modde, S. Lenaerts, S. Denys. CFD investigation of a multi-tube photocatalytic reactor in non-steadystate conditions // Chemical Engineering Journal. 2016. № 304. P. 808–816.
9. M. Manninen, V. Taivassalo. On the mixture model for multiphase flow. – Espoo: Technical research center of Finland. VTT Publications. 1996. P. 67.
10. H.A. Jacobsen. Chemical Reactor Modeling: multiphase reactive flows. – Berlin: Springer, 2008. P. 1244.
11. E.M. Marshall, A. Bakker. Computational Fluid Mixing. – Lebanon: Fluent Inc., 2003. P. 154.
12. С.В. Морданов, С.Н. Сыромятников, А.П. Хомяков. Методика определения полезной мощности привода механического перемешивающего устройства // Сборник научных трудов «Информационная школа молодого ученого». – Екатеринбург. Уральский центр академического обслуживания. 2011. С. 228–237.
13. А.А. Лащинский, А.Р. Толчинский. Основы конструирования и расчета химической аппаратуры. – Л.: Машиностроение, 1970. С. 752.
14. Ф. Стренк. Перемешивание и аппараты с мешалками. – Л.: Химия, 1975. С. 384.
15. З. Штербачек, П. Туаск. Перемешивание в химической промышленности. – Л.: ГХИ, 1963. С. 416.

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 615.451.22

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА В ПЕРОРАЛЬНЫХ СУСПЕНЗИЯХ

В.В. Верниковский[1]*, Е.В. Третьякова[2]

Резюме. В работе рассмотрены подходы к классификации и выделению групп вспомогательных веществ в пероральных суспензиях как отечественных, так и зарубежных авторов. Приводится ряд существующих классификаций вспомогательных веществ пероральных суспензий. Проведен анализ составов пероральных суспензий, зарегистрированных на фармацевтическом рынке России, для оценки ассортимента вспомогательных веществ, наиболее актуальных в настоящее время. Проведен учет частоты применения конкретных вспомогательных веществ, а также, при возможности, используемые концентрации.

Ключевые слова: вспомогательные вещества, пероральные суспензии, жидкие лекарственные формы.

EXCIPIENTS IN ORAL SUSPENSIONS

V.V. Vernikovsky[1]*, E.V. Tretyakova[2]

Abstract. The article describes the approaches to classification and separation of groups of excipients in oral suspensions of both domestic and foreign authors. A number of existing classifications of excipients for oral suspensions are presented. The analysis of formulations of oral suspensions that are registered on the pharmaceutical market of Russia to assess the range of excipients the most relevant at the present time. Evaluations of the frequency of use of specific excipients are carried out and, if possible, the concentrations used.

Keywords: excipients, oral suspension, liquid dosage forms.

1 – Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России», 357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

2 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

1 – Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of the Volgograd state medical university Russian Ministry of Health, 11, Kalinina av., Pyatigorsk, 357532, Russia

2 – RUDN University, 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: v.v.vernikovsky@mail.ru
Тел.: 8 (918) 747 89 61

ВВЕДЕНИЕ

Эволюцию подходов к конструированию пероральных суспензий можно проследить по изменениям классификации вспомогательных веществ, используемых в их составе. Наиболее полно этот вопрос раскрывается в основополагающих учебных и научных изданиях, посвящённых технологии лекарственных форм. Так, И.А. Муравьёв [1] указывает, что в состав суспензий, помимо действующего вещества и дисперсионной среды, в ряде случаев необходимо включать стабилизаторы агрегативной и седиментационной устойчивости, в качестве которых рекомендуется использовать электролиты и высокомолекулярные соединения, обладающие поверхностно-активными свойствами. Несколько иной подход к роли, выполняемой вспомогательными веществами, предлагается В.Н. Большаковым, включающим в состав суспензий стабилизаторы-загустители и стабилизаторы-эмульгаторы, выделенные в отдельные группы [2]. Более поздние работы также расширяют круг вспомогательных веществ, включаемых в состав суспензий. Так, Я.А. Егорова и Л.Н. Хохлова [3], кроме стабилизаторов-загустителей и стабилизаторов-эмульгаторов, включают в состав суспензий также антиоксиданты и консерванты (рисунок 1). В работе Н.В. Меньшутиной и соавт. [4] рассмотрение используемых в суспензиях вспомогательных веществ также сводится к характеристике стабилизирующего действия высокомолекулярных соединений и поверхностно-активных веществ.

Следует отметить, что отечественные источники в области фармацевтических суспензий основное внимание уделяют вопросам стабильности получаемых дисперсных систем. При этом акценты смещаются либо на получение частиц необходимой степени дисперсности, либо чаще всего на чисто теоретические аспекты стабильности суспензий. Вопросы корригирования получаемой лекарственной формы, её микробиологической и химической стабильности, а также вспомогательные вещества, применение которых обеспечивает указанные аспекты, в отечественных источниках, к сожалению, как правило, не рассматриваются. Однако в Государственной фармакопее XIII издания указывается, что в состав суспензий в качестве вспомогательных веществ могут включаться буферные растворы, стабилизаторы (вещества, повышающие вязкость дисперсионной среды, поверхностно-активные вещества и др.), корригенты, консерванты, антиоксиданты, красители и другие, разрешенные к медицинскому применению вещества [5]. Таким

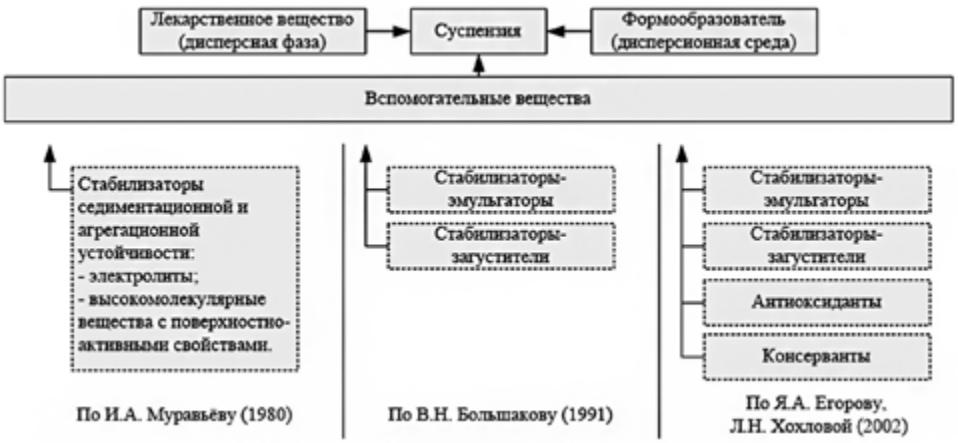


Рисунок 1. **Вспомогательные вещества в фармацевтических суспензиях (по данным отечественных авторов)**

образом, возникает дисбаланс между достаточно широким кругом разрешённых для введения в состав лекарственных суспензий вспомогательных веществ и относительно узким перечнем этих веществ, описываемых в отечественной фармацевтической литературе применительно к лекарственной форме суспензии.

Зарубежные источники значительно более полно освещают виды вспомогательных веществ, используемых в составе фармацевтических суспензий (рисунки 2 и 3).

Классификация V. Gallardo с соавт. [6] основана на целевом назначении вводимых в состав суспензии вспомогательных веществ: способствующие смачиванию поверхности частиц лекарственного вещества; соединения, предотвращающие агрегацию и седиментацию частиц и т.д.

Как видно из приведённой на рисунке 3 схемы, классификация S.K. Niazi [7, 8] является смешанной: в качестве классификационного показателя выступают и назначение использования вспомогательных



Рисунок 2. **Классификация вспомогательных веществ, используемых в составах фармацевтических суспензий (по V. Gallardo с соавт., 2000)**



Рисунок 3. **Классификация вспомогательных веществ, используемых в составах фармацевтических суспензий (по S.K. Niazi, 2004)**

веществ (регуляторы pH, красители и др.), и их физико-химические свойства (гидроколлоиды и др.), и химическое строение (многоатомные спирты).

Альтернативная классификация, приведённая в работе R.C. Moreton [9], разделяет вспомогательные вещества пероральных суспензий на следующие группы (рисунок 4). Данная классификация составлена преимущественно исходя из роли тех или иных вспомогательных веществ в составе суспензий, однако в ней в числе прочих выделены группы «минеральные глины» и «водорастворимые гидроколлоиды», объединяющие вещества минерального, растительного или синтетического происхождения, основной целью использования которых является повышение вязкости композиции.

Следует отметить, что зарубежные классификации вспомогательных веществ значительно более подробны и включают практически весь спектр вспомогательных веществ, используемых в современной технологии суспензионных лекарственных препаратов.

Таким образом, целью настоящей работы явилось обобщение и систематизация данных о современных вспомогательных веществах, используемых в актуальных составах пероральных суспензий.

АНАЛИЗ СОСТАВОВ ПЕРОРАЛЬНЫХ СУСПЕНЗИЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА РОССИЙСКОМ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ РЫНКЕ

В качестве источника сведений о вспомогательных веществах, используемых в составах пероральных суспензий, представленных на фармацевтическом рынке России, использовались инструкции к лекарственным препаратам, внесённым в электронную версию Государственного реестра лекарственных средств [10], содержащие в ряде случаев также указания на количественные соотношения компонентов. Опираясь на данные сведения, были проанализированы составы 51 суспензии для приема внутрь, позволившие классифицировать и описать следующие группы вспомогательных веществ.

Модификаторы вязкости (загустители) используются для повышения стабильности дисперсной системы путем повышения вязкости дисперсионной среды в соответствии с законом Стокса [4]. В составе этой группы можно выделить вещества синтетического, полусинтетического и природного происхождения, являющиеся растительными полисахаридами.

В качестве модификаторов вязкости в пероральных суспензиях в настоящее время используются глинистые минералы, камеди, производные целлюлозы, а также карбополы, высокомолекулярный макрогол и повидон (таблица 1).

Таблица 1.

Модификаторы вязкости, используемые в составах суспензий для приёма внутрь (ГРЛС)

Наименование	Частота упоминания в составах
Глинистые минералы	
Бентонит	1
Магния алюмосиликат (вээгум)	5
Камеди	
Камедь акации	1
Камедь гуаровая (гуаровая смола)	1
Камедь ксантановая (камедь ксантамовая, ксантановая смола)	14
Карбомер (карбомер 974Р)	7
Макрогол-4000 (ПЭО-4000)	1
Повидон	3
Производные целлюлозы	
Гидроксиэтилцеллюлоза (гиэтеллоза)	5
Гидроксипропилметилцеллюлоза (гипромеллоза, Е464)	
Метилгидроксипропилцеллюлоза	1
Гипромеллоза-4000	2
Гипромеллоза-15000	1
Метилцеллюлоза	1
Натрий-КМЦ (кармеллоза, кармеллоза натрия)	7
Оксипропилметилцеллюлоза	1

В 35% составов пероральных суспензий для повышения вязкости вводят производные целлюлозы, причем наиболее популярным среди них является традиционное и хорошо известное в отечественной фармацевтической практике вещество – натриевая



Рисунок 4. Классификация вспомогательных веществ, используемых в составах фармацевтических суспензий (по R.C. Moreton, 2010)

соль карбоксиметилцеллюлозы, упоминаемая в составах под названием «кармеллоза натрия» и используемая в 13,7% изученных составов. Следующим по востребованности производным целлюлозы является гидроксиэтилцеллюлоза (гиэтеллоза, ГЭЦ), упоминаемая в 9,8% составов, гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) используется в 7,8% изученных суспензий, а такие производные, как метилцеллюлоза и оксипропилметилцеллюлоза востребованы как загустители пероральных суспензий в значительно меньшей степени (упоминаются примерно в 2% суспензий). Что касается используемых концентраций, то согласно представленным в инструкциях к лекарственным препаратам сведениям ГЭЦ вводится в составы суспензий для внутреннего применения в количестве 0,1–0,3%, ГПМЦ – 0,3–1,0%, а натрий-КМЦ – около 1%.

Самым популярным модификатором вязкости в суспензиях для внутреннего применения является камедь ксантановая (27,5% изученных составов), однако другие модификаторы вязкости группы камедей – гуаровая камедь и камедь акации – используются очень редко, всего в 2% составов. При этом ксантановая камедь использовалась в концентрации 0,3–0,6%, камедь акации упоминалась в составах в концентрации 1,5–6%.

Для повышения вязкости дисперсионной среды суспензий для внутреннего применения также используют глинистые минералы – магния алюмосиликат (вээгум) в концентрации 0,25–0,57% и значительно реже бентонит.

Также в составе пероральных суспензий достаточно широко применяются полимеры группы карбополов (карбомеров), например, карбомер 947P, однако их использование требует дополнительного введения в состав суспензии щелочных компонентов, чаще всего натрия гидроксида. Концентрация карбопола в рассмотренных составах суспензий находилась в диапазоне от 0,035% до 0,4%.

Повидон, представляющий собой линейный полимер 1-винил-2-пирролидона, упоминался в составах около 6% рассмотренных пероральных суспензий. Удалось обнаружить только единичное упоминание вводимого количества повидона – около 0,06%. Столь невысокая концентрация может объясняться тем, что повидон в малых концентрациях используется не столько для повышения вязкости, сколько в качестве так называемого полимерного адсорбционного стабилизатора (*polymeric adsorption stabilizer*). При этом молекулы повидона сорбируются на поверхности частиц суспендированного вещества и осуществляют стерическую стабилизацию суспензии, препятствуя слипанию частиц. Кроме того, в ряде случаев повидон может использоваться и для понижения вязкости, точнее, для улучшения текучести суспензий с большим количеством дисперсной фазы [9].

Высокомолекулярный полиэтиленоксид (макрогол 4000) используется для модификации вязкости в крайне небольшом числе (около 2%) рассмотренных составов суспензий для внутреннего применения.

Таким образом, по частоте использования в составах пероральных суспензий можно выстроить следующий ряд модификаторов вязкости: камедь ксантановая > карбомер = натрий-КМЦ > магния алюмосиликат = ГЭЦ > повидон > ГПМЦ > прочие.

Поверхностно-активные вещества, используемые в составах суспензий, в различных источниках могут носить названия **смачивающих агентов** (*wetting agents*) [6, 11] или **сурфактантов** (*surfactants*) [9]. В этой роли могут выступать как индивидуальные соединения, так и, реже, смеси сходных по химической природе веществ синтетического (полисорбаты, стеараты) или природного (аммония глицирризинат, лецитин) происхождения.

Таблица 2.

Поверхностно-активные вещества, используемые в составах суспензий для приёма внутрь (ГРЛС)

Наименование	Частота упоминания в составах
Аммония глицирризинат	1
Лецитин соевый	1
Макрогола глицерилгидроксистеарат (Кремофор RH40)	3
Макрогола-400 стеарат	1
Полисорбат-20 (Твин-20)	1
Полисорбат-80 (Твин-80)	17
Эфир полигликостеариловой кислоты	1

Безусловным лидером среди ПАВ, вводимых в составы суспензий для внутреннего применения, является полисорбат-80 (твин-80). Согласно проведённым исследованиям полисорбат-80 упоминался в более чем 30% рассмотренных составов. Указанные в доступных источниках используемые концентрации при этом укладывались в диапазон от 0,05% до 1%.

На втором месте по частоте использования (около 6% изученных составов) стоит производное макрогола – макрогола глицерилгидроксистеарат, также встречающийся под названием Кремофор RH40 (Cremophor RH40). Для стабилизации суспензии его вводили в концентрациях 0,2–1,14%.

Прочие поверхностно-активные вещества вводились в составы пероральных суспензий в единичных случаях. При этом использовались достаточно низкие концентрации: эфир полигликостеариловой кислоты – 0,01%, аммония глицирризинат и макрогола-400 стеарат – 0,1%, лецитин соевый – 0,25%.

Сорастворители – группа вспомогательных веществ, как и ПАВ, используемая для снижения поверхностного натяжения жидкой фазы и улучшения смачивания поверхности суспендированных частиц. В западной литературе упоминается также под названием «растворители» (*solvents*) [11].

Сорастворители вводились в 68% изученных составов, причём следует отметить, что при столь ши-

роком применении ассортимент используемых сорастворителей был весьма ограничен: в этом качестве в составах пероральных суспензий использовались всего 3 вещества (таблица 3).

Таблица 3.

Сорастворители, используемые в составах суспензий для приёма внутрь (ГРЛС)

Наименование	Частота упоминания в составах
Глицерин (глицерол)	20
Пропиленгликоль (Е1520)	10
Спирт этиловый 96%	5

Наиболее часто в пероральных суспензиях используется глицерин (39% исследованных составов). Пропиленгликоль использовался примерно в 20% составов пероральных суспензий, при этом вводимая концентрация колебалась от 0,12% до 2,5%. Наиболее редко в состав суспензий для внутреннего применения вводился спирт этиловый – всего в 10% составов, что может быть связано с ограничением круга возможных потребителей суспензии при введении в её состав спирта этилового. При этом концентрация спирта в суспензиях колебалась от 0,05% до 2%.

Группа **консервантов** традиционно включает в себя вещества, повышающие микробиологическую устойчивость лекарственной формы.

Как следует из данных, приведённых в таблице 4, перечень используемых в составах пероральных суспензий консервантов довольно обширен. Среди них можно выделить группы бензоатов, парагидроксибензоатов и сорбатов, а также несколько консервирующих веществ, не входящих в эти группы.

Наиболее часто в суспензиях для внутреннего применения использовались консерванты группы парагидроксибензоатов (парабенов). Безусловным лидером как внутри этой группы, так и среди всех использованных консервантов является метилпарагидроксибензоат (нипагин), немного уступает ему по частоте применения пропилпарагидроксибензоат (нипазол). Также в этой группе следует отметить достаточно экзотический консервант – натрия нипасепт (*Nipasept Sodium*), представляющий собой комбинацию натриевых солей нипагина, нипазола и этипарагидроксибензоата.

На втором месте по частоте применения располагаются консерванты группы бензоатов, включающей в себя бензоат натрия и собственно кислоту бензойную. Следует отметить, что если в случае бензоатов натриевая соль значительно более популярна, чем чистая кислота, то в случае сорбатов ситуация противоположная: сорбиновая кислота оказалась значительно популярнее, чем также используемая соль калия.

Прочие консерванты (бронопол, домифена бромид, натрия гипохлорит и хлоргексидина биглюконат) применяются в единичных случаях.

Таблица 4.

Консерванты, используемые в составах суспензий для приёма внутрь (ГРЛС)

Наименование	Частота упоминания в составах
Бензоаты	
Кислота бензойная	2
Натрия бензоат	9
Бронопол (2-бром-2-нитропропан-1,3-диол)	1
Домифена бромид	1
Натрия гипохлорит	1
Парагидроксибензоаты	
Метилпарагидроксибензоат (нипагин)	32
Этилпарагидроксибензоат	2
Пропилпарагидроксибензоат (нипазол)	29
Бутилпарагидроксибензоат	2
Натрия нипасепт	1
Сорбаты	
Кислота сорбиновая	4
Калия сорбат	1
Хлоргексидина биглюконата раствор 20%	1

Что касается используемых концентраций, то, по имеющимся данным, нипагин вводился в концентрациях, находящихся в интервале от 0,05–0,4%, нипазол – 0,01–0,06%. Бутилпарагидроксибензоат применялся в пероральных суспензиях в концентрациях 0,05–0,27%, а для этилпарагидроксибензоата была указана концентрация 0,16%. Консерванты других групп использовались в концентрациях 0,15% (кислота бензойная), 0,15–0,24% (натрия бензоат), 0,05% (кислота сорбиновая) и 0,2% (хлоргексидина биглюконат).

Антиоксиданты препятствуют протеканию в пероральных суспензиях окислительных реакций. К ним относят также и **секвестранты (хелатирующие соединения)**, которые, однако, выделяются некоторыми авторами в отдельную группу [9].

Как следует из данных таблицы 5, антиоксиданты вводились в составы пероральных суспензий в единичных случаях. При этом использовались такие соединения, как аскорбиновая кислота (вводилась в концентрациях до 1%), натрия дисульфит (вводился в концентрации 0,05%) и натрия эдетат.

Наполнители, или **вспомогательные суспендирующие агенты** (*auxiliary suspending agents* [9]), – группа вспомогательных веществ суспензий, обычно обходимая вниманием в отечественной технологической литературе. Как правило, о наполнителях упоминают, когда речь идёт о твёрдых лекарственных формах, в первую очередь таблетках [12, 13]. В то же время зарубежные авторы выделяют эту группу вспомогательных веществ и в жидких лекарственных формах – суспензиях. Наполнители предлагается вводить в состав суспензий в том случае, когда доза действующего вещества слишком мала, чтобы обеспечить достаточное количество частиц в разовой дозе суспензии [9]. В качестве наполнителей в суспензиях могут исполь-

зоваться неорганические твёрдые вещества, нерастворимые производные целлюлозы и нерастворимые синтетические полимеры [6, 8, 9, 13].

Таблица 5.

Антиоксиданты, используемые в составах суспензий для приёма внутрь (ГРЛС)

Наименование	Частота упоминания в составах
Кислота аскорбиновая	2
Натрия дисульфит	1
Натрия эдетат (динатрия эдетат)	2

Перечень наполнителей, используемых в изученных пероральных суспензиях, представлен в таблице 6.

Таблица 6.

Наполнители, используемые в составах суспензий для приёма внутрь (ГРЛС)

Наименование	Частота упоминания в составах
Кальция карбонат	1
Кальция фосфат	1
Кремния диоксид коллоидный (аэросил)	6
Кросповидон	1
Титана диоксид	1
Целлюлоза диспергируемая, МКЦ + КМЦ (авицел RC-591; RC 591 FMC)	10

Наиболее часто в качестве наполнителя использовалась микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) в так называемой коллоидной форме. Данная модификация МКЦ является сочетанием собственно микрокристаллической целлюлозы и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы и выпускается под различными марками, наиболее популярной из которых является RC-591, используемая примерно в 20% изученных составов в концентрациях 1,2–1,5%. Столь широкое применение этого вспомогательного вещества может объясняться тем, что, кроме формирования суспензионной взвеси, его введение позволяет также регулировать вязкость получаемой композиции.

На втором месте по частоте использования находился такой инертный наполнитель неорганической природы как кремния диоксид коллоидный (аэросил), – его вводили примерно в 12% составов, при этом используемая концентрация колебалась в пределах 0,2–1%.

Кальция карбонат и фосфат, а также титана диоксид использовались в единичных случаях. Используемая концентрация была приведена только для диоксида титана и составляла 0,4%. Следует также отметить, что титана диоксид часто используют в фармацевтических составах в качестве пигмента, дающего белый цвет [12]. Не исключено, что эту функцию он выполняет и при включении в состав суспензионных препаратов.

Так же единично был использован и кросповидон – аналог синтетического гидрофильного полимера повидона, отличающийся наличием поперечной сшивки между молекулами, из-за чего он теряет способность к растворению в воде. Преимущественно используется в качестве дезинтегранта в таблетках [4, 13]. По данным литературы, в состав суспензий рекомендуется включать микронизированную форму кросповидона [4].

Регуляторы pH и буферы используются для повышения химической и физической стабильности пероральных суспензий за счёт создания оптимального значения pH среды. Необходимость введения вспомогательных веществ этой группы обусловлена тем, что вязкость растворов ряда полимеров, используемых в фармацевтической практике и в составе пероральных суспензий в частности, зависит от величины pH.

Таблица 7.

Регуляторы pH и буферы, используемые в составах суспензий для приёма внутрь (ГРЛС)

Наименование	Частота упоминания в составах
Кислоты лимонной моногидрат (лимонная кислота)	28
Кислота хлористоводородная (0,12%, конц.)	1
Кислота яблочная	1
Натрия гидроксид,	10
в т.ч. для карбомера	6
Натрия гидроксид 0,5 М + Кислота хлористоводородная 0,5 М	1
Натрия гидроортофосфат 5% + Кислоты лимонной моногидрат 5% (pH 5,8+0,2)	1
Натрия гидрофосфата додекагидрат (безводный)	3
Натрия дигидрофосфата дигидрат	1
Натрия цитрат (дигидрат)	9

Самым популярным регулятором кислотности является лимонная кислота, упоминавшаяся более чем в половине рассмотренных составов пероральных суспензий. Используемая концентрация в композициях согласно приводимым в инструкциях данным колебалась в пределах примерно от 0,017% до 0,91%. В качестве закисляющих компонентов единично использовались также кислота яблочная и кислота хлористоводородная (в виде 0,12% раствора), которая вводилась в суспензию из расчёта 0,018 мл на 100 мл.

Второе место занимают различные натриевые соли (цитрат, гидрофосфат, дигидрофосфат), которые в совокупности вводились примерно в 25% изученных составов. Несмотря на достаточно широкое применение натрия цитрата (в 9 из 51 пероральной суспензии), в инструкциях указывалась лишь одна величина концентрации – 0,06%. Для натрия гидрофосфата удалось обнаружить указания на две используемые концентрации – 0,264% и 0,46%. Натрия дигидрофосфат вводился в одну пропись в концентрации 2%.

Для повышения уровня pH в состав суспензий вводился натрия гидроксид (около 20% композиций), причём в 60% случаев его применения напрямую указывалась цель введения – повышение вязкости карбомера, используемого в данных суспензиях в качестве загустителя.

Отдельно следует указать использование в двух составах пар «кислота – основание». В этом качестве выступали сочетания 0,5 М растворов натрия гидроксида и кислоты хлористоводородной и 5% растворов натрия гидроортофосфата и кислоты лимонной моногидрата. Последняя пара использовалась для достижения показателя pH 5,8±0,2.

Пеногасители относительно редко включаются в состав пероральных суспензий. Тем не менее среди рассмотренных нами суспензий было установлено использование таких пеногосителей, как эмульсия силиконовая (в концентрации 0,05%), симетикон (в концентрации 0,3%) и эмульсия симетикона «Q7-2587» (представляет собой водоразбавляемую неионогенную эмульсию, содержащую 30% масс. симетикона, производство Dow Corning Corporation), которая вводилась в составы в количестве от 0,05% до 0,72%.

Таблица 8.

Пеногасители, используемые в составах суспензий для приёма внутрь (ГРЛС)

Наименование	Частота упоминания в составах
Симетикон	1
Эмульсия силиконовая	1
Эмульсия симетикона 30% (Q7-2587)	5

Обширная группа **корригентов** используется в составах пероральных суспензий преимущественно для маскировки неприятного цвета или запаха [15]. Следует отметить, что в отличие от красителей и ароматизаторов корригенты вкуса (подсластители и вкусовые добавки) часто сочетают между собой, вводя в состав суспензий композицию из нескольких подсластителей или из подсластителей и вкусовой добавки.

Наиболее популярными фармацевтическими подсластителями являются сахароза (сукроза), глюкоза, фруктоза, сорбит и глицерин [16]. Среди **подсластителей** суспензий лидером является сорбит, входящий примерно в 52,9% рассмотренных составов. Указываемая в инструкциях к препаратам концентрация при этом колебалась в достаточно широких пределах, от 1,4% до 35%, однако следует учитывать тот факт, что в составах часто указывался не чистый сорбит, а раствор сорбита 70% (или сорбитол-70).

Второе место среди подсластителей уверенно занимает натрия сахаринат, указанный в 47% изученных составов. Согласно имевшимся данным в пероральные суспензии он вводился в концентрациях 0,01–0,25%.

На третьем месте (24,9% рассмотренных составов) расположился такой традиционный подсластитель, как сахароза, вводимая также в составы пероральных суспензий в виде сиропа и сахара-рафинада в весьма значительных количествах – 20–34,2%.

Таблица 9.

Подсластители, используемые в составах суспензий для приёма внутрь (ГРЛС)

Наименование	Частота упоминания в составах
Аспартам	1
Ацесульфам К (сунетт)	1
Глюкоза	2
Ксилитол	2
Мальтол (мальтитол, мальтитол жидкий, гидрогенат сиропа глюкозы)	6
Маннитол	2
Натрия сахаринат (сахарин натрия)	24
Натрия цикламат	3
Сахароза (сахарный сироп, сахар-рафинад)	15
Сорбит (сорбитол, сорбита р-р 70%, сорбитол-70, сорбитол кристаллизованный)	27
Сукралоза	1

Прочие подсластители серьёзно уступают по частоте применения первой тройке. Так, мальтол вводили только в 11,7% проанализированных составов (были указаны концентрации в пределах до 0,1%), натрия цикламат – в 5,9% (указаны концентрации в пределах 0,2–0,5%), ксилитол (указаны концентрации в пределах 15–32%), глюкоза и маннитол (указана концентрация 0,25%) – в 3,9%. Единично использовались такие подсластители, как аспартам, ацесульфам К (сунетт) и сукралоза.

Что касается вкусовых добавок, то их в пероральные суспензии вводят относительно редко: в изученных составах были указаны вкусовые добавки «ваниль» (в количестве 0,0436 мл на 100 мл суспензии), «манго» (0,081 мл на 100 мл суспензии), а также эссенции шоколадная, мороженого и фруктовая смешанная.

Ассортимент корригентов запаха (ароматизаторов), используемых в пероральных суспензиях, весьма обширен (таблица 10). Широко представлены как фруктово-ягодные ароматы (ананасовый, вишнёвый и др.), так и такие индивидуальные запахи, как сливочный, карамельный и др. Следует отметить, что наиболее популярными являлись цитрусовые запахи (лимонный, апельсиновый) и запах мяты (левоментол, масло мяты перечной и др.). Обычно ароматизаторы вводились в состав пероральных суспензий в относительно низких концентрациях (сотые доли процента), однако в единичных случаях вводимое количество может достигать величины 1%.

Достаточно редко в пероральные суспензии включаются красители (таблица 11): только в 10 из 51 рассмотренного состава были указаны вспомогательные вещества данной группы. Из 5 используемых соединений только одно относится к так называемым

натуральным красителям (рибофлавин), а остальные – синтетические соединения, продукты переработки каменноугольной смолы или нефтепродуктов.

Таблица 10.

Ароматизаторы, используемые в составах суспензий для приёма внутрь (ГРЛС)

Наименование	Частота упоминания в составах
Абрикосовый	1
Ананасовый 503092C	3
Апельсиновый 051941CS2	6
Банановый	4
Ванилин	3
Ванильный	1
Виноградный искусственный №998	1
Вишнёвый (Вишня)	3
Вишня дикая	1
Жёлтый сливово-лимонный аромат 39K020	1
Земляничный	1
Карамельный	1
Клубничный	4
Кремовый	1
Левоментол	1
Лимонный (Givaudan PHL-134488)	1
Малиновый 502700C	4
Масло лимонное	2
Масло мяты перечной (мяты перечной листьев масло)	4
Миндаль F31209	1
Мятный (мяты перечной №87177 натуральный, мятный натуральный №104)	4
Персиковый	1
Сладкое дерево	1
Сливочный	1
Фенхель	1
Черносмородиновый-карамельный	1

Таблица 11.

Красители, используемые в составах суспензий для приёма внутрь (ГРЛС)

Наименование	Частота упоминания в составах
Азорубин (E122, кармоизин, кислотный красный 2C)	3
Жёлтый (E110, солнечный закат жёлтый, закатно-жёлтый)	3
Красный очаровательный (E129)	1
Рибофлавин	1
Хинолиновый жёлтый (E104)	2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённый анализ составов пероральных суспензий лекарственных препаратов, включённых в Государственный реестр лекарственных средств, позволяет сделать вывод о широком использовании в их рецептуре вспомогательных веществ разных групп, значительно превосходящем ассортимент, традиционно описываемый в отечественной базовой фармацевтической литературе [1, 2, 3, 4, 12]. Нарастающий интерес специалистов в этой области обуславливает выход в последние несколько лет серии отечественных изданий, подробно освещающих в том числе и номенклатуру используемых в различных фармацевтических композициях вспомогательных веществ [13, 17, 18, 19, 20], однако фармацевтические суспензии пока не привлекали к себе внимания авторов. Обоснованный выбор и применение соответствующих вспомогательных веществ позволяет создавать эффективные лекарственные препараты с высокими потребительскими свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. И.А. Муравьёв. Технология лекарств. Изд. 3-е, перераб. и доп. Т. 2. – М.: Медицина, 1980. 704 с.
2. В.Н. Большаков. Вспомогательные вещества в технологии лекарственных форм. – Л.: ЛФХИ, 1991. 46 с.
3. Промышленная технология лекарств. Т. 2. / Под ред. В.И. Чуешова. – Харьков: НФАУ МТК-Книга, 2002. 716 с.
4. Н.В. Меньшутина и др. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства. Т. 2. – М.: БИНОМ, 2013. 480 с.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания: в 3 т. Т. 2. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/ (дата обращения 15.04.2017).
6. Pharmaceutical emulsions and suspensions: second edition, revised and expanded / Ed. by F. Nielloud, G. Marti-Mestres. – New-York; Basel: Marcell Dekker Inc, 2000. 660 p.
7. S.K. Niazi. Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations: Volume 3 Liquid Products. – Boca Raton: CRC Press, 2004. 400 p.
8. S.K. Niazi. Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations: Volume 5 Over-the-Counter Products. – Boca Raton: CRC Press, 2004. 350 p.
9. Pharmaceutical suspensions: From formulation development to manufacturing / Ed. by A.K. Kulshreshtha, O.N. Singh, G.M. Wall. – Springer, 2010. 328 p.
10. Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx (дата обращения 15.04.2017).
11. Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design, 2nd ed. / Ed. by M.E. Aulton, K. Taylor. – Spain: Churchill Livingstone Press, 2002. 679 p.
12. Н.В. Меньшутина и др. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства. Т. 1. – М.: БИНОМ, 2012. 328 с.
13. Полимеры для фармацевтической технологии / Под ред. проф. С.А. Кедика. – М. 2011. 511 с.
14. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th ed. / Ed. by R.C. Rowe, P.J. Sheskey and S.C. Owen. – London; Washington DC: Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association, 2006. 945 p.
15. Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes / Ed. by Shayne Cox Gad. – New Jersey, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2008. 1384 p.
16. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 3rd ed. / Ed. by J. Swarbrick. – New-York: Informa Healthcare USA, Inc, 2006. 4372 p.
17. А.И. Сливкин и др. Фармацевтическая технология. Высокомолекулярные соединения в фармации и медицине. / Под ред. И.И. Краснюка. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 560 с.
18. К.В. Алексеев и др. Фармацевтическая технология. Мази / Под ред. С.А. Кедика. – М.: ИФТ, 2014. 584 с.
19. К.В. Алексеев и др. Фармацевтическая технология. Таблетки / Под ред. С.А. Кедика. – М.: ИФТ, 2015. 672 с.
20. К.В. Алексеев и др. Фармацевтическая технология. Суппозитории / Под ред. С.А. Кедика. – М.: ИФТ, 2015. 560 с.

УДК 615.2

ОБОСНОВАНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ ОПТИМУМОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ГИДРОФИЛЬНОЙ ОСНОВЕ. СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ГЕЛИ

М.Н. Анурова[1]*, Е.О. Бахрушина[1], Г.Г. Барнолицкий[1], С.П. Кречетов[2]

Резюме. В статье представлены результаты изучения реологических характеристик стоматологических препаратов в форме гелей, зарегистрированных в Российской Федерации: Дентамет®, Камистад®, Калгель®, Метрогил Дента® и Холисал®. Обоснованы параметры реологических измерений, проводимых для стоматологических мягких лекарственных форм. На основании полученных результатов предложены оптимумы реологических характеристик, которые могут быть рекомендованы к использованию при разработке стоматологических гелей.

Ключевые слова: ротационная вискозиметрия, стоматологические гели, реологические оптимумы, вязкость, тиксотропия, кривые вязкости и течения.

JUSTIFICATION OF THE RHEOLOGICAL OPTIMUM IN THE DEVELOPMENT OF SEMISOLID FORMS. DENTAL GELS

M.N. Anurova[1]*, E.O. Bakhrushina[1], G.G. Barnolitskiy[1], S.P. Krechetov[2]

Abstract. The article presents the results of studying the rheological characteristics of dental preparations in the form of gels registered in the Russian Federation: Dentamet®, Kamistad®, Calgel®, Metragyl-Denta® and Holisal®. The parameters of rheological measurements conducted for dental soft medicinal forms are substantiated. On the basis of the results obtained, optimum rheological characteristics are suggested, which can be recommended for use in the development of dental gels.

Keywords: rotary viscosimetry, dental gels, rheological optimum, viscosity, thixotropy, rheograms of flow and viscosity.

1 – ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

2 – Центр живых систем ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», 141701, Россия, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9, стр. 7

1 – I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskij University), 8, Trubetskaya str., Moskow, 119991, Russia

2 – Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 9/7, Institutskiy per., Dolgoprudny, Moscow region, 141701, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: amn25@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

В стоматологической практике находят применение лекарственные препараты различных фармакотерапевтических групп – противовоспалительные, местноанестезирующие, анальгезирующие, вяжущие, а также антибиотики и другие антибактериальные средства [1]. В терапии заболеваний зубов, десен и слизистой оболочки полости рта применяются различные лекарственные формы: таблетки для рассасывания, пленки, растворы и спреи для местного применения, а также мягкие лекарственные формы на гидрофильных основах – гели.

Согласно приказу Минздрава РФ № 538н «Об утверждении Перечня наименований лекарственных форм лекарственных препаратов для медицинского применения» от 27 июля 2016 г. стоматологический гель – гель, предназначенный для трех и более путей введения: перидонтального нанесения на зубы, десны и слизистую оболочку полости рта.

В 2017 году доля стоматологических средств в лекарственной форме геля от общего числа препаратов, зарегистрированных на российском фармацевтическом рынке, составляет около 5% [1], что является четвертым по величине показателем после гелей для наружного применения, вагинальных и глазных гелей (рисунок 1).

За последние годы в отношении зарегистрированных в Российской Федерации препаратов в форме стоматологических гелей прослеживается тенденция к сокращению ассортимента почти в два раза. Так, по данным РЛС, в 2007 году доля гелей для применения в стоматологии составляла 11% от общего числа зарегистрированных гелей [1].

Стоматологические гели обладают некоторыми преимуществами по сравнению с дру-



Рисунок 1. Диаграмма соотношения зарегистрированных в Российской Федерации мягких лекарственных форм на гидрофильной основе, распределенных в зависимости от способа применения, по данным на 2017 год [1]

гими лекарственными формами для применения в ротовой полости. Являясь вязкопластичной лекарственной формой, гель при нанесении на поврежденный участок десны или слизистой оболочки создает защитную пленку, предотвращая механическое раздражение и обеспечивая локализованное действие лекарственных компонентов [2]. Стоматологические лекарственные средства предназначены для местного применения, однако жидкие стоматологические лекарственные формы из-за своей низкой вязкости не могут воздействовать локализованно на пораженный участок. Этого недостатка лишены гели для стоматологического применения, которые, кроме достаточной вязкости, должны обладать также высокой биоадгезией и окклюзионными свойствами, благодаря которым они хорошо распределяются и удерживаются на месте нанесения, не оказывая фармакологического действия на здоровые ткани. Применяя мягкие лекарственные формы в терапии стоматологических заболеваний, возможно добиться пролонгированного действия препарата, что в ряде случаев повысит эффективность лечения [3].

Таким образом, разработка гелей для применения в терапии заболеваний полости рта различной этиологии является перспективным направлением современной фармацевтической науки.

Наиболее важным критическим параметром стоматологических мягких лекарственных форм на гидрофильных основах, контролируемым на этапе разработки, является изучение реологических характеристик, к которым относят динамическую и пластическую вязкость, предел текучести, степень и наличие тиксотропного эффекта, характер типа течения [4].

Методология определения оптимумов реологических характеристик мягких лекарственных форм была предложена в 80-х годах XX века и изложена в работах А.А. Аркуши, И.М. Перцева и др. [5, 6]. В этих работах были приведены реологические оптимумы консистенции и намазывания, на сегодняшний день также учитываемые при разработке мягких лекарственных форм на гидрофильной основе. В исследовании проводилось изучение мягких лекарственных форм только дерматологического применения, в качестве основ изучали небольшой ассортимент веществ, применяемых в то время (полиэтиленгликоли, бентониты, метилцеллюлозу и аэросил), которые сегодня ограниченно используются в составах выпускаемых лекарственных препаратов. Ассортимент гидрофильных основ к настоящему времени существенно расширился, и основные гелеобразователи в зарегистрированных в России мягких лекарственных формах – это карбополы, производные целлюлозы (гидроксиэтилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза и гидроксипропилцеллюлоза), полоксамеры и др. [7].

Техническое оснащение для проведения реологических исследований, которое ранее включало ротационный вискозиметр Реотест-II (ГДР), в настоящее время представлено современными моделями вискозиметров [Anton Paar (Австрия), Lamy Rheology (Франция), Fungilab S.A. (Испания) и др.], позволяющими осуществлять изучение реологических характеристик в широком диапазоне скоростей сдвига с использованием измерительной геометрии, подобранной в зависимости от вязкопластичных свойств конкретной системы («цилиндр в цилиндре», «плита – плита», «конус – плита»), программное обеспечение которых позволяет проводить аппроксимацию реологических параметров измеряемых образцов по одной из реологических моделей (Кэссона, Бингама и др.). Таким образом, является необходимым проведение на современном уровне обоснований и определений реологических оптимумов мягких лекарственных форм на гидрофильных основах с учетом имеющейся в настоящее время номенклатуры вспомогательных веществ и аналитического оснащения технологических лабораторий.

Целью данной работы являлось определение и обоснование реологических оптимумов стоматологических гелей на основе изучения реологических характеристик образцов стоматологических лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На сегодняшний день на российском фармацевтическом рынке представлены 5 торговых названий препаратов в виде данной лекарственной формы: Дентамет® (Россия), Камистад® (Германия), Калгель® (Польша), Метрогил Дента® (Индия) и Холисал® (Польша).

В таблице 1 приведены составы изучаемых лекарственных препаратов [1]. В качестве гелеобразователей для изучаемых образцов используются гидроксиэтилцеллюлоза (ГЭЦ) в концентрации от 2,0% до 2,5% и карбомеры в концентрации от 1,25% до 1,5%. Также в качестве вспомогательных веществ в состав

Таблица 1.

Стоматологические гели, представленные на российском фармацевтическом рынке

Торговое наименование	Фирма-производитель	МНН/ФС*	Гелеобразователь	Вспомогательные вещества
Калгель®	«ГлаксоСмитКляйн Фармасьютикалз С.А.», Польша	Лидокаин / цетилпиридиния хлорид	Гидроксиэтилцеллюлоза (ГЭЦ) 2,5%	Сорбитола раствор 70% некристаллизующийся – 210,0 мг Ксилитол – 140,0 мг Этанол 96% – 93,6 мг Макрогола глицерилгидроксистеарат – 10,0 мг Лауромакрогол-600 – 3,3 мг Макрогол-300 – 3,3 мг Натрия сахаринат – 1,0 мг Левоментол – 0,6 мг Ароматизатор травяной 17.42.5490 – 4,8 мг Карамель Е150 – 1,0 мг Натрия цитрат – 8,3 мг Лимонной кислоты моногидрат – 1,05 мг Вода – до 1000,0 мг
Холисал®	Фармзавод Ельфа А.О., Польша	Холина салицилат / цеталкония хлорид	Гидроксиэтллцеллюлоза (ГЭЦ) 2,0%	Метилпарагидроксибензоат – 1,5 мг Пропилпарагидроксибензоат – 0,8 мг Глицерол – 50,0 мг Аниса обыкновенного семян масло – 1,61 мг Этанол 96% – 390,0 мг Вода – до 1000,0 мг
Метрогил Дента®	«Юник Фармасьютикал Лабораториз», Индия (отделение фирмы «Дж. Б. Кемикалс энд Фармасьютикалс Лтд.»)	Метранидазол/ хлоргексидин	Карбомер-980 1,5% Натрия гидроксид – 4,0мг	Пропиленгликоль – 50,0 мг Динатрия эдетат – 0,5 мг Натрия сахаринат – 1,0 мг Левоментол – 5,0 мг Вода – до 1000,0 мг
Дентамет®	ЗАО «Алтайвитамины», Россия	Метронидазол / хлоргексидин	Карбомер 1,25% Троламин (триэтаноламин термостабильный) – 0,47г	Левоментол – 0,25 г Глицерол – 5,0 г Пропиленгликоль – 5,0 г Натрия сахарината дигидрат – 0,25 г Вода очищенная – 86,28 г
Камистад®	«Штада Арцнаймиттель АГ», Германия	Лидокаин / экстракт цветков ромашки аптечной	Карбомер 1,5%	Бензалкония хлорид, 50% раствор – 2,0 мг Коричника камфорного масло – 1,0 мг Натрия сахаринат – 1,0 мг Трометамол – 28,1 мг Муравьиная кислота – 0,4 мг Этанол 96% – 8,2 мг Вода очищенная – 739,3 мг

Примечание: *ФС – фармацевтическая субстанция.

изучаемых лекарственных препаратов введены корригенты вкуса (растворы сахаров и полиолов, карамель), глицерол, макроголы, масла, оказывающие влияние на реологические свойства фармацевтических композиций.

Реологические характеристики образцов изучали методом ротационной вискозиметрии на коаксильном вискозиметре Lamy Rheology RM 200 (Франция) с помощью измерительной системы «цилиндр в цилиндре» MS-DIN 33. Программное обеспечение – RHEOMATIK (ver. T, Lamy Rheology, Франция).

Критическими параметрами реологических исследований являются температурный режим, диапазон скоростей сдвига, а также выбор реологической модели для аппроксимации результатов. В предыдущих работах, посвященных изучению структурно-механических свойств вязкопластичных тел, использовался диапазон скоростей сдвига 1,3–1310 $с^{-1}$, что было обусловлено в первую очередь рабочим режимом ротационного вискозиметра Реотест-II (ГДР) [5]. Измерение гелевых структур при столь высоких скоростях сдвига приводит к их полной деструкции и позволяет наблюдать тиксотропный эффект, однако не позволяет оценить особенности реологического поведения конкретной системы. В работе [8] были определены величины диапазонов скоростей сдвига, соответствующие различным стадиям производства и применения гелей. Было показано, что диапазон скоростей сдвига от 0 до 300 $с^{-1}$ является достаточ-

ным для моделирования условий получения гелей и розлива в упаковку.

Реологические характеристики лекарственных препаратов изучали в двух температурных режимах – 20±1 °С и 37±1 °С, соответствующих хранению и применению. Реологическое поведение при нанесении на слизистую оболочку полости рта является обязательным контролируемым параметром при изучении оральных лекарственных форм, так как вязкость и другие структурно-механические характеристики системы будут оказывать влияние на биоадгезивные свойства геля и, как следствие, влиять на терапевтическую эффективность препарата.

Аппроксимацию полученных результатов проводили с помощью уравнения Кэссона.

$$\sigma^{1/2} = \sigma_{\gamma}^{1/2} + (\eta_{\rho}\gamma)^{1/2},$$

где σ_{γ} – предел текучести; η_{ρ} – пластическая вкость; γ – скорость сдвига.

Модель Кэссона относится к уравнениям с пределом текучести и может быть применена для оценки реологических свойств материалов, которые не текут при низких скоростях сдвига или имеют столь высокие значения вязкости, что при технологических приложениях ими можно пренебречь [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунках 2 (А, Б) и 3 (А, Б) приведены кривые течения и вязкости изучаемых образцов при температуре 20±1 °С и 37±1 °С.

По кривым течения образцов можно судить о неньютоновском типе течения гелей в заданном температурном диапазоне с выраженным пределом текучести, значимо не изменяющимся при повышении температуры. Таким образом, анализируемые образцы будут сохранять прочность гелевой структуры при нанесении в ротовой полости, что позволит им локализированно воздействовать на область воспаления.

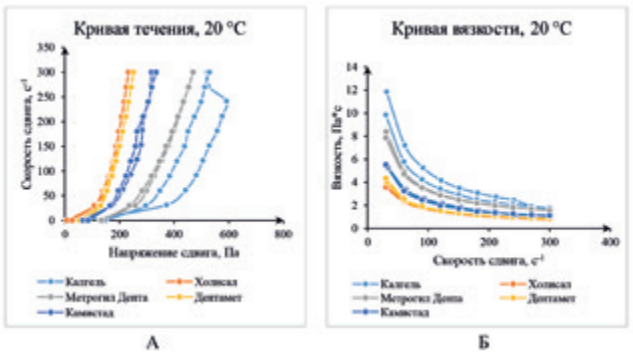


Рисунок 2. Кривые течения (А) и вязкости (Б) изучаемых образцов в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 $с^{-1}$ при температуре 20 °С

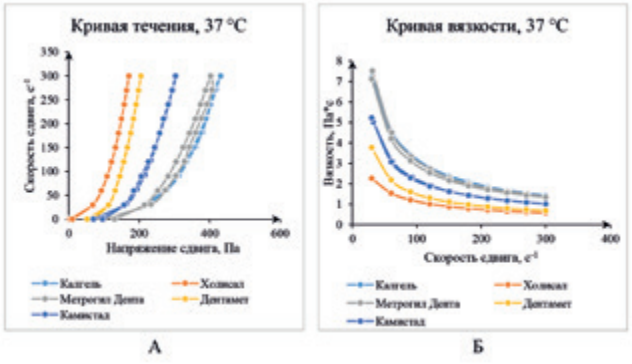


Рисунок 3. Кривые течения (А) и вязкости (Б) изучаемых образцов в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 $с^{-1}$ при температуре 37 °С

На рисунках 2Б и 3Б приведены кривые вязкости изучаемых образцов, построенные в координатах зависимости динамической вязкости от скорости сдвига после измерения в условиях циклических сдвиговых деформаций «большой сдвиг – малый сдвиг – большой сдвиг». Из приведенных данных видно, что все образцы тиксотропны, причем с повышением температуры измерений степень тиксотропии увеличивается. Об этом можно судить по фактической эквивалентности значений динамической вязкости изучаемых образцов гелей на восходящей и нисходящей цепи цикла.

При изучении полученных реограмм было также показано, что природа и концентрация гелеобразующего полимера не играет ведущей роли в определении характера реологических кривых. Так, стоматологические гели Калгель® и Холисал®, имеющие общий гелеобразователь – ГЭЦ в концентрации 2,0 и 2,5%, не имеют общей тенденции в реологическом поведении в эксперименте при прочих равных условиях. Намного большую сходность реологических кривых демонстрируют гели Холисал® и Дентамет®, в которых в качестве гелеобразователей используются ГЭЦ и карбомер соответственно.

Из кривых вязкости, построенных по данным измерений при температурах 20 °С и 37 °С (рисунки 2Б и 3Б), видно, что с повышением температуры измерения динамическая вязкость гелей на основе карбомеров Метрогил Дента®, Дентамет® и Камистад® значимо не изменяется, в то время как образцы на основе целлюлозы (Калгель® и Холисал®) становятся менее вязкими, сохраняя общий характер реологических кривых.

В отличие от изучаемых образцов промышленного производства определенные преимущества будут иметь термореверсивные составы для стоматологического применения. Менее вязкие при температуре хранения и экструзии из упаковки и более вязкие после нанесения на пораженный участок ротовой полости, они, скорее всего, будут обладать более высоки-

ми окклюзионными свойствами. Зависимое от температуры гелеобразование может быть достигнуто при применении полоксамеров (плюроников) в качестве моногелеобразователей или компонентов комбинированной основы. Такие препараты активно разрабатываются за рубежом [9, 10, 11].

В таблице 2 приведены реологические параметры изучаемых систем, рассчитанные по модели Кэссона. Значения пластической вязкости образцов находятся в диапазоне от 0,174 до 0,398 Па·с, величины пределов текучести – от 37,0 до 164,4 Па, причем наблюдается следующая зависимость: более вязкие лекарственные препараты обладают более высоким пределом текучести и, как следствие, большей прочностью структуры. Исключением является препарат Холисал®, обладающий низким пределом текучести (37,0 Па) при среднем значении пластической вязкости. Следует заметить, что предел текучести препарата Калгель® на том же гелеобразователе (ГЭЦ) в сходной концентрации (2,5%) выше в 4,5 раза. Это связано с наличием в составе Калгель® производных стеариновой кислоты, которые значительно повышают прочность структуры [5].

Таблица 2.

Значения пластической вязкости и предела текучести изучаемых образцов, рассчитанные по модели Кэссона

Измеряемый параметр / ЛП	Пластическая вязкость по модели Кэссона, Па·с	Предел текучести, Па
Калгель®	0,398±0,03	164,4±2,2
Метрогил Дента®	0,354±0,02	138,8±1,9
Холисал®	0,344±0,03	37,0±0,9
Камистад®	0,274±0,02	90,0±2,0
Дентамет®	0,174±0,04	79,4±1,6

Проведенные реологические исследования стоматологических гелей позволили эмпирически вывести оптимумы вязкости в диапазоне скоростей свдига от 0 до 300 $с^{-1}$ при температуре 20 °С и 37 °С (для лекарственных форм, не обладающих термореверсивными свойствами) (рисунок 4). На основании проведеных исследований можно рекомендовать применение полученных оптимумов для разработки стоматологических лекарственных форм, так как изучаемые в работе препараты обладают доказанной фармакологической эффективностью, производятся отечественными и иностранными компаниями в течение длительного времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определены оптимумы вязкости в интервалах скоростей сдвига, соответствующих применению, производству и хранению стоматологических гелей. На основании изучения реологических свойств проанализированных лекарственных прапаратов в форме стоматологических гелей, зарегистрированых

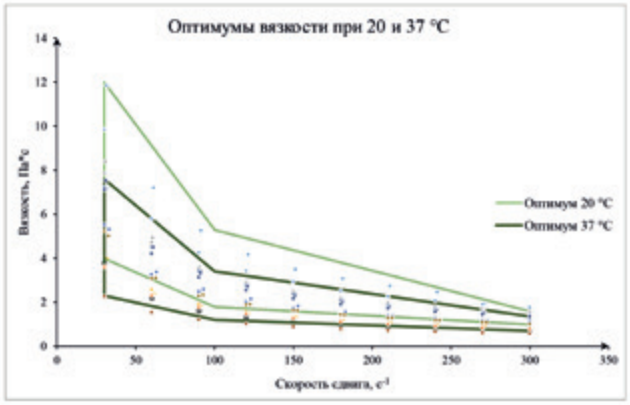


Рисунок 4. Оптимумы динамической вязкости в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 $с^{-1}$ при различных температурах

на территории РФ, можно рекомендовать следующие оптимумы для разработки новых лекарственных форм данной группы: пластическая вязкость – в интервале от 0,170 до 0,400 Па·с, предел текучести – от 50,0 до 170,0 Па.

ЛИТЕРАТУРА

1. Реестр лекарственных средств России. URL: https://www.rlsnet.Реестр лекарственных средств России. URL: https://www.rlsnet.ru (дата обращения 15.03.2017).
2. Н.С. Кавушевська, Т.І. Тюпка. Экспериментальное обоснование состава и изучение токсикологических показателей нового стоматологического геля на основе лизоцима гидрохлорида // Вісник проблем біології і медицини. 2013. № 1. Т. 2(99). С. 108–111.
3. Е.В. Барг, С.И.Токмакова, Ю.В. Луницына, Ю.В. Киященко, К.С. Козлова. Сравнительная оценка антимикробной активности стоматологических гелей // Проблемы стоматологии. 2014. № 1. С. 30–33.
4. А.Я. Малкин, А.И. Исаев. Реология: концепции, методы, приложения / Пер. с англ. – СПб.: Профессия. 2010. 560 с.
5. А.А. Аркуша. Исследование структурно-механических свойств мазей с целью определения оптимума консистенции: автореф. дис. … канд. фарм. наук. – Харьков. 1982. 192 с.
6. А.А. Аркуша, И.М. Перцев. Оценка и контроль консистенции мазей с использованием реограмм. Информационное письмо. – К.: РЦНМИ МЗ УССР, вып. 10 по проблеме «Фармация». 1983. 2 с.
7. М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина. Обзор современных гелеобразователей в технологии лекарственных форм // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49. № 9. С. 57-64.
8. М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, С.П. Кречетов. Изучение влияния состава комбинированной матрицы на реологические характеристики экспериментальных образцов пероральных гелей нимесулида // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4(17). С. 98–104.
9. K. Bansal, M. K. Rawat, A. Jain, A. Rajput, T. P. Chaturvedi, S. Singh. Development of Satranidazole Mucoadhesive Gel for the Treatment of Periodontitis // AAPS PharmSciTech. 2009. V. 10(3). P. 716–721.
10. Patent US № 20160015737 A1. Multipurpose dental gel, 2014.
11. E. Esposito, V. Carotta, L. Trombelli, E. Menegatti, C. Nastruzz. Comparative analysis of tetracycline-containing dental gels: Poloxamer- and monoglyceride-based formulations // International Journal of Pharmaceutics. 1996. V. 142(1). P. 9–23.

BECKMAN COULTER

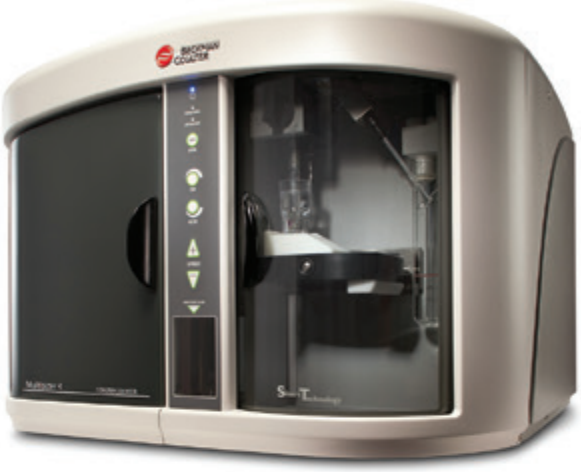
Анализаторы Beckman Coulter Life Sciences для подсчета и характеризации частиц и клеток

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)



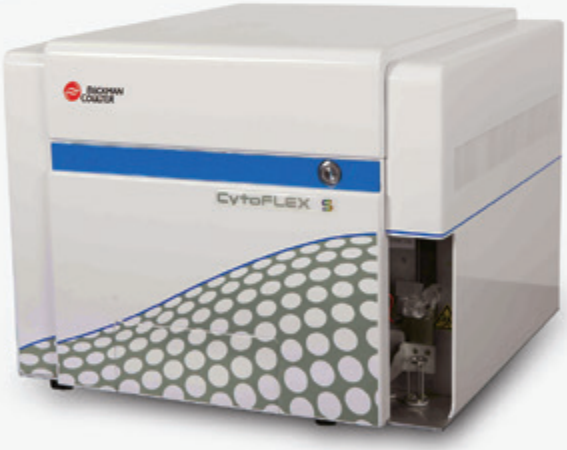


Анализатор размеров частиц методом лазерной дифракции

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)
www.phct-group.com

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

УДК 579.61

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ БИОМАССЫ *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ С ЦЕЛЬЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ

Д.Н. Бибиков[1], О.А. Волох[1], А.В. Комиссаров[1]*, Ю.И. Самохвалова[1], Н.Г. Авдеева[1], А.К. Никифоров[1,2]**

Резюме. Исследована возможность применения седиментационного, центробежного и фильтрационного методов концентрирования суспензии *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, полученной после ее глубинного культивирования. Выявлена преимущественность использования метода тангенциальной фильтрации с целью внедрения в технологический процесс производства живой туляремийной вакцины. Изучены характеристики концентрата *F. tularensis* 15 НИИЭГ, хранимого при разных температурно-временных параметрах. Показано, что концентраты целесообразно хранить при температуре 4 °С не более 6 сут.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, концентрирование, живая туляремийная вакцина.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE METHODS FOR *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 NIIEG BIOMASS CONCENTRATION TO BE USED IN MANUFACTURING OF LIVE TULAREMIA VACCINE

D.N. Bibikov[1], O.A. Volokh[1], A.V. Komissarov[1]*, Yu.I. Samokhvalova[1], N.G. Avdeeva[1], A.K. Nikiforov[1,2]

Abstract. The possibility of applying sedimentation, centrifuge, and filtration techniques for concentration of *F. tularensis* 15 NIIEG suspensions obtained after submerged cultivation has been evaluated. It is established that realization of tangential ultrafiltration as part of technological process of live tularemia vaccine production is of distinct advantage. Characteristics of *Francisella tularensis* 15 NIIEG concentrate stored under different temperature/time-dependent conditions have also been studies. It is demonstrated that it is practical to preserve them at 4 °C within ≤6 days.

Keywords: *Francisella tularensis*, concentration, live tularemia vaccine.

1 – Федеральное казенное учреждение здравоохранения Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

2 – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 410012, Россия, г. Саратов, Театральная пл., д. 1

1 – Federal Government Health Institution Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare , 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russia

2 – Federal State Funded Educational Institution of Higher Postgraduate Education «N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University», Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 1, Theatrical Square, Saratov, 410012, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: rusrapi@microbe.ru
Тел.: (8452) 26 21 31

** **адресат для переписки:**
E-mail: rector@sgau.ru
Тел.: (8452) 23 32 92

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время единственным иммунобиологическим лекарственным препаратом, применяемым для специфической профилактики туляремии в Российской Федерации, является живая туляремийная вакцина (ЖТВ). Вакцинация против туляремии в 2011 г. приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ (№ 51н от 31 января 2011 г.) включена в национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям [1].

Технология производства ЖТВ предусматривает получение посевных культур I, II и III генерации штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, процесс накопления биомассы, необходимой для приготовления микробной взвеси определенной концентрации, к последующим розливом, замораживанием, сублимационным высушиванием, герметизацией и упаковкой препарата, при этом количество микробных клеток в 1 мл готовой лекарственной формы препарата должно быть 20±10 млрд [2, 3].

Отсутствие стадии концентрирования туляремийного микроба в технологии ее производства приводит к ряду отрицательных моментов:

- потенциальная возможность выбраковки биомассы после процесса ее накопления в случае недостаточной для приготовления готовой лекарственной формы концентрации микроорганизма;
- возможная повышенная реактогенность вакцины из-за наличия питательной среды после выращивания микроорганизмов.

Принято выделять следующие методы концентрирования, нашедшие наиболее широкое применение для сгущения бактериальной массы, выращенной глубинным способом: седиментация, центрифугирование (сепарирование) и фильтрование, обладающие присущими им недостатками и достоинствами.

В связи с этим проведение научных исследований с целью экспериментального обоснования технологии концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ является актуальным.

Готовая лекарственная форма живой туляремийной вакцины представляет собой лиофилизат. Временной промежуток после получения нативной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ до начала процесса сублимационного высушивания довольно длительный, что связано с оценкой качества нативной культуры с целью принятия (или непринятия) решения о начале процесса лиофилизации. Кроме того, в любом производстве возможно возникновение ситуаций, в результате которых проведение процесса сублимационной сушки в установленное время не представляется возможным.

Таким образом, актуальность исследований по определению условий и времени хранения концентратов биомассы *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ представляет определенную научно-практическую значимость.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». В качестве плотной питательной среды на этапах подготовки культуры и анализа ее свойств использовали FT-агар (производство ГНЦ ПБМ, Оболенск).

Для оценки применимости методов концентрирования испытаниям подвергалась нативная культура *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выращенная методом глубинного культивирования в течение 22±1 ч при температуре (37±0,5) ºС на жидкой питательной среде на основе ферментативного гидролизата фибрина (pH 7,2±1) [4]. В качестве критерия технологического применения методов концентрирования было принято 10-кратное увеличение концентрации микроорганизмов. Седиментацию суспензии туляремийного микроба проводили при температуре 2…10 °С с периодическим отбором проб. Сгущение биомассы центрифугированием осуществляли на центрифуге Avanti J-301 (Beckman Coulter, США) при числе оборотов ротора, равном 12000, в течение 25 мин. Для оценки возможности применения фильтрационных методов использовали тангенциальную микрофильтрацию на микрофильтрационной установке Vivaflow 200 (Sartorius, Германия) через мембраны с размером пор 0,2 мкм.



Центрифуга Avanti J-301, Beckman Coulter

Для исследований изменений характеристик концентрированной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ в процессе хранения были выбраны 2 температурных интервала хранения – 2–8 °С и 18–24 °С.

Полученные концентраты анализировали по следующим показателям: концентрация микробных клеток, процент живых микробных клеток, степень диссоциации. Применяли методы, изложенные в фармакопейной статье на вакцину туляремийную живую [2].

Концентрацию микробных клеток измеряли по отраслевому стандартному образцу мутности – ОСО мутности 42-28-85-П (10 МЕ) ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, эквивалентной концентрации 5 млрд кл. мл$^{-1}$, с учетом разведения пробы. Для расчета общей концентрации (ОК) использовали формулу:

$$ОК = \frac{(0,5 + V) \times 5 \times 10^9}{0,5},$$

где V – объём 0,9% раствора натрия хлорида, взятого на разведение пробы, мл; 0,5 – объём испытуемого образца, мл; 5×10^9 – эквивалент туляремийного мик-

роба, соответствующий стандарту мутности (10 МЕ), м.к./мл.

Жизнеспособность (процент живых микробных клеток) определяли высевом на пластинки с FT агаром, учет проводили через 5 сут выдерживания посевов при температуре (37±1) °С. Из полученных проб (образцов) делали последовательные десятикратные разведения до 10^{-7}, из которого по 0,1 мл взвеси отдельно для каждого образца высевали на 3 чашки Петри с питательной средой. За количество живых микробных клеток принимали среднее арифметическое определений количества выросших колоний в трех образцах. Содержание живых микробных клеток в процентах (% живых м.к.) рассчитывали по формуле:

$$\%\ \text{живых}\ \text{м.к.} = \frac{\text{БК}}{\text{ОК}} \times 100\%,$$

где БК – количество живых м.к. в 1 мл; ОК – общая концентрация м.к.

Степень диссоциации культуры определяли по числу SR (белых) колоний от общего количества выросших колоний. После инкубации чашек Петри в термостате при температуре (37±1) °С в течение 5 сут их помещали на 24 ч в холодильник при температуре от 2 до 8 °С. После этого подсчитывали число иммуногенных, «белых», и неиммуногенных, «серых», колоний и вычисляли их процентное соотношение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований по экспериментальному обоснованию технологии концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ представлены в таблице 1.

Исходные показатели полученной биомассы (микробной суспензии) были следующие: концентрация микробных клеток – $26{,}8\times10^9$ м.к./мл, жизнеспособность – (98±1)%, степень диссоциации – (81±2)%.

Таблица 1.

Результаты исследований по экспериментальному обоснованию технологии концентрирования бактерий *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Метод концентрирования	После концентрирования		
	концентрация микробных клеток, м.к. в 1 мл	процент живых микробных клеток, %	степень диссоциации, % (кол-во SR (белых) колоний)
Центрифугирование	$(270{,}9\pm0{,}9)\times10^9$	58,9±2,2	87,2±2,2
Тангенциальная фильтрация	$(315{,}9\pm0{,}9)\times10^9$	98,2±0,2	81,3±0,5
Седиментация (до ½ объема)	$(27{,}2\pm0{,}5)\times10^9$	85,5±0,5	50±1

Исходя из данных, представленных в таблице, можно сделать вывод о том, что использование микрофильтрации позволяет достигнуть 10-кратного увеличения концентрации микробов в суспензии, при этом время протекания технологического процесса при объеме исходного материала 1,0 дм^3 составило не более 1 ч. Это является более предпочтительным по сравнению с результатами седиментации, при которой 10-кратная степень концентрирования не была достигнута и через 39 сут (время наблюдения). Возможно, что добавление седиментирующих веществ позволит сократить время и увеличить количество иммуногенных (SR-колонии) клеток. Таким образом, время приготовления микробного концентрата сократилось более чем в 900 раз (в часах или в 38 раз – в сутках). В полуфабрикате вакцинного препарата, произведенном методом мембранного разделения (микрофильтрации), не происходило ухудшения характеристик в сравнении с нативной культурой *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученной после ее глубинного культивирования.

Что касается использования центробежного метода для концентрирования туляремийного микроба, можно констатировать следующее. Необходимая степень концентрирования достигалась за то же время, что и при тангенциальной фильтрации. Но жизнеспособность микробной суспензии сильно снижалась – на 40%, хотя этот показатель оставался в пределах регламентируемого (количество живых клеток должно составлять не менее 40% от общего количества микробных клеток). Данный способ концентрирования не влиял на степень диссоциации субпопуляции. Использование центробежного метода требует наличия боксированного сепарационного оборудования с автоклавируемыми узлами (ротор) для обеспечения защиты от контаминации суспензии вакцинного штамма и биологической безопасности производственного процесса.

Следует сказать о том, что полученные данные коррелируют с данными других исследователей. Так, в авторском свидетельстве на изобретение № 1792969 констатируется, что «осаждение бактериальных спор, полученных на плотных питательных средах и ресуспендированных в физиологическом растворе, проходит за 10 и более суток», а «полученных суспензионным способом – более чем за 35 суток» [5]. Также уместно привести результаты исследований, проведенные А.В. Пиковым. Им определен ряд недостатков сепарирования для концентрирования клеток *Brucella melitensis* REV-1 в технологическом процессе производства противобруцеллезной вакцины: сложность аппаратурного оформления процесса; необходимость паровой стерилизации сепаратора; гибель клеток *B. melitensis* REV-1 из-за создаваемого давления в сепараторе и повышенной температуры; потери продукта

Таблица 2.

Результаты исследований по определению условий и времени хранения концентратов биомассы *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Условия хранения / Время хранения	Показатели					
	концентрация микробных клеток, $\times 10^9$ м.к. в 1 мл.		процент живых микробных клеток, %		степень диссоциации,%	
сут	2–8 °С	18–24 °С	2–8 °С	18–24 °С	2–8 °С	18–24 °С
1	315,9±0,9	315,9±0,9	98,2±0,2	97,5±0,5	80,7±0,5	80,8±0,5
2	н.о.*	н.о.*	95,6±0,4	92,8±0,8	83,8±2,5	80,5±0,5
3	н.о.*	н.о.*	92,4±0,4	84,5±7,5	82,5±1,5	80,4±1,2
6	н.о.*	н.о.*	87,3±4,5	18,2±4,5	81,3±6,2	65,5±1,5
7	н.о.*	н.о.*	98,5±0,5	3,2	79,5±4,9	50
21	224±5	200±5	65±0,5	0	61,5±1,5	0
31	232±5	н.о.	82,5±0,5	0	63±0,5	0
54	241±5	н.о.	74,5±6,4	н.о.	67,5±0,5	н.о.

Примечание: * – для титрации использовали значения концентрации, определенные на 1-е сутки [(315,9±0,9)$\times 10^9$ м.к. в 1 мл].

при сепарировании из-за уноса части клеточной биомассы в фугат; длительность процесса. Вышеперечисленные недостатки были устранены за счет использования концентрирования клеток *B. melitensis* REV-1 микрофильтрацией в тангенциальном потоке жидкости с применением плоскорамных мембранных модулей с порогом отсечки 0,2 мкм. При этом полученные концентраты полностью удовлетворяли требованиям нормативных документов [6].

На следующем этапе исследований определяли максимальный временной промежуток после получения концентрированной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ до начала процесса сублимационного высушивания. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Анализ данных таблицы 2 свидетельствует о том, что оптимальное время хранения концентрированной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ при комнатной температуре составляет не более 3 сут, в условиях холодильника – не более 6 сут. По показателям концентрации микробных клеток и их жизнеспособности концентрат полупродукта соответствовал нормируемым значениям при хранении до 1 месяца при температуре от 2 до 8 °С. Возможно, что добавление в концентрат криопротекторов среды высушивания позволит увеличить продолжительность хранения без ухудшения показателя «степень диссоциации».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенных исследований экспериментально оценены следующие методы концентрирования биомассы *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ с целью использования в производстве живой туляремийной вакцины: седиментация, центрифугирование и тангенциальная фильтрация. Сравнительное изучение временных характеристик процессов, свойств полученных концентратов выявило преимущественность применения метода тангенциальной фильтрации. Выявлены температурно-временные режимы хранения концентрата туляремийного микроба до его переработки. Показана целесообразность хранения полупродукта до его дальнейшей переработки при температуре 2–8 °С не более 6 сут.

ЛИТЕРАТУРА

1. Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 31 января 2011 г. № 51н. URL: http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/4092137/ (дата обращения 18.11.2016).
2. ФС.3.3.1.0019.15. Вакцина туляремийная живая // Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. III. – М.: ФЭМБ, 2015. С. 952–957.
3. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения. Вакцина туляремийная живая // Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=9ba98af5-a6d4-4b6f-afd9-5ff24b64bc65&t= (дата обращения 21.11.2016).
4. Патент RU № 2518282, МПК C12N1/20. Питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба / О.А. Волох, М.В. Антонычева, Н.Г. Авдеева, Н.И. Вахрушина, А.К. Никифоров. – Бюлл. № 16. 2014.
5. Авторское свидетельство № 1792969 СССР, кл. С 12 N 1/02. Способ концентрирования бактериальных спор / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, Ю.В. Числов и др. Заявл. 20.12.1988; опубл. 07.02.1993.
6. А.В. Пиков. Оценка различных фильтрующих модулей в технологии мембранного концентрирования нативных культур клеток *Brucella melitensis REV-1* для получения полуфабриката противобруцеллезной вакцины // Ветеринарная медицина. 2009. № 4. С. 4–6.

УДК 615.4

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР)

А.А. Новикова[1]*, П. Кезимана[1], Я.М. Станишевский[1]

Резюме. В статье представлен обзор по основным способам получения липосомальных лекарственных препаратов, таким как конвекционный, звуковой методы, метод высокого давления, метод растворения и удаления детергента и метод испарения с обращением фаз. Показаны проблемы технологии гидрофобных антиоксидантных средств (низкая растворимость и химическая стабильность данных лекарственных веществ) и преимущества липосом для их доставки. Установлено, что наиболее перспективной технологией получения липосом с лекарственными веществами, обладающими антиоксидантными свойствами, является метод гидратации тонкой пленки с дальнейшим озвучиванием.

Ключевые слова: липосомы, фосфолипиды, направленный транспорт, метод гидратации тонкой пленки, ультразвуковое воздействие.

METHODS OF OBTAINING LIPOSOMES, USED AS DRUG DELIVERY SYSTEMS (REVIEW)

A.A. Novikova[1]*, P. Kezimana[1], Ya.M. Stanishevskiy[1]

Abstract. The article presents an overview of the main methods for producing liposomal medications, such as convectional and acoustic methods, high pressure method, detergent dissolution and removal method and the vapor method with phase inversion. The problems of hydrophobic technology of antioxidant pharmaceuticals (low solubility and chemical stability of such drug) and the advantages of liposomes to deliver them are reported. It is established that the most promising technology of producing liposomes containing drugs with antioxidant effects is a thin film hydration method with further sonication.

Keywords: liposomes, phospholipids, directional transport, thin film hydration method, sonication.

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Институт биохимической технологии и нанотехнологии), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

1 – Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology), 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: annterskih@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних нескольких десятилетий во всем мире активно исследуются вопросы создания инновационных препаратов, которые содержат системы направленной доставки или системы направленного транспорта лекарственных веществ. Такие системы смогут позволить контролировать распределение по тканям, адсорбцию, метаболизм и выведение лекарственного препарата из организма пациента, а также улучшить биодоступность и биосовместимость препарата [1–6].

Особый интерес в области разработки систем направленного транспорта лекарств вызывают переносчики на основе фосфолипидов (липосомы). Благодаря ряду преимуществ с помощью липосом можно транспортировать очень широкий спектр препаратов – от традиционных лекарственных субстанций до генных конструкций. Многие лекарственные препараты, инкапсулируемые в липосомы, уже нашли свое применение в медицине [7–11].

Важную роль средства транспортировки препаратов играют в фармакологии новых антиоксидантных средств [12]. Антиокислительные агенты чаще всего имеют низкую растворимость, плохую химическую стабильность и в этой связи быстро разрушаются в пищеварительном тракте [13]. Решением перечисленных проблем становится применение антиоксидантных средств в липосомальной форме.

Целью настоящей работы является информационно-аналитическое исследование по некоторым способам получения липосомальных носителей и их особенностям.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМ

В литературе описаны различные методы получения липосомальных частиц. Одни из наиболее популярных: конвекционный, звуковой методы, метод высокого давления, метод растворения и удаления детергента и метод испарения с обращением фаз [14–25].

Конвекционный метод (метод гидратации тонкой пленки)

По этой методике фосфолипиды растворяются в смеси органических растворителей и при использовании роторного испарителя откладываются в виде тонкой пленки на стенках круглодонной колбы. В качестве органических растворителей обычно используют смеси, содержащие в своем составе полярный растворитель, например метанол. При добавлении водного буфера, содержащего в избыточном объеме лекарственное вещество, в образовавшейся тонкой пленке происходит образование многослойных липидных везикул. Включение лекарственного вещества в липосомы зависит от времени гидратации высушенной пленки и от условий перемешивания реакционной массы. Отделить невключенное лекарственное вещество можно посредством центрифугирования или гель-фильтрации [14]. Установлено, что при гидратировании липидов в течение 20 ч при слабом перемешивании, в липосому включается наибольшее количество водной фазы. Чтобы сократить время гидратации до 2 ч, колбу с эмульсией необходимо интенсивно встряхивать [15].

Звуковой метод (метод озвучивания)

Целью данного метода является получение гомогенной дисперсии малых везикул, которые способны проникать в ткани организма. Многослойные везикулы, приготовленные конвекционным методом, подвергают звуковой обработке с использованием пульсирующих звуковых волн высокой частоты. В результате такой обработки в суспензии образуются однослойные везикулы диаметром 15–50 нм [16]. Недостатками этого метода являются:

1) денатурация или инактивация некоторых термочувствительных веществ (например, ДНК, некоторых белков и др.), включаемых в липосомы;
2) окисление ненасыщенных связей в цепях остатков жирных кислот фосфолипидов;
3) гидролиз фосфолипидов с образованием лизофосфолипидов и свободных жирных кислот [17];
4) неустойчивость везикул и их склонность к слиянию и, таким образом, укрупнению.

Метод высокого давления (экструзии)

В работе [15] многослойные везикулы, приготовленные конвекционным методом, под высоким давлением пропускали через поликарбонатные мембраны с широким диапазоном диаметров пор. Однако при экструзии используются фильтры из других материалов, совместимых с лекарственным веществом. Таким образом, размер везикул можно варьировать, подбирая фильтры с желаемым диметром пор. Преимуществом экструзионного метода является получение липосом с гомогенным распределением по размеру. Также, в результате продавливания многослойных липосом сквозь малые поры снимаются последовательные слои липидных мембран, что приводит к образованию однослойных везикул. Метод экструзии применим для получения стабильных липосом с различным липидным составом [18, 19]. Наиболее часто используемое давление в данном методе – 5 МПа, но при низкой концентрации липидов также возможна и экструзия при низких давлениях (≈1 МПа) [20]. С помощью экструзионного метода можно получить только небольшие количества липосом. Для обеспечения наиболее высокого выхода продукта был предложен метод непрерывной экструзии под высоким давлением до 10,5 МПа [21].

Метод растворения и удаления детергента

В данном методе в качестве растворителя для липидов используется детергент (неионный, анионный или катионный сурфактант). Метод растворения и удаления детергента позволяет получить большие однослойные везикулы [22]. Детергент должен иметь высокую критическую концентрацию мицеллообразования, для того чтобы его можно было легко удалить диализом или колоночной хроматографией. Растворение липидов осуществляется в водном растворе детергента и белков, подлежащих инкапсуляции [23]. Образование одномембранных везикул диаметром 80–200 нм происходит при удалении детергента из смеси. Данный метод наиболее применим для инкапсуляции белков биомедицинского назначения [24].

Метод испарения с обращением фаз

По данной методике водный раствор лекарственного вещества быстро вводится в органический раствор липидов. Одновременно смесь подвергают звуковой обработке, что приводит к образованию эмульсии – капель воды в органическом растворителе [25]. Далее полученную эмульсию высушивают до полутвердого геля с использованием роторного испарителя. После гель подвергается сильному механическому воздействию до получения фазового изменения из дисперсии «вода в масле» в «масло в воде» (т.е. водную суспензию везикул). В ходе механического воздействия некоторые капли воды образуют внешнюю фазу, в то время как другие – замкнутый внутри везикул водный объем. При использовании этого метода становится возможным получение однослойных везикул диаметром от 0,1 до 1 мкм для инкапсуляции как малых, так и больших молекул (РНК и различные ферменты, без потери активности) [17, 25]. По сравнению с везикулами, полученными методом гидратации тонкой пленки с последующей звуковой обработкой, липосомы, полученные методом испарения с обращением фаз, имеют больший объем захватываемой водной среды и большую эффективность инкапсуляции гидрофильных лекарств [26]. В некоторых случаях метод может иметь следующие ограничения в использовании:

1) долгая выдержка материала, подлежащего инкапсуляции, в органических растворителях не всегда возможна;

2) механическая обработка может привести к денатурации некоторых белков или разрыву цепей ДНК [17].

Ряд сложностей при получении липосомальных лекарственных форм представляет включение в них гидрофильных веществ. Однако многие антиоксиданты, которые в настоящее время имеют перспективы разработки липосомальных препаратов, являются гидрофильными.

Наиболее часто применяемым методом для включения антиоксидантов в липосомальную оболочку является метод гидратации тонкой пленки. В результате образуются многослойные везикулы, после чего происходит получение мелких однослойных везикул посредством звуковой обработки или пропусканием суспензии через фильтры экструдера. В таблице 1 приведены примеры получения липосомальных препаратов с антиоксидантной активностью методом гидратации тонкой липидной пленки и методом озвучивания (ультразвуковой обработки).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди способов получения липосом наиболее часто в литературе упоминаются конвекционный, звуковой методы, метод высокого давления, метод растворения и удаления детергента и метод испарения с обращением фаз. Каждый из этих способов имеет свои особенности. Так, методом озвучивания можно получить из крупных липосом, полученных конвекционным методом, однослойные везикулы диаметром 15–50 нм. При этом следует отметить, что метод озвучивания не подходит для некоторых термочувствительных веществ (например, ДНК, некоторых белков и др.), включаемых в липосомы, а также может приводить к окислению и гидролизу фосфолипидов.

Методом высокого давления возможно получить однослойные везикулы, но лишь в небольшом количестве. Для получения большого количества однослойных липосом больше подходит способ растворения и удаления детергента.

Использование метода испарения и обращения фаз рационально, когда требуется получить большие однослойные везикулы.

По сравнению с везикулами, полученными методом гидратации тонкой пленки с последующей звуковой обработкой, липосомы, полученные методом испарения с обращением фаз, имеют больший объем захватываемой водной среды и большую эффективность инкапсуляции гидрофильных лекарств. Однако метод испарения с обращением фаз также не лишен недостатков. Среди них – возможность денатурации некоторых белков или разрыв цепей ДНК материала, подлежащего инкапсуляции, в процессе механической обработки.

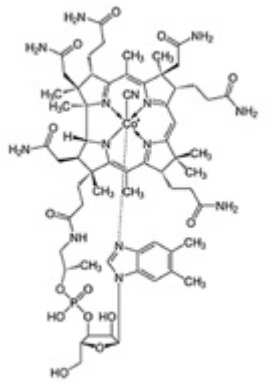
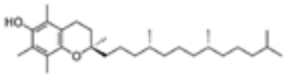
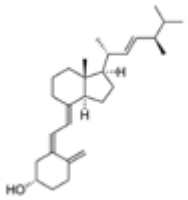
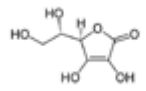
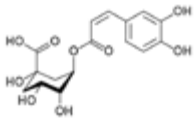
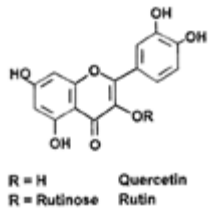
Наиболее перспективной технологией получения липосом с лекарственными веществами, обладающими антиоксидантными свойствами, является метод гидратации тонкой пленки с дальнейшим озвучиванием.

ЛИТЕРАТУРА

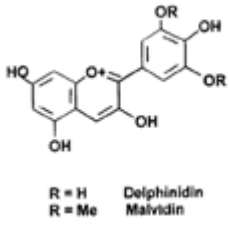
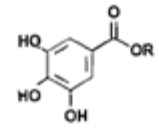
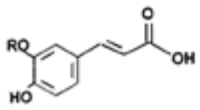
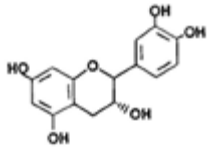
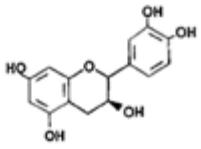
1. T. Stozek. The Effect of Entrapment of Procaine Hydrochloride in Liposomes on Local Anesthetic Action // Pharmazie. 1989. V. 44(7). P. 466–468.
2. B. Haley, E. Frenkel. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment // Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. 2008. V. 26. P. 57–64
3. Y. Barenholz. Liposome application: problems and prospects // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2001. 6. P. 66–77.
4. M.K. Basu. Liposomal delivery of antileishmanial agents // Journal of Applied Research. 2005. V. 5(1). P. 221–236
5. J.K. Vasir, M.K. Reddy, V.D. Labhasetwar. Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges // Current Nanoscience. 2005. V. 1(1). P. 47–64.
6. Н.Б. Демина. Биофармация – путь к созданию инновационных лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 5.
7. C.G. Thanos, D.F. Emerich. Choroid Plexus Epithelial Cell Transplants for Repair of the Brain // Cellular Transplantation. 2007. P. 399–416.
8. U.K. Nassander, G. Storm, P.A.M. Peeters, D.J.A. Crommelin. Liposomes // Biodegradable polymers as drug delivery systems / Ed. by M. Chasin, R. Langer. – New York: Marcel Dekker, 1990. P. 261–338.
9. G. Storm , S.O. Belliot, T. Daemen, D.D. Lasic. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system // Adv. Drug Deliv. Rev. 1995. V. 17. P. 31–48
10. A.S. Ulrich. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles // Bioscience Reports. 2002. V. 22(2). P. 129–150
11. R. Tong, Y. Boucher, S. Kozin. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors // Cancer Res. 2004. V. 64. P. 3731–3736.
12. D.B. Fenske, P.R. Cullis. Liposomal nanomedicines // Expert Opin. Drug Deliv. 2008. V. 5(1). P. 25–44.
13. Р.А. Мухамадияров, А.В. Веремеев, Н.Е. Марцияш, В.Г. Зинчук. Влияние α-токоферола на динамику процессов липопероксидации в липосомах, полученных методами ультразвуковой сонификации и экструзии, при различных температурах хранения // Фундаментальные исследования 2012. № 6. С. 566–570.
14. A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. P. 238–252.
15. F. Olson, C.A. Hunt, F.C. Szoka, W.J. Vail, D. Papahadjopoulos. Preparation of liposoms of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes // Biochim Biophys Acta. 1976. V. 557. P. 9–23.
16. S.M. Johnson, A.D. Bangham, M.W. Hill, E.D. Korn. Single bilayer liposomes // Biochim Biophys Acta. 1971. V. 233. P. 820–826.
17. M.U. Uhumwangho, R.S. Okor. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review // JMBR: A Peer-review Journal of Biomedical Sciences.2005. V. 4. № 1. P. 9–21.
18. R. Nayar, M.J. Hope, P.R. Cullis. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholine by extrusion techniques // Biochim Biophys Acta. 1989. V. 986. P. 200–206.
19. M.J. Hope, M.B. Bally, G. Webb, P.R. Cullis. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterisation of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential // Biochim Biophys Acta. 1985. V. 812. P. 55–65.
20. S. Amselem, A. Gabizon, Y. Barenholz. A large-scale method for the preparation of sterile and non pyrogenic liposomal formulations of defined size distributions for clinical use // Liposome Technology. 2nd Edition / Ed. by G. Gregoriadis. – Boca Raton: CRC Press, 1993. P. 501–525.

Таблица 1.

Способы получения липосомальных препаратов с антиоксидантами [27–30]

Антиоксидант	Состав липидной оболочки	Метод	Раств-ли	Буфер	Размер липосом	Ист.
Цианокобаламин (Витамин B_{12}) 	L-α-фосфатидилхолин (ФХ) Холестерин (ХОЛ) L-α-фосфатидил-DL-глицерин натриевая соль (ФГ) (10:8:1)	Метод гидратации тонкой пленки (мультиламеллярные везикулы, МЛВ) с дальнейшим озвучиванием (малые моноламеллярные везикулы, ММВ)	$CHCl_3$/ CH_3OH (2:1)	Буферный раствор фосфата pH 7,4	МЛВ 5770±1230 нм ММВ 51±28 нм	27
α-Токоферол (Витамин Е) 	L-α-фосфатидилхолин (ФХ) Холестерин (ХОЛ) (20:1)	Метод гидратации тонкой пленки (МЛВ) с дальнейшим озвучиванием (ММВ)	$CHCl_3$/ CH_3OH (2:1)	Буферный раствор фосфата pH 7,4	МЛВ 3890±1720 нм ММВ 40±9 нм	27
Эргокальциферол (Витамин D_2) 	L-α-фосфатидилхолин (ФХ) Холестерин (ХОЛ) (20:1)	Метод гидратации тонкой пленки (МЛВ) с дальнейшим озвучиванием (ММВ)	$CHCl_3$/ CH_3OH (2:1)	Буферный раствор фосфата pH 7,4	МЛВ 2960 1970 нм ММВ 48±37 нм	27
L-аскорбиновая кислота (Витамин С) 	L-α-фосфатидилхолин (ФХ) Холестерин (ХОЛ) (20:80, 40:60, 60:40 и 80:20) Хитозан	Метод озвучивания	C_2H_5OH	Буферный раствор фосфата pH 7,4	ММВ 80 нм	28
3-кофеилхинная кислота (Хлорогеновая кислота) 	Соевый лецитин Холестерин (ХОЛ) (5:1)	Метод гидратации тонкой пленки (большие моноламеллярные везикулы (БМВ))	CH_2Cl_2 C_2H_5OH	–	БМВ 132,15±3,03 нм	29
Кверцитин, рутин 	Соевый лецитин (L-α-фосфатидилхолин 80%)	Метод озвучивания	C_2H_5OH/ Янтарная кислота	Янтарно кислый буфер pH 4,7 (без или с 0,16% альбумином бычей сыворотки)	ММВ 30–100 нм	30

Окончание табл. 1

Антиоксидант	Состав липидной оболочки	Метод	Раств-ли	Буфер	Размер липосом	Ист.
Мальдивин, Дельфинин 	Соевый лецитин (L-α-фосфатидилхолин 80%)	Метод озвучивания	C_2H_5OH	Янтарно кислый буфер pH 4,7 (без или с 0.16% альбумином бычей сыворотки)	ММВ 30–100 нм	30
Кислоты Катехины    (+)-Epicatechin  (+)-Catechin	Соевый лецитин (L-α-фосфатидилхолин 80%)	Метод озвучивания	Феноль-ные смолы	Янтарно кислый буфер pH 4,7 (без или с 0,16% альбумином бычей сыворотки)	ММВ 30–100 нм	30

21. T. Schneider, A. Sacfse, G. Robling, M. Brandl. Generation of contrast-carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method // Int J Pharm. 1995. V. 119. P. 1–12.
22. J. Brunner, P. Skrabai, H. Hauser. Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physicochemical properties // BiochimBiophys Acta. 1976. V. 455. P. 322–331.
23. N. Weiner, F. Martin, M. Riox. Liposomes as drug delivery system // Drug Dev Ind Pharm. 1989. V. 15. № 10. P. 1523–1554.
24. F. Frezard. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines // Braz J Biol Res. 1999. V. 32. № 2. P. 181–189.
25. F. Szoka, D. Papahadjopoulos. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase // Proceeding to the National Academy of Sciences. 1978. V. 75. P. 4194–4198.
26. B. Tiwari Sandip, N. Udupa, B.S.S. Rao, P. Uma Devi. Thermosensitive liposomes and localised hyperthermia – an effective bimodality approach for tumour management // Indian Journal of Pharmacology. 2000. V. 32. P. 214–220.
27. S. Bochicchio, A.A. Barba, G. Grassi, G. Lamberti. Vitamin delivery: Carriers based on nanoliposomes produced via ultrasonic irradiation // LWT – Food Science and Technology. 2016. V. 69. P. 9–16.
28. N. Liu, H.J. Park. Factors effect on the loading efficiency of Vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2010. V. 76. P. 16–19.
29. Y. Feng, C. Sun, Y. Yangyang, et al. Enhanced oral bioavailability and *in vivo* antioxidant activity of chlorogenic acid via liposomal formulation // International Journal of Pharmaceutics. 2015.
30. M. Heinonen, D. Rein, T.M. Satue´-Gracia, J. S.-W. Huang, B. German, E.N. Frankel. Effect of Protein on the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in a Lecithin-Liposome Oxidation System // J. Agric. Food Chem. 1998. V. 46. P. 917–922.



УПАКОВКА ВСЕХ ТИПОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Крупнейший национальный дистрибьютор технологического оборудования в России ГК «Фармконтракт» представляет широкий спектр решений для упаковки жидких, мягких и твердых лекарственных форм на базе европейских и корейских производителей фасовочно-упаковочного оборудования:

ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА





Розлив продуктов в банки и флаконы с последующей укупоркой и закруткой



Фасовка вязких продуктов в пластиковые и алюминиевые тубы, производительность до 8 000 туб в час



Фасовка порошков и гранул в саше



Розлив до 200 контейнеров в минуту в виалы, шприцы и картриджи с последующей укупоркой

ВТОРИЧНАЯ УПАКОВКА

Фасовка в коробки



Групповая упаковка



Решения по упаковке готовых лекарственных форм от ГК «Фармконтракт» - 100% гермитичность, а значит, гарантия качества и сохранности лекарственных средств даже в самых экстремальных условиях транспортировки!

ГРУППА КОМПАНИЙ "ФАРМКОНТРАКТ" – ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

8 800 775-87-10
(БЕСПЛАТНЫЙ ЗВОНОК ПО РОССИИ 24 ЧАСА)

www.phct.ru
info@phct.ru

Pharmcontract® group of companies

УДК 6.61.615.1

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖЕЛЕЗА В ГЕМОСТАТИЧЕСКОМ СРЕДСТВЕ

Ю.Н. Барсукова[1]*, О.А. Мельникова[1], М.Ю. Мельников[1]

Резюме. В статье представлены данные по разработке методики фотометрического определения хлорида железа (III) в гемостатическом средстве с помощью химической реакции образования салицилатов железа. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, сходимость. По результатам исследования основные валидационные характеристики метода соответствуют критериям приемлемости. Методика предназначена для определения железа в окрашенных растворах лекарственных препаратов в диапазоне 0,04-0,1 г/мл. Относительная погрешность измерения 0,83%.

Ключевые слова: гемостатическое средство, хлорид железа, количественное определение.

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION OF PHOTOMETRIC DETERMINATION OF IRON IN HEMOSTATIC TOOL

Yu.N. Barsukova[1]*, O.A. Melnikova[1], M. Yu. Melnikov[1]

Abstract. The article presents data on the development of a technique of photometric determination of ferric chloride (III) as a hemostatic tool, through the formation of salicylates iron. The developed method was validated for following validation characteristics: specificity, linearity, accuracy. The results of the study the main validation characteristics of the method meet the acceptance criteria. The technique is intended for definition of iron in the painted solutions of medicines in the range of 0,04-0,07 g/ml. Relative error of measurement of 0,83%.

Keywords: hemostatic agent, ferric chloride, bleeding, quantitative determination.

1 – ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3

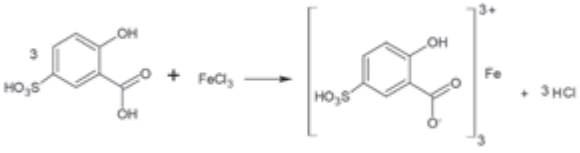
1 – Urals State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3, Repin str., Yekaterinburg, 620028, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: iulija.barsukowa@yandex.ru, newfarmacia@mail.ru
Тел.: 8 (909) 003 21 22

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время широкое применение для остановки наружного кровотечения в нейрохирургии находят гемостатические средства местного применения. Как правило, это губка гемостатическая коллагеновая, тахокомб, желпластан, изогенная фибринная пленка, фибриновый клей и другие. Однако несмотря на широкий ассортимент гемостатических лекарственных средств, поиск наиболее безопасных и эффективных средств данной группы сохраняет свою актуальность. В рамках поставленной задачи нами был разработан состав гемостатического средства, включающий хлорид железа (III), аминокапроновую кислоту и гидроксиэтилкрахмал. Железо содержится в гемоглобине крови, участвует в кроветворении, введение его в данный препарат приводит к проявлению гемостатических свойств и предотвращает развитие анемии. Введение аминокапроновой кислоты ингибирует активаторы профибринолизина и тормозит его превращение в фибринолизин. Плазмозамещающее средство гидроксиэтилкрахмал длительно циркулирует в кровяном русле, обеспечивая общий объём циркулирующей крови, способствует нормализации и улучшению гемодинамических показателей, поддерживает артериальное давление [1].

В качестве метода количественного определения железа в созданной лекарственной форме предложена фотометрия с сульфосалициловой кислотой. Химизм реакции можно представить схемой:



Как видно из рисунка, ион железа III образует с сульфосалициловой кислотой ряд комплексов, состав и окраска которых зависят от кислотности раствора. При pH=3 образуется соединение фиолетового цвета состава 1:1. Светопоглощение этого комплекса максимально при λ=510 нм (ε=1600).

Целью данного исследования является разработка методики фотометрического определения железа с сульфосалициловой кислотой в лекарственной форме гемостатического средства и ее валидация.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования является гемостатическое средство. Его состав представлен в таблице 1.

Таблица 1.

Состав гемостатического средства

Ингредиент	Масса, г (Объем, мл)
Хлорид железа III	5,0*
Гидроксиэтилкрахмал	2,5
Кислота аминокапроновая	1,25
Вода очищенная	100,0

Примечание: * – концентрация хлорида железа в растворе 0,05 г/мл.

Аппаратура: Фотометр КФК-3 ЗОМЗ (Загорский опытный завод пластмасс, Россия); лабораторные аналитические весы CE-224C («Сартогосм», Россия, технология Sartorius, Германия).

Реактивы. В экспериментальных исследованиях использовали:

- хлорид железа III 6-водный (х.ч., ОАО «Бром», Россия);
- гидроксиэтилкрахмал (ОАО НПК «Эском», Россия);
- кислоту аминокапроновую (х.ч., ООО «Полисинтез», Россия);
- кислоту сульфосалициловую 2-водную (х.ч., 25% раствор, ЗАО «Ереванский завод химреактивов», Армения);
- квасцы железоаммонийные (ЖАК) (ч., ЗАО «НПО ЭКРОС», Россия);
- кислоту серную (х.ч., 0,05 М раствор, «Химитекс», Россия);
- кислоту азотную разв. (х.ч., ООО «ХимТТ», Россия);
- воду очищенную.

Посуда. Пипетка градуированная (10 $см^3$) и простая (2 $см^3$) (ГОСТ 29227-9). Колба плоскодонная мерная с цилиндрической горловиной (50 и 250 $см^3$). Цилиндры мерные (10 и 25 $см^3$) (ГОСТ 29044-91 и ГОСТ 1770-74).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

При разработке методики учитывали такие параметры, как объем аликвоты, длина волны, при которой светопоглощение комплекса максимально. В результате предложенная нами методика состоит из следующих этапов.

1. Приготовление стандартных растворов сульфосалицилата железа

Отбирают 2, 4, 6, 8, 10, 12 и 14 мл рабочего раствора железоаммонийных квасцов в мерные колбы объемом 50 мл, в каждую колбу добавляют 3 мл раствора сульфосалициловой кислоты, 1 мл серной кислоты и доводят до метки дистиллированной водой. Затем отбирают 10 мл раствора в колбу объемом 250 мл, доводят объем колбы водой до метки.

Приготовление основного стандартного раствора железоаммонийных квасцов. 30 г квасцов железоаммониевых растворяют в 100 мл воды; к раствору прибавляют разведенную азотную кислоту до перехода коричневой окраски в жёлто-зеленую. Раствор хранят в защищенном от света месте [2].

Приготовление рабочего раствора железоаммонийных квасцов. Полученный основной стандартный раствор разбавляют в 30 раз. Концентрация составляет 0,01 г/мл.

2. Снятие спектра поглощения сульфосалицилата железа, выбор светофильтра

Раствор с наибольшей концентрацией [$C(Fe^{3+})$ = 0,192 мг/мл] наливают в кювету фотоэлектроколориметра (l=1 см); в качестве раствора сравнения используют воду. Измеряют оптическую плотность полученного раствора в диапазоне длин волн 400–600 нм. Выбирают для дальнейшей работы светофильтр, соответствующий максимуму поглощения света окрашенным соединением (λ_{max}). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Выбор оптимальной длины волны

Длина волны, нм	Оптическая плотность
416	0,734
510	1,127
520	1,016
545	0,914

Максимальное значение оптической плотности при данном разведении наблюдается при длине волны λ=510 нм (зелёный светофильтр). Таким образом, светопоглощение образовавшегося комплекса максимально при данной длине волны.

3. Построение градуировочного графика (рисунок 1)

Для построения градуировочного графика измеряют оптическую плотность приготовленных стандартных растворов железоаммонийных квасцов, содержащих различное количество железа.

Измеряют оптическую плотность стандартных растворов ($A_{ст}$) при длине волны λ=510 нм (три параллельных измерения для каждого раствора). Данные заносятся в таблицу 3.

Таблица 3.

Построение градуировочного графика железоаммонийных квасцов

$C(Fe^{3+})$, мг/мл	Оптическая плотность A			
	A_1	A_2	A_3	$A_{ср}$
0,016	0,219	0,220	0,219	0,219
0,032	0,234	0,234	0,234	0,234
0,064	0,301	0,297	0,297	0,298
0,096	0,505	0,505	0,510	0,506
0,126	0,569	0,567	0,570	0,569
0,160	0,784	0,782	0,783	0,783
0,192	1,127	1,126	1,126	1,126

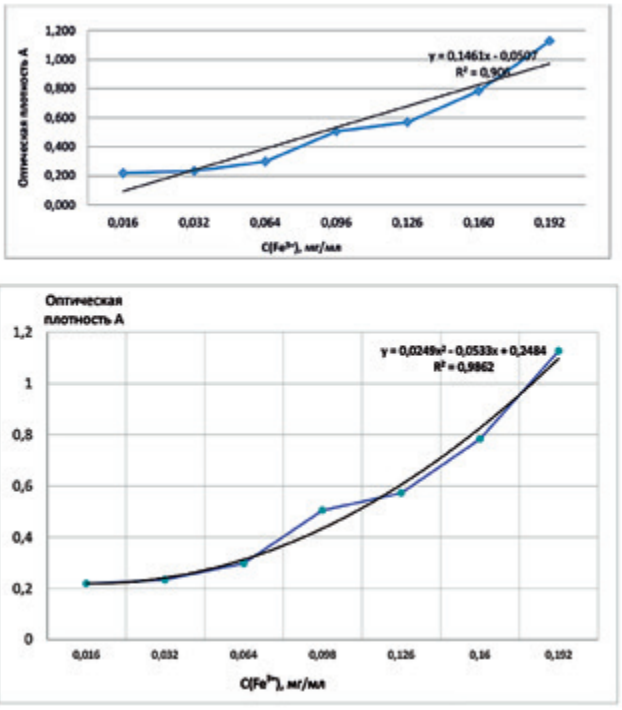


Рисунок 1. Градуировочный график железоаммонийных квасцов с концентрацией рабочего стандартного раствора 0,01 г/мл

4. Фотометрирование гемостатического средства

10 мл гемостатического средства (состав представлен в таблице 1) помещают в колбу объемом 250 мл (V_1) и доводят до метки дистиллированной водой. Перемешивают, отбирают аликвоту 10 мл (V_n) и помещают ее в колбу объемом 250 мл (V_2). Затем в нее добавляют 3 мл сульфосалициловой кислоты, 1 мл серной кислоты и доводят до метки. Измеряют оптическую плотность A_x (шесть параллельных определений) при длине волны λ=510 нм (l=1 см). Раствор сравнения – вода дистиллированная. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Значение оптической плотности гемостатического средства при длине волны λ=510 нм

Оптическая плотность	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	$A_{ср}$
Гемостатическое средство	0,885	0,874	0,878	0,884	0,879	0,883	0,881

По градуировочному графику (рисунок 1) рассчитывают концентрацию ионов железа (при использовании уравнения кривой **y = 0,1461x – 0,0507**).

Далее производят расчет количественного содержания иона железа III по формуле:

$$g = \frac{C(Fe^{3+}) \cdot V_2 \cdot V_1}{1000 \cdot V_n} = \frac{C(Fe^{3+}) \cdot 250 \cdot 250}{1000 \cdot 10 \cdot 10},$$

где $C(Fe^{3+})$ – концентрация ионов железа III, вычисленная с использованием градуировочного графика, мг/мл; V_1 – объем мерной колбы, мл; V_2 – объем мерной колбы, мл; V_n – объем раствора, взятый из мерной колбы для анализа, мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные в результате фотометрического определения железа III, и данные их статистической обработки с использованием Microsoft Excel представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Статистическая обработка результата фотоколориметрического определения иона железа III в гемостатическом средстве. Метрологическая характеристика метода анализа (P = 95 %; n = 6)

№	A	C(Fe), мг/мл	X, г/мл	$X_{ср}$, г/мл	ΔX	ε, %	$X_{абсол}$	$X_{ср}$±ΔX, г/мл
1	0,885	0,0785985	0,049124063	0,048713	0,000405	0,832086	0,05	0,0487±0,0004
2	0,874	0,0769914	0,048119625					
3	0,878	0,0775758	0,048484875					
4	0,884	0,0784524	0,04903275					
5	0,879	0,0777219	0,048576188					
6	0,883	0,0783063	0,048941438					
		y = 0,1461x – 0,0507			f=6–1=5			

Примечание: Полученный результат: **$X(Fe^{3+})$**=0,0487±0,0004, г/мл.

РАСЧЕТ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ

Валидацию методики фотометрического определения железа с сульфосалициловой кислотой в гемостатическом средстве проводили по таким характеристикам, как специфичность, линейность, правильность и сходимость (повторяемость) [3].

1. Специфичность методики

Специфичность аналитической методики считается доказанной, если ни растворитель, ни компоненты плацебо не искажают результат. Для определения данного показателя необходимо приготовить ряд модельных смесей.

Для установления специфичности методики требуется проанализировать модельные смеси по следующей методике: 10 мл каждой модельной смеси поместить в колбу объемом 250 мл (V_1), довести до метки дистиллированной водой. Перемешать, отобрать аликвоту 10 мл (V_n) и поместить ее в колбу объемом 250 мл (V_2), добавить 3 мл сульфосалициловой кислоты, 1 мл серной кислоты и довести до метки дистиллированной водой. Измерить оптическую плотность A_x (шесть параллельных определений) при длине волны λ=510 нм (l=1 см). Состав модельных смесей и результаты представлены в таблице 6.

Заключение по показателю «специфичность»: таким образом, полученные результаты соответствует требованию валидации по показателю специфичность фотометрического определения железа с сульфосалициловой кислотой, так как модельные смеси № 1, 2, 3, 4 не поглощают свет при длине волны 510 нм, а модельная смесь № 5 – поглощает.

2. Линейность методики

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

Линейность выражается уравнением ***y=ax+b***. Это уравнение называют линейной регрессией. Параметр ***b*** градуировочной функции характеризует отрезок, отсекаемый на оси ординат и соответствующий значению холостого опыта, а коэффициент ***a*** характеризует наклон градуировочной кривой и является отражением чувствительности методики. В нашем случае градуировочный график железоаммонийных квасцов (рисунок 1) представлял собой полиномиальную функцию ***(y=0,0249x²–0,0533x+0,2484)***, поэтому для построения линейности нами был выбран линейный диапазон с концентрацией железа от 0,04 до 0,1 г/мл.

Для проверки линейности следует брать не менее 6 экспериментальных точек. При этом наиболее правильно использовать отдельные навески и затем готовить из них растворы соответствующих концентраций.

На характер градуировочного графика и на линейность в значительной степени могут оказывать влияние условия выполнения анализа: количество реактивов, концентрации анализируемых растворов и др.

Линейность аналитической методики показывает, что внутри заданного диапазона методики существует прямо пропорциональное соотношение между концентрациями исследуемого вещества в растворе и оптической плотностью при выбранной длине волны (510 нм).

Линейность доказывалась на 5 разных разведениях модельной смеси гемостатического средства: 0,04 мг/мл, 0,064 мг/мл, 0,08 мг/мл, 0,096 мг/мл, 0,112 мг/мл. Графическое представление линейности методики показано на рисунке 2.

Растворы модельной смеси готовили путем увеличения аликвоты по следующей схеме: отбираем 5, 8, 10, 12 и 14 мл гемостатического средства в мерные колбы объемом 250 мл, в каждую колбу добавляем 3 мл раствора сульфосалициловой кислоты, 1 мл серной кислоты и доводим до метки дистиллированной водой. Затем отбираем 10 мл раствора и помещаем в колбу на 250 мл, доводим объем колбы водой до метки. Измеряем оптическую плотность каждого раство-

Таблица 6.

Состав модельных смесей для показателя «специфичность методики»

№	Состав модельной смеси	Оптическая плотность							
		A_1	A_2	A_2	A_2	A_2	A_2	A_2	$A_{ср}$
1.	Вода (растворитель)	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000
2.	2,5% водный раствор гидроксиэтилкрахмала	0,001	0,002	0,003	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002
3.	1,25% водный раствор аминокапроновой кислоты	0,003	0,003	0,002	0,001	0,002	0,003	0,003	0,002
4.	Смесь 2+3	0,004	0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,003	0,004
5.	5% водный раствор хлорида железа III	0,823	0,836	0,822	0,823	0,824	0,823	0,824	0,825

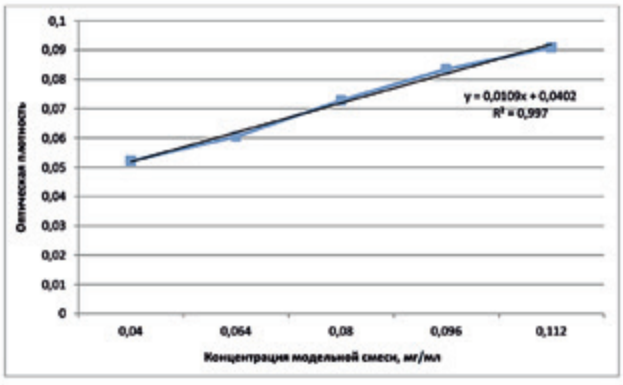


Рисунок 2. Графическое представление линейности фотометрического определения железа в гемостатическом средстве

ра на фотометре КФК-3 ЗОМЗ при λ=510 нм. Результаты представлены в таблицах 7 и 9.

Таблица 7.

Зависимость оптический плотности от концентрации

C_x, мг/мл	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	$A_{ср}$
0.04	0,053	0,052	0,052	0,053	0,051	0,052	0,052167
0.064	0,061	0,06	0,06	0,061	0,06	0,061	0,0605
0.08	0,074	0,072	0,07	0,075	0,075	0,071	0,072833
0.096	0,081	0,085	0,082	0,081	0,088	0,084	0,0835
0.112	0,095	0,09	0,089	0,09	0,089	0,092	0,090833

Полученные данные следует представлять в виде градуировочного графика с линией тренда, уравнения графика и величины коэффициента корреляции.

Основной характеристикой линейности является коэффициент корреляции, мера взаимосвязи изменяемых явлений (взаимосвязь).

Коэффициент корреляции составил 0,997.

Формулы и расчеты коэффициентов градуированного графика:

$$a = \frac{n \cdot \Sigma x_i \cdot y_i - \Sigma x_i \cdot \Sigma y_i}{n \cdot \Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2}$$

$$b = \frac{\Sigma x_i^2 \cdot \Sigma y_i - \Sigma x_i \cdot \Sigma x_i \cdot y_i}{n \cdot \Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2}.$$

Коэффициент корреляции (обозначается R) рассчитывается по специальной формуле:

$$r = \frac{m \times \sum_1^m x_i \times y_i - \sum_1^m x_i \times \sum_1^m y_i}{\sqrt{\left[m \times \sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i\right)^2\right] \times \left[m \times \sum_1^m y_i^2 - \left(\sum_1^m y_i\right)^2\right]}}.$$

Данные для расчетов представлены в таблице 8.

Таблица 8.

Результаты определения оптической плотности и концентрации. Расчёты

	x_i	y_i	$x_i \times y_i$	X^2	y^2
	0,04	0,048056	0,001922222	0,0016	0,002309
	0,064	0,061833	0,003957333	0,004096	0,003823
	0,08	0,074611	0,005968889	0,0064	0,005567
	0,096	0,087833	0,008432	0,009216	0,007715
	0,112	0,098278	0,011007111	0,012544	0,009659
	0,392	0,370611	0,031287556	0,033856	0,029073
Σ=	0,784	0,741222	0,062575111	0,067712	0,058145

Примечание: x – концентрация, мг/мл; y – аналитический сигнал (оптическая плотность).

Таблица 9.

Результаты методики по показателю «линейность»

Характеристика	Статистические характеристики	Результаты
Линейность	Уравнение прямой	y=0,0109x+0,0402
	Наклон (a)	0,0109
	Коэффициент корреляции	R^2=0,997
	Отрезок на оси ординат b: 95% доверительный интервал	0,0402

Заключение по показателю «линейность»: для аналитических целей можно использовать только ту методику, для которой зависимость функций от аргумента коррелируется с коэффициентом r, который должен быть ≥0,99.

Таким образом, полученные результаты находятся в пределах допустимых отклонений, так как валидация по показателю «линейность» может варьироваться в незначительных пределах.

3. Правильность методики

Правильностью аналитической методики называется степень близости экспериментальных результатов к истинному значению во всей области измерений. Главным фактором, определяющим правильность, является значение систематической погрешности.

Для оценки правильности методик количественного определения субстанции применимы следующие подходы:

- применение аналитической методики к образцу с известной степенью чистоты, например к стандартному образцу;
- сравнение результатов анализа, полученных с использованием валидируемой методики и арбитражного метода, правильность и прецизионность которого известны;

- заключение о правильности можно сделать после того, как установлены прецизионность, линейность и специфичность.

Оценка проводилась путем расчета процента определения известной концентрации, стандартного отклонения, коэффициента вариации (КВ) и доверительного интервала среднего значения (P=95%). Результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10.

Правильность фотометрического определения железа III

Уровень концентрации, %	Масса навески, г	$A_{ср}$	X, г/мл	R, %
80%	0,0411	0,734	0,0356	86,62
80%	0,0416	0,743	0,0362	87,02
80%	0,0418	0,748	0,0367	87,80
100%	0,0510	0,881	0,0486	97,2
100%	0,0505	0,879	0,0486	97,2
100%	0,0518	0,884	0,049	98,0
			y=0,1461x – 0,0507	
			$(C(Fe)\cdot V_2\cdot V_1)/(1000\cdot V_n)$	

Для тестирования методики на правильность готовятся модельные смеси с точным содержанием каждого из компонентов, включая и вспомогательные вещества. Согласно рекомендациям ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) необходимо проанализировать не менее 9 образцов на 3 уровнях концентраций [3]. Правильность методики устанавливается в указанном диапазоне ее применения. Для оценки полученных результатов наиболее простым и наглядным критерием служит открываемость (R), которая вычисляется по формуле:

$$R = \frac{\text{найдено аналита}}{\text{взято аналита}} \cdot 100\%.$$

При проведении анализа будут получены 9 значений открываемости.

Для более детальной оценки следует статистически обработать полученные значения R, рассчитав стандартное и относительное стандартное отклонение. Данные значения занесены в таблицу 11.

Заключение по показателю «правильность»: полученные результаты показывают, что методика соответствует требованиям валидации.

4. Сходимость (повторяемость) методики

Сходимость показывает, что методика анализа при проведении в одинаковых условиях обеспечивает получение сравнимых показателей. Сходимость была доказана при помощи испытаний проб действующего вещества – хлорида железа III. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 11.

Правильность фотометрического определения железа III, статистические характеристики

Статистические характеристики	Результат, %
Среднее значение	92,31
Стандартное отклонение	2,32
Коэффициент вариации (КВ)	5,95
Нижняя граница доверительного интервала (P=0,95)	86,26
Верхняя граница доверительного интервала (P=0,95)	98,26

Таблица 12.

Повторяемость фотометрического определения железа III

Проба	Оптическая плотность, А	Концентрация ионов железа III в пробе, мг/мл	Содержание хлорида железа III в пробе, г/мл
1	0,885	0,0785985	0,049124063
2	0,874	0,0769914	0,048119625
3	0,878	0,0775758	0,048484875
4	0,884	0,0784524	0,04903275
5	0,879	0,0777219	0,048576188
6	0,883	0,0783063	0,048941438

Оценка проводилась путем расчета процента определения известной концентрации, стандартного отклонения и доверительного интервала (P=95%). Расчеты приведены в таблице 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика фотометрического определения хлорида железа III в гемостатическом средстве. Проведена валидация разработанной методики; были доказаны специфичность, линейность, правильность и прецизионность методики. Диапазон аналитической методики 0,04–0,1 г/мл. Методика может быть воспроизведена в лабораторных условиях с доверительной вероятностью 95% и $X_{ср}\pm\Delta X=0,0487\pm0,0004$ г/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю.Н. Барсукова, О.А. Мельникова. Состояние фармацевтического рынка гемостатических лекарственных препаратов российской федерации// Сборник материалов «Современные тенденции развития науки и технологий» XVI Международной научно-практической конференции. Агентство перспективных научных исследований (АПНИ). 2016. № 7 (3). С. 13–15
2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. М3 СССР. 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. 399 с.
3. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея. XIII изд.
4. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Q2B «Validation of Analytical Procedures: Methodology». ICH: Geneva, 1997.

УДК 543.544

МЕТОДИКА СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОТРИАЗОЛА И ТРИАЗОЛОПИРИМИДИНОНА – СУБСТРАТА И ПОЛУПРОДУКТА СИНТЕЗА ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «ТРИАЗИД» МЕТОДОМ ВЭЖХ

А.В. Баклыков[1]*, А.А. Тумашов[1,2], С.К. Котовская[1,2], Е.Н. Уломский[1,2], Г.Л. Русинов[1,2], В.Л. Русинов[1,2], О.Н. Чупахин[1,2], В.Н. Чарушин[1,2]

Резюме. Разработана методика совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Для достижения наилучших хроматографических характеристик предложено использовать колонку с привитой аминофазой Zorbax NH_2 (Agilent Technologies, США). Возможность применения разработанной методики для осуществления технологического контроля первой стадии процесса получения препарата «Триазид» установлена по итогам проведения валидации.

Ключевые слова: аминотриазол, триазолопиримидинон, «Триазид», ВЭЖХ, валидация.

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF AMINOTRIAZOLE AND TRIAZOLOPYRIMIDINONE – SUBSTRATE AND INTERMEDIATE IN THE SYNTHESIS OF «TRIAZIDE» BY HPLC

A.V. Baklykov[1]*, A.A. Tumashov[1,2], S.K. Kotovskaya[1,2], E.N. Ulomskiy[1,2], G.L. Rusinov[1,2], V.L. Rusinov[1,2], O.N. Chupahin[1,2], V.N. Charushin[1,2]

Abstract. Method of simultaneous determination of aminotriazole and triazolopyrimidinone using HPLC with UV-detection was developed. For best chromatographic performance Zorbax NH_2 amino phase column (Agilent Technologies, USA) was selected. The applicability of the developed method for providing technological control of the 1st stage of «Triazide» production was approved according to the results of validation procedure.

Keywords: aminotriazole, triazolopyrimidinone, «Triazide», HPLC, validation.

1 – ФГБУН Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 620990, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 22 / Академическая, д. 20

2 – ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620002, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

1 – I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis UB of RAS, 22, S. Kovalevskaya str. / 20, Academicheskaya str., Yekaterinburg, 620990, Russia

2 – Ural Federal University named after the first president of Russia B.N. Yeltsin, 19, Mira str., Yekaterinburg, 620002, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: art.baklykov@gmail.com
Тел.: 8 (982) 643 07 77

ВВЕДЕНИЕ

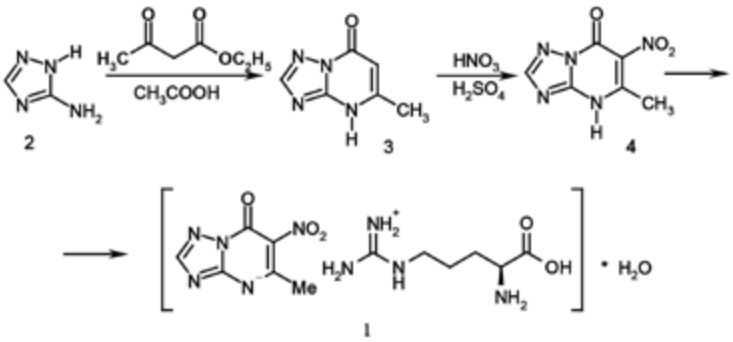
Одним из приоритетных направлений в области инновационного развития фармацевтической промышленности является разработка лекарственных средств для лечения и профилактики вирусных заболеваний. В результате совместных исследований Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Уральского федерального университета им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, НИИ гриппа МЗ РФ и ПАО «Отисифарм» разработан оригинальный противовирусный препарат «Триазид» (5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида *l*-аргинииния, моногидрат **1**), для которого проводятся клинические испытания [1]. В создании лекарственного средства важной составляющей наряду с эффективностью и безопасностью является технологичность процесса производства [2].

Процесс получения «Триазида» включает три химические стадии:

– циклоконденсация 5-амино-3-Н-1,2,4-триазола **2** (аминотриазола) с ацетоуксусным эфиром при кипячении в уксусной кислоте с образованием 5-метил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она **3** (триазолопиримидинона);

– нитрование триазолопиримидинона **3** нитрующей смесью с образованием 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она **4**;

– получение «Триазида» (5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида *l*-аргинииния **1)** при обработке соединения **4** *l*-аргинином.



Технологический контроль при проведении масштабирования технологии получения препарата и наработке опытно-промышленных партий занимает важное место в производстве лекарственных препаратов [2]. В процессе масштабирования и наработки опытно-промышленных партий субстанции препарата «Триазид» особое внимание уделялось методам контроля качества получаемых полупродуктов и продуктов синтеза.

На первой стадии процесса – циклоконденсации аминотриазола **2** в триазолопиримидинон **3** контролировали степень конверсии исходного субстрата, проводили количественную оценку содержания получаемого полупродукта **3** и содержания в нем примеси исходного вещества **2**.

В литературе описаны различные методы определения аминотриазола: газохроматографические [3, 4], методы капиллярного электрофореза [5, 6], методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [7, 8]. Определение аминотриазола сопряжено со многими трудностями, и большинство методик предполагает проведение дополнительной процедуры дериватизации. Аналитических методик совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона в литературе не найдено.

Целью данного исследования является разработка и валидация аналитической методики совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** – субстрата и полупродукта синтеза препарата «Триазид» – методом ВЭЖХ. Целесообразность проведения полной оценки метрологических характеристик обусловлена дальнейшим применением разработанной методики при осуществлении контроля опытно-промышленного и промышленного производства препарата «Триазид».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали жидкостной хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором и автосамплером, снабженный колонкой Zorbax NH_2 длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм (Agilent Technologies, США). Температуры колонки – 25 °С, температура автосамплера – комнатная. Режим элюирования – изократический. Скорость потока – 0,8 мл/мин. Детектирование осуществляли при длине волны 206 нм для аминотриазола **2** (рисунок 1), и при 270 нм – для триазолопиримидинона **3** (рисунок 2). Объем вводимой пробы – 10 мкл.

В качестве элюента использовали ацетонитрил (HPLC-grade, Sigma-Aldrich, США кат. № i10001) и буферный раствор 0,01 М ацетата аммония (Sigma-Aldrich, США кат. № 240192) в 0,1 % уксусной кислоте (х.ч. ледяная, ЗАО «Химреактивснаб», Россия) в соотношении 30:70.

Субстанция «Триазида» была синтезирована в Уральском федеральном университете им. первого Президента России Б.Н. Ельцина. Образцы полупродуктов были получены в технологической лаборатории Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН.

Все используемые субстанции растворяли в 1% растворе муравьиной кислоты (ч., ЗАО «Вектон», Россия).

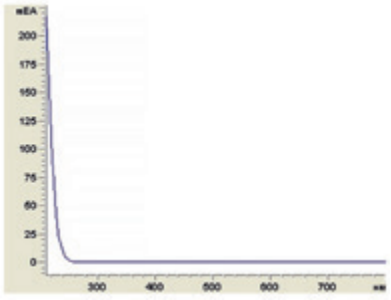


Рисунок 1. **УФ-спектр аминотриазола**

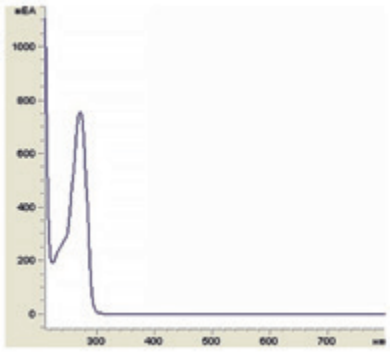


Рисунок 2. **УФ-спектр триазолопиримидинона**



Жидкостной хроматограф Agilent 1200

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке методики необходимо было подобрать оптимальные хроматографические условия для эффективного разделения веществ: тип колонки, состав подвижной фазы, условия элюирования.

Первоначально для проведения анализа и разделения исследуемых веществ использовали наиболее часто применяемую колонку с привитой обращенной фазой C_{18}, но время удерживания и разрешение пиков оказались недостаточными для проведения точного количественного определения. Поэтому было решено опробовать колонки с привитой аминофазой для определения полярных соединений – Zorbax NH_2 (амино-пропилсилановая фаза, Agilent Technologies, США) и Supelcosil LC-NH_2 (амино-пропиловая фаза, Supelco, США). Лучшие результаты были получены на колонке Zorbax NH_2, обеспечивающей наибольшую симметричность пиков при меньшем времени анализа по сравнению с колонкой Supelcosil LC-NH_2.

При выборе состава подвижной фазы были исследованы различные буферные растворы: 0,01 М ацетат аммония в 0,04% гидроксиде аммония (pH=9); 0,01 М ацетат аммония в 0,02% уксусной кислоте (pH=5); 0,01 М ацетата аммония в 0,1% уксусной кислоте; 0,1% муравьиная кислота в воде, в различных соотношениях с ацетонитрилом и метанолом. Лучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве элюента 0,01 М ацетата аммония в 0,1% уксусной кислоте (рисунки 3а – 3с).

Процедуру валидации разработанной методики осуществляли по следующим параметрам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность [9].

Аналитическая область методики для аминотриазола **2** – от 1 до 10 мг/г, для триазолопиримидинона **3** – 210–1050 мг/г.

Линейность методики характеризуется наличием линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

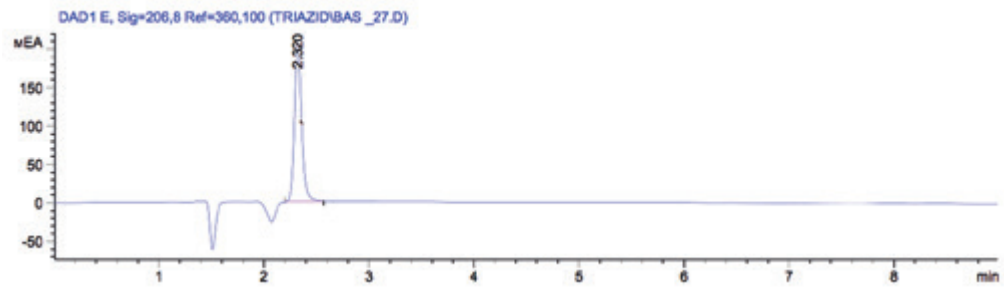


Рисунок 3a. **Хроматограмма аминотриазола, 206 нм**

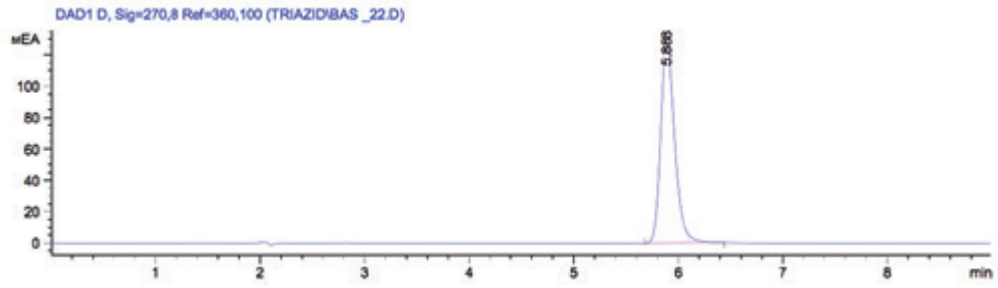


Рисунок 3b. **Хроматограмма триазолопиримидинона, 270 нм**

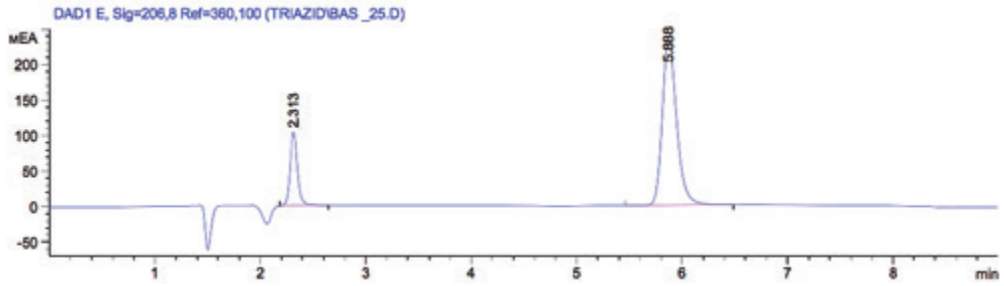


Рисунок 3с. **Хроматограмма совместного определения аминотриазола, 206 нм, и триазолопиримидинона, 270 нм**

Для оценки линейности использовали стандартные растворы аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** с номинальными концентрациями от 0,008 до 0,04 мг/мл (таблицы 1, 2). Установлено, что графики зависимости имеют линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций и описываются уравнениями: y=23826x+1,7474 для аминотриазола (рисунок 4a) и y=30211x+3,8517 для триазолопиримидинона (рисунок 4b), коэффициент корреляции в обоих случаях близок к единице (0,9994 и 0,99994 соответственно).

Правильность характеризует близость результатов, получаемых с помощью данной методики, к истинному значению. Правильность методики устанавливали по результатам анализа методом добавок (таблица 3).

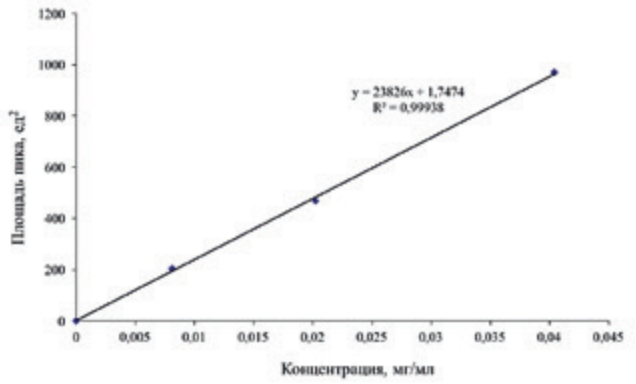


Рисунок 4a. **График зависимости концентрации от площади пика для аминотриазола**

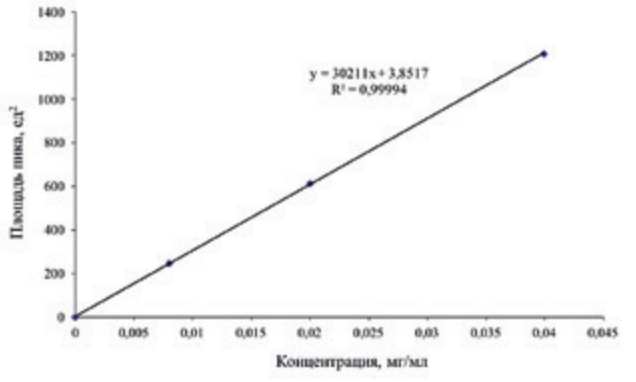


Рисунок 4b. **График зависимости концентрации от площади пика для триазолопиримидинона**

Таблица 1.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации аминотриазола от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед²			Среднее значение	СКО, %
	S_1	S_2	S_3		
0,008080	205	209	201	205,0	1,951
0,020200	470	463	475	469,3	1,284
0,040400	980	944	983	969,0	2,240

Таблица 2.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации триазолопиримидинона от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед²			Среднее значение	СКО, %
	S_1	S_2	S_3		
0,007984	247	248	245	246,7	0,619
0,019960	611	613	612	612,0	0,163
0,039920	1209	1205	1207	1207,0	0,166

Специфичность представляет собой способность достоверно определять анализируемое вещество в присутствии других компонентов и возможных примесей. Для подтверждения специфичности методики получены хроматограммы следующих растворов: триазолопиримидинона **3** (определяемого основного вещества), аминотриазола **2** (примеси) и матрицы. Время удерживания пика триазолопиримидинона составило около 6,2 мин, аминотриазола – около 2 мин. На хроматограмме матрицы отсутствуют пики, мешающие определению основного вещества и примеси в нем, что свидетельствует о возможности применения данной методики для определения исследуемых веществ.

Таблица 3.

Данные для оценки правильности методики

Введенное кол-во в образец, мг/мл	Результат, мг/мл	Процент восстановления, %	Среднее значение результатов, мг/мл	СКО, %	Коэффициент вариации
Аминотриазол					
0,00808	0,00810	100,25	0,00808	0,002	0,258
	0,00809	100,12			
	0,00806	99,75			
0,0202	0,0200	99,01	0,0203	0,055	2,718
	0,0199	98,51			
	0,0209	103,47			
0,0404	0,0409	101,24	0,0402	0,062	1,553
	0,0397	98,27			
	0,0400	99,01			
Триазолопиримидинон					
0,007984	0,007992	100,10	0,00798	0,001	0,138
	0,007970	99,82			
	0,007982	99,97			
0,01996	0,02006	100,50	0,0200	0,007	0,333
	0,01993	99,85			
	0,02002	100,30			
0,03992	0,04000	100,20	0,0400	0,014	0,338
	0,03988	99,90			
	0,04015	100,58			

Сходимость характеризует степень согласованности результатов измерений (испытаний), полученных одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Коэффициент вариации параллельных определений для 6 измерений составил менее 2 %. Коэффициент вариации испытаний при определении внутрилабораторной прецизионности (три рабочих дня, два оператора) составил менее 3%.

Предел количественного определения устанавливали через отношение аналитического сигнала к уровню шума. Минимальная концентрация аминотриазола **2**, при которой величина данного отношения – около 10:1, составляет 0,004 мг/мл, триазолопиримидинона **3** – 0,003 мг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования разработана методика совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона посредством ВЭЖХ. Методика проста в применении, не требует больших временных затрат и дополнительных процедур дериватизации с большим расходом реагентов, обладает высокой чувствительностью и позволяет определять содержание примеси исходного вещества до 0,10 % от основного вещества.

Проведена валидация разработанной аналитической методики, по результатам которой показана возможность ее применения для контроля первой стадии технологического процесса получения опытно-промышленных и промышленных партий препарата «Триазид».

Данная методика была успешно применена для анализа опытных партий препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент № 2529487 РФ. 5-Метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинид l-аргинииния моногидрат / О.Н. Чупахин, В.Н. Чарушин, В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, С.К. Котовская, О.И. Киселев, Э.Г. Деева, К.В. Саватеев, С.С. Борисов. – № 2013116765; заявл. 15.04.13; опубл. 27.09.14.
2. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».
3. J.M. van der Poll, M. Vink, J.K. Quirijns. Determination of amitrole in plant tissues and sandy soils by capillary gas chromatography with alkali flame ionization detection // Chromatographia. 1990. V. 30. P. 155–158.
4. B.V. Pepich, B. Prakash, M.M. Domino, T.A. Dattilio, D.J. Munch, E.K. Price. Development of U.S. EPA Method 527 for the Analysis of Selected Pesticides and Flame Retardants in the UCMR Surve // Environ. Sci. Technol. 2005. V. 39. P. 4996–5004.
5. M. Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, M. Moreno. Determination of 3-amino-1,2,4-triazole (amitrole) in environmental waters by capillary electrophoresis // Talanta. 2003. V. 59. P. 37–45.
6. S. Takeda, K. Fukushi, K. Chayama, Y. Nakayama, Y. Tanaka, S. Wakida. Simultaneous separation and on-line concentration of amitrole and benzimidazole pesticides by capillary electrophoresis with a volatile migration buffer applicable to mass spectrometric detection // J. of Chrom. A. 2004. V. 1051. P. 297–301.
7. J. Dugay, M.-C. Hennion. Evaluation of the performance of analytical procedures for the trace-level determination of aminotriazole in drinking waters // Trends in Anal. Chem. 1995. V. 14. P. 407–414.
8. Y. Sun, L. Luo, F. Wang, J. Li, Y. Cao. Ion-pairing high-performance liquid chromatography determination of amitrole in apple after solid-phase extraction and precolumn derivatization // Anal. and Bioanal. Chem. 2009. V. 395. P. 465–471.
9. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. I. – М.: НЦЭСМП.

Решения Agilent Technologies для анализа элементных примесей по методам ICH И USP



AGILENT 7900 ICP-MS

Масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Agilent 7900 ICP-MS

- Анализ вариабельных матриц с высоким содержанием хлоридов.
- Чувствительность >109 имп/с/ppm при сигнале CeO < 2%.

AGILENT 5110 ICP-OES

Оптико-эмиссионный спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Agilent 5110 ICP-OES



- Высокая скорость и исключительная точность.
- Дихроичный спектральный сумматор (DSC) позволяет за 1 измерение получить одновременно результаты для аксиального и радиального обзоров плазмы.

Спектральное оборудование Agilent Technologies – идеальные возможности анализа широкого диапазона фармацевтических продуктов по методам ICH Q3D и USP <232>/<233>

Стр. 332

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 615.07

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ КОЛОНКИ С АМИДНЫМ СОРБЕНТОМ ДЛЯ АНАЛИЗА КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЛАТИНЫ

А.С. Осипов[1]*, О.А. Попова[1], Н.В. Рослякова[1], Л.Л. Кожемякина[1]

Резюме. Хроматографическая колонка с амидным сорбентом (XBridge Amide) была использована для анализа координационных соединений Pt (II). Данные соединения могут быть проанализированы с помощью обращённо-фазовой хроматографии [подвижная фаза: ацетонитрил – H_2O (2:98)] либо посредством жидкостной хроматографии гидрофильным взаимодействий [подвижная фаза: ацетонитрил – H_2O, (90:10)]. Анализируемые соединения лучше разделялись в условиях жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий. При использовании подвижных фаз с высоким содержанием ацетонитрила (более 80%) изменяются свойства колонки по отношению к координационным соединениям. Сорбция соединений Pt на амидных сорбентах при большом содержании ацетонитрила обусловлена специфическими координационными взаимодействиями между атомом Pt и амидными группами сорбентов.

Ключевые слова: ВЭЖХ, жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий, карбоплатин, оксалиплатин, Фармакопея США, Европейская Фармакопея.

APPLICATION OF CHROMATOGRAPHIC COLUMNS WITH AMIDE SORBENT TO THE ANALYSIS OF PLATINUM COORDINATION COMPOUNDS

A.S. Osipov[1]*, O.A. Popova[1], N.V. Raslyakova[1], L.L. Koshimyakina[1]

Abstract. It was established that chromatographic column with amide sorbent (XBridge Amide) could be applied to the analysis of Pt (II) coordination compounds. The compounds could be analyzed by both reversed-phase chromatography [mobile phase: MeCN – H_2O (2:98)] and hydrophilic interaction liquid chromatography [mobile phase: MeCN – H_2O (90:10)]. The analytes were better resolved for hydrophilic interaction liquid chromatography. The properties of the amide columns differed substantially for analysis of Pt (II) coordination compounds using mobile phases with more 80% MeCN. Sorption of the Pt compounds to the amide columns at high MeCN contents was due to specific coordination interactions between the Pt atom and sorbent amides.

Keywords: HPLC, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC), Carboplatin, Oxaliplatin, United States Pharmacopeia; European Pharmacopeia.

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123182,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, 123182, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: Osipov@expmed.ru
Тел.: 8 (495) 234 61 04 доб. 31–03

ВВЕДЕНИЕ

Координационные соединения платины (II) применяют в медицинской практике для лечения онкологических заболеваний. В настоящее время из лекарственных средств данной фармакологической группы применяют в основном препараты, содержащие цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин (рисунок 1). Для контроля качества данных препаратов по показателям «количественное определение» и «посторонние примеси» применяют обращенно-фазовую и различные варианты ион-парной хроматографии на колонках с сорбентами С18 и С8. При этом содержание ацетонитрила в подвижных фазах варьирует от 1–2% (обращенно-фазовая хроматография) до 10–20% (варианты ион-парной хроматографии). Для определения посторонних примесей в цисплатине используют хроматографию на ионообменных колонках. В Фармакопее США и Японской фармакопеи [1, 2] для количественного определения цисплатина применяют хроматографирование на колонках с аминосорбентом с использованием подвижной фазы: этилацетат – метанол – диметилформамид – вода (25:16:5:5). В соответствующей монографии Британской Фармакопеи [3] для количественного определения цисплатина на колонке с аминосорбентом приведена подвижная фаза иного состава: ацетонитрил – вода (90:10). Для количественного определения и определения хроматографической чистоты в субстанции и лекарственной форме карбоплатина [4–6] применяют колонки аналогичного типа и близкую по составу подвижную фазу: ацетонитрил – вода (87:13). Следует отметить, что в этих случаях при анализе соединений платины на аминосорбентах имеет место нормально-фазовый механизм разделения в жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий Хроматографические колонки других типов

для анализа координационных соединений платины (II) в ведущих зарубежных фармакопеях не описаны. Ранее была показана возможность применения для анализа координационных соединений платины (II), наряду с аминосорбентами [7], хроматографических колонок с диольными, нитрильными или фенильными сорбентами [8–10]. Амино-, диольные и нитрильные группы сорбентов в целом обладают сходными свойствами при разделении координационных соединений платины в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий. Причём колонки с диольными и нитрильными сорбентами могут быть использованы (по крайней мере теоретически) как в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий, так и в условиях обращенно-фазовой хроматографии. Сорбенты с фенильными группами отличаются по свойствам от других исследованных сорбентов. Фенильные группы практически не обладают способностью взаимодействовать с атомами платины анализируемых соединений [9, 10]. Разделение координационных соединений платины по типу жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий на колонках с фенильными сорбентами невозможно.

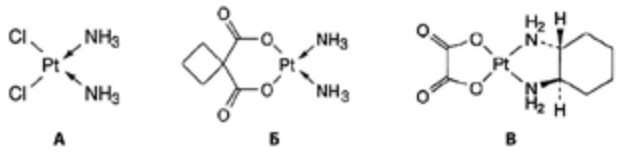


Рисунок 1. Структурные формулы координационных соединений платины (II):

А – цисплатин, Б – карбоплатин, В – оксалиплатин

Цель работы: исследовать возможность применения хроматографической колонки с амидным сорбентом для анализа координационных соединений платины, а также уточнить механизм их хроматографического разделения на данных колонках. Необходимо отметить, что хроматографические колонки с амидными сорбентами (амидами органических кислот) достаточно редки для жидкостной хроматографии и выпускаются ограниченным кругом хроматографических фирм, в частности фирмой Waters.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на хроматографе Agilent, серии 1100 (Agilent Technologies, США). Испытывали колонку XBridge Amide 150x4,6 мм; 3,5 мкм (Waters, Ирландия). Детектирование проводили при 220 нм. Скорость потока элюента – 1 мл/мин. Ввод образцов в объёме 5 мкл. Температура колонки – 20 °С. Температура автосемплера – 12 °С. В работе использовали стандартные образцы цисплатина (EP Cisplatin CRS, сер. 6), оксалиплатина (EP Oxaliplatin CRS, сер 4) Европейской Фармакопеи, а также стандартный образец карбоплатина (USP Carboplatin RS, сер. H1F175) Фармакопеи США. Стандартные образцы соединений платины вводили в хроматограф в растворителях, близких по составу к используемым подвижным фазам.

Анализировали лекарственные препараты «Карботера» (карбоплатин) 150 мг, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий во флаконах (серия CA647B, лаборатория «ТЮТОР С.А.С.И.Ф.И.А.», Аргентина), и «Плаксат» (оксалиплатин) 100 мг, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий во флаконах (серия BC09004D, «С.К. Синдан-Фарма С.Р.Л.», Румыния). Подготовка проб: первоначально лекарственные препараты растворяли в воде до концентрации действующих веществ 1 мг/мл.

Препарат «Плаксат» (лиофилизат оксалиплатина) растворяли во флаконе в деминерализованной воде и количественно переносили раствор препарата в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки деминерализованной водой.

Препарат «Карботера» (лиофилизат карбоплатина) растворяли во флаконе в деминерализованной воде и количественно переносили раствор препарата в мерную колбу вместимостью 150 мл (мерная колба нестандартной вместимости), доводили до метки деминерализованной водой.

Затем полученные водные растворы препаратов разводили ацетонитрилом до концентрации действующих веществ 0,2 мг/мл (5 мл водного раствора препарата помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, перемешивали с 15 мл ацетонитрила и доводили до метки тем же растворителем). Перед введением в хроматограф все пробы центрифугировали при 11 тыс. об/мин в течение 7 мин (центрифуга ELMI CM 50, Латвия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 приведены некоторые результаты хроматографирования координационных соединений платины на колонке с амидным сорбентом XBridge Amide, а также на колонках с нитрильными сорбентами Nova-Pak CN HP и Zorbax Eclipse XDB-CN, полученные ранее [10]. Очерёдность элюирования компонентов анализируемой смеси на колонке XBridge Amide имела аналогичный характер, что и на колонках с нитрильными сорбентами. Увеличение времени удерживания с увеличением содержания ацетонитрила в подвижной фазе от 80 до 90 частей, а также увеличение разрешения между пиками оксалиплатина и карбоплатина свидетельствует о том, что на колонке XBridge Amide разделение координационных соединений платины протекает по нормально-фазовому механизму жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Разделение компонентов анализируемой смеси на колонке XBridge Amide возможно как в услови-

ях обращенно-фазовой (содержание ацетонитрила в подвижной фазе 2–5%), так и в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий (содержание ацетонитрила 80–90%). Следует отметить, что при переходе от хроматографии гидрофильных взаимодействий к обращенно-фазовой хроматографии меняется очерёдность элюирования оксалиплатина и карбоплатина (рисунки 2 и 3). Также необходимо отметить, что в обращённо-фазовых условиях не было достигнуто разделения пиков цисплатина и карбоплатина на колонке XBridge Amide. В целом, разделение координационных соединений платины в условиях хроматографии гидрофильных взаимодействий значительно лучше, чем в условиях обращённо-фазовой хроматографии.

При высоком содержании ацетонитрила в подвижных фазах сорбция соединений платины на амидных, диольных, нитрильных и аминоколонках обусловлена специфическими координационными взаимодействиями между атомом платины и амино-, диольными, нитрильными или амидными группами сорбентов. При низком содержании ацетонитрила и, соответственно, высоком содержании воды в подвижных фазах атомы платины анализируемых соединений полностью гидратированы молекулами воды. В этом случае сорбция координационных соединений осуществляется за счёт гидрофобных взаимодействий лигандов данных соединений и алкильными группировками, расположенными на поверхности сорбента.

При хроматографировании на колонке XBridge Amide 150x4,6 мм (3,5 мкм) с использованием подвижной фазы «ацетонитрил – вода» (85:15) было подтверждено заявленное изготовителем количественное содержание оксалиплатина и карбоплатина в лекарственных препаратах. При этом использовались стандарты EP Oxaliplatin CRS и USP Carboplatin RS.

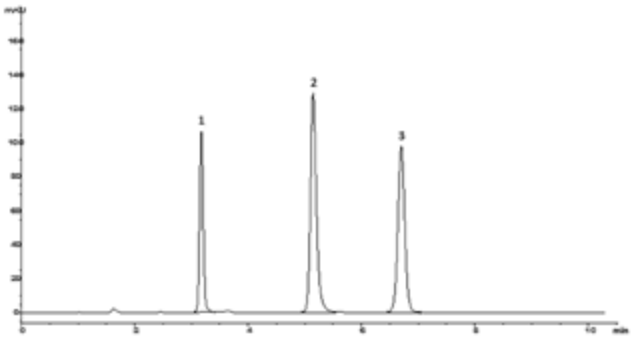


Рисунок 2. Хроматограмма разделения смеси стандартных образцов координационных соединений платины на колонке XBridge Amide 150x4,6 мм (3,5 мкм).

Условия анализа: подвижная фаза – ацетонитрил – вода (85:15); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование при 220 нм.

1 – цисплатин, 2 – оксалиплатин, 3 – карбоплатин

Таблица 1.

Времена удерживания (Т) координационных соединений платины и разрешение между пиками карбоплатина и оксалиплатина на колонках с различными типами сорбентов*

Наименование колонки; скорость потока; состав подвижной фазы	Т, мин цисплатина	Т, мин оксалиплатина	Т, мин Карбоплатина	Разрешение между пиками карбоплатина и оксалиплатина
XBridge Amide 150x4,6 мм, 3,5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (80:20)	2,82	3,88	4,72	5,21
XBridge Amide 150x4,6 мм, 3,5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (85:15)	3,18	5,15	6,71	7,74
XBridge Amide 150x4,6 мм, 3,5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (90:10)	3,98	7,37	11,70	11,08
XBridge Amide 150x4,6 мм, 3,5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (5:95)	2,12	2,87	2,12 (не разделяется с цисплатином)	6,06
XBridge Amide 150x4,6 мм, 3,5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (2:98)	2,18	3,24	2,18 (не разделяется с цисплатином)	7,45
Nova-Pak CN HP 150x3,9 мм, 4 мкм; 0,72 мл/мин; ацетонитрил – вода (90:10)	1,63	2,28	2,73	3,80
Nova-Pak CN HP 150x3,9 мм, 4 мкм; 0,72 мл/мин; ацетонитрил – вода (3:97)	1,65	2,36	1,82	4,95
Zorbax Eclipse XDB-CN 150x4,6 мм, 5 мкм; 1 мл/мин; ацетонитрил – вода (3:97)	1,81	6,63	2,02	3,27

Примечание: * – средняя величина пяти определений для каждого условия хроматографирования.

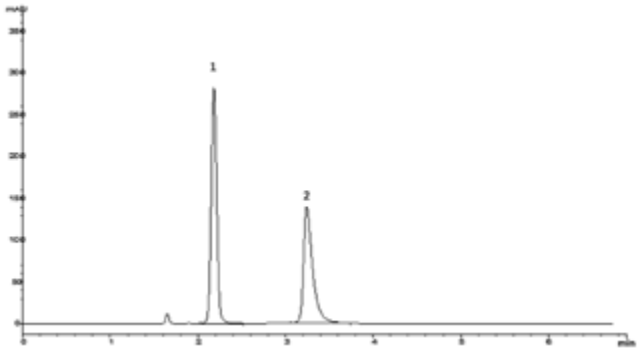


Рисунок 3. Хроматограмма разделения смеси стандартных образцов координационных соединений платины на колонке XBridge Amide 150x4,6 мм (3,5 мкм).

Условия анализа: подвижная фаза – ацетонитрил – вода (2:98); скорость потока – 1,0 мл/мин; детектирование при 220 нм.

1 – цисплатин совместно с карбоплатином, 2 – оксалиплатин

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере хроматографической колонки XBridge Amide показано, что колонки с амидными сорбентами могут быть использованы для анализа карбоплатина и оксалиплатина в лекарственных препаратах. Разделение компонентов анализируемой смеси на колонках с амидными сорбентами может осуществляться как по механизму хроматографии гидрофильных взаимодействий, так и по обращенно-фазовому механизму.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monograph: Cisplatin for Injection // United State Pharmacopoeia 39.
2. Monograph: Cisplatin // Japanese Pharmacopoeia XVI.
3. Monograph: Cisplatin Injection // British Pharmacopoeia 2012.
4. Monograph: Carboplatin // European Pharmacopoeia edition 8.0..
5. Monograph: Carboplatin for Injection // United State Pharmacopoeia 39.
6. Monograph: Carboplatin Injection // British Pharmacopoeia 2012.
7. А.С. Осипов, В.П. Бобылев В.П., Е.Б. Нечаева и др. Применение ВЭЖХ для анализа соединений платины в лекарственных препаратах // Биомедицина. 2010. № 5. С. 107–109.
8. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева, О.А. Победин. Применение хроматографической колонки с диольным сорбентом для анализа координационных соединений платины // Химико-фармацевтический журнал. Т. 47. № 6. 2013. С. 51–53.
9. Е.Б. Нечаева, А.С. Осипов, О.А. Победин. Применение хроматографических колонок с фенильными сорбентами для анализа координационных соединений платины // Ведомости НЦЭСМП, 2014. № 4. С. 3–7.
10. А.С. Осипов, Е.Б. Нечаева. Применение хроматографических колонок с нитрильными и фенильными сорбентами для анализа координационных соединений платины // Химико-фармацевтический журнал. 2014. Т. 48. № 8. С. 45–48.

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 T 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

УДК 615.453.6; 543.544

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ТАБЛЕТИРОВАННЫХ ФОРМ АМИНОКИСЛОТ В РЕЖИМЕ ИК-СПЕКТРОСКОПИИ ДИФФУЗНОГО ОТРАЖЕНИЯ

А.А. Марьин[1]*, И.Г. Танцерева[1], Ю.Г. Чистохин[1]

Резюме. Изучена возможность применения инфракрасных спектров диффузного отражения в ближней и средней области для стандартизации и оптимизации технологического процесса изготовления таблетированных форм алифатических аминокислот: аминомасляной, β-аланина, гамма-аминомасляной кислоты. Показана информативность ближней инфракрасной области для нормирования содержания влаги в субстанции, на стадиях технологического процесса, а также в готовой лекарственной форме. В работе проанализирована информативность инфракрасных спектров применительно к таблетированным формам гамма-аминомасляной кислоты, глицина. Получены спектральные данные, позволяющие дифференцировать гомологические аминокислоты: γ-аминомасляную, β-аминопропановую и аминоуксусную.

Ключевые слова: ГАМК, ближняя инфракрасная спектроскопия, небелковые аминокислоты.

STANDARDIZATION OF THE AMINO ACIDS TABLETS BY DIFFUSE REFLECTION IR SPECTROSCOPY

A.A. Maryin[1]*, I.G. Tansereva[1], Y.G. Chistohin[1]

Abstract. The possibility of using the infrared spectra of the diffuse reflection in the near and medium field of standardization and optimization of the technological process of tablet forms of aliphatic amino acids: butyric, β-alanine, γ-aminobutyric acid. Shown near infrared informative to normalize the moisture content of a substance in the stages of the process, as well as in the finished dosage form. The paper analyzed the descriptiveness of the infrared spectra with respect to the tablet form of gamma-aminobutyric acid, glycine. The spectral data to differentiate the homologous amino acids: γ-aminobutyric, beta-aminopropanoic, and glycine.

Keywords: gamma-aminobutyric acid, near-infrared spectroscopy, nonprotein amino acid.

1 – ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а

1 – Kemerovo State Medical University, Ministry of Healthcare, 22a, Voroshilova str., Kemerovo, 650056, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: mfandr@mail.ru
Тел.: 8 (384) 235 89 12

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно формируется целостный подход при проектировании, разработке, анализе и контроле важнейших характеристик качества сырья и полупродуктов, а также критических параметров качества процесса изготовления с целью обеспечения качества конечного продукта. Это особенно актуально для производства аминокислот и их аналогов, включая небелковые [1].

Интерес к небелковым аминокислотам постоянно растет, особенно в области медицины и фармации. Это связано с различными эффектами, для ГАМК (гамма-аминомаслянная кислота) описано тормозящее действие на центральную нервную систему (седация, антиинсомния), а также антигипертензивный и диуретический эффекты [2]. В настоящее время основным способом получения аминокислот является микробиологический синтез [1]. Так, ГАМК получают несколькими способами, а именно обогащением растительной ткани, микробной ферментацией и биотрансформацией [3]. При производстве таблетированных форм одним из существенных показателей является степень гидратированности (влажности) субстанции. Высокая степень влажности сырья будет приводить к технологическим дефектам, а избыточная сушка – к экономическим затратам и удорожанию производства. С другой стороны, необходимы экспрессные способы идентификации аминокислот для предупреждения и выявления фактов фальсификации (подмены алифатических аминокислот другим видом). Это создаёт предпосылки для внедрения современных недеструкционных подходов к оценке качества технологического процесса и конечного продукта. Из широкого разнообразия физико-химических методов для решения указанных проблем видится возможным использование методов спектроскопии в инфракрасной области.

Метод инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием – достаточно устоявшийся и динамично совершенствующийся аналитический метод, который характеризуется экспрессностью, высокой производительностью, недеструктивностью, широким диапазоном, с возможностью решения нетривиальных задач [4, 5].

Целью данной работы явилось изучение возможности стандартизации фармакологически значимых аминокислот по спектральным характеристикам в ближней и средней областях инфракрасного спектра в режиме диффузного отражения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы образцы аминокислот фирм Reanal (Венгрия) и Panreak (Испания), а также таблетированные лекарственные формы, приобретённые через розничную аптечную сеть. Калия бромид квалификации для ИК-спектроскопии фирмы Fluka (Германия).

Подготовка проб для анализа: образец массой 2 мг в агатовой ступке перетирали с бромидом калия (200 мг) и изготавливали диск методом прессования с усилением 3000 psi.

Условия получения ИК-спектров: в работе использовали однолучевой интерференционный (с обратным преобразованием Фурье) ИК-спектрометр ФСМ-1202 («Инфраспек», Россия). Параметры записи спектров: диапазон длин волн 7500–400 $см^{-1}$, разрешение 4 $см^{-1}$, циклическая запись с количеством сканов 25. Фоновый спектр получали непосредственно перед записью каждого спектра. Спектры в режиме диффузного отражения получены с помощью приставки ПДО (сер. № 100013). Управление прибором и обработку спектров осуществляли с использованием программы Fspec (версия 4.0.0.2). Высушивание образцов проводилось с использованием вакуумного сушильного шкафа ШСВ-65/3,5 при температуре 70 °С и вакууме при остаточном давлении в рабочей камере 6,6 Па (0,05 мм рт. ст.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рассматриваемые в нашем исследовании образцы ГАМК и аминокислот обладают специфичным набором полос поглощения, позволяющий дифференцировать образец по показателю «подлинность» (рисунок 1).

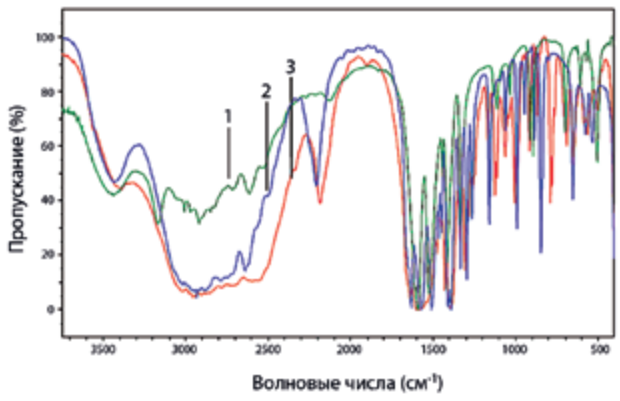


Рисунок 1. ИК-спектры образцов в диапазоне 4000–400 $см^{-1}$: аминомасляной кислоты (1), β-аланина (2), γ-аминомасляной кислоты (3), выполненных в диске с калия бромидом

Так, на спектрах образцов прослеживаются характерные для алифатических аминопроизводных, и в частности аминокислот, полосы в диапазоне 2200–2000 $см^{-1}$, относящиеся к комбинации антисимметричного деформационного и крутильного колебаний группы NH_3^+. Для глицина максимум поглощения составил 2129 $см^{-1}$, для β-аланина – 2204 $см^{-1}$, для ГАМК – 2184 $см^{-1}$. При этом крутильные колебания прослеживаются в области 550–500 $см^{-1}$: для глицина – 505 $см^{-1}$, у β-аланина – 531–538 $см^{-1}$, для ГАМК – 500 $см^{-1}$ [6].

Деформационные (ножнечные) колебания N–H первичных аминов наблюдаются в области 1650–1580 $см^{-1}$: для образца ГАМК – 1641 и широкая полоса 1597 $см^{-1}$, для глицина 1611 и 1591 $см^{-1}$. Некоторое смещение в сторону высоких частот объясняется ассоциацией молекул, и в первую очередь такие ассоциации образуются в таблетированной форме. Валентные колебания C–N проявляются в области 1250–1020 $см^{-1}$. Следует отметить, что у изучаемого в нашей работе образца ГАМК в указанном диапазоне присутствуют три полосы поглощения: 1166 $см^{-1}$, дуплетная 1123 $см^{-1}$ и 1113 $см^{-1}$ и полоса 1064 $см^{-1}$. Для глицина характерна дуплетная полоса 1133 и 1113 $см^{-1}$. При этом положение полос в данной области определяется классом аминопроизводного, а в данном случае зависит от типа замещения α-углеродного атома. Группа NH_3^+ соли первичного амина поглощает в области 1600–1575 $см^{-1}$ и 1550–1504 $см^{-1}$ и обусловлена асимметричными колебаниями. Наличие полосы 1426 $см^{-1}$ у образца ГАМК, видимо, связано с наличием аммониевых солей, образующихся в результате деструкции. Данная полоса является важным критерием оценки доброкачественности лекарственного препарата, а также используемой субстанции.

Анализ технологии процесса определяется как «система для непрерывного анализа и контроля производственных процессов на основе реального времени или быстрого измерения в процессе обработки, качества и функциональных свойств сырья и материалов и процессов в процессе производства для обеспечения качества конечного продукта при завершении процесса» [2]. Для того чтобы обеспечить качество продукции, предложено введение норм, позволяющих обеспечить контроль качества в процессе получения целевого продукта в зависимости от стадии исходного сырья, промежуточных полуфабрикатов и стадий процесса. С учётом указанного метод ближней инфракрасной спектроскопии (БИК) является передовой аналитической технологией, которая совершенствуется, позволяя нормировать промежуточные этапы фармацевтического производства.

Ближней ИК-областью (БИК) называется область спектра, простирающаяся от 3800 $см^{-1}$ до границы видимого света. В данной области появляются обертоновые и комбинационные колебания, составные частоты которых приходятся на среднюю ИК-область. Следует отметить, что в БИК-области в силу ангармоничности основных колебаний, которые характерны в первую очередь для легких атомов водорода, проявляются

лишь колебания групп C–H, O–H, N–H, S–H и P–H, связи которых колеблются с большой амплитудой [7].

В свою очередь, области БИК-спектров нативных образцов при волновых числах в пределах от 7500 до 4000 $см^{-1}$, представленные на рисунке 2, также являются информативными, позволяя идентифицировать аминокислоту. Так, определилось несколько характерных пиков поглощения, которые можно наблюдать для аминоуксусной кислоты: 4655 $см^{-1}$, обусловленный фундаментальным растяжением и деформационным колебанием N-H; и 4446, 4400 и 4304 $см^{-1}$ в комбинации с фундаментальным растяжением и деформационным колебанием C–H. Подобные сигналы, обусловленные влиянием CH_2 и NH_2, обнаруживаются ГАМК β-аланина. Но, как можно увидеть из линий тренда, суперпозиция полос основных соединений индивидуальна, обладая отличительными особенностями для каждого соединения.

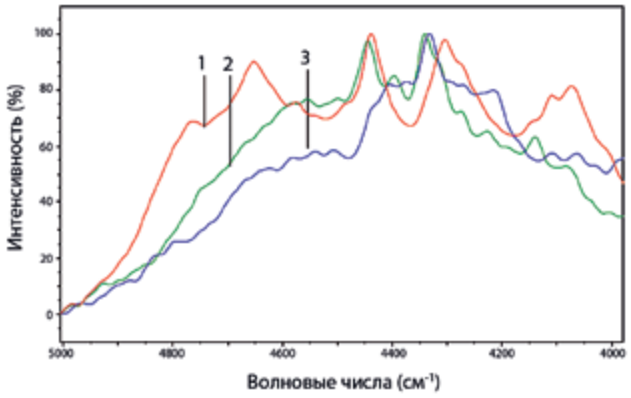


Рисунок 2. БИК-спектр диффузного отражения 5000–4000 $см^{-1}$ образцов: аминоуксусной кислоты (1), β-аланина (2), γ-аминомасляной кислоты (3)

Другой характерной зоной спектров является область первого обертона, характерная для CH, CH_2 и CH_3, – около 6230–5480 $см^{-1}$. Здесь интенсивность сигнала увеличивается по мере увеличения углеродного скелета. Наконец, спектральные изменения, обусловленные 1-м обертоном гидроксильной группы, для глицина и β-аланина соответствуют 6900 $см^{-1}$, тогда как для ГАМК характерно некоторое смещение до 6840 $см^{-1}$.

Изменения БИК-спектров при сушке образца ГАМК представлено на рисунке 3. График показывает спектры, полученные в процессе сушки для таблетируемой массы ГАМК. Спектральные изменения характеризуются сильным поглощением около 5385 $см^{-1}$, что соответствует сочетанию основных деформаций растяжения, вибрации O–H-связи [7]. В процессе сушки значение этой области, соответствующей отклику молекул воды, постепенно уменьшается. Данный факт указывает на то, что БИК может отражать химическую информацию образца, способствуя оптимизации технологического процесса производства.

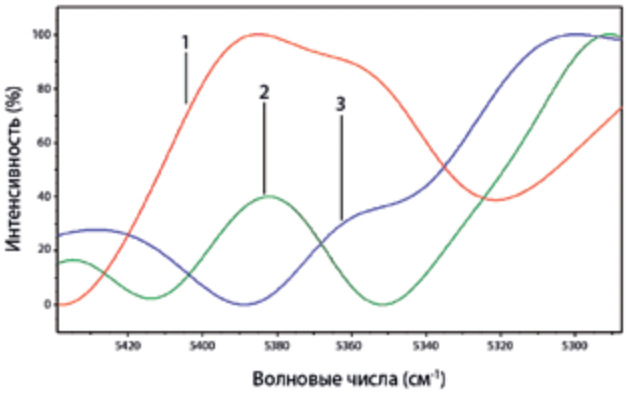


Рисунок 3. Участок БИК-спектра в диапазоне 5430–5290 $см^{-1}$ образца ГАМК, соответствующий степени гидратированности, где образец: 1 – нативный; 2 – вакуумная сушка 60 мин; 3 – вакуумная сушка 120 мин

Результаты свидетельствуют о том, что метод диффузного отражения БИК ФТ может быть принят в качестве быстрого, объективного и недеструктивного способа прогнозирования качественных и количественных параметров технологического процесса изготовления таблетированных форм аминокислот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что значения некоторых функциональных групп в режиме диффузного отражения несколько вариабельны, что требует дополнительных исследований применительно к конкретным объектам. Полученные с использованием метода ближней инфракрасной спектроскопии результаты отражают химическую информацию образца, степень гидратированности, качественную характеристику, что может быть использовано в оптимизации технологического процесса при производстве таблетированных форм аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.С. Сагиян. Энантиомерно чистые небелковые аминокислоты. Способы получения. – М.: Наука. 2010. 342 с.
2. M. Diana, J. Quílez, M. Rafecas. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review // Journal of Functional Foods. 2014. V. 10. P. 407–420.
3. G. Ding, Y. Hou, J. Peng, Y. Shen. On-line near-infrared spectroscopy optimizing and monitoring biotransformation process of γ-aminobutyric acid // J. Pharm. Anal. 2016. V. 6. P. 171–178.
4. В.П. Кузнецов, Е.В. Салтанова, А.С. Сухих, Ю.А. Фадеев. ИК-спектроскопическое исследование сегнетоэлектрических свойств на примере кроконовой кислоты // Ползуновский вестник. 2013. № 1. С. 52–54.
5. И.В. Потапов, А.С. Сухих. Окислительно-восстановительные свойства комплексных соединений фторхинолонов с ионами меди (II) // Фундаментальная и клиническая медицина. 2016. Т. 1. № 1. С. 39–45.
6. Сильверстейн Р., Вебстер Ф., Кимл Д. Спектрометрическая идентификация органических соединений / Пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаб. знаний, 2011. 557 с.
7. P.K. Ghosh, D.S. Jayas. Use of spectroscopic data for automation in food processing industry. Sens and Instrumen Food Qual. 2009. V. 3. P. 3–11.

The Moscow Times
CONFERENCES

15 ИЮНЯ 2017
«МАРРИОТТ РОЯЛ АВРОРА»

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ

Модернизация фармацевтической промышленности является одним из приоритетных и значимых направлений внутренней политики государства. К стратегически важным задачам в сфере регулирования фармацевтического рынка относится уменьшение доли импортных и увеличение доли отечественных лекарственных препаратов. Локализация фармпроизводства на территории России является одним из способов достижения указанной цели.

КЛЮЧЕВЫЕ ТЕМЫ КОНФЕРЕНЦИИ

- Развитие локальных производственных мощностей: текущие барьеры и перспективы. Финансовая и иная поддержка государства.
- Формы ведения бизнеса в РФ: строительство завода VS контрактное производство. Как найти свою нишу в условиях непрекращающегося роста рынка?
- Особенности госзакупок в сфере здравоохранения. Трехступенчатая конструкция: быть или не быть?
- Кластеризация, размещение производств в индустриальных парках и особых экономических зонах.
- Развитие инновационного фармацевтического производства в России.
- Перспективы локализации трансфера технологий.
- Защита интеллектуальной собственности и развитие конкуренции: есть ли баланс?





Руководитель проекта
Ольга Понамарева
o.ponamareva@vedomosti.ru

Реклама и спонсорство
Наталья Бондарева
n.bondareva@vedomosti.ru

Участие в проекте
Евгения Сауткина
e.sautkina@vedomosti.ru

Реклама

УДК 543.062

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСОРБАТОВ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

В.И. Гроховский[1]*, А.А. Бендрышев[1], С.В. Швец[1], Д.А. Орлов[1], О.А. Ваганова[1]

Резюме. Статья представляет собой обзор публикаций, посвященных количественному определению полисорбатов в лекарственных препаратах. В статье затронуты вопросы строения и свойств полисорбатов. Рассмотрен вопрос применения полисорбатов в производстве лекарственных препаратов. Оценены подходы и методы количественного определения полисорбатов, приведены их достоинства и недостатки.

Ключевые слова: полисорбат, ВЭЖХ, биотехнологические препараты, вспомогательные вещества.

DETERMINATION OF POLYSORBATE IN BIOTECH DRUGS

V.I. Grokhovskiy[1]*, A.A. Bendryshev[1], S.V. Shvets[1], D.A. Orlov[1], O.A. Vaganova[1]

Abstract. The article is a review of publications on the quantitative determination of polysorbates in pharmaceuticals. The author touches upon the structure and properties of polysorbates. The question of the use of polysorbates in the production of drugs is considered. Approaches and methods for quantitative determination of polysorbates are evaluated, their advantages and disadvantages are indicated.

Keywords: polysorbate, HPLC, biotechnological preparations, pharmacologically inactive substance.

1 – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123182, Россия, г. Москва, ул. Щукинская, д. 6.

1 – Scientific Center for Expertise of Medicinal products, Ministry of Healthcare, 6, Schukinskaya st., Moscow, 123192, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: grohovsky@expmed.ru

ВВЕДЕНИЕ

Полисорбаты нашли широкое применение в фармацевтической, пищевой и косметической промышленностях. В фармации полисорбаты чаще всего используются в качестве солюбилизаторов и стабилизаторов в лекарственных средствах, содержащих в качестве действующего вещества белки и пептиды. Наличие полисорбатов в составе таких лекарственных средств обусловлено необходимостью сохранения биологической активности, что обеспечивается за счет снижения абсорбции белка на поверхности первичной упаковки (флакона, шприца или ампулы), а также снижения поверхностного натяжения между фазами «воздух – жидкость». Кроме того, присутствие полисорбата обеспечивает сохранение третичной структуры белка при хранении и транспортировке [1, 2].

Биотехнологические лекарственные препараты, главным образом содержащие в качестве действующего вещества белки или пептиды, в последнее десятилетие являются наиболее активно развивающейся группой как зарубежного, так и отечественного фармацевтического рынка, отражая тенденции передовых разработок в этом направлении. Проблемы, связанные с необходимостью сохранения структуры и активности действующих веществ данной группы, гораздо более лабильных по сравнению с лекарственными препаратами, получаемыми путем химического синтеза, при их, как правило, высокой стоимости, делают разработку подходов к сохранению стабилизации биотехнологических соединений востребованной задачей.

Использование именно полисорбатов в производстве лекарственных препаратов в немалой степени обусловлено тем, что многочисленными исследованиями подтверждена их относительная безопасность [3]. В последние годы, однако, появились данные о проявлении реакции гиперчувствительности на различные препараты при введении в их состав полисорбатов. Количество полисорбата и его примесей, содержащихся в препаратах, различается в зависимости от количества необходимого для обеспечения стабильности основного компонента. Можно предположить, что реакцию гиперчувствительности вызывают не сами полисорбаты, а их пероксидные производные и некоторые другие примеси. Таким образом, не только концентрация полисорбата, но и концентрация продуктов его распада может оказывать существенное влияние на качество и безопасность применения лекарственных препаратов. Указанные данные, а также общая тенденция по повышению требований приводят к тому, что определение содержания полисорбатов и оценка состава используемого полисорбата всё чаще включаются в нормативную документацию по контролю ка-

чества лекарственных средств, становясь неотъемлемой частью рутинного контроля.

Поддерживая в неизменённом состоянии структуру белка в лекарственных препаратах, полисорбат образует с ним единый комплекс. Выделить и провести количественное определение полисорбата из таких комплексов чрезвычайно сложно. При этом затруднения может вызвать не только выбор методов и разработка методик определения полисорбата, но и самого белка. Многие методики, особенно использующие хроматографические методы, недостаточно специфичны в отношении действующего вещества и позволяют определять не индивидуальные соединения, а только комплекс «белок – полисорбат», что неприемлемо, поскольку не приводит к должной точности и правильности в оценке содержания белка.

Поэтому разработка воспроизводимой, обладающей требуемой степенью чувствительности, точности, а главное, специфичности методики определения полисорбата в белковых препаратах – чрезвычайно актуальная задача.

Данная работа посвящена рассмотрению наиболее распространенных методов определения полисорбатов.

СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ПОЛИСОРБАТОВ

Полисорбаты представляют собой амфифильные, неионогенные, поверхностно активные вещества, состоящие из эфира жирной кислоты (гидрофобная часть) и длинной полиоксиэтиленовой цепи (гидрофильная часть) (рисунок 1). При растворении в воде при определенной концентрации и температуре молекулы полисорбата образуют мицеллы с гидрофобной частью внутри и гидрофильной группой снаружи. Таким образом, гидрофобное ядро мицеллы связывается с гидрофобными участками белков (рисунок 3) [4].

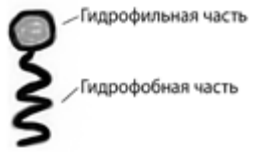


Рисунок 1. Молекула полисорбата



Рисунок 2. Молекула белка

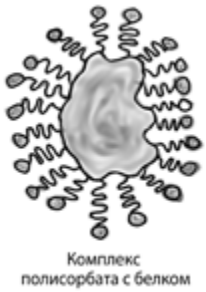


Рисунок 3. Комплекс полисорбата с белком в водном растворе

Все полисорбаты имеют одинаковую полиоксиэтиленовую часть и различаются жирной кислотой, образующей с ней эфир [5].

Полисорбат-20 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан монолаурат

Полисорбат-21 – Полиоксиэтилен 4 сорбитан монолаурат

Полисорбат-40 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан монопалмитат

Полисорбат-60 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан моностеарат

Полисорбат-61 – Полиоксиэтилен 4 сорбитан моностеарат

Полисорбат-65 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан тристеарат

Полисорбат-80 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан моноолеат

Полисорбат-81 – Полиоксиэтилен 5 сорбитан моноолеат

Полисорбат-85 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан триоолеат

Полисорбат-120 – Полиоксиэтилен 20 сорбитан моноизостеарат

Схема синтеза полисорбата-80, а также возможные побочные продукты синтеза представлены на рисунке 4.

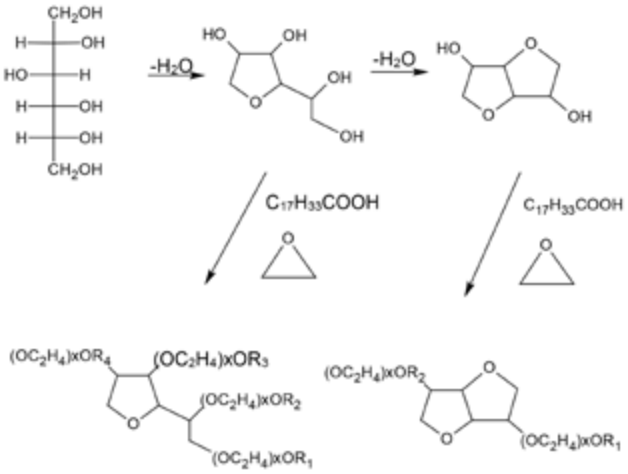


Рисунок 4. Схема синтеза полисорбата-80

В фармации наиболее часто используются полисорбат-20 (рисунок 5) и полисорбат-80 (рисунок 6).

Согласно литературным данным, для качественного и количественного определения полисорбатов можно использовать методы проточно-инжекционного анализа, ЯМР-спектроскопии, спектрофотометрии, однако наиболее часто используются хроматографи-

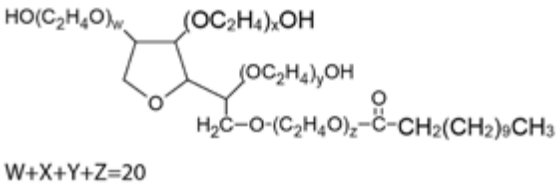


Рисунок 5. **Структура полисорбата-20**

ческие методы с различными вариантами детектирования. Методы определения полисорбата условно можно разделить на два типа: методы, основанные на определении самого полисорбата, и методы, основанные на определении продуктов его гидролиза. Основными лекарственными препаратами, в состав которых включен полисорбат, являются препараты белкового происхождения.

Таблица 1.

	R_1	R_2	R_3	R_4
Полиоксиэтилен сорбитан	H	H	H	H
Полиоксиэтилен сорбитан моноолеат	H	H	H	$C_{17}H_{33}CO$
Полиоксиэтилен сорбитан диолеат	H	H	$C_{17}H_{33}CO$	$C_{17}H_{33}CO$
Полиоксиэтилен сорбитан триолеат	H	$C_{17}H_{33}CO$	$C_{17}H_{33}CO$	$C_{17}H_{33}CO$
Полиоксиэтилен сорбитан тетраолеат	$C_{17}H_{33}CO$	$C_{17}H_{33}CO$	$C_{17}H_{33}CO$	$C_{17}H_{33}CO$
	R_1	R_2		
Полиоксиэтилен изосорбид	H	H		
Полиоксиэтилен изосорбид моноолеат	H	$C_{17}H_{33}CO$		
Полиоксиэтилен изосорбид диолеат	$C_{17}H_{33}CO$	$C_{17}H_{33}CO$		

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ НАТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ

Данная группа методов определения полисорбатов в отличие от методов, основанных на определении продуктов его гидролиза, не требует обязательного использования в качестве стандартного образца именно того полисорбата (состав, партия, лот), который был использован при производстве лекарственного препарата.

Наиболее часто для определения полисорбатов в нативном виде используются методы ВЭЖХ с различными типами детекторов.

Использование УФ-детектора затруднено тем, что поглощение полисорбата в ультрафиолетовой области незначительно в интервале длин волн 190–200 нм, которые не являются специфическими, что затрудняет идентификацию пика среди прочих компонентов, входящих в анализируемую смесь. Данный факт делает необходимым использование отличных от УФ-ВЭЖХ-детекторов, таких как ELSD, CAD, MS. Разделение обычно осуществляется либо в режиме эксклюзионной хроматографии, либо в режиме ОФ-ВЭЖХ. Рассмотрим существующие в настоящий момент подходы подробнее.

ОФ-ВЭЖХ с детектором заряженного аэрозоля (CAD-детектор)

В работе S. Fakete и соавторов [2] предложен быстрый и чувствительный метод определения полисорбатов в жидких лекарственных формах в присутствии белков и вспомогательных веществ. Определение основано на разделении компонентов смеси методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разделение проводилось при градиентном элюировании смесью ацетонитрил : метанол : вода : трифторуксусная кислота (80 : 20 : 900 : 1) и ацетонитрил : метанол: вода : трифторуксусная кислота (720 : 180 : 100 : 1) в качестве элюента на колонке Poroshell 300SB-C18, 75×2,1 мм, 5 мкм. Для детектирования использовали CAD-детектор (ESA Inc., Chelmsford, MA). Диапазон линейности составил от предела количественного определения до 150% (10–60 мкг/мл). ПО – 5 мкг/мл, ПКО – 10 мкг/мл. Возможности детектора заряженного аэрозоля, отклик которого не связан с химической структурой определяемого вещества, способность определять нелетучие вещества, не имеющие хромофорных групп, в том числе и белков, и совместимость с любыми ВЭЖХ-системами, включая СВЭЖХ [сверхпроизводительная высокоэффективная (сверх-

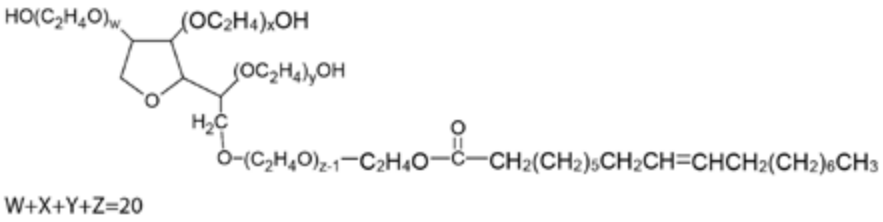


Рисунок 6. **Структура полисорбата-80**

эффективная) жидкостная хроматография], делают его универсальным детектором для определения полисорбата в биотехнологических препаратах.

ОФ-ВЭЖХ с испарительным детектором по светорассеянию (ELSD – детектор)

В работе L.M. Nair и соавторов [6] описан метод для определения полисорбата-80 в лекарственных препаратах, основанный на разделении компонентов смеси в градиентном режиме. В качестве подвижных фаз использованы метанол и вода. Для разделения использована колонка Alltima C18, 250×4,6 мм, 5 мкм; регистрация сигнала осуществлялась с помощью детектора Alltech ELSD 2000; линейность отклика подтверждена в диапазоне концентраций от 2 до 6 мг/мл.

ELSD является универсальным детектором и реагирует на любые аналиты, которые менее летучи, чем подвижная фаза. Он имеет низкий фоновый сигнал, совместим с широким спектром растворителей, а также позволяет использовать градиентное элюирование.

ОФ-ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (MS-детектор)

В работе A. Sparreboom и соавторов [7] обсуждается метод совместного определения полисорбата-80 и противоопухолевого препарата доцетаксел в плазме крови человека с добавлением внутреннего стандарта (паклитаксел), с предварительной экстракцией смесью ацетонитрила и н-бутилхлорида (1:4 в/в) с последующим разделением методом жидкостной хроматографии при изократическом элюировании смесью метанол : 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде (9:1) на колонке Waters X-Terra MS ODS 50×2,1 мм, 3,5 мкм и детектированием MS-детектором (Waters Model 996). Метод применим в интервале концентраций от 1 до 100 мкг/мл.

ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ СО СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

В работе T.H. Tani и соавторов [8] предложен метод, основанный на выделении полисорбата-80 из компонентов смеси, содержащей белки и другие вспомогательные компоненты, методом гель-фильтрационной хроматографии при изократическом элюировании буферным раствором 10 мМ натрия фосфата в растворе 150 мМ натрия хлорида, pH 7,0, с добавлением 10 мл раствора полисорбата-80 с концентрацией 1000 мкг/мл, в 1 литре буферного раствора на колонке TSK G2000/SWXL, 300×7,8 мм, 5 мкм, с последующим детектированием спектрофотометрическим детектором при длине волны 235 нм. Перед разделяющей колонкой устанавливалась специальным образом заполненная сорбентом CL-4B sepharose с привитым протеином А предколонка. Диапазон линейности отклика – от 2 до 1000 мкг/мл.

D.L. McKean и соавторы [9] в своей работе описывают определение полисорбата-20 и полисорбата-80 в биологических жидкостях, основанное на выделении полисорбата из компонентов смеси методом гель-фильтрационной хроматографии в изократическом режиме элюирования. В качестве подвижной фазы используется дихлорметан. Его же используют для экстракции полисорбата из образцов. Разделение осуществляется на колонке uStyragel, 150×3,9 мм, с последующим спектрофотометрическим детектированием при длине волны 620 и 320 нм. Для получения окрашенного комплекса используется заполненная специально подготовленным, содержащим кобальта тиоцианат аммония сорбентом колонка для дериватизации, которая устанавливается между разделяющей колонкой и детектором. Предел обнаружения данного метода – 5 мкг.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Спектрофотометрические методы определения полисорбата, как правило, основаны на его реакции с кобальта тиоцианат аммонием, в результате которой образуется окрашенный продукт. Данные методы применимы ко всем полисорбатам, так как реакция с окрашивающим реактивом идет по общей для всех полисорбатов полиоксиэтиленовой части молекулы.

В работе R.A. Greff и соавторов [10] предложен метод определения полисорбата в малых концентрациях 0–20 ppm. Метод основан на образовании голубого комплекса между кобальта тиоцианат аммонием и полиоксиэтиленовым соединением с последующей экстракцией комплекса бензолом. Определение проводится методом спектрофотометрии при длине волны 320 нм.

В работе A. Nozawa и соавторов [11] предложен метод определения полисорбата, аналогичный вышеописанному, но с измерением при длине волны 624 нм.

В работе N.H. Anderson и соавторов [12] описан метод определения полисорбата, основанный на образовании голубого комплекса с кобальта тиоцианат аммонием. Полиоксиэтиленовые цепи полисорбата реагируют с кобальта тиоцианат аммонием с образованием окрашенного в синий цвет комплекса. Образовавшийся комплекс экстрагируют хлороформом. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации полисорбата. Тиоционатный комплекс нестабилен в хлороформе, и для повышения стабильности необходимо добавление нитрозо-Р-реагента. Опре-

деление проводится методом спектрофотометрии при длине волны 500 нм.

Метод определения полисорбата в малых концентрациях 1–20 мкг/мл, основанный на образовании голубого амилозно-крахмально-йодного комплекса, описан в работе N.B. Cucakovich [13]. Детектирование проводится спектрофотометрически при длине волны 680 нм. Данный метод может давать неточный результат из-за взаимодействия йода с некоторыми аминокислотами и белками. Добавление окислителя делает метод точным и воспроизводимым.

ЯМР- И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

В работе Vu Dang и соавторов [14] обсуждены исследования разных серий полисорбата-60 методами ЯМР- и масс-спектрометрии, которые показали, что серии отличаются между собой соотношением эфиров полиоксиэтиленсорбитана и различных жирных кислот. Также были обнаружены различия в соотношении сорбитана и изосорбитана. Различия в соотношении жирных кислот делают необходимым использование полисорбата только серии, используемой при производстве лекарственного препарата, при количественном определении по продуктам гидролиза.

В работе M. Khossravi и соавторов [15] проведено сравнение ряда методов (спектрофотометрического, флюоресценции мицелл и ЯМР) определения полисорбата-20 в виде нативного соединения. Показано, что спектрофотометрический метод с образованием комплекса с кобальта тиоцианат аммонием не позволяет отличить деградированную форму полисорбата от нативного соединения. Метод флюоресценции мицеллы позволяет определить уменьшение мицеллы, но не может подтвердить того, что мицелла уменьшилась из-за деградации, а не из-за фактического снижения содержания полисорбата. ЯМР-анализ, который использует в основном сигнал от сорбитанполиоксиэтиленовых групп, не позволяет отличить нативное соединение от продуктов деградации.

Спектрофотометрические методы анализа не позволяют достоверно количественно оценить содержание полисорбата, так как определяют не сам полисорбат в нативном состоянии, а лишь его компоненты.

В работе [16] авторами описан метод проточно-инжекционного анализа с детектированием флюоресцентным детектором (метод флюоресценции мицеллы). Данный метод основан на флуоресценции красителя N-фенил-1-нафтиламином (NPN) в гидрофобном ядре полисорбата при длине волны возбуждения 350 нм и длине волны эмиссии 420 нм.

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА ПОЛИСОРБАТА

Данное направление методов анализа базируется на определении продуктов гидролиза полисорбата, основным из которых является соответствующая жирная кислота. По данным литературных источников, процентное содержание жирных кислот в полисорбатах может различаться. Так, для полисорбата 80 процентное содержание основного компонента гидролиза – олеиновой кислоты, может варьироваться от 58 до 85%, а для полисорбата 20 процентное содержание лауриловой кислоты может варьироваться от 40% до 60% [5]. Таким образом, для точного определения содержания полисорбатов в лекарственных препаратах методами, основанными на определении продуктов гидролиза, необходимо в качестве стандартного образца использовать именно тот полисорбат, который использовался при производстве препарата.

В работе M. Hu и соавторов [1] предложен метод определения полисорбата-80 по образующейся при его гидролизе олеиновой кислоте. Гидролиз проводился 1 М раствором калия гидроксида при температуре 40 °С в течение 6 ч. Разделение проводилось в режиме изократического элюирования с использованием колонки Symmetry C_{18}, 150×3,9 мм, 5 мкм, с последующим детектированием УФ-детектором при длине волны 220 нм. В качестве элюента использовали смесь раствора калия фосфата одноосновного с ацетонитрилом в соотношении 8:2 о/о и pH 2,8, Линейность метода была подтверждена в диапазоне концентраций от 0,01 до 0,04% полисорбата-80.

M. Adamo и соавторы [17] предложили аналогичный метод определения полисорбата-80 по олеиновой кислоте. Разделение проводилось в условиях, аналогичных работе [1], за исключением длины волны детектирования 195 нм. Авторы использовали следующие условия гидролиза: 300 мМ раствор натрия гидроксида при температуре 60 °С в течение 18 ч. После проведения гидролиза в смесь добавлялся ацетонитрил, а затем, после перемешивания, 5 М раствор натрия гидроксида (для разделения водного и ацетонитрильного слоя). Для анализа использовали органический слой.

Z. Oszi и соавторы [18] предложили метод определения полисорбата-20 по лауриловой кислоте. Гидролиз проводился 4 М раствором серной кислоты при комнатной температуре в течение 24 часов. Разделение осуществлялось на колонках Purospher RP-18, 250×4,0 мм, 5 мкм; Lichrosphere 100 RP-8, 250×4,0 мм, 5 мкм; Summetry C_{18}, 250×4,6 мм, 10 мкм; uBondapak C18, 300×3,9 мм, 10 мкм; Zorbax RX-C18, 250×4,6 мм, 5 мкм, в изократическом режиме. В качестве элюента использовали смесь 20 мМ раствора

натрия гидрофосфата в воде pH 2,8 с ацетонитрилом в соотношении 25:75. Детектирование осуществляли при длине волны 210 нм. Все опробованные колонки пригодны для определения содержания полисорбата. Хроматограммы, полученные на разных колонках, различались между собой по времени удерживания, асимметрии пика лауриловой кислоты и эффективности колонки. Диапазон линейности метода подтвержден в диапазоне концентраций от 2,5 до 125 мг/мл.

ФАРМАКОПЕЙНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Ведущие мировые фармакопеи не включают метод количественного определения полисорбатов. Методом контроля состава является количественное определение жирных кислот, входящих в их состав, методом газовой хроматографии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье рассмотрены основные методы количественного определения полисорбатов. Каждый из подходов имеет свои положительные и отрицательные стороны. Методы анализа полисорбата в нативном виде в большинстве случаев не требуют сложной пробоподготовки, и для их использования в качестве стандартного образца не обязательно использовать именно тот полисорбат, который присутствует в испытуемом образце, однако для этих методов необходимо более дорогостоящее и менее распространенное оборудование (хроматографы, снабженные MS-, ELSC-, CAD-детекторами). При этом в ряде случаев, как например при использовании ELSD- и CAD-детектора, необходимо построение сложной градуировочной зависимости. С другой стороны, анализ полисорбата по продуктам его гидролиза более сложен в пробоподготовке и из-за непостоянного от серии к серии состава полисорбата в качестве стандартного образца требует того же полисорбата, что и в испытуемом. Однако данный подход менее требователен к оборудованию.

Существует ряд нехроматографических методов, использование которых возможно для определения полисорбата в простых объектах, однако для определения полисорбата в сложных смесях методы или совсем не пригодны, или требуют сложной пробоподготовки, которая приводит к увеличению погрешности методики.

Принимая во внимание сложность определения полисорбата в лекарственных препаратах, следует отметить актуальность данной проблемы и необходимость ее дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Hu, M. Niculescu, X.M. Zhang, A. Hui. High-performance liquid chromatographic determination of polysorbate 80 in pharmaceutical suspensions // Journal of Chromatography A. 2003. V. 984. I. 2. P. 233–236.
2. S. Fekete, K. Ganzler, J. Fekete. Fast and sensitive determination of Polysorbate 80 in solutions containing proteins // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. V. 52. I. 5. P. 672–679.
3. Evaluation Report of Food Additives «Polysorbate 20, Polysorbate 60, Polysorbate 65 and Polysorbate 80». Food Safety Commission. Office Location of the FSC: Japan. Tokyo. 2007.
4. R. Zhang, Y. Wang, L. Tan, H.Y. Zhang, M. Yang. Analysis of polysorbate 80 and its related compounds by RP-HPLC with ELSD and MS detection // Journal of Chromatographic Science. 2012. V. 50(7) P. 598–607.
5. R.C. Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6th Edition. – London; Chicago: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009. 888 p.
6. L.M. Nair, N.V. Stephens, S. Vincent, N. Raghavan, P.J. Sand. Determination of polysorbate 80 in parenteral formulations by high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection // Journal of Chromatography A. 2003. V. 1012(1) P. 81–86.
7. A. Sparreboom, M. Zhao, J.R. Brahmer, J. Verweij, S.D. Baker. Determination of the docetaxel vehicle, polysorbate 80, in patient samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. V. 773(2). P. 183–190.
8. T.H. Tani, J.M. Moore, T.W. Patapoff. Single step method for the accurate concentration determination of polysorbate 80 // Journal of Chromatography A. 1997. V. 786. I. 1. P. 99–106.
9. D.L. McKean, A.J. Pesce, W. Koo. Analysis of polysorbate and its polyoxyethylated metabolite // Analytical Biochemistry. 1987. V. 161. I. 2. P. 348–351.
10. R.A. Greff, E.A. Setzkorn, W.D. Leslie. A colorimetric method for the determination of parts million of nonionic surfactants // Journal of the American Oil Chemists' Society. 1965. V. 42 (3). P. 180–185.
11. A. Nozawa, T. Ohnuma, T. Sekine. Re-examination of the microanalysis of non-ionic surfactants that contain polyoxyethylene chains by the method involving solvent extraction of the thiocyanatocobaltate(II) complex // Analyst. 1976. V. 101 (1204). P. 543–548.
12. N.H. Anderson, J. Girling. Determination of polyoxyethylene non-ionic surfactants at trace levels // Analyst. 1982. V.107 (1276). P. 836–838.
13. N.B. Cucakovich, N.B. Cucakovich. Determination of Tween 80 in tissue culture media, vaccines, and related products // Analytical Biochemistry. 1971. V. 40. I. 1. P. 183–186.
14. H.V. Dang, A.I. Gray, D. Watson, C.D. Bates, P. Scholes, G.M. Eccleston. Composition analysis of two batches of polysorbate 60 using MS and NMR techniques // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006. V. 40. I. 5. P. 1155–1165.
15. M. Khossravi, Y.H. Kao, R.J. Mrsny, T.D. Sweeney. Analysis methods of polysorbate 20: A new method to assess the stability of polysorbate 20 and established methods that may overlook degraded polysorbate 20 // Pharmaceutical research 2002. V. 19 (5). P. 634–9.
16. H.C. Mahle, S.K.K. Ravuri. Pharmaceutical formulation for proteins. November 22. 2012. US Patent App. 13/574,071.
17. M. Adamo, L.W. Jr. Dick, D. Qiu, A.H. Lee, J. Devincentis, K.C. Cheng. A simple reversed phase high-performance liquid chromatography method for polysorbate 80 quantitation in monoclonal antibody drug products // Journal of chromatography B. 2010. V. 878 (21). P. 1865–70.
18. Z. Őszi, G. Pethő, Quantitative determination of polysorbate 20 in nasal pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1998. V. 18. I. 4–5. P. 715–720.

УДК 547.398 + 547.583

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АРОИЛГИДРАЗИДОВ 1,4-ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Н.В. Колотова[1]*, А.В. Старкова[1]

Резюме. Исследованы антигельминтная, инсектицидная активности и влияние на гемостаз ароилгидразидов 1,4-дикарбоновых кислот. Антигельминтная активность изучена для 8 соединений, из них три вещества проявили антигельминтный эффект, превышающий действие эталона (пирантела). Инсектицидная активность исследована для четырех гидразидов 1,4-дикарбоновых кислот, все соединения неактивны. Пять соединений, исследуемых на гемостаз, не обладают антикоагулянтной активностью. Для них характерно гемостатическое действие, уступающее активности этамзилата.

Ключевые слова: ароилгидразиды 1,4-дикарбоновых кислот, инсектицидная, антигельминтная, антикоагулянтная активности.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF AROYLHYDRAZIDES 1,4-DICARBOXYLIC ACIDS

N.V.Kolotova[1]*, A.V. Starkova[1]

Abstract. Anthelmintic, insecticidal activities and influence on hemostasis of aroylhydrazides 1,4-dicarboxylic acids were investigated. Anthelmintic activity was investigated for 8 compounds, including three substances showed effect that exceed effect of the standard (Pyrantelum). Insecticidal activity was investigated for 4 hydrazides 1,4-dicarboxylic acids, all compounds are inactive. Compounds that were tested for hemostasis do not possess anticoagulant activity. They are characterized by a hemostatic effect which is lower than activity of Etamsylate.

Keywords: aroylhydrazide 1,4-decarboxylic acids, antihelminthic activity, insecticidal activity, anticoagulating activity, local anesthetizing activity.

1 – ФГБОУ ВО «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.: (342) 282 58 56, 8 919 48 98 914

ВВЕДЕНИЕ

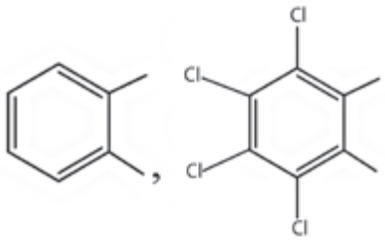
Данная работа является продолжением наших исследований по поиску соединений с антигельминтным, инсектицидным, антикоагулянтным и гемостатическим действиями среди монозамещенных гидразидов 1,4-дикарбоновых кислот [1–6]. Впервые антигельминтная активность для производных 1,4-дикарбоновых кислот была исследована для монозамещенных гидразидов диметилмалеиновой и итаконовой кислот [1]. Ранее среди монозамещенных гидразидов 1,4-дикарбоновых кислот были обнаружены соединения с инсектицидным действием [2, 3]. Для этих соединений характерно также влияние на гемостаз [4–6]. Поиск соединений с высоким уровнем этих видов активности является актуальным, поскольку происходит привыкание при продолжительном использовании препаратов и, кроме того, многие применяемые лекарственные средства имеют нежелательные побочные эффекты [7–10]. Дальнейшие исследования этих видов активности для производных 1,4-дикарбоновых кислот позволят установить зависимость активности от структуры гидразидного и кислотного фрагментов соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами изучения биологической активности явились ароилгидразиды 1,4-дикарбоновых кислот общей формулы:

RCOX–YCOOH

Где **X–Y**: $-CH_2-CH_2-$, $-CH=CH-$, $-CH=C(CH_3)-$,



R: $2\text{-}NH_2C_6H_4CONHNH-$, $4\text{-}NH_2C_6H_4CONHNH-$, $3\text{-}CH_3OC_6H_4CONHNH-$, $4\text{-}CH_3OC_6H_4CONHNH-$

Исследование антигельминтной активности соединений проводили на дождевых червях, приобретенных в зоомагазине г. Перми, по методике М.П. Николаева [11]. В чашку Петри помещали 5 мл 0,5% водного раствора исследуемых соединений и погружали 5 особей червей дли-

ной 5–8 см и диаметром 3–5 мм. 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 противогельминтные препараты «Пирантел» (ООО «Озон», Россия) и «Левамизол» (GedeonRichter, Венгрия) с действующим сроком годности, приобретенные в аптечной сети и соответствующие требованиям ФС.

Инсектицидная активность соединений изучалась на личинках комаров Chironomidae (мотыль) (приобретены в зоомагазине, г. Пермь). В чашку Петри помещали 5 мл 0,1% водного раствора исследуемых соединений и погружали 5 личинок комаров. Эффект действия соединений определялся временем наступления смерти. В качестве эталонов использовали имидаклоприд (танрек), диазинон и пиримифос (приобретены в специализированных магазинах г. Перми), широко применяемые в качестве инсектицидных средств.

Результаты исследования антигельминтной и инсектицидной активности соединений обработаны способом вариационной статистики по методу Фишера – Стьюдента [12] с помощью программы статистической обработки Stat Base.

Изучение влияния соединений на гемостаз проводили на коагулометре АПГ4-02-П. Для исследования использовали цитратную (3,8%) кровь (9:1) кроликов. Для определения активности в кювету помещали 50 мкл крови и добавляли 50 мкл 0,2% раствора исследуемого соединения, для контроля вместо вещества добавляли 50 мкл изотонического раствора хлорида натрия. В качестве препарата сравнения добавляли 50 мкл гепарина в концентрации 1 ЕД/мл крови или 50 мкл раствора этамзилата в концентрации 0,2%. Затем пробы инкубировали в течение 60 с. Добавляли 50 мкл 1% раствора хлорида кальция и приступали к измерению времени свертывания крови.

Степень влияния соединений на гемостаз определяли по изменению времени свертывания цитратной крови в контроле и опыте и статистически обрабатывали с использованием коэффициента Стьюдента [12].

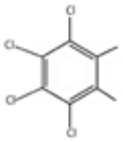
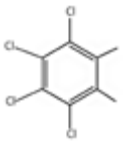
Оценка влияния соединений на гемостаз в экспериментах на крови кроликов осуществлялась в соответствии с требованиями Фармакологического комитета, изложенными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [13]. Содержание кроликов соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 51000.3-96 «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.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антигельминтная активность изучена для 8 соединений, из них три вещества проявили антигельминтный эффект, превышающий действие пирантела (таблица 1). Замена малеинового фрагмента у соединения 2 на остаток цитраконовой кислоты (соединение 3) приводит к появлению антигельминтной активности, в 2 раза превышающей действие эталона. Замена 4-аминобензоильной группы в соединении 2 на 4-метоксибензоильную (соединение 7) практически в 3 раза усиливает антигельминтное действие в сравнении с пирантелом.

Таблица 1.

Антигельминтная активность соединений

n\n	X–Y	R	Продолжительность жизни червей, мин (опыт)	Продолжительность жизни червей, мин (контроль)
1.	$-CH_2-CH_2-$	2-$NH_2C_6H_4CONHNH$	более 200	1 сутки
2.	–CH=CH–	4-$NH_2C_6H_4CONHNH$	более 200	1 сутки
3.	$-CH=C(CH_3)-$	4-$NH_2C_6H_4CONHNH$	93,7±2,84	1 сутки
4.		4-$NH_2C_6H_4CONHNH$	122,7±10,70	1 сутки
5.		4-$NH_2C_6H_4CONHNH$	более 200	1сутки
6.	$-CH_2-CH_2-$	3-$CH_3OC_6H_4CONHNH$	более 200	1 сутки
7.	–CH=CH–	4-$CH_3OC_6H_4CONHNH$	71,6±2,60	1 сутки
8.		4-$CH_3OC_6H_4CONHNH$	более 200	1 сутки
Эталоны		Пирантел	215,0±0,37	1 сутки
		Левамизол	20,2±2,08	1 сутки

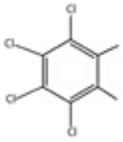
Ранее инсектицидная активность для гидразидов янтарной и тетрахлорфталевой кислот не изучалась. Для гидразидов малеиновой и фталевой кислоты были обнаружены соединения с инсектицидной активностью [2, 3]. Результаты исследований инсектицидной активности четырех ароилгидразидов янтарной, цитраконовой и тетрахлорфталевой кислот приведены в таблице 2. Все соединения не оказали противокомариного действия.

Авторами проведен скрининг на прямую антикоагулянтную и гемостатическую активность для пяти ароилгидразидов 1,4-дикарбоновых кислот. Установлено, что исследованные соединения не обладают антикоагулянтной активностью (таблица 3). Для них характерно гемостатическое действие, уступающее активности этамзилата. Ранее было обнаружено достаточно высокое антикоагулянтное действие для 4-аминобензоилгидразида янтарной кислоты [4], для

ацилгидразидов тетрахлорфталевой кислоты обнаружена высокая антикоагулянтная и гемостатическая активность [5], гидразиды цитраконовой кислоты проявили только гемостатическое действие [6].

Таблица 2.

Инсектицидная активность соединений

n\n	X–Y	R	Продолжительность жизни личинок, мин (опыт)	Продолжительность жизни личинок, мин (контроль)
1.	$-CH_2-CH_2-$	2-$NH_2C_6H_4CONHNH$	более 200	1 сутки
2.	$-CH=C(CH_3)-$	4-$NH_2C_6H_4CONHNH$	более 200	1 сутки
3.		4-$NH_2C_6H_4CONHNH$	более 200	1 сутки
4.	$-CH_2-CH_2-$	3-$CH_3OC_6H_4CONHNH$	более 200	1 сутки
Эталоны		Диазинон	17,0±1,87	1 сутки
		Пиримифос	24,5±1,69	1 сутки
		Имидаклоприд	43,5±3,39	1 сутки

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

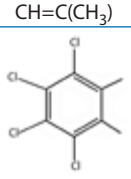
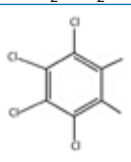
Изучено несколько видов активности для ароилгидразидов 1,4-дикарбоновых кислот: антигельминтная, инсектицидная, прямая антикоагулянтная и гемостатическая. Среди исследованных соединений обнаружены вещества с антигельминтным эффектом, превышающим действие пирантела, применяемого в терапии гельминтозов. Продолжен поиск соединений с инсектицидным действием, установлено, что все исследованные ароилгидразиды 1,4-дикарбоновых кислот проявляют гемостатическую активность. Дальнейшие исследования этих видов активности у производных 1,4-дикарбоновых кислот позволят установить зависимость активности от структуры соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.В. Колотова, А.В Старкова, С.В. Чащина. Синтез и биологическая активность монозамещенных гидразидов итаконовой и диметилмалеиновой кислот // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. 2016. № 3(13). С. 15–23.
2. Б.Я. Сыропятов, Н.В. Колотова, Е.А. Машкина и др. Инсектицидная активность производных бутендиовых кислот // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2015. № 8. С. 19–22.
3. 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.
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 фталевых кислот // Сборник материалов XVI международной заочной научно-практической конференции «Инновации в науке». 2013. С. 139–147.
6. Б.Я. Сыропятов, Н.В. Колотова. Влияние на гемостаз производных цитраконовой кислоты // Вопросы биологической, медицинской и фар-мацевтической химии. 2015. № 6. С. 54–56.
7. В.Е. Поляков, А.Я. Лысенко. Гельминтозы и детей и подростков. – М.: Медицина, 2003. 256 с.
8. Р.Г. Лукшина, М.М. Локтева, Т.Н. Павликовская. Паразитарные болезни человека: Монография / Под общ. ред. Р. Г. Лукшиной. 2-е изд., перераб. и доп. – Харьков: ИНЖЭК, 2005. 472 с.
9. А.П. Середа. Профилактика тромбоэмболических осложнений после эндопротезирования коленного и тазобедренного суставов. URL: http: travmaorto.ru/96.html (дата обращения 14.04.2017)
10. Р.М. Тихилов, Ю.М. Стойко, М.Н. Замятин и др. Профилактика тромбоэмболических осложнений в травматологии и ортопедии: Методические рекомендации / Под ред. акад. РАМН Ю.Л. Шевченко. – М., 2006. 20 с.
11. М.П. Николаев. Экспериментальные основы фармакологии и токсикологии. Практическое руководство. – М.-Л.: Медгиз, 1941. 195 с.
12. В.В. Прозоровский. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований // Психофармакология и биологическая наркология. 2007. Т. 7. Вып. 3-4. С. 2090-2120.
13. А.Н. Миронов. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. – М.: Гриф и К. 2012. 197 с.

Таблица 3.

Влияние соединений на время свертывания крови

n\n	X–Y	R	Время свертывания, с (контроль)	Время свертывания, с (опыт)	% изменения свертываемости	P
1.	$-CH_2-CH_2-$	2-$NH_2C_6H_4CONHNH$	121,1±3,43	107,6±4,62	+11,1	<0,01
2	$CH=C(CH_3)$	4-$NH_2C_6H_4CONHNH$	183,1±6,67	160,0±6,86	+12,6	<0,05
3.		4-$NH_2C_6H_4CONHNH$	174,7±4,23	159,6±4,37	+8,6	<0,05
4.	$-CH_2-CH_2-$	3-$CH_3OC_6H_4CONHNH$	154,0±3,46	136,5±6,49	+11,4	<0,05
5.		4-$CH_3OC_6H_4CONHNH$	153,5±4,34	134,9±5,93	+12,1	<0,05
Эталоны		Этамзилат	144,1±7,83	121,0±7,20	+16,0	<0,05
		Гепарин	145,7 ±9,64	618,3±55,88	-324,4	<0,001

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 615.28; 615.07; 661.77; 547.858

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СТРУКТУРЫ ПРОИЗВОДНЫХ 6-ГИДРОКСИПИРИМИДИН-4(*3H*)-ОНОВ НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ В СИСТЕМЕ 1-ОКТАНОЛ – ВОДА

А.Э. Потапова[1]*, А.А. Теслев[1]

Резюме. В статье представлены результаты экспериментального изучения влияния структуры заместителей и pH среды на величину коэффициентов распределения в системе 1-октанол – вода для ряда 2,5-замещенных 6-гидроксипиримидин-4(*3H*)-онов.

Ключевые слова: фармацевтическая субстанция, 6-гидроксипиримидин-4(*3H*)-он, коэффициент распределения, всасываемость, биофармация, гетероциклические соединения, водородный показатель, липофильность.

STUDY OF THE EFFECT OF STRUCTURE ON OCTANOL-WATER DISTRIBUTION OF 6-HYDROXYPYRIMIDINE-4-(*3H*)-ONES DERIVATIVES

A.E. Potapova[1]*, A.A. Teslev[1]

Abstract. The results of an experimental study of the effect of structure of substituting groups and pH value on the partition coefficients in biphasic systems of n-octanol and water for a number of 2,5-substituted 6-hydroxypyrimidine-4-(*3H*)-ones are presented.

Keywords: pharmaceutical substance, 6-hydroxypyrimidine-4(*3H*)-on, partition coefficient, absorption, biopharmacy, heterocyclic compounds, pH, lipophilicity.

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

1 – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Saint Petersburg Chemical-Pharmaceutical Academy» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 14, Prof. Popova st., Saint Petersburg, 197376, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: anastasia.potapova@pharminnotech.com
Тел.: (812) 499 39 00 (доб. 4501)

ВВЕДЕНИЕ

Возможность использования органических соединений в качестве фармацевтических субстанций существенным образом зависит от их фармакодинамических (пути взаимодействия молекулы с биологической мишенью) и фармакокинетических (адсорбции, распределения и элиминирования молекулы из организма человека) свойств [1]. При этом распределение вещества в организме может оказывать существенное влияние на его фармакологические свойства [2].

Известно, что вещества с большими значениями коэффициента распределения преимущественно переходят в липофильные ткани и жидкости (билипидные слои клеток), тогда как вещества с малыми значениями коэффициентов распределения преимущественно локализуются в гидрофильных (сыворотка крови и т.п.) [3].

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния pH на величину коэффициента распределения (*log P*), одного из фармакокинетических параметров *in vitro*, характеризующего перенос вещества через границу раздела фаз различной полярности [4]. Настоящий показатель используется для описания распределения вещества через липидные бислои клеточных мембран, неспецифической связываемости растворенных веществ с биомакромолекулами, для оценки биологической доступности *in vitro* и *in silico*, активности и неспецифической токсичности, а также для исследования соотношения «структура – активность» [5, 6]. Кроме того, с помощью параметров липофильности возможно прогнозирование поведения веществ в условиях химического анализа [3].

Известно наличие корреляции между биологической активностью и величиной константы распределения вещества в системе 1-октанол – вода ($P_{o/w}$) [7], а само значение *log P* можно использовать в качестве параметра липофильности. Выбор 1-октанола в качестве органической фазы основан на том, что баланс полярных и неполярных фрагментов в молекуле имитирует дифильные свойства липидов и белков в клетках живых организмов [8].

В настоящее время наибольшее распространение находят три основных метода определения параметра $P_{o/w}$ [5]: прямое определение экстракционным методом, косвенное

определение хроматографическим методом и расчетные методы, к которым также относят прогнозирование *in silico* [6, 9].

К достоинствам прямого определения можно отнести простоту и экспрессность метода, его дешевизну, отсутствие необходимости в дорогостоящем оборудовании и приборах, в использовании стандартов [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты и оборудование

Компоненты, входящие в состав буферных систем: динатрия гидрофосфата додекагидрат (ч.д.а.), калия дигидрофосфат (ч.д.а.), ортофосфорная кислота концентрированная (ч.д.а.), калия гидроксид (х.ч.), натрия гидроксид (х.ч.), лимонная кислота (х.ч.).

В качестве объектов исследования были выбраны 2,5-замещенные 6-гидроксипиримидин-4(*3H*)-оны (таблица 1), которые использовали в виде фармацевтических субстанций с массовой долей основного вещества не менее 99,0%.

1-октанол квалификации (х.ч.) дополнительно очищали кипячением над металлическим натрием в течение двух часов на установке с обратным холодильником, после чего охлаждали. Образовавшийся натрия гидроксид отфильтровывали, а 1-октанол перегоняли методом простой перегонки [5]. Собирали фракцию чистого вещества при 194–195 °С. В качестве растворителя для приготовления буферных растворов использовали воду бидистиллированную.

Изучение распределения проводили с использованием камеры климатической HPP 110 (Memmert, Германия). Системы помещали в стеклянные флаконы (марка стекла – МТО). Температуру поддерживали с точностью ±0,2 °С. Количественное определение проводили на спектрофотометре СФ-2000 («ОКБ Спектр», Россия) в закрывающихся кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Значения pH определяли потенциометрически с помощью pH-метра PB11 (Sartorius, Россия). Стандартное отклонение измерений pH не превышало 0,03 единиц [5].

Условия эксперимента

Ранее было установлено, что полученные на кафедре органической химии ФГБОУ ВО СПХФА 2,5-дизамещенные 6-гидроксипиримидин-4(*3H*)-оны обладают анальгетической и антимикробной активностью [10, 11].

Целью настоящего исследования являлось определение влияния заместителей и pH среды на величины коэффициентов распределения для ряда полигидроксипиримидинов.

Вещества вводили в двухфазные системы в виде растворов в соответствующих буферах с концентрацией около 0,0025 моль/л (таблица 1) [3].

Распределение изучали при равных объёмах водной и органической фаз (50,0 мл), проводя не менее 3 повторений каждого эксперимента. Термостатирование и перемешивание фаз проводили в течение 24 ч. Пробы водной и органической фазы отбирали через 2 и 24 часа. Пипетку погружали в двухфазную систему, через неё осторожно продували воздух, чтобы предотвратить попадание в пипетку верхней органической фазы [3]. Пробу органического слоя таким же образом напрямую отбирали пипеткой.

Содержание вещества в каждой из фаз после распределения определяли по его собственной абсорбции при длине волны максимума поглощения (таблица 1).

В качестве растворов сравнения использовали фосфатные буферные растворы с соответствующим значением pH и 1-октанол соответственно.

Значение коэффициента распределения P (partition coefficient) рассчитывали по формуле (1),

$$P = \frac{[HA]_{oct}}{[HA]_{aq}}, \quad (1)$$

где $[HA]_{oct}$ и $[HA]_{aq}$ – равновесные концентрации веществ в октанольной и водной фазе соответственно.

Определение удельного коэффициента поглощения ($E^{уд}$) для исследуемых соединений проводили по стандартной фармакопейной методике [12, 13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментального определения показателя *log P* в зависимости от pH буферной системы приведены в таблице 2.

Было установлено, что в условиях эксперимента термодинамические равновесия в системах устанавливаются в течение 24 ч.

В структуру первого соединения входят три вида групп, способных к ионизации: кислотные (NH), основные (пиридиновый атом азота) и амфотерные (OH). Данный аспект обусловливает относительно высокую растворимость таких соединений во всем диапазоне pH и наличие узкого интервала pH, соответствующего его изоэлектрической точке (ИЭТ). Растворимость такого соединения в гидрофильных средах намного выше, чем в липофильных, что коррелирует с полученными экспериментальными результатами. Значения *log P* на первом графике лежат ниже оси абсцисс и приближаются к ней лишь в узком интервале pH при значениях, близких к ИЭТ (рисунок 1).

Таблица 1.

Значения внесенных концентраций и удельных коэффициентов поглощения исследуемых веществ

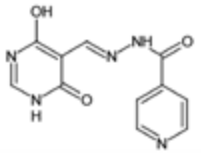
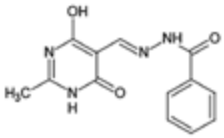
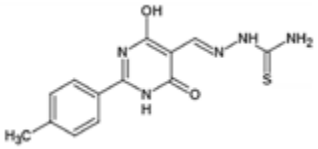
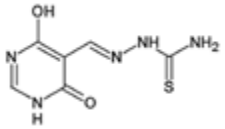
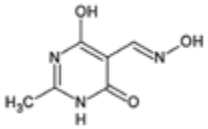
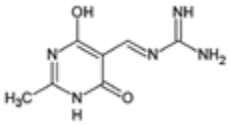
Фармацевтическая субстанция			Внесенная концентрация, $C_{исх}$, г/л	Удельный коэффициент поглощения, $E_{уд}$	Длина волны максимума поглощения, λ_{max}, нм
Шифр	Формула	Название по IUPAC			
1		N-[(4-гидрокси-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил)метилиден] пиридин-4-карбгидрозид	0,0020±0,0003	1722	375±1
2		N-[(4-гидрокси-2-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил)метилиден] бензгидразид	0,0043±0,0001	1001	355±1
3		2-{[4-гидрокси-2-(4-метилфенил)-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил] метилиден}гидразинкарботиоамид	0,0028±0,0001	736	345±1
4		2-[(4-гидрокси-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил)метилиден] гидразинкарботиоамид	0,0037±0,0003	1088	337±2
5		6-гидрокси-5-[(гидроксиимино)метил] пиримидин-4(3H)-он	0,0020±0,0001	1142	340±1
6		1-[(4-гидрокси-2-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил)метилиден] гуанидин	0,0028±0,0002	719	298±2

Таблица 2.

Значения коэффициентов распределения (log P) веществ в системе 1-октанол – вода

Шифр	Время, ч	pH							
		2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,8
1	2	–0,71	–0,58	–0,24	–0,21	–0,20	–0,37	–0,58	–0,78
	24	–0,89	–0,72	–0,40	–0,26	–0,25	–0,45	–0,73	–0,97
2	2	1,39	1,38	1,42	1,48	–0,26	–0,28	–0,23	–1,18
	24	1,30	1,31	1,33	1,35	–0,23	–0,25	–0,21	–1,05
3	2	1,25	1,24	1,21	1,09	–0,44	–0,81	–0,80	–0,74
	24	1,18	1,21	1,19	1,05	–0,60	–0,96	–1,02	–0,95
4	2	0,78	0,47	0,11	–0,13	–0,41	–0,62	–0,76	–0,80
	24	0,61	0,32	0,08	–0,26	–0,58	–0,96	–1,16	–1,25
5	2	1,41	0,89	0,53	–0,09	–0,53	–1,01	–0,94	–0,97
	24	1,45	1,03	0,73	0,39	0,03	–0,25	–0,27	–0,28
6	2	0,37	0,24	0,12	0,02	–0,47	–1,29	–1,43	–1,48
	24	0,41	0,31	0,23	0,10	–0,15	–0,51	–0,75	–0,97

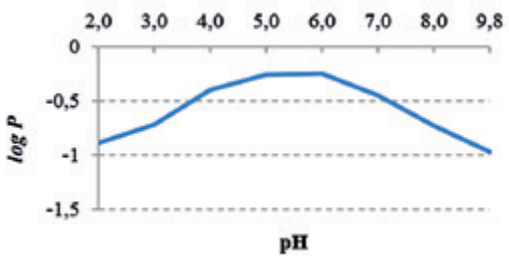


Рисунок 1. Зависимость *log P* от pH для N-[(4-гидрокси-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил)метилиден]пиридин-4-карбгидрозида (соединение 1)

В структуру всех остальных изучаемых соединений входят кислотные (NH) и амфотерные группы (OH), из-за сильного эффекта сопряжения основность пиридинового атома азота в структуре пиримидинового кольца заметно снижается. Растворимость таких соединений в гидрофильных средах проявляется при pH>6, в кислой же области наблюдается сравнительно высокое сродство к липофильной фазе. Для соедине-

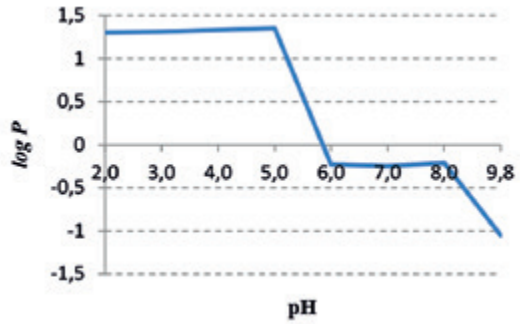


Рисунок 2. **Зависимость *log P* от pH для N-[(4-гидрокси-2-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил)метилиден]бензгидразида (соединение 2)**

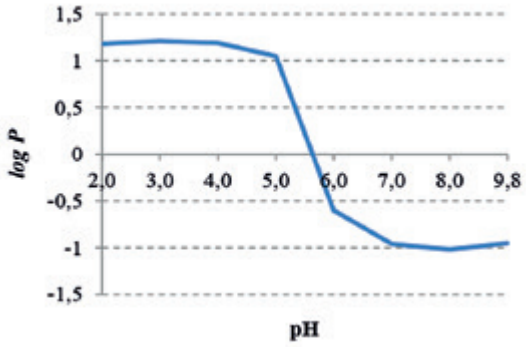


Рисунок 3. **Зависимость *log P* от pH для 2-{[4-гидрокси-2-(4-метилфенил)-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил]метилиден}гидразинкарботиоамида (соединение 3)**

ний 2–6 внешний вид зависимостей *logP* от величины pH определяется кислотными свойствами изучаемых структур.

Соединения 2 и 3 содержат в своей структуре два кислотных центра средней и слабой силы, что обусловливает их слабую гидрофильность в середине шкалы pH и высокую растворимость в сильнощелочных средах (рисунки 2, 3).

Соединения 4, 5 и 6 содержат в своей структуре три кислотных центра различной силы. Гидрофильность соединений 4, 5 и 6 плавно возрастает с увеличением pH (рисунки 4, 5, 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Зависимость *log* P от pH среды в системе 1-октанол – буферный раствор может быть использована для оценки потенциальной биодоступности лекарственных веществ *in vitro*.

Были определены величины коэффициентов распределения для ряда полигидроксипиримидинов. Показано влияние заместителей и pH среды на значения показателя *log P*.

Установлено, что наличие во втором положении пиримидинового цикла электронодонорных заместителей (метильной и п-толлильной групп) значительно повышает растворимость данных производных в липофильной фазе, что соответственно приводит к увеличению значений *log P* в области pH<5.

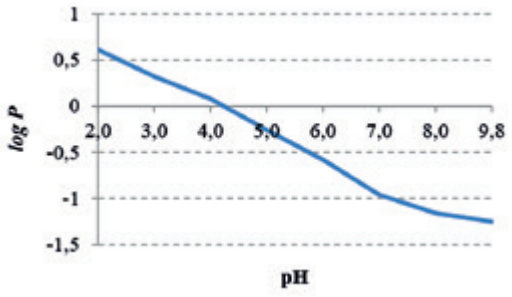


Рисунок 4. **Зависимость *log P* от pH для 2-[(4-гидрокси-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил)метилиден]гидразинкарботиоамида (соединение 4)**

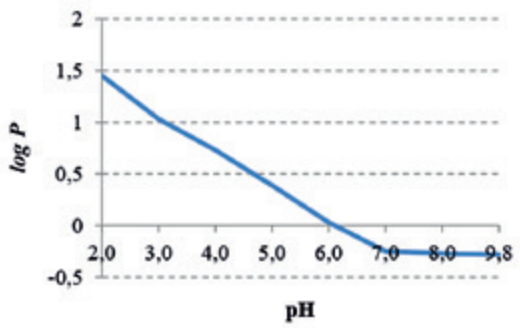


Рисунок 5. **Зависимость *log P* от pH для 6-гидрокси-5-[(гидроксиимино)метил]пиримидин-4(3H)-он (соединение 5)**

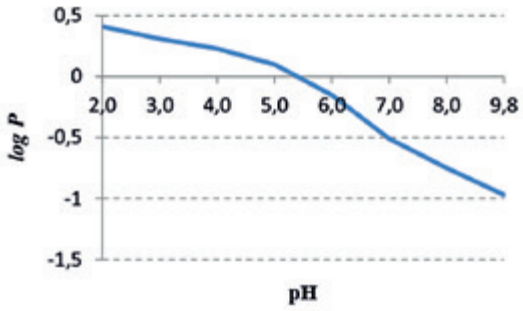


Рисунок 6. **Зависимость *log P* от pH для 1-[(4-гидрокси-2-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-ил)метилиден]гуанидина (соединение 6)**

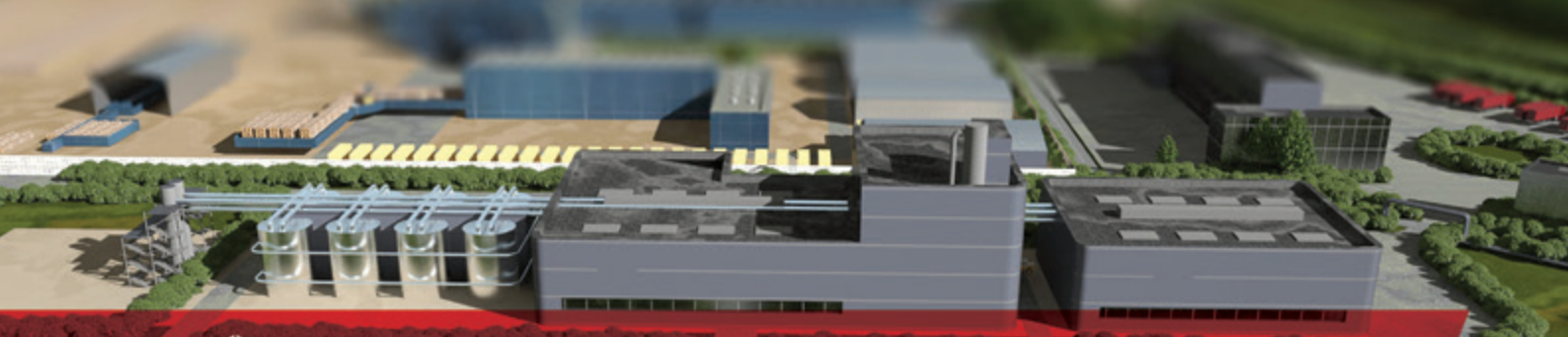
Введение сильных электроотрицательных атомов (серы и азота) в структуру заместителей в пятом положении повышает NH-кислотность структур, вследствие чего значительно увеличивается их растворимость при pH>8 в водной фазе.

Липофильность изучаемых соединений, определяющая проницаемость веществ через липидные мембраны, возрастает с увеличением значения pH водной фазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.Я. Головенко, И.Ю. Борисюк. Биофармацевтическая классификационная система – экспериментальная модель прогнозирования биодоступности лекарственных средств // Биомедицинская химия. 2008. Т. 54. С. 392–407.
2. J.Kujawski, M.K. Bernard, A. Janusz, W. Kuzma. Prediction of log P: ALOGPS application in medicinal chemistry education // Journal of Chemical Education. 2012. V. 89. P. 64–67.
3. А.А. Теслев. Разработка составов и технологий препаратов на основе 4-(3-оксо-3-этоксипропанамидо)бензойной кислоты, обладающих антиоксидантным и антиишемическим действием.: дис. … канд. фарм. наук. СПб., 2016.
4. И.Е. Шохин, Ю.И. Кулинич, Г.В. Раменская, В.Г. Кукес. Важнейшие биофармацевтические свойства лекарственных веществ на стадии абсорбции в ЖКТ (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2011. №7 (45). С. 37–40.
5. О.С. Чернышова, А.С. Власенко, А.Ю. Куликов. Распределение фенола и его производных в системе вода – 1-октанол // Вісник Харківського Національного Університету. 2005. № 669. 13(36). С. 139–144.
6. И.Е. Шохин, Г.В. Раменская. Методики прогнозирования кишечной проницаемости лекарственных веществ с применением компьютерного моделирования // Biomedicin. 2011. № 2. С. 35–40.
7. K.T. Valsaraj, L.J. Thibodeaux. On the Estimations of Micelle-Water Partition Constants for Solutes from Their Octanol-Water Partition Constants, Normal Boiling Points, Aqueous Solubilities, and Group and Bond Contribution Schemes // Separation Science and Technology. 1990. V. 25. №. 4. P. 369–395.
8. M.D. Trone, M.S. Leonard, M.G. Khaledi. Congeneric Behavior in Estimations of Octanol–Water Partition Coefficients by Micellar Electrokinetic Chromatography // Analytical Chemistry. 2000. V. 72. P. 1228–1235.
9. Н.Н. Пшенкина. Предиктивные технологии в исследовании новых лекарственных веществ URL: http://www.medline.ru/public/art/tom12/art86.html (дата обращения 01.02.2017).
10. А.Э. Потапова, И.П. Яковлев, Е.В. Куваева. Антимикробная активность 2,5-замещенных-6-гидроксипиримидин-4(3Н)-онов // Инновации в здоровье нации: сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2016. С. 504–507.
11. А.Э. Потапова, Е.В. Куваева, М.В. Сопова, Г.В. Ксенофонтова, И.П. Яковлев. Реакции 2-замещенных 6-гидрокси-4-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-карбальдегидов с некоторыми N-нуклеофилами // Бутлеровские сообщения. 2016. № 10 (48). С. 87–92.
12. ОФС.1.2.1.1.0003.15. Спектрофотометрия в УФ- и видимой областях // Государственная фармакопея. XIII изд. Т. 1. – М. 2016.
13. D.A. Smith, C. Allerton, A.S. Kalgutkar, H. van de Waterbeemd, D.K. Walker. Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design. Third Ed. – New Jersey: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012. P. 257.





«ФАРМКОНТРАКТ ИНЖИНИРИНГ»

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

ГЕНПОДРЯД

сертификат ИСО 9001-2011 (ISO 9001:2008)

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, КЛИМАТИЧЕСКИЕ, 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:



Илатовский Алексей Анатольевич

Вице-президент по развитию направлений проектирование, строительство и инжиниринг



Пергаев Михаил Анатольевич

Руководитель направления проектирование и строительство, инжиниринг



Фроленков Константин Александрович

Руководитель направления синтез субстанций

ФАРМКОНТРАКТ ИНЖИНИРИНГ: ВМЕСТЕ МЫ СОЗДАЕМ БУДУЩЕЕ РОССИЙСКОЙ ФАРМАЦЕВТИКИ!

Лицензия на проведение работ с использованием сведений составляющих гостайну № 27688 от 20.01.2016

Свидетельство СРО № 4204.01-2017-7724838223-П-192 от 24.01.2017

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

УДК 615.212.7; 615.03

РАЗВИТИЕ КОМПЛЕКСНОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ СИЛЬНОЙ И СРЕДНЕЙ БОЛИ. ЧАСТЬ I. МУЛЬТИТАРГЕТНОЕ КОМБИНИРОВАНИЕ ОПИОИДОВ И НЕНАРКОТИЧЕСКИХ АНАЛЬГЕТИКОВ ЦЕНТРАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

А.В. Соснов[1]*, Ф.М. Семченко[1], М.И. Власов[1], В.Н. Тохмахчи[1], А.А. Соснова[1]

Резюме. Анальгетики на основе опиоидов в настоящее время являются основным средством фармакотерапии сильной боли. На основе анализа данных по использованию и разработке медицинских и ветеринарных анальгетиков, действующих на различные биомишени ЦНС, описаны и классифицированы подходы к увеличению эффективности и безопасности комплексной анальгезии на основе опиоидов. Показаны принципы создания мультитаргетных комбинаций фиксированного состава (КФС), приведены примеры мультимодальной анальгезии, а также разработки мультитаргетных солекарств. Рассмотрены возможности комбинирования опиоидов с лигандами альфа-2 андренорецепторов; антагонистами рецепторов возбуждающих аминокислот; ГАМК-лигандами, их производными и аналогами; каннабиоидами; ингибиторами обратного нейронального захвата моноаминов, антагонистами опиатных рецепторов. Продемонстрирована универсальность мультитаргетных веществ. Приведены примеры создания препаратов, купирующих зависимость и развитие толерантности к опиоидам и принципы защиты от немедицинского использования препаратов. Методология мультитаргетной анальгезии является одним из драйверов развития на фоне незначительного прогресса в разработке новых эффективных веществ-анальгетиков для купирования сильной и средней боли. Наибольший интерес представляют КФС, обладающие эффектом потенцирования и действующие в низких дозах, что позволит создавать разнообразные препараты анальгетиков.

Ключевые слова: опиоид, ненаркотический анальгетик, биомишень, мультитаргетный препарат, мультимодальная анальгезия, фармацевтическая композиция, комбинация фиксированного состава, солекарство.

DDEVELOPMENT OF COMPLEX PHARMACOTHERAPY OF SEVERE AND MODERATE PAIN. PART I. MULTITARGETED COMBINATION OF OPIOIDS AND NON-OPIOID ANALGESICS WITH CENTRAL EFFECTS

A.V. Sosnov[1]*, F.M. Semchenko[1], M.I. Vlasov[1], V.N. Tohmahchi[1], A.A. Sosnova[1]

Abstract. Medicines based on opioid analgesics are the basic means of pharmacotherapy of severe pain at present. Approaches to increase efficacy and safety of complex opioid analgesia are described and classified based on analysis of medicinal and veterinary analgesics acting on different CNS biotargets. Principles of creation multitargeted fixed-dose combinations (FDC) and some schemes of multimodal analgesia are demonstrated by the example of opioid combinations with ligands of alpha-2 adrenergic receptors, antagonists of excitatory amino acid receptors, GABA ligands, their derivatives and analogues, cannabinoids, monoamines reuptake inhibitors and opiate receptor antagonists. Importance of multitargeted substances in general including codrug approach for facilitating of drug delivery and bioactivity enhancement were demonstrated. Development of opioid formulations with low level of dependency and tolerance and also principles to protect opioid formulations against non-medical use were described. Methodology of multitargeted analgesia is one of the drivers in drug development on the background of low progress in the development of new effective molecules for relief of severe and moderate pain. The greatest interest is development of FDC with drug potentiation and efficacy at low doses. It allows creating wide variety of analgesics formulations.

Keywords: opioid, non-narcotic analgesic, biological target, multitargeted formulation, multimodal analgesia, pharmaceutical composition, fixed-dose combination, codrug.

1 – ФГУП «Государственный завод медицинских препаратов» (ФГУП «ГосЗМП»), Россия, 111024, г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 23

1 – Federal State Unitary Enterprise «State Pharmaceutical Plant» (FSUE «GosZMP»), 23, sh. Entuziastov, Moscow, 111024, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: andrey.sosnov@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия во многих странах Европейского союза, США, России и других странах с увеличивающейся долей пожилого населения отмечается неуклонный рост числа пациентов с выраженной хронической болью. Увеличение доли пациентов с хроническими болевыми синдромами обусловлено хроническими заболеваниями опорно-двигательного аппарата, развитием осложнений диабета, ростом онкологической патологии (характерно для РФ, но не для США и большинства стран ЕС), бытового и производственного травматизма, травм, полученных в военных конфликтах (характерно для США) и стихийных бедствиях, а также проблемами адаптации населения к социальному стрессу [1, 2]. Согласно статистическим данным от хронической боли страдает каждый пятый житель западной Европы и каждый четвертый житель США [3]. Статистические данные по России имеют большой разброс и демонстрируют наличие хронического болевого синдрома у взрослого населения от 25% до 56%. [4, 5]. Более 40% людей,

страдающих хронической болью, указывают на то, что боль серьезно снижает качество их жизни [6].

Это обуславливает устойчивый рост медицинского потребления анальгетиков в экономически развитых странах. Мировой рынок препаратов для терапии боли демонстрирует устойчивый рост примерно 3,2% в год [7]. Прогноз объема мирового рынка фармацевтических средств купирования боли предполагает его рост от $67,8 млрд в 2016 г. до $75,2 млрд в 2027 г. [8]. Вероятно, существенное увеличение потребности в анальгетиках и других средствах купирования боли при прогнозируемой активизации масштабных вооруженных конфликтов [9–11].

Комплексная фармакотерапия сильной и средней боли подразумевает использование сильнодействующих анальгетиков. Россия относится к группе стран с крайне недостаточным обеспечением пациентов сильнодействующими анальгетиками. Это обусловлено экономическими факторами, недостаточной номенклатурой доступных препаратов, крайне малым объемом отечественного производства субстанций [12], а также несовершенством правового регулирования в области здравоохранения [13].

Под сильнодействующими анальгетиками, как правило, понимают анальгетики, относимые к наркотическим, главным образом опиоиды. Уровень использования наркотических лекарств в РФ составляет 107 статистических условных суточных доз (СУСД) на миллион человек в сутки. Показатель меньше 200 СУСД оценивается как недостаточный, а 100 СУСД – как крайне низкий. В США медицинское потребление наркотиков в 39 раз больше, чем в РФ, в Германии – в 19 раз, в Австрии – в 15 раз, во Франции – в 7 раз, в Белоруссии – в 2 раза [14–16]. Разработки сильнодействующих ненаркотических анальгетиков ведутся, но данные анальгетики в настоящее время в РФ отсутствуют [17]. Острый дефицит в РФ отечественных субстанций и препаратов анальгетиков для купирования синдрома сильной и средней боли различной природы (как по номенклатуре веществ, так и по объему производства в морфиновом эквиваленте) является хронической проблемой с выраженным социальным аспектом. По оценке авторов [12], необходимо увеличить отечественное производство субстанций сильных анальгетиков примерно в 20 раз в морфиновом эквиваленте, примерно от 300 кг/год до 6 т/год. Также необходимо разработать и организовать производство отечественных препаратов и изделий, удобных для использования хроническими пациентами, на основе наркотических анальгетиков.

По мнению ряда специалистов [18–21], отсутствие адекватной анальгезии на фоне социального стресса является одной из причин массового использования алкоголя для купирования болевого синдрома. Отмечено, что потребление алкоголя в качестве средства самолечения изменяет восприятие боли пациентами и создает проблемы при терапии хронического болевого синдрома [22]. Можно предположить, что отсутствие адекватной анальгезии является одним из значимых факторов алкоголизма в РФ.

Согласно распоряжению Правительства РФ от 01.07.2016 № 1403-р «Повышение доступности наркотических и психотропных средств для использования в медицинских целях», а также поручений Правительственной комиссии по импортозамещению планируется создать отечественное производство сырья, полупродуктов, фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм анальгетиков и анестетиков на основе наркотических и психотропных соединений [23].

Область сильнодействующих анальгетиков имеет ряд специфических особенностей, а именно: выраженные физиологические эффекты, действие в малых дозах, преимущественное фармацевтическое использование индивидуальных стереоизомеров, возможность создания разнообразных лекарственных форм (инъекционных, ингаляционных, трансдермальных, интраназальных и др.), побочные центральные эффекты (для действующих на ЦНС), вероятность развития различных зависимостей (при наличии наркотических или психотропных эффектов), отнесение активных веществ к первому и второму классам опасности, контроль и ограничение внутреннего оборота, контроль и учет импорта и экспорта субстанций и готовых форм, опасность незаконного использования в весьма разнообразных криминальных сценариях. Поэтому значительная часть данных физиологически активных веществ находится под национальным и международным контролем, что создает специфику и накладывает ограничения на доступность препаратов для пациентов РФ, международную торговлю препаратами, субстанциями и их основными прекурсорами. В качестве альтернативы опиатам прогнозируется выход на рынок (в ближайшие 5 лет) сильнодействующих ненаркотических анальгетиков на основе природного тетродотоксина (ТТХ), которые смогут конкурировать с опиоидами при купировании сильной и средней боли [12]. Это может увеличить объем продаж анальгетиков для потенциально трудоспособных пациентов и несколько изменить схемы купирования средней и сильной боли в целом. На доклинических стадиях проводится исследование препаратов на основе других сильнодействующих природных токсинов и их аналогов [24].

Таким образом, в области фармакотерапии средней и главным образом сильной боли наблюдается противоречивая ситуация: с одной стороны альтернативы наркотическим анальгетикам в настоящее время практически не существует, с другой стороны – использование опиоидов (особенно для потенциально трудоспособных пациентов) сопряжено со значимыми побочными эффектами и рисками. Одним из путей решения в среднесрочной перспективе является разработка более эффективной методологии мультитаргетной анальгезии сильной и средней боли как на основе

сочетания известных веществ в одном инновационном препарате (перспективные комбинации фиксированного состава), так и на основе комбинирования уже используемых или перспективных препаратов (мультимодальная анальгезия).

Для комплексной фармакотерапии боли Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) ранее была предложена методология («лестница») обезболивания, которая подразумевает комплексное использование для терапии сильной и средней боли онкологического происхождения комбинации наркотических и ненаркотических анальгетиков, а также вспомогательных (адъювантных) средств [15, 25, 26]. Это позволяет увеличить эффективность и снизить терапевтические дозы и, соответственно, побочные эффекты наркотических анальгетиков. Дальнейшее развитие средств и схем фармакотерапии на основе понимания механизмов физиологического действия позволяет дополнить предлагаемые ВОЗ схемы терапии. Новые подходы, основанные на понимании механизмов физиологической активности, пытаются сочетать свойства ненаркотического анальгетика со способностью существенно усиливать анальгетический эффект без увеличения побочных эффектов [27]. Их использование позволит существенно снизить дозу наркотического компонента в процессе терапии и частично заменить или дополнить эффект адъювантного средства.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПОДХОДЫ К УВЕЛИЧЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ АНАЛЬГЕЗИИ НА ОСНОВЕ ОПИОИДОВ

Вещества, используемые в качестве опиоидных (наркотических) анальгетиков, с точки зрения действия на целевые биомишени центральной нервной системы (ЦНС) можно классифицировать следующим образом.

1. Мощные агонисты опиатных рецепторов, например морфин, промедол, фентанилы.
2. Агонисты-антагонисты и частичные агонисты опиатных рецепторов, например бупренорфин, буторфанол, налбуфин, пентазоцин.
3. Мультитаргетные вещества (dual-acting compounds), проявляющие свойства агонистов опиатных рецепторов, например трамадол, тапентадол, метадон, леворфанол.

Используемые в литературе термины «dual-acting compounds» или «multi-target compounds» следует отличать от терминов «multi-target therapeutics» или «multi-target drugs», которые относятся обычно не к веществам, а к терапевтическим комбинациям препаратов и к препаратам с фиксированным составом веществ, действующих на различные биомишени. Мультитаргетные вещества (dual-acting compounds или multi-target compounds) – элемент в методологии создания мультитаргетных лекарств (multi-target drug discovery, MTDD) в рамках относительно нового направления – полифармакологии [28].

Мультитаргетные подходы актуальны не только для создания комплексных препаратов для терапии одной патологии, но и для терапии различных заболеваний, особенно у пожилых хронических пациентов [29]. На рисунке 1 представлены данные по количеству заболеваний у обследованных пациентов в зависимости от возрастной группы.

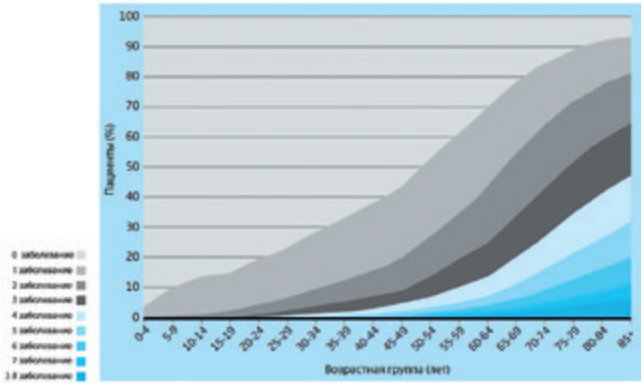


Рисунок 1. Распределение числа хронических заболеваний по возрастным группам [30]

Увеличение продолжительности жизни населения развитых стран делает все более актуальным разработку именно мультитаргетных препаратов. Например, важное терапевтическое значение для комплексных препаратов-анальгетиков и схем терапии сильной и средней боли имеют седативный и анксиолитический эффекты.

В рамках методологии мультитаргетной анальгезии возможны различные подходы:

- использование индивидуальных веществ, действующих на различные биомишени, ассоциированные с анальгезией (multi-acting compounds);
- использование КФС, действующих на различные биомишени и механизмы анальгезии (multi-target therapeutics) и обеспечивающих дополнительные терапевтические воздействия;
- совместное использование различных препаратов анальгетиков и адъювантов для воздействия на мишени и механизмы анальгезии, что относится к стратегиям комплексной (мультимодальной) фармакотерапии болевого синдрома и является дальнейшим развитием принципов «лестницы обезболивания» ВОЗ.

По времени эффективного действия опиоидные анальгетики подразделяются на вещества продолжительного и короткого действия (Long- and Short-Acting Opioids, LAO и SAO соответственно) [31]. Примером

анальгетика продолжительного действия является метадон (период полувыведения из плазмы – 24 ч), используемый за рубежом в качестве анальгетика и средства заместительной терапии. Примером анальгетиков короткого действия являются гидроморфон и кодеин (период полувыведения из плазмы – 2–3 ч).

Для сравнения эквианальгетических доз наркотических анальгетиков и мощности анальгетического действия препаратов на человека используется (особенно в паллиативной медицине) термин «эквивалент морфина» (Morphine Equivalent Dose, MED). За единицу анальгетического действия вещества или препарата принимается пероральное действие 10 мг морфина. Для каждого вещества (с учетом его способа введения в составе фармпрепарата) оценивается эквианальгетическая доза (мг) и относительная мощность действия в единицах MED [32].

Вещества, дополняющие или усиливающие анальгетический эффект опиатов, являются неотъемлемым компонентом 2-й и 3-й ступени терапии средней и сильной боли трёхступенчатой «лестницы обезболивания» ВОЗ [15]:

- 1 ступень – ненаркотический анальгетик ± адъювантное средство;
- 2 ступень – слабый опиоид ± ненаркотический анальгетик ± адъювантное средство;
- 3 ступень – средний или сильный опиоид ± ненаркотический анальгетик ± адъювантное средство.

Стратегия лечения боли подразумевает, что применение комплекса препаратов на одной ступени проводится до тех пор, пока не исчерпан эффект более слабых анальгетиков, затем переходят на следующую ступень [33]. В качестве ненаркотических анальгетиков (т.е. не являющихся агонистами опиатных рецепторов и не вызывающих зависимость с т.з. нормативных документов ВОЗ) в клинической практике в основном используются нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) и парацетамол (ацетаминофен), значительно реже дулоксетин и габапентиноиды (в основном для купирования нейропатической боли). В качестве адъювантов используются антидепрессанты, антиконвульсанты, кортикостероиды, спазмолитики, мышечные релаксанты. Терапевтический пошаговый подход прежде всего предполагает назначение неопиоидных анальгетиков пациентам с легкой болью, слабых опиоидов пациентам с умеренной болью и сильных опиоидов пациентам с сильной болью [15, 25, 26]. В рекомендациях ВОЗ предложено назначение анальгетиков 2-й ступени в том случае, если лечение анальгетиками 1-й ступени оказалось неэффективным.

Данный подход затем был экстраполирован на неонкологическую боль, в том числе боль в суставах. При острой суставной боли, интенсивность которой может быстро нарастать, можно сразу начать с назначения сильного опиоида в течение недели для быстрого облегчения боли, а затем перейти на неопиоидные анальгетики, если боль уменьшилась [34]. В 2015 г. Международная ассоциация по изучению боли (IASP) обсудила данный подход и предложила другие классификации, основанные на клинической эффективности или механизмах боли. Подход, основанный на механизме действия, вероятно, более целесообразен [34]. В книге Pharmacology of Pain предложена рациональная классификация, в основе которой лежат и механизмы боли, и молекулярные мишени анальгетиков [27]. Ноцицептивную боль воспалительного происхождения можно лечить уменьшением воспаления с помощью стероидов или НПВС, невоспалительную ноцицептивную боль – опиоидами и неопиоидными анальгетиками, нейропатическую боль – антидепрессантами или антиконвульсантами, включая специфические лекарственные препараты при определенных клинических ревматологических случаях, в частности колхицин – для лечения подагры. Подход, отличный от «лестницы обезболивания» ВОЗ, позволяет лечить боль в соответствии с клиническими реалиями и избегать шаблонов в рамках терапевтического повышения к более сильным лекарственным препаратам. Так, например, «лестница обезболивания» ВОЗ не является подходящей для лечения острой или хронической боли в суставах. В данном случае требуется более углубленная характеристика разных механизмов боли в суставах и применение лекарственных препаратов в соответствии с их молекулярными мишенями [34].

ФАРМАКОТЕРАПИЯ БОЛИ НА ОСНОВЕ МУЛЬТИТАРГЕТНЫХ КОМБИНАЦИЙ ОПИОИДОВ

Лечебный алгоритм купирования хронической боли должен учитывать особенности клинической картины, быть безопасным и эффективным. Лекарственные средства должны назначаться на длительный срок и приниматься по расписанию в индивидуальной дозировке. Принципы терапии хронической боли включают [35]:

1) подавление синтеза и выделения алгогенов в поврежденных тканях;
2) ограничение ноцицептивной афферентной импульсации из зоны повреждения в ЦНС;
3) активацию структур антиноцицептивной системы;
4) восстановление механизмов контроля возбудимости ноцицептивных нейронов;
5) устранение генерации эктопических импульсов в периферических нервах;
6) устранение болезненного мышечного напряжения;
7) нормализацию психологического состояния пациента.

Комплексная анальгезия предполагает воздействие на различные механизмы боли и различные целевые биомишени, что реализуется как в виде мультитаргетных препаратов анальгетиков, так и в схемах мультимодальной терапии. Опиоиды способны воздействовать только на часть фармакологически актуальных механизмов анальгезии, поэтому для купирования сильной и средней боли в современной клинической практике используется широкий спектр ненаркотических веществ с различными механизмами действия, как правило, дополняющих опиоид и частично купирующих его побочные эффекты и развитие толерантности (эффект суммирования анальгезии и/или дополнение других полезных свойств). Наиболее эффективно использование дополнительного соединения, потенцирующего анальгетический эффект опиоида за счет синергизма, при этом снижается терапевтическая доза наркотика. Методология 2-й и 3-й ступени лестницы обезболивания ВОЗ главным образом основана на суммировании и/или дополнении эффекта опиоида, что позволяет несколько усилить эффективность. Комбинированный подход может быть реализован как в виде препарата фиксированного состава (fixed-dose combination), состоящего из двух и более лекарств, так и с использованием нескольких отдельных препаратов [36]. Разработка эффективных комбинаций фиксированного состава (КФС) анальгетиков является задачей фармацевтической индустрии. Разработка схем комплексного использования отдельных препаратов является задачей медицины. При этом задачей фарминдустрии является обеспечение необходимого разнообразия препаратов.

Анализ базы данных Thomson Reuters Integrity [37] показывает, что в настоящее время выпускается около 20 КФС анальгетиков, а в процессе регистрации и клинических исследований находится еще около 40 КФС анальгетиков в основном на основе опиоидов (рисунок 2). Интересно отметить, что количество одобренных КФС анальгетиков на основе опиоидов сравнимо с количеством коммерческих монопрепаратов на основе агонистов опиатных рецепторов (рисунок 3). На стадиях клинических исследований и разработки находится больше КФС анальгетиков на основе опиоидов, чем монопрепаратов опиоидов. Соотношение в пользу КФС демонстрирует перспективность мультитаргетных анальгетиков относительно разработки традиционных монопрепаратов на основе опиоидов.

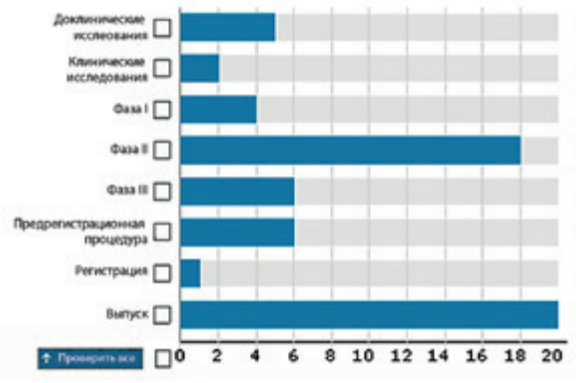


Рисунок 2. Клиническое использование и разработка препаратов на основе новых комбинаций фиксированного состава анальгетиков, включающих опиоиды [37]

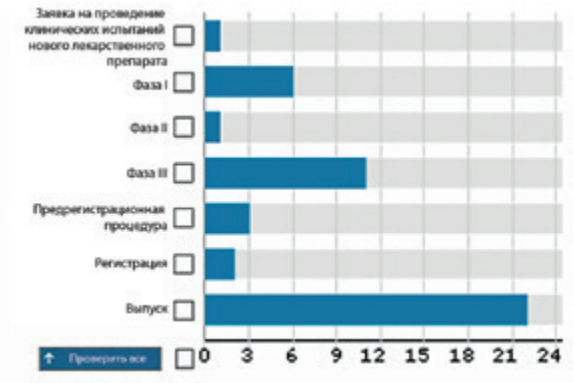


Рисунок 3. Структура клинического использования и разработки традиционных препаратов анальгетиков на основе единственного действующего вещества – опиоида [37]

Комбинации веществ-анальгетиков взаимодополняют физиологические эффекты фармакокинетически и/или фармакодинамически, давая положительный или отрицательный фармакологический результат. Успешные обезболивающие комбинации должны удовлетворять двум важным фармакодинамическим критериям [38]:

- компоненты комбинации должны обеспечивать эффект суммирования или потенцирования анальгезии;
- взаимодействие анальгетиков в комбинации должно обеспечивать снижение дозы каждого из активных веществ, что приводит к улучшению профиля безопасности препарата.

Потенцирование анальгезии за счет синергизма веществ, действующих на различные биомишени, представляет наибольший интерес, особенно для терапии детей и потенциально трудоспособных пациентов, поскольку позволяет существенно снизить терапевтическую дозу опиата.

КОМБИНАЦИИ ФИКСИРОВАННОГО СОСТАВА НА ОСНОВЕ ОПИОИДОВ

В настоящее время используются и разрабатываются комбинации фиксированного состава опиоидов с НПВС, парацетамолом (ацетаминофеном) и аспирином, реже с ГАМК-аналогами и некоторыми другими депрессантами ЦНС [39, 40]. В эффективных КФС содержание каждого из активных компонентов, как прави-

ло, ниже, чем в индивидуальных препаратах – анальгетиках на их основе. На основе анализа изученных сочетаний наркотических анальгетиков с ненаркотическими (в основном центрального действия) [41] можно предложить примерную классификацию наиболее известных КФС опиоидов.

1. Опиоид/парацетамол, например:
   - низкодозовая комбинация оксикодон/парацетамол (2,5/325 мг), эффективная для купирования различных типов боли [42];
   - комбинация трамадол/парацетамол [43]. Значение T_{max} для обоих энантиомеров трамадола составляет 2 ч после перорального приема и 3 ч для важнейшего активного метаболита – О-дезметилтрамадола, который проявляет в 200 раз более высокую аффинность к μ-опиоидным рецепторам, чем сам трамадол, и имеет более высокое время полувыведения. Поэтому КФС трамадола с анальгетиком быстрого действия ацетаминофеном (T_{max} 0,5–2 ч) представляет собой фармакокинетически рациональное сочетание. Клинические исследования фармакодинамических свойств орального трамадола и ацетаминофена показали, что эта комбинация обеспечивает более высокую эффективность, чем отдельные компоненты комбинации [38].
2. Опиоид/НПВС – оксикодон/ибупрофен [44], гидрокодон/ибупрофен, трамадол/декскетопрофен (75/25 мг) [45].
3. Опиоид/ГАМК-лиганды, например комбинация ARX-F03 суфентанил/триазолам 15/200 мкг сублингвально (мощный опиоид/мощный агонист $ГАМК_A$-рецептора) [46].
4. Опиоид/ГАМК-производные – лиганды кальциевых каналов, например комбинации оксикодон/прегабалин и оксикодон/габапентин [44].
5. Опиоид/блокаторы спектра ионных натриевых каналов, например Bufyl эпидурально (фентанил/бупивакаин) [47].
6. Опиоид/агонист каннабиноидных рецепторов синергические комбинации, например морфин/тетрагидроканнабинол (Δ9-THC) и фентанил/Δ9-THC [48–51]. Комбинации опиоид/Δ9-THC исследуются также в виде трансдермальных терапевтических систем.
7. Опиоид/мультитаргетное вещество, например OxycoDex – оксикодон/декстрометорфан [52, 53] (опиоид, ингибитор обратного захвата серотонина, лиганд NMDA-рецептора, агонист сигма-1-рецептора).
8. Опиоид/антагонист опиатных рецепторов. Используются КФС опиоид/налтрексон (реже налоксон) для продолжительной терапии боли, снижающие риск развития зависимости и толерантности, а также немедицинского использования препаратов, например:
   - Embeda – пролонгированный морфин/налтрексон (20/0,8 мг) для купирования болей при остеоартрите [54].
   - Oxytrex и Oxynal (ALO-02) – комбинации для орального применения на основе сочетания оксикодон/налтрексон (разработанные фирмой Pain Therapeutics и совместно фирмами Elite и Pfizer соответственно), обладающие пониженной физической зависимостью и толерантностью при терапии хронической средней и сильной боли [55]. Oxynal (соотношение оксикодон/налтрексон 20/2,4 мг) – более удачная комбинация, зарегистрирована FDA в 2016 г.
   - Talwin Nx – пентазоцин/налоксон (50/0,5 мг) [56].
   - Исследуются композиции опиоид/(+)-налоксон и (+)-налтрексон (антагонисты рецепторов TLR4 и TLR9) [57]. В отличие от изомеров природного происхождения (-)-налоксона и (-)-налтрексона их (+)-изомеры не проявляют антагонизма к опиатным рецепторам.

Предполагается, что действие низких доз антагониста опиатных рецепторов налтрексона, который используется в дозе 1/10 от обычной терапевтической и ниже, а также его активного метаболита – 6-бета-налтрексола предотвращает изменение G-белка в месте связывания с опиатными рецепторами, что и влияет на опиоидную толерантность и зависимость [55].

Разрабатываются тройные (или 1+1/1) КФС анальгетиков [41], действующие на более широкий спектр биомишеней, ассоциированных с анальгезией, например:

- фентанил/тразодон/парацетамол [58], основанная на сочетании опиоида, ингибитора обратного захвата серотонина, лиганда альфа-2-андренорецептора, ингибитора циклооксигеназ;
- гидрокодон/прометазин/парацетамол [59, 60] (также обладающая антимигренозным действием), основанная на сочетании опиоида, антагониста H1-рецептора гистамина, ингибитора циклооксигеназ;
- HydrocoDex – гидрокодон/декстрометорфан/парацетамол, основанная на сочетании опиоида, ингибитора обратного захвата серотонина, лиганда альфа-2-андренорецептора, агониста сигма-1-рецептора, ингибитора циклооксигеназ [41, 61];

- PercoDex – оксикодон/декстрометорфан/парацетамол, основанная на сочетании опиоида, ингибитора обратного захвата серотонина, лиганда альфа-2-андренорецептора, агониста сигма-1-рецептора, ингибитора циклооксигеназ [41, 61];
- гидрокодон/парацетамол/налтрексон, основанная на сочетании опиоида, ингибитора циклооксигеназ, антагониста опиатных рецепторов [62].

Имеются примеры КФС анальгетиков, включающей 4 лекарства, в том числе барбитурат (агонист $ГАМК_А$-рецептора), например:

- Fiorinal C – буталбитал/аспирин/кофеин/кодеин (50 мг / 325 мг / 40 мг / 30 мг) [41];
- Ascomp-Codeine (Fioricet with Codeine) – буталбитал/парацетамол/кофеин/кодеин [41].

Анализ известных комбинаций позволяет сделать выводы о практической эффективности сочетания различных соединений с опиоидами, предварительно оценить актуальные механизмы действия и биомишени, отобрать вещества для создания еще более эффективных комбинаций. Например, морфиноподобный, но неопиоидный мультитаргетный декстрометорфан [63] (ингибитор обратного захвата серотонина, лиганд NMDA-рецептора, агонист сигма-1-рецептора, входит в список III перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации [64]) потенцирует анальгетический эффект большинства опиоидов, например оксикодона, кодеина, морфина, героина, трамадола, фентанила и гидрокодона.

Также разрабатываются КФС опиоид/опиоид для терапии острой боли, например морфин/оксикодон, а также КФС опиоид плюс опиоид двойного действия / неопиоид (фентанил и трамадол/парацетамол) [65]. Предполагается, что данные комбинации обеспечивают более благоприятный для пациентов профиль побочных эффектов по сравнению с терапией индивидуальными опиоидами [66]. Однако в литературе отмечено, что создания КФС действующих на одну и ту же биомишень (например, смешанные однотипные опиоиды) или использования веществ с близкими побочными эффектами (например, комбинации опиоидов с некоторыми антидепрессантами) следует избегать [38]. Некоторые КФС, включающие вещества с близкими побочными эффектами, отклонены, например MorphiDex – комбинация морфин/декстрометорфан в соотношении 1/1 [67, 68]. КФС анальгетиков имеют практическое значение только тогда, когда они были разработаны на основе понимания фармакокинетических и фармакодинамических критериев, а их преимущества подтверждены достоверными экспериментальными данными в правильно спланированных клинических исследованиях [38, 66].

Другим важным источником информации для разработки мультитаргетных препаратов мощных медицинских анальгетиков являются данные по сильнодействующим ветеринарным анальгетикам и близким к ним по механизмам действиям ветеринарным анестетикам [69–71]. В ветеринарных препаратах (как индивидуально, так и в составе КФС) широко используются мощные опиоиды (морфин, метадон, буторфанол, бупренорфин, фентанил), антагонисты NMDA-рецепторов (в основном кетамин), различные агонисты альфа-2-андренорецепторов (ксилазин, детомидин, медетомидин, дексмедетомидин, ромифидин), барбитураты (модуляторы $ГАМК_А$-рецептора), мощные бензодиазепины (агонисты $ГАМК_А$-рецептора). В состав ветеринарных препаратов, особенно для терапии крупных животных, также входят наиболее сильнодействующие вещества центрального действия, активно исследуемые, но еще не используемые в составе лекарственных препаратов. В процессе мультимодальной анальгезии и анестезии используются сочетания сильнодействующих препаратов. В том числе не содержащие опиоиды, например сочетание мидазолам/кетамин/ксилазин (агонист $ГАМК_А$-рецептора, антагонист NMDA-рецепторов, агонист альфа-2-андренорецепторов) [72]. Имеется пример трансдермальной ветеринарной системы на основе фентанила со скоростью подачи 100 мкг/ч.

ОСНОВНЫЕ НЕОПИОИДНЫЕ КОМПОНЕНТЫ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ МУЛЬТИТАРГЕТНЫХ АНАЛЬГЕТИКОВ

Вещества, усиливающие анальгетический эффект опиоидов при совместном использовании (как в виде препарата фиксированного состава, так и в схемах комплексной анальгезии), с точки зрения стратегии разработки комплексных препаратов можно классифицировать по эффективности потенцирования анальгетического эффекта, наличию других полезных физиологических эффектов, по отношению ненаркотического анальгетика к ограничительным спискам контролируемых веществ.

1. Классификация по мощности и характеру анальгетического эффекта, а также соотношению терапевтических доз опиоидного и неопиоидного компонентов:
    - умеренно усиливающие и/или пролонгирующие общий анальгетический эффект за счет суммы анальгетических эффектов различного происхождения и других физиологических эффектов, не связанных с действием на опиатные рецепторы ЦНС. При этом терапевтические дозы неопиатного компонента существенно выше терапевтических доз опиоида;

- существенно усиливающие общий анальгетический эффект за счет синергизма эффектов действия на различные биомишени ЦНС. При этом терапевтические дозы неопиоида и опиоида могут быть близки.

2. Классификация по наличию у опиоида и/или неопиоида других полезных физиологических эффектов, т.е. рассматривается ли каждый активный компонент в качестве моно- или мультитаргетного терапевтического средства, в том числе и по способности купировать развитие зависимости и толерантности к опиоиду.

3. По отношению неопиоидного компонента/анальгетика к контрольным спискам психоактивных веществ в РФ [64]. Это влияет на его практическую доступность, а также на сложность организации отечественного производства субстанций и готовых форм.

Одно из перспективных и универсальных направлений комплексной анальгезии сильной боли – создание мультитаргетных препаратов, сочетающих опиоид и желательно мощный ненаркотический анальгетик(и). Применимость данного подхода ограниченна малым выбором ненаркотического компонента, действующего в низких дозах и отвечающего фармакодинамическим и фармакокинетическим критериям эффективной композиции. Поэтому КФС анальгетиков на основе двух и более сильнодействующих веществ являются сложным техническим решением. Использование комбинации веществ, действующих именно в низких дозах (желательно ниже 10 мг/чел. для каждого из активных компонентов), открывает возможности для создания самых разнообразных лекарственных форм на основе КФС. В том числе удобных и атравматичных для пациента трансмукозных (букальных), назальных и пролонгирующих трансдермальных форм на основе КФС, которые представлены единичными примерами в настоящее время.

Критериям мощности действия, фармакодинамической и фармакокинетической совместимости с опиоидами (в идеале обеспечивающие эффект потенцирования и действующие в низких дозах) соответствуют некоторые анальгетики, а также усиливающие эффекты опиоидов анестетики, анксиолитики и седативные вещества центрального действия из следующих классов:

- агонисты альфа-2-андренорецепторов ЦНС [73, 74];
- антагонисты рецепторов возбуждающих аминокислот, главным образом антагонисты NMDA-рецепторов [75–77], а также антагонисты AMPA- и каинатных рецепторов (AMPA/KA-GluR-антагонисты) [78, 79];
- ГАМК-лиганды, ГАМК-производные и аналоги, действующие на различные биомишени [80–85];
- каннабиоиды (агонисты каннабиноидных рецепторов CB_2 и CB_1) [48–51, 86];
- ингибиторы обратного нейронального захвата моноаминов (норадреналина, серотонина, дофамина) [87–89].

Данные типы анальгетиков и близкие к ним терапевтические средства, потенцирующие полезные эффекты опиоидов, активно исследуются в моделях комплексной анальгезии совместно с опиоидами с целью создания более эффективных и безопасных мультитаргетных препаратов. Возможности для комплексного фармакологического воздействия на систему проведения ноцицептивных сигналов схематично суммированы на рисунке 4.

Информация по использованию и разработке новых препаратов ветеринарных анальгетиков, а также мультимодальных подходов к сбалансированной анальгезии животных демонстрирует новые подходы [90], актуальные и для фармакологии.

С точки зрения возможности разработки разнообразных и удобных для пациента лекарственных форм и изделий следует отметить комбинирование опиоидов с агонистами каннабиоидных рецепторов. Так, например, экспериментальные трансдермальные комбинации тетрагидроканнабинола (дронабинол, Δ(9)-THC) с фентанилом и бупренорфином значительно усиливают анальгетический потенциал опиоидов [91, 92].

Другим перспективным направлением создания мультитаргетных анальгетиков является создание солекарств – ковалентных соединений двух и более синергических молекул, действующих на разные биомишени системы передачи нервного импульса, что обеспечивает потенцирование целевой активности [93]. Например, разработка солекарства – ковалентного коньюгата кодеина и тетрагидроканнабинола (codeine-Δ9-THC или Cod-THC codrug), веществ, вызывающих анальгезию у животных в сравнимых дозах (рисунок 5). Cod-THC демонстрирует более высокую анальгетическую активность и улучшенный фармакокинетический профиль при разных способах введения по сравнению с совместным действием кодеина и тетрагидроканнабинола [94].

Однако проведение экспериментальных работ с каннабиоидами в России невозможно, поскольку данные фармацевтически значимые вещества включены в список I перечня наркотических средств и психотропных веществ, использование которых в медицинских целях запрещено [64].

Актуальным направлением улучшения безопасности комбинаций на основе опиоидов являет-



Рисунок 4. Мишени для комплексного фармакологического воздействия на систему проведения ноцицептивных сигналов в периферической (ПНС) и центральной нервной системе человека

ся подавление толерантности к опиоидам и развития наркотической зависимости, а также защита от незаконного немедицинского использования. Примером данного подхода является технология Abuse-Deterrent Formulations (ADF) [96–103], реализованная, например, в препаратах Embeda, Oxytrex и Oxycodone DETERx. Для защиты от незаконного использования также используется подход Abuse-Resistant – создание формуляций, затрудняющих нецелевое выделение наркотика, например препарат Remoxy на основе матрицы с высокой вязкостью, контролируемо выделяющей оксикодон [104].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основными задачами, решаемыми в процессе развития комплексной анальгезии на основе опиоидов, являются: увеличение эффективности, снижение побочных эффектов (в том числе подавление развития толерантности к опиоидам и развития зависимости у пациентов), а также защита препаратов от немедицинского использования. Методология комплексной анальгезии является одним из драйверов развития фарминдустрии на фоне незначительного прогресса в разработке новых мощных, эффективных и безопасных веществ-анальгетиков на клинических и доклинических стадиях [105, 106]. Разработка препаратов и методологии комплексной анальгезии на основе фармакокинетически и фармакодинамически эффективных комбинации опиоидов и наиболее эффективных ненаркотических веществ представляется оптимальным подходом к купированию сильной и средней боли различной природы в рамках текущих научных, технологических и экономических возможностей в РФ. Перспективной, но более сложной и затратной представляется разработка новых молекул – мультитаргетных солекарств на основе актуальных анальгетиков, теоретически способных демонстрировать лучшие характеристики по сравнению с аналогичными комбинациями фиксированного состава.

Развитие данного цикла статей будет посвящено оценке возможности создания новых препаратов и методов комплексной анальгезии на основе сочета-

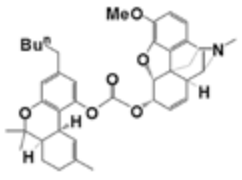
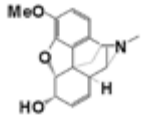
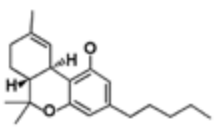
		
Кодеин-Δ9-THC (Cod-THC) 1. ED_{50} = 6,42 мг/кгg (0,01 ммоль/кг), Tail-flick тест [94] 2. ED50=3,99 мг/кг (0,0062 ммоль/кг) CCI тест [94]	Кодеин 1. ED_{50}=12,5 мг/кг (0,042 ммоль/кг) Tail-flick тест [94] 2. ED_{50}=13,5 мг/кг (0,045 ммоль/кг), CCI тест [94]	Тетрагидроканнабинол (delta(9)-tetrahydrocannabinol, Δ9-THC) ED_{50}=12 мг/кг (0,038 ммоль/кг), Tail-flick тест [95]

Рисунок 5. Сравнение эквипотенциальных анальгетических эффектов Cod-THC с эффектами кодеина и Δ9-THC в моделях острой (Tail-flick тест) и нейропатической (CCI тест) боли у крыс [94, 95]

ния опиоидов (и других наиболее мощных анальгетиков) с описанными в статье, а также другими классами сильнодействующих веществ. Будут рассмотрены фармакологические подходы к обеспечению безопасности хронических пациентов и принципы создания препаратов с защитой от немедицинского использования. Также будут приведены текущие исследования ФГУП «ГосЗМП» в области разработки препаратов сильнодействующих анальгетиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research / Institute of Medicine (US) Committee on Advancing Pain Research, Care, and Education. – Washington (DC): National Academies Press (US), 2011. 364 p.
2. Общие проблемы хронической и патологической боли. Курс образовательных статей по проблемам диагностики и лечения хронической боли. URL: https://www.painstudy.ru/education/index.php (дата обращения 11.02.2017).
3. H. Breivik, E. Eisenberg, T. O'Brien. The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care // BMC Public Health. 2013. V. 13. P. 1229–1243.
4. Болевой синдром. Клинические рекомендации. Общероссийская общественная организация «Ассоциация врачей общей практики (семейных врачей) Российской Федерации». – Москва – Санкт-Петербург – Ростов-на-Дону. 2014. 27 с.
5. С.С. Павленко. Состояние и проблемы эпидемиологических исследований болевых синдромов // Боль. 2006. № 4. С. 2–7.
6. А.Б. Данилов. Новые подходы в лечении пациентов с хронической болью// Лечащий врач. URL: http://www.lvrach.ru/2009/04/7634652/ (дата обращения 13.04.2017).
7. Steady Growth in Drug and Device Markets for Pain Management. Market Research Report // BCC Research LLC. 2015. № 8. P. 28–36.
8. Pain Relieving Drugs Market Forecast 2017-2027. ReportBuyer Ltd. United Kingdom. Dec. 2016.
9. E. George, I. Elman. Pain in an era of armed conflicts: Prevention and treatment for warfighters and civilian casualties // Prog. Neurobiol. 2016. № 141. P. 25-44.
10. C. Giannou. M. Baldan. War Surgery. Working with limited resources in armed conflict and other situations of violence // International Committee of the Red Cross. 2010. V. 1. 283 p.
11. U. Friedman. Global Conflicts to Watch in 2017 / The Council on Foreign Relations (CFR). December 2016.
12. А.В. Соснов, С.С. Голубев, Б.С. Пункевич, С.В. Садовников, Ф.М. Семченко, В.Н. Тохмахчи, А.А. Соснова. Оценка потребности российской федерации в сильнодействующих анальгетиках // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 2 (15). С. 202–215.
13. Я.В. Власов, Е.В. Синеок, Н.П. Дронов. Анализ основных проблем доступности оказания паллиативной медицинской помощи онкобольным // Ремедиум. 21.09.2016. URL: http://www.remedium.ru/health/detail.php?ID=69753 (дата обращения 11.02.2017)
14. Наличие психоактивных средств, находящихся под международным контролем: обеспечение надлежащего доступа для медицинских и научных целей // Доклад ООН / Международный комитет по контролю над наркотиками. – Нью-Йорк, ООН. 2011. URL: http://www.un.org/ru/ development/surveys (дата обращения 11.02.2017)
15. А.Д. Каприн. Фармакотерапия хронического болевого синдрома у взрослых пациентов при оказании паллиативной медицинской помощи в стационарных и амбулаторно-поликлинических условиях. Методические рекомендации / ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена». – М.: Министерство здравоохранения РФ, 2015.
16. А.Д. Каприн, Р.Г. Абузарова. Фармакотерапия онкологической боли в России. Реальность и перспективы // Материалы Международного медицинского конгресса «Паллиативная медицина в здравоохранении Российской Федерации и стран СНГ». Москва. 2014. URL: www.palliamed.ru/files/ download/ file335.html (дата обращения 15.01.2017).
17. А.В. Соснов, С.В. Садовников, Ф.М. Семченко, К.А. Руфанов, В.Н. Тохмахчи, А.А. Соснова, И.А. Тюрин. Сильнодействующие ненаркотические анальгетики как направление развития фармацевтики // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1 (14). С. 196–207.
18. R. Sheu, D. Lussier, A. Rosenblum, et al. Prevalence and characteristics of chronic pain in patients admitted to an outpatient drug and alcohol treatment program // Pain Med. 2008. V. 9 (7). P. 911–917.
19. M. Egli, G.F. Koob, S. Edwards. Alcohol dependence as a chronic pain disorder // Neurosci. Biobehav. Rev. 2012. V. 36 (10). P. 2179–2192.
20. A.V. Apkarian, V. Neugebauer, G. Koob, et al. Neural mechanisms of pain and alcohol dependence // Pharmacol Biochem Behav. 2013 V. 112. P. 34–41.
21. J.L. Riley, C. King. Self-report of alcohol use for pain in a multi-ethnic community sample // J Pain. 2009. V. 10 (9). P. 944–952.
22. Horn-Hofmann et al. The effect of nonrecurring alcohol administration on pain perception in humans: a systematic review // Journal of Pain Research. 2015. V. 8. P. 175–187.
23. Повышение доступности наркотических и психотропных средств для использования в медицинских целях. Распоряжение Правительства РФ № 1403-р от 01.07.2016.
24. A.L. Harvey. Toxins and drug discovery. Review // Toxicon. 2014. V. 92. P. 193–200.
25. Обезболивание при раке. – Женева. ВОЗ. 1998. 75 с. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/141317/1/5225017924.pdf (дата обращения 11.02.2017)
26. A. Caraceni at al. Use of opioid analgesics in the treatment of cancer pain: evidence-based recommendations from the EAPC // Lancet Oncol. 2012. V. 13 (2). P. 58–68.
27. P. Beaulieu, D. Lussier, F. Porreca, A. Dickenson. Pharmacology of Pain. – Seattle: IASP Press, 2010. 638 p.
28. A.S. Reddy, S. Zhang. Polypharmacology: drug discovery for the future // Expert Rev Clin Pharmacol. 2013 V. 6 (1). P. 43–47.
29. M. Duerden, T. Avery, R. Payne. Polypharmacy and medicines optimisation. – London. The King's Fund. 2013. 56 p. URL: https://www.kingsfund.org.uk/sites/files/kf/field/field_publication_file/polypharmacy-and-medicines-optimisation-kingsfund-nov13.pdf (дата обращения 15.04.2017).
30. K. Barnett, S.W. Mercer, M. Norbury, G. Watt. Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study // The Lancet. (2012). V. 380. P. 37–43.
31. C.E. Argoff, D.I. Silvershnein. A Comparison of Long- and Short-Acting Opioids for the Treatment of Chronic Noncancer Pain: Tailoring Therapy to Meet Patient Needs // Mayo Clin Proc. 2009. V. 84 (7). P. 602–612.
32. А.В. Соснов, С.С. Голубев, Б.С. Пункевич, С.В. Садовников, Е.М. Загребин, И.С. Родина, Ф.М. Семченко, А.А. Соснова. Стандартные образцы контролируемых сильнодействующих компонентов препаратов анальгетиков // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1 (14). С. 216–223.
33. В.А. Семенченя, О.М. Конопацкова, Е.А. Валах. Некоторые аспекты медикаментозного лечения хронической боли онкологического генеза: Методические рекомендации для врачей. – Саратов. 2014. 25 с.

34. P. Vergne-Salle. Лестница обезболивания ВОЗ: подходит ли она при боли в суставах? От НПВП к опиоидам // IASP. 2016. Fast sheet № 18.

35. М.Л. Кукушкин. Этиопатогенетические принципы лечения хронической боли // Лечащий Врач. 2008. № 4(8). URL: https://www.lvrach.ru/2008/04/5002175/ (дата обращения 15.04.2017).

36. T.T. Kararli, K. Sedo, J. Bossart. Fixed-Dose Combination Products. Review // Drug Development & Delivery. 2014. V. 5. URL: http://www.drug-dev.com/Main/Back-Issues/FIXEDDOSE-COMBINATIONS-FixedDose-Combination-Produ-661.aspx#sthash.HL7Nq3sB.dpuf (дата обращения 11.02.2017)

37. Thomson Reuters Integrity. URL: http://ip-science. thomsonreuters.com/pharma/integrity_whatsnew/ (дата обращения 07.02.2017).

38. J. Demeules, V. Rollason, V. Piguet, P. Dayer. Clinical pharmacology and rationale of analgesic combinations // European Journal of Anaesthesiology 2003. V. 20 (28). P. 7–12

39. R.B. Raffa. Analgesic combinations // J Pain. 2010. V. 11(8). P 701–709.

40. I. Gilron, T.S. Jensen, A.H. Dickenson. Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside // Lancet Neurol 2013. V. 12. P. 1084–95

41. (A) List of Narcotic analgesic combinations. URL: https://www.drugs.com/drug-class/narcotic-analgesic-combinations.html (дата обращения 07.02.2017). (B) Analgesics, Opioid Combos. URL: http://reference.medscape.com/drugs/analgesics-opioid-combos (дата обращения 07.02.2017).

42. A. Gatti, E. Sabato. Oxycodone/paracetamol: a low-dose synergic combination useful in different types of pain // Clin Drug Investig. 2010. V. 30 (2). P. 3–14.

43. J.V. Pergolizzi (Jr.), M. van de Laar, R. Langford, H.-U. Mellinghoff. Tramadol/paracetamol fixed-dose combination in the treatment of moderate to severe pain // Journal of Pain Research. 2012. V. 5. P. 327–346.

44. R.B. Raffa, J.V. Pergolizzi, D.J. Segarnick, R.J. Tallarida. Oxycodone combinations for pain relief // Drugs Today (Barc). 2010. V. 46(6). P. 379–398.

45. J. Moore et al. Dexketoprofen/tramadol: randomised double-blind trial and confirmation of empirical theory of combination analgesics in acute pain // The Journal of Headache and Pain. 2015. V. 16. P. 60.

46. P. Palmer. Compositions and methods for mild sedation, anxiolysis and analgesia in the procedural setting. EP2488156 A1. Acelrx Pharmaceuticals, Inc. 2012. URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00894699 (дата обращения 20.03.2017).

47. N. Zeynep, I. Akcaboy, Y. Erkan, I. Akcaboy, et al. Spinal anesthesia with low-dose bupivacaine-fentanyl combination: a good alternative for day case transurethral resection of prostate surgery in geriatric patients // Rev. Bras. Anestesiol. 2012. V. 62 (6). P. 753–761.

48. D.L. Cichewicz. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics // Life Sci. 2004. V. 74(11). P. 1317–1324.

49. J. Elikkottil, P. Gupta, K. Gupta. The analgesic potential of cannabinoids // J Opioid Manag. 2009. V. 5(6). P. 341–357.

50. L.R. Gerak, C.P. France. Combined Treatment with Morphine and Δ9-Tetrahydrocannabinol in Rhesus Monkeys: Antinociceptive Tolerance and Withdrawal // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2016. V. 357 (2). P. 357–366.

51. D.R. Maguire, C.P. France. Interactions between cannabinoid receptor agonists and mu opioid receptor agonists in rhesus monkeys discriminating fentanyl // Eur J Pharmacol. 2016. V. 5 (784). P. 199–206.

52. Sebastiano Mercadante. Opioid combination: rationale and possible clinical applications // Ann Palliat Med. 2013. V 2(4). P. 189–196.

53. P.-P. Yang, G.-C. Yeh, E.Y.-K. Huang, P.-Y. Law, H.H. Loh, P.-L. Tao. Effects of dextromethorphan and oxycodone on treatment of neuropathic pain in mice // Journal of Biomedical Science. 2015. V. 22. P. 81.

54. C. Gharibo. Managing Chronic Moderate to Severe Pain–EMBEDA® (Morphine Sulfate and Naltrexone Hydrochloride) Extended Release Capsules for Oral Use // US Neurology. 2010. V. 6(1). P. 18–22.

55. L.R. Webster. Oxytrex: an oxycodone and ultra-low-dose naltrexone formulation // Expert Opin Investig Drugs. 2007. V. 16(8). P. 1277–83.

56. TALWIN Nx. NDA 018733/S-015. FDA Reference ID:2909136. URL: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/018733s015lbl.pdf (дата обращения 11.02.2017)

57. X. Wang, Y. Zhang, et al. Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4 // Br. J. Pharmacol. 2016. V. 173(5). P. 856.

58. V. Fernández-Dueñas, R. Poveda, et al. Fentanyl-trazodone-paracetamol triple drug combination: multimodal analgesia in a mouse model of visceral pain // Pharmacol Biochem Behav. 2011. V. 98(3). P. 331–336.

59. E. Schachtel, S. Daniels, et al. Results from using the nausea intensity scale: The severity of nausea is significantly reduced by CL-108 compared with a standard hydrocodone/acetaminophen analgesic when used to treat moderate-to-severe pain // 16th World Congr Pain. Yokohama. September 26–30. 2016.

60. B. Schachte, et al. Clinically meaningful pain relief in patients with moderate to severe acute pain treated with CL-108 // 16th World Congr Pain. Yokohama. 2016.

61. K. Newman, J. Carsi, S. Han. Analgesic efficacy and safety of oxycodone 5 mg/ibuprofen 400 mg compared with oxycodone 5 mg/acetaminophen 325 mg and hydrocodone 7,5 mg/acetaminophen 500 mg in the dental and orthopedic pain models // 25th Annu Sci Meet. Am Pain Soc. San Antonio. 2006.

62. J. Mao, M.S. Gold, M. Backonja. Combination Drug Therapy for Chronic Pain: A Call for More. Clinical Studies // J Pain. 2011. V. 12(2). P. 157–166.

63. A.A. Weinbroum at al. The role of dextromethorphan in pain control // Canadian Journal of Anaesthesia. 2000. V. 47(6). P.585-96.

64. Постановление Правительства РФ № 681 от 30 июня 1998 г. «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации» (с изменениями и дополнениями). URL: http://base.garant.ru/12112176/#ixzz4YBllOJqX (дата обращения 15.03.2017).

65. V. Fernández-Dueñas, R. Poveda, S. Sánchez, F. Ciruela. Synergistic interaction between fentanyl and a tramadol: paracetamol combination on the inhibition of nociception in mice // J Pharmacol Sci. 2012. V. 118(2). P. 299–302.

66. R.B. Raffa, R.J. Tallarida, R Taylor. Fixed-dose combinations for emerging treatment of pain // Expert Opin Pharmacother. 2012. V. 13(9). P. 1261-70.

67. N. Sambol, et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of an NMDA-enhanced analgesic EN3231 in chronic pain patients who are slow and fast metabolizers of dextromethorphan // 10th World Congr Pain. San Diego. 2002. Abst 187-P183.

68. B.S. Galer, et al. MorphiDex(R) (morphine sulfate/dextromethorphan hydrobromide combination) in the treatment of chronic pain: Three multicenter, randomized, double-blind, controlled clinical trials fail to demonstrate enhanced opioid analgesia or reduction in tolerance // Pain. 2005. V. 115(3). P. 284.

69. Veterinary Anesthesia and Analgesia. 5th Ed. / Ed. by K.A. Grimm. – Wiley. 2015. 1072 p.

70. Veterinary Anesthetic and Analgesic Formulary. Animal care and use program. University of Colorado. URL: http://www.colorado.edu/innovate/sites/default/files/attached-files/CU%20Denver%20Analgesic%20%26%20Anesthetic%20Drug%20Formulary.pdf (дата обращения 10.02.2017)

71. J.A.E. Hubbell at al. The use of sedatives, analgesic and anaesthetic drugs

in the horse: An electronic survey of members of the American Association of Equine Practitioners (AAEP) // Equine Veterinary Journal. 2010. V. 42(6). P. 487–493.

72. J.A.E. Hubbell. Evaluation of midazolam-ketamine-xylazine infusion for total intravenous anesthesia in horses // American Journal of Veterinary Research. 2012. V. 73(4). P. 470-5.

73. A.K. Chan, C. W. Cheung, Y.K. Chong. Alpha-2 agonists in acute pain management // Expert Opin Pharmacother. 2010. V. 11(17). P. 2849–68.

74. J.A. Giovannitti, S.M. Thoms, J.J. Crawford. Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonists: A Review of Current Clinical Applications // Anesth Prog. 2015. V. 62(1). P. 31–38.

75. D.D. Price, D.J. Mayer, J. Mao, F.S. Caruso. NMDA-receptor antagonists and opioid receptor interactions as related to analgesia and tolerance // J Pain Symptom Manage. 2000. V. 19(1). P. 7–11.

76. K. Subramaniam, B. Subramaniam, R. Steinbrook. Ketamine as adjuvant analgesic to opioids: a quantitative and qualitative systematic review // Anesth Analg. 2004. V. 99(2). P. 482-95.

77. D. Jamero, A. Borghol at al. The Emerging Role of NMDA Antagonists in Pain Management. U.S. Pharmacist. URL: http://www.medscape.com/viewarticle/744071_3 (дата обращения 02.02.2017).

78. C.S. Bonnet, A.S. Williams, et al. AMPA/kainate glutamate receptors contribute to inflammation, degeneration and pain related behaviour in inflammatory stages of arthritis // Ann Rheum Dis. 2015. V. 74(1). P. 242–51.

79. D.R. Kirkpatrick et al. Transmission pathways and mediators as the basis for clinical pharmacology of pain // Expert Rev Clin Pharmacol. 2016. V. 4. P. 1-25.

80. A Study to Evaluate the Clinical Efficacy, Safety and Tolerability of ARX-F03 Sublingual Sufentanil/Triazolam Nano-Tab™ in Patients Undergoing an Elective Abdominal Liposuction Procedure // ClinicalTrials. AcelRx Pharmaceuticals, Inc. URL: https://clinicaltrials.gov/show/NCT00894699 (дата обращения 02.02.2017).

81. D. Perret, Z.D. Luo. Targeting voltage-gated calcium channels for neuropathic pain management // Neurotherapeutics. 2009. V. 6(4). P. 679-92.

82. S. Goyal et al. Comparison of the Effects of Zonisamide, Ethosuximide and Pregabalin in the Chronic Constriction Injury Induced Neuropathic Pain in Rats // Ann Med Health Sci Res. 2015. V. 5(3). P. 189–96.

83. J.A. Fidler, Y.A. Jamal, et al. GABA antagonist, delays return of righting reflex in mice after isoflurane anesthesia but does not significantly alter dendritic spine density. 46th Annu Meet Soc Neurosci. San Diego // 2016. Abst 343.20.

84. P. Compton, P. Kehoe, K. Sinha. Gabapentin improves cold-pressor pain responses in methadone-maintained patients // Drug Alcohol Depend. 2010. V. 109(1–3). P. 213–9.

85. N. Stoicea, D. Russell, G. Weidner, M. Durda, Sergio D. Bergese. Opioid-induced hyperalgesia in chronic pain patients and the mitigating effects of gabapentin // Front Pharmacol. 2015. V. 27. P. 96–104.

86. D.R. Maguire, C.P. France. Impact of efficacy at the μ-opioid receptor on antinociceptive effects of combinations of μ-opioid receptor agonists and cannabinoid receptor agonists // J Pharmacol Exp Ther. 2014. V. 351(2). P. 383–9.

87. F. Shen, P.R. Tsuruda, J.A. Smith, G.P. Obedencio, W.J. Martin. Relative contributions of norepinephrine and serotonin transporters to antinociceptive synergy between monoamine reuptake inhibitors and morphine in the rat formalin model // PLoS One. 2013. V. 8(9). P. 74891.

88. M.L. Banks, K.C. Rice, S.S. Negus. Antinociceptive interactions between Mu-opioid receptor agonists and the serotonin uptake inhibitor clomipramine in rhesus monkeys: role of Mu agonist efficacy // J Pharmacol Exp Ther. 2010. V. 335(2). P. 497–505.

89. J.X. Li, W. Koek, K.C. Rice, C.P. France. Effects of direct- and indirect-acting serotonin receptor agonists on the antinociceptive and discriminative stimulus effects of morphine in rhesus monkeys // Neuropsychopharmacology. 2011. V. 36(5). P. 940–949.

90. Pain Management in Veterinary Practice / Editors: Christine M. Egger, Lydia Love, Tom Doherty. – NY: John Wiley & Sons, Ltd. 2014. 447 p.

91. D.L. Cichewicz, S.P. Welch, F.L. Smith. Enhancement of transdermal fentanyl and buprenorphine antinociception by transdermal delta9-tetrahydrocannabinol // Eur J Pharmacol. 2005. V. 525 (1–3). P. 74–82.

92. R.G. Pertwee. Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2012. V. 367(1607). P. 3353–3363.

93. I.A. Aljuffali, C.-F. Lin, C.-H. Chen & J.-Y. Fang. The codrug approach for facilitating drug delivery and bioactivity // Expert Opinion on Drug Delivery. 2016. V. 13 (9). P. 1311-1325.

94. H.K. Dhooper. Opioid-Cannabinoid Codrugs with Enhanced Analgesic and Pharmacokinetic Profile: PhD dissertation. University of Kentucky. 2010. 160 p.

95. J.L. Wiley, M.M. O'connell, M.E. Tokarz, M.J. Wright. Pharmacological effects of acute and repeated administration of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in adolescent and adult rats // J Pharmacol Exp Ther. 2007. V. 320 (3). P. 1097–1105.

96. Abuse-Deterrent Opioids – Evaluation and Labeling Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Clinical Medical. 2015. URL: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM334743.pdf (дата обращения 11.02.2017)

97. R. Moorman-Li, C.A. Motycka, L.D. Inge, et al. A review of abuse-deterrent opioids for chronic nonmalignant pain // P&T®. 2012. V. 37(7). P. 412–418.

98. H. Soltani, A. Pardakhty. Marketed New Drug Delivery Systems for Opioid Agonists/Antagonists Administration: A Rapid Overview // Addict Health. 2016. V. 8(2). P. 115–122.

99. L.R. Webster, E.A. Kopecky, M.D. Smith, A.B. Fleming. A Randomized, Double-Blind, Double-Dummy Study to Evaluate the Intranasal Human Abuse Potential and Pharmacokinetics of a Novel Extended-Release Abuse-Deterrent Formulation of Oxycodone // Pain Med. 2016. V. 17(6). P. 1112–30.

100. M.E. Schatman, L.R. Webster. The health insurance industry: perpetuating the opioid crisis through policies of cost-containment and profitability // J Pain Res. 2015. V. 18(8). P. 153–158.

101. D.A. Tompkins, R.K. Lanier, J.A. Harrison, E.C. Strain, G.E. Bigelow. Human abuse liability assessment of oxycodone combined with ultra-low-dose naltrexone // Psychopharmacology (Berl). 2010. V. 210(4) P. 471–480.

102. L.R. Webster, J. Markman, E.J. Cone, G. Niebler. Current and future development of extended-release, abuse-deterrent opioid formulations in the United States // Postgraduate Medicine. 2017. V. 129(1). P. 102–110.

103. S.G. Severtsona, M.S. Ellis, S.P. Kurtzc. Sustained reduction of diversion and abuse after introduction of an abuse deterrent formulation of extended release oxycodone // Drug and Alcohol Dependence. 2016. V. 168 P. 219–229.

104. S.D. Passik. Issues in long-term opioid therapy: unmet needs, risks, and solutions // Mayo Clin Proc. 2009. V. 84(7). P. 593–601.

105. I. Kissin. The Development of New Analgesics Over the Past 50 Years: A Lack of Real Breakthrough Drugs // Anesthesia and analgesia. 2010. V. 110(3). P. 780–789.

106. J.E. Barrett. Perspectives and Trends in Pharmacological Approaches to the Modulation of Pain // Adv Pharmacol. 2016. V. 75. P. 1–33.

УДК 547.794.3

ХЛОРИД 2-[(1Z)-1-(3,5-ДИФЕНИЛ-1,3,4-ТИАДИАЗОЛ-2(3Н)-ИЛИДЕН)МЕТИЛ]-3,5-ДИФЕНИЛ-1,3,4-ТИАДИАЗОЛ-3-ИЯ КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ СОЕДИНЕНИЕ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

А.С. Кошевенко[1]*, В.Н. Юсковец[1], И.П. Яковлев[1], Е.П. Ананьева[1], Т.Л. Семакова[1]

Резюме. Разработан метод получения нового гетероциклического соединения – хлорида 2-[(1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3Н)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия. Его строение доказано физико-химическими методами идентификации органических соединений: ^{1}Н-ЯМР- и ^{13}С-ЯМР-спектроскопией, ИК-спектроскопией, масс-спектрометрией. Определена антифунгальная активность в отношении культур *C. albicans, T. rubrum, T. mentagrophytes, F. proliferatum, S. brevicaulis*. Показано, что данное соединение обладает выраженной антифунгальной активностью и потенциально может быть использовано в медицине в качестве антимикробного средства с фунгицидным действием

Ключевые слова: 1,3,4-тиадиазол, антифунгальная активность, минимальная подавляющая концентрация.

CHLORIDE-2-[(1Z)-1-(3,5-DIPHENYL-1,3,4-THYADIAZOLE-2(3H)-ILIDEN)METHYL]-3,5-DIPHENYL-1,3,4-THYADIAZOLE-3 AS A PROMISING COMPOUND FOR THE DEVELOPMENT OF NEW DRUGS

A.S. Koshevenko[1]*, V.N. Yuskovets[1], I.P. Yakovlev1, E.P. Ananyeva[1], T.L. Semakova[1]

Abstract. The method of obtaining new heterocyclic compound – chloride 2-[(1Z)-1-(3,5-diphenyl-1,3,4-thiadiazol-2(3H)-ilidene)methyl]-3,5-diphenyl-1,3,4-thiadiazol-3-Ia was developed. Its structure was proved by physicochemical methods of identification of organic compounds: ^{1}H- and ^{13}C-NMR-, IR-spectrometry, mass spectrometry. Antifungal activity was defined against *C. albicans, T. rubrum, T. mentagrophytes, F. proliferatum, S. brevicaulis*. It was shown that this compound has potent antifungal activity and can potentially be used in medicine as antimicrobial with fungicidal action.

Keywords: 1,3,4-thiadiazole, antifungal activity, the minimal inhibitory concentration.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России), 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14

1 – Federal State Educational Institution of Higher Education «Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy» of the Russian Federation Ministry of Health, 14, str. Professor Popov, St. Petersburg, 197022, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: anastasia.koshevenko@pharminnotech.com
Тел.: +7 (981) 185 46 74

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, свыше 1/3 населения Земли страдает грибковыми заболеваниями. Наблюдается рост грибковых заболеваний как поверхностных, так и тяжелых висцеральных микозов, ассоциированных с ВИЧ-инфекцией, онкогематологическими заболеваниями [1].

Среди грибковых инфекций дерматомикозы являются одной из наиболее распространенных. Проблема заболеваемости, обусловленной дерматомикозами, с каждым годом не только не теряет своей актуальности, а, наоборот, заставляет концентрировать свое внимание на этой патологии.

В структуре заболеваемости микозами у взрослого населения максимальную часть составляют микозы стоп и онихомикозы, на распространение которых в большой степени влияет социальный и культурный уровень жизни [2].

Основными возбудителями онихомикоза являются антропофильные грибы *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton mentagrophytes*. Поражения ногтей, вызванные грибами *Candida* spp., встречаются у 5–10% больных и могут составлять до 40% случаев онихомикоза на руках. Недерматофитные плесени, такие как *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium* spp. и некоторые другие, могут вызывать около 10–15% онихомикозов [3].

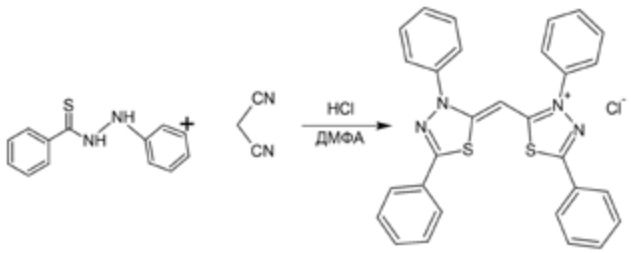
К сожалению, в современных условиях на отечественном и мировом рынке фармацевтическими компаниями представлен относительно небольшой спектр антимикотических препаратов, преимущественно зарубежного производства («Батрафен», «Лоцерил», «Ламизил»). Поэтому проблема микозов остается чрезвычайно актуальной в связи с ростом контингента боль-

ных и появлением резистентных к лечению штаммов, что требует расширения действующего арсенала за счет новых эффективных нетоксичных противогрибковых средств [4, 5].

Целью данной работы является синтез и изучение противогрибковой активности нового производного хлорида 2-[(1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия в отношении клинических штаммов основных возбудителей онихомикоза: грибов *Candida albicans, Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Fusarium proliferatum, Scopulariopsis brevicaulis.*

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На кафедре органической химии путем взаимодействия замещенного N'-фенилтиобензгидразида с малондинитрилом в соотношении 2:1 в среде полярного органического растворителя (диметилформамида) и хлористого водорода был получен хлорид 2-[(1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден) метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия:



Выход продукта в виде ярко-желтых мелких игольчатых кристаллов составил 85–87% от теоретического из расчета на N'-фенилтиобензгидразид. $T_{пл}$ варьирует в пределах 269–271 °C. Продукт хроматографически однороден: R_f=0.87 (хлороформ : метанол – 2:1).

Состав синтезированного соединения подтвержден элементным анализом. Брутто-формула: $C_{29}H_{21}ClN_4S_2$. Найдено, %: C – 66,6, H – 4,06, Cl – 6,78, N – 10,71, S – 12,29. Вычислено, %: C – 66,33, H – 4,03, Cl – 6,75, N – 10,67, S – 12,21.

Строение синтезированного вещества было доказано физико-химическими методами идентификации органических соединений: ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР-спектроскопией (прибор Avance III, Bruker, США), ИК-спектроскопией (прибор ФСМ-1201, «Инфраспек», Россия), масс-спектрометрией (прибор micrOTOF, Bruker, США).

В ИК-спектрах вещества (таблетки KBr) наиболее характеристической является область 1540–1440 см$^{-1}$, где наблюдаются полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям связей C=C и C=N сопряженной системы. Аналогичные колебания C–H-связей бензольных колец находятся в диапазоне 3100–3000 см$^{-1}$.

В спектре ^{1}H-ЯМР полученного соединения в ДМСО-d_6+$CDCl_3$ 1:3 присутствуют сигналы протонов бензольных колец [δ 7,59-7,73 (м, 16H), 8,04 (д, 4H, J=6,9Hz)] и протона метинового мостика между 1,3,4-тиадиазольными циклами (δ 6,01 с 1H).

Спектр ^{13}C-ЯМР этого соединения характеризуется сигналами ядер углерода бензольных колец (δ 125,4–136,2 м.д.), тиадиазольных циклов (δ 162,9 и 168,5 м.д.) и метинового мостика между 1,3,4-тиадиазольными циклами (δ 79,26 м.д.).

Также строение полученного вещества было доказано с помощью масс-спектрометрии. Рассчитанная молекулярная масса полностью совпала с экспериментально полученной (M^+=525).

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 1,3,4-тиадиазола готовили в 50% водном диметилсульфоксиде из-за их ограниченной растворимости в воде.

Для приготовления взвеси дрожжевой культуры *C. albicans* использовали 2-суточные культуры, выращенные на плотной питательной среде Сабуро. Готовили взвесь по стандарту Мак-Фарланда ($2{\cdot}10^8$ КОЕ/мл), затем полученную суспензию разводили в 100 раз 0,85% стерильным раствором хлорида натрия. Количество вносимой рабочей взвеси в каждую пробирку ряда составляло 0,1 мл.

Для приготовления взвеси тест-культуры грибов *T. rubrum, T. mentagrophytes, F. proliferatum, S. brevicaulis* выращивали в течение 2 недель на плотной питательной среде Сабуро. Готовили взвесь по стандарту Мак-Фарланда ($2{\cdot}10^8$ КОЕ/мл), затем полученную суспензию разводили в 100 раз 0,85% стерильным раствором хлорида натрия. Количество вносимой рабочей взвеси в каждую пробирку ряда составляло 0,1 мл.

В каждом исследовании ставили 3 контроля:

1) культуры (1 мл питательной среды + 0,1 мл рабочей взвеси тест-культуры);
2) питательной среды (1 мл питательной среды);
3) раствора образца (1 мл питательной среды + 0,1 мл исходного разведения образца)

Посевы выращивали в течение 2 суток для C. *albicans* и 7-10 суток (до появления роста гриба в первом контроле) для грибов *T. rubrum, T. mentagrophytes, F. proliferatum, S. brevicaulis*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве препаратов сравнения были выбраны препараты из группы азолов – кетоконазол и флуконазол.

Кетоконазол имеет широкий спектр действия. Средняя МПК для дерматофитов составляет около 0,1–0,2 мкг/мл, для *C. albicans* – около 0,5 мкг/мл. Фунгицидный эффект достигается при очень высоких концентрациях препарата, редко получаемых при лечении. Многие плесневые грибы – возбудители недерматофитного онихомикоза – устойчивы к кетоконазолу.

Флуконазол имеет относительно широкий спектр действия, включающий большинство видов *Candida*, дерматофиты, *Malassezia furfur* и «классических» диморфных возбудителей. Среди грибов рода *Candida* наиболее чувствительными к флуконазолу являются *C. albicans* (МПК составляет в среднем 1,0–16,0 мкг/мл). Активность флуконазола в отношении разных плесневых грибов меньше, чем в отношении дрожжевых [3].

Установлено, что исследуемое соединение обладает фунгицидным действием в отношении *C. albicans*. Минимальная подавляющая концентрация производного хлорида 2-[(1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия составляла 1,57 мкг/мл, что превышает минимально подавляющую концентрацию антифунгального препарата – флуконазола.

В отношении грибов *T. mentagrophytes, T. rubrum* хлорид 2-[(1Z)-1-(3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол-3-ия проявил фунгистатическую активность в концентрациях 1,57 и 3,14 мкг/мл и фунгицидное действие – в концентрациях 3,14 и 6,25 мкг/мл соответственно.

Исследуемое соединение также проявило фунгистатическую активность в отношении штамма *S. brevicaulis* в концентрации 25 мкг/мл и фунгицидную активность – в концентрации 100 мкг/мл.

В отношении штамма *F. proliferatum* наблюдали фунгицидный эффект при концентрации соединения 100 мкг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами синтезировано новое производное 1,3,4-тиадиазола – хлорид 2-[(1Z)-1-(3-(3,5-дифенил)-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3-(3,5-дифенил)-5-(4-арил)-1,3,4-тиадиазол-3-ия, обладающее высокой активностью в отношении дрожжей рода *Candida*, превышающей активность флуконазола.

Фунгицидный эффект соединения в отношении грибов *T. rubrum, T. mentagrophytes* достигается при значительно небольших концентрациях, чего нельзя сказать о препарате сравнения – кетоконазоле.

Хлорид 2-[(1Z)-1-(3-(3,5-дифенил)-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3-(3,5-дифенил)-5-(4-арил)-1,3,4-тиадиазол-3-ия, в отличие от препаратов сравнения – флуконазола и кетоконазола, обладает фунгистатическим действием в отношении возбудителя недерматофитного онихомикоза *S. brevicaulis.*

Полученные результаты позволяют потенцировать соединение хлорид 2-[(1Z)-1-(3-(3,5-дифенил)-5-(4-арил)-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3-(3,5-дифенил)-1,3,4-тиадиазол-3-ия как перспективное лекарственное средство, обладающее антифунгальной активностью на уровне существующих на рынке противогрибковых препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.Ю. Сергеев, О.Л. Иванов, Ю.В. Сергеев. Исследование современной этиологии онихомикоза в России // Российский журнал кожных и венерологических болезней. 2002. Т. 5. С. 42–46.
2. Н.Н. Климко, Я.И. Козлова, О.В. Шадривова и др. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LifeProgram // Проблемы медицинской микологии. 2014. Т. 16. № 1. С. 3–7.
3. А.Ю. Сергеев. Системная терапия онихомикозов: пособие для врачей. 2-е изд. – М.: Национальная академия микологии. 2007. С. 3–17.
4. А.Г. Довнар, Е.С. Носонова. Характеристика множественной резистентности клинических штаммов энтеробактерий, ацинетобактер и кандид // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2011. № 4. С. 53–54.
5. Д.А. Донгак, О.Г. Карноухова, Г.Ю. Коган и др. Частота выделения и лекарственная резистентность грибов рода *Candida* от больных ВИЧ-инфекцией в Иркутске // Сибирский медицинский журнал. 2013. № 5. С. 57–59.

Таблица 1.

Антифунгальная активность, мкг/мл

	C. albicans		*T. mentagrophytes*		*T. rubrum*		*F. proliferatum*		*S. brevicaulis*	
	ФС действие	**ФЦ действие**	**ФС действие**	**ФЦ действие**	**ФС действие**	**ФЦ действие**	**ФС действие**	**ФЦ действие**	**ФС действие**	**ФЦ действие**
Исследуемое соединение	–	1,57	1,57	3,14	3,14	6,25	–	100	25	100
Флуконазол	–	12,5	–	50	–	100	–	–	–	–
Кетоконазол	0,78	–	0,19	–	0,19	–	–	–	–	–

МЕДФАРМ СОЧИ

XIV ежегодная межрегиональная конференция

25 – 27 июня 2017 г.

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОЙ И МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

КОНФЕРЕНЦИЯ СО СВОЕЙ ИСТОРИЕЙ ПРОВЕДЕНИЯ





УНИКАЛЬНЫЙ СОСТАВ УЧАСТНИКОВ




АКТУАЛЬНАЯ ПРОГРАММА — САМЫЕ ВОСТРЕБОВАННЫЕ ТЕМЫ

Пленарное заседание

- Оценка инновационных технологий в педиатрической практике
- Безопасность фармакотерапии в России
- Основные барьеры доступности лекарственных средств
- Обзор фармацевтического рынка России: тенденции и перспективы развития
- Обеспечение доступности качественной лекарственной и медицинской помощи на региональном уровне

Секционные заседания

- Актуальные вопросы лекарственного обеспечения социально значимых заболеваний (на примере отдельных заболеваний)
- Организация и проведение закупок лекарственных средств на региональном уровне. Организация региональной льготы
- Экспертиза лекарственных средств
- Государственный контроль обращения лекарственных средств
- Особенности функционирования фармацевтических организаций (ГУП) в условиях динамично развивающегося рынка
- Регулирование обращения лекарственных средств на территории государств-членов Евразийского экономического сообщества — ЕврАзЭС
- Аптечная секция

СОВРЕМЕННЫЙ И ТЩАТЕЛЬНО ПРОДУМАННЫЙ ФОРМАТ ПРОВЕДЕНИЯ






- Пленарное заседание
- Секционные заседания
- Круглые столы
- Деловая игра
- Дискуссии
- Беседа в кулуарах

ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ПРОВЕДЕНИЯ — 15 ЭТАЖ ГРАНД ОТЕЛЯ ЖЕМЧУЖИНА




ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБСУЖДЕНИЕ




Дополнительная информация на сайте www.fru.ru, 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

УДК 615.273.53; 547.587.51

СИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ВАРФАРИНА

А.З. Абышев[1], И.К. Журкович[2], Д.Ю. Ивкин[1], К.Б. Нгуен[1]*

Резюме. Разработаны методы синтеза 7 производных варфарина, из которых три являются комбинированными. Современными спектральными методами (ИК-, ЯМР-спектроскопия) определены их структурные особенности, физико-химические свойства синтезированных соединений. Изучена их антикоагулянтная активность *in vivo* путем определения протромбинового времени (ПТВ). Наиболее выраженной активностью, сравнимой с препаратом варфарином (37,4±2,8 с), обладали субстанции **AZ-5** (конъюгат варфарина с фрагментом субстанции диуманкала, 41,2±2,3 с) и **AZ-9** (диуманкал, 45,18±4,85 с), сравнимые с препаратом варфарином (37,4±2,8 с).

Ключевые слова: кумарин, варфарин, диуманкал, антикоагулянтная активность.

SYNTHESIS, PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF SOME DERIVATIVES OF WARFARIN

A.Z. Abyshev[1], I.K. Zhurkovich[2], D.Yu. Ivkin[1], C.B. Nguyen[1]*

Abstract. Methods of synthesis of 7 warfarin derivatives from which three are combined has been developed. Their structural features, physicochemical properties of synthesized compounds by modern and spectral methods (IR, NMR spectroscopy) were determined. Their anticoagulant activity *in vivo* were studied by determining prothrombin time (PT). The most pronounced activity was possessed by substances **AZ-5** (conjugate warfarin with a fragment of the substance diumancal, 41,2±2,3 s) and **AZ-9** (diumancal, 45,18±4,85 s), comparable with the reference drug warfarin (37,4±2,8 s).

Keywords: coumarin, warfarin, diumancal, anticoagulant activity.

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

2 – ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА», 192019, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

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

2– 2 – Institute of Toxicology FMBA, 1, Bekhtereva str., St-Petersburg, 192019, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: nguyencongbang.ru@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоэмболия сосудов разной локализации занимает одно из ведущих мест среди причин инвалидизации, смертности и сокращения средней продолжительности жизни населения, которые определяют необходимость широкого применения в медицинской практике препаратов с антикоагулянтными свойствами. Антикоагулянты непрямого действия (антагонисты витамина К) являются краеугольным камнем современной противотромботической терапии [1–3].

Доказательные исследования показали высокую эффективность антикоагулянтов непрямого действия для предупреждения и лечения венозной тромбоэмболии, профилактики системных эмболий, ассоциированных с фибрилляцией предсердий или искусственными клапанами сердца, предотвращения инсульта и повторного инфаркта миокарда [2–4].

Варфарин является наиболее часто применяемым антикоагулянтом данной группы лекарственных препаратов. Однако использование варфарина в медицинской практике ограничено ввиду его тяжелых побочных эффектов. Среди них нужно выделить возможность возникновения серьезных кровотечений [1, 5].

Исходя из изложенных выше данных мы в течение многих лет продолжаем поиск новых, наиболее активных и безвредных лекарственных веществ среди производных кумарина в двух направлениях:

1) среди производных кумарина природного и синтетического происхождения, не содержащих в 4-м положении оксигруппы;

2) путем химиической модификации структуры варфарина с целью сохранения его высокой фармакологической активности и снижения токсичности, особенно для избавления от такого побочного эффекта варфарина, как обильные кровоизлияния при его оральном применении. Более подробная информация по синтезу и фармакологической активности полученных соединений представлена в монографиях [1, 6].

Поэтому задачей настоящей работы является расширение арсенала антикоагулянтов непрямого действия, поиск нового средства на основе химической структуры варфарина, имеющего более низкую токсичность, чем варфарин, широко применяющийся в медицинской практике. Указанная задача нами решается в течение многих лет путем создания новых антикоагулянтов непрямого действия на основе структуры различных комбинированных производных кумарина, поскольку целенаправленный поиск и синтез новых модифицированных эффективных лекарственных средств на основе молекулы варфарина и изучение их биологической активности является весьма актуальным научным направлением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная химическая часть

На спектрометре ФСМ-1201 («СПб Инструментс», Россия) регистрировали ИК-спектры веществ в виде суспензии в вазелиновом масле или в дисках с KBr. Спектры ЯМР сняты на спектрометрах Bruker Avance III 400MHz (Bruker, США), внутренний стандарт – тетраметилсилан (ТМС). Температуры плавления синтезированных соединений определены на приборе Melting points Apparatus IA9000 Series (Electrothermal, США).

ТСХ проводили на пластинках Sorbfil UV254 (ПТСХ-П-В-УФ) (ЗАО «Сорбполимер», Россия) или Kieselgel 60 F254 (Merck, США) размером 10×20 см в системе растворителей бензол – этилацетат в соотношении 3:1.

ВЭЖХ-анализы выполнены на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с УФ-детектором модели 168 с диодной матрицей. Рабочая длина волны 220 нм. Колонка из нержавеющей стали (250×4,6 мм), упакованная октадецилсиликагелем зернением 5 мкм типа Nucleosil C_{18}, температура колонки 30±1 °C.

Подвижная фаза 1: в мерную колбу вместимостью 1 л помещают 150 мл деионизованной воды, доводят объем до метки ацетонитрилом (сорт 0, ос.ч., «Криохром», Россия) и перемешивают.

Подвижная фаза 2: в мерную колбу вместимостью 1 л помещают 100 мл деионизованной воды, доводят объем до метки ацетонитрилом и перемешивают.

Испытуемые растворы образцов с концентрацией 0,1 мг/мл помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в ацетонитриле и доводят объем раствора до метки тем же растворителем.

Условия хроматографирования:

Колонка: Symmetry C18, 5 мкм, 4,6×250 мм (Waters, США)

Подвижная фаза: смесь воды и ацетонитрила в соотношении 15:85 (для AZ-1,5) или 10:90 (для AZ-9)

Скорость потока: 1,0 мл/мин

Температура колонки: 35 °C

Объем пробы: 20 мкл

Длина волны УФ-детектора: 220 нм

Время регистрации хроматограммы: 0–40 мин.

Общая методика синтеза соединений AZ-4 и AZ-5

В круглодонную колбу объемом 100 мл помещают 0,27 г (1 ммоль) 4-(2-бромэтокси)кумарина или 7-(2-бромэтокси)кумарина, 0,31 г (1 ммоль) варфарина, 1,0 г карбоната калия; добавляют 25 мл ДМФА. Реакционную смесь в течение 10 часов нагревают при температуре 100–110 °C при постоянном перемешивании с использованием магнитной мешалки. Цвет раствора: оранжево-коричневый. Затем реакционную массу вливают в стакан с водой 150 мл с работающей магнитной мешалкой. Цвет раствора становится мутно-молочным Образовавшиеся кристаллы отфильтровывают, тщательно промывают водой и остаток перекристаллизовывают из различных растворителей.

Общая методика синтеза соединений AZ-1 и AZ-2

1,0 г (3,2 ммоль) варфарина растворяют в 15 мл ДМФА, 1,0 мл (12,4 ммоль) сухого пиридина в круглодонной колбе вместимостью 100 мл, снабженной магнитной мешалкой, добавляют 2,0 мл уксусного ангидрида или пропионового ангидрида. Реакционную смесь постоянно перемешивают при комнатной температуре (20–25 °C) до полного исчезновения исходного варфарина при ТСХ-контроле (около 3 ч). Затем реакционную смесь вливают в стакан с дистиллированной водой (100 мл). Выпадает осадок белого цвета. Осадок отфильтровывают и перекристаллизовывают из спирта.

Общая методика синтеза соединений AZ-3 и AZ-6

3,1 г (19,1 ммоль) 4-гидроксикумарина растворяют в 50 мл ацетона и 20 мл ДМФА в круглодонной колбе вместимостью 100 мл, снабженной магнитной мешалкой, добавляют 3,3 мл (38,3 ммоль) дибромэтана и 1,66 г (12,0 ммоль) K_2CO_3. Затем реакционную смесь кипятят в течение 24 часов и вливают в стакан с водой 150 мл с работающей магнитной мешалкой. Осадок отфильтровывают. Чистый продукт получают с помощью колоночной хроматографии на колонке (5×150 см) с нейтральной Al_2O_3 (800 г, II степени активности). Элюирование проводят смесью хлористого метилена и петролейного эфира, постепенно увеличивая полярность системы.

Методика синтеза соединений AZ-7

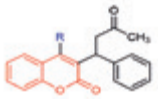
В круглодонную колбу объемом 50 мл помещают 0,31 г (1 ммоль) варфарина, 15,0 мл хлористого тионила. Реакционную смесь постоянно перемешивают в обратном холодильнике до кипения в течение 2 ч с использованием магнитной мешалки. Избыток $SOCl_2$ упаривают при пониженном давлении. Реакционная масса была помещена в морозильную камеру (–18 °С) на 10 часов. Выпавший осадок отфильтровывают и промывают водой. Затем перекристаллизовывают из изопропилового спирта. Осадок отфильтровывают, промывают водой и высушивают при 80 °С.

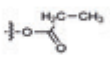
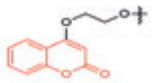
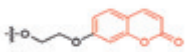
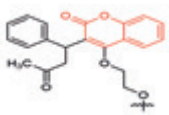
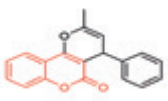
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Строение и физико-химические свойства синтезированных нами новых соединений определены современными химическими и спектральными методами (ИК-, ЯМР-спектроскопия и хроматография, в частности ВЭЖХ) (таблицы 1–5).

Таблица 1.

Структуры некоторых новых комбинированных производных варфарина



Соединения	Название	R
AZ-1	4-ацетат варфарина	
AZ-2	4-пропионат варфарина	
AZ-3	4-бром-этокси-варфарин	
AZ-4	4-кумаринил-этокси-варфарин	
AZ-5	7-кумаринил-этокси-варфарин	
AZ-6	димер варфарина	
AZ-7	метаболит варфарина	

При этом следует отметить, что для подтверждения структуры синтезированных новых и известных (для сравнения их фармакологических свойств) веществ и возможных примесей в них исходных используемых компонентов, наряду с характерной химической реакцией на 2H-1-бензопиранового цикла, также использовали вышепредставленные результаты физико-химических и спектральных исследований. В частности:

1. ИК-спектр исследуемого вещества, снятый в виде суспензии в вазелиновом масле или в диске с KBr в области от 400 до 4000 $см^{-1}$, должен иметь полное совпадение полос поглощения с полосами поглощения прилагаемого к соответствующим ФС или ФСП спектра по положению и относительным интенсивностям полос (таблица 4).

Таблица 2.

Структуры синтетических веществ, используемых для сравнительного анализа фармакологических данных

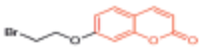
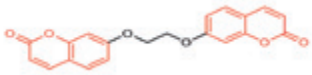
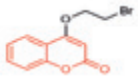
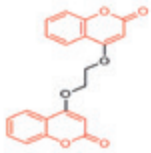
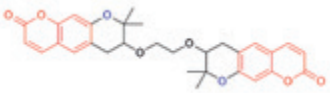
Соединения	Название	Структурные формулы
AZ-8	7-(2-бромэтокси)-кумарин	
AZ-9	диуманкал	
AZ-10	4-(2-бромэтокси)-кумарин	
AZ-11	4,4′-этилендиокси-2H-1-дибензопиран-2,2′-дион	
AZ-12	декурсинол	
AZ -13	димер декурсинола	

Таблица 3.

Содержание основного вещества и примесей в наиболее активных синтезированных субстанциях

№ п/п	Лабораторные названия	Содержание основного вещества и примесей (%)*		
		Действующие вещества	Примеси	
			Единичные	Суммарно
1	AZ-1	98,7	Варфарин – 1,3	1,3
2	AZ-5	99,7	7-бромэтоксикумарин – 0,2; Варфарин – 0,1	0,3
3	AZ-9	99,5	7-оксикумарин – 0,3; 7-бромэтоксикумарин – 0,2	0,5

Примечание: * – расчет выполнен по методу внутренней нормализации площадей.

Таблица 4.

Некоторые данные ИК- и ^{1}H-ЯМР – спектров синтезированных соединений

Соединения	Молекулярная формула	Выход, %	Температура плавления, °С	ИК-спектр, см$^{-1}$	^{1}H-ЯМР (δ, м.д.)
AZ-1	$C_{21}H_{18}O_5$	89	116–118	1763 (оч.с.), 1720 (с.), 1454-1627 (ср.)	2,1 (с, 3Н), 2,51 (с. 3Н), 3,49 (д., 2Н), 4,85 (т, 1Н), 7,22-7,52 (м-комплекс)
AZ-2	$C_{22}H_{20}O_5$	50	134–136	1626 (С=О в алифатической цепочке), 1718 (С=О в бензопирановом цикле), 1774 (сложноэфирная группа)	1,38 (т, J = 7.53 Гц, 1Н), 2,19 (с. 1Н), 2,83 (дк., J=7.49, 2.64 Гц, 1Н), 3,48 (ддд, J = 41.40, 18.14, 7.02 Гц, 1Н), 7,33-7,17 (м, 1Н), 7.36 (дд. J =11.02, 42 Гц, 1Н), 7.52-7.46 (м, 1Н)
AZ-3	$C_{21}H_{19}O_4Br$	30	181–183	1720 (С=О в бензопирановом цикле), 1455-1565 (–СН=СН– в аром. цикле)	1,25 (т, 1Н), 1.80 (с., 1Н), 2,0 (с. 4Н), 3.00-5.20 (м., 7Н),7.0-8.0 (м. 9Н)
AZ-4	$C_{30}H_{24}O_7$	42	198–200	1622 (оч.с.), 1710 (с.), 1454-1564 (ср.)	2,1 (с, 3Н), 4,62-4,71 (д, 4Н), 3,5 (д., 2Н), 4,98 (т, 1Н), 7,2-7,7 (м-комплекс).
AZ-5	$C_{30}H_{24}O_7$	38	210–212	1700, 1730 (С=О в циклах), 1650 (С=О в алифатической цепочке), 1600 (–СН=СН–) 1280, 1285(–О-CH_2–)	2,20 (с, –$COCH_3$), 2,90 и 3,20 (д и дд, J=29,09 Гц, J1=5,4 и 18,3 Гц, 2-СН), 4,0 (дд, J=9,6 и 18,3 Гц, 3-СН), 4,70 (д, J=5,7 Гц, 13-СН2), 5,0 (д, J=5,4 Гц, 14-CH_2), 6,30 (д, J=9,48 Гц, 18-СН), 6,9 (м, 15-СН, 19-СН), 7,3 (м, 16-, 11-, 10-, 9-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-СН), 7,70 (д, J=9,49 Гц, 17-СН), 7,9 (д, J=7,85 Гц, 12-СН)
AZ-6	$C_{40}H_{34}O_8$	28	192–195	1624 (С=О в алифатической цепочке), 1722 (С=О в бензопирановом цикле), 2926, 3101 (–CH_2–CH_2–)	2.19 (д, J=7.01 Гц, 1Н), 3.08 (дд, J =18.32,4-83 Гц, 1Н), 4.15 (тд, J=21.78, 10.90 Гц, 1Н), 4.69-4.57 (м, 1Н), 4.93-4.84 (м, 1Н), 5.12 (дд, J=10.32, 10.32 Гц, 1Н), 7.39-7.14 (м, 1Н), 7.58-7.47 (м, 1Н), 7.93 (дд, J=7.91, 1.09 Гц, 1Н)
AZ-7	$C_{19}H_{13}O_3$	30	141–143	1612.7, 1635.8 (С=С), 1726.5 (С=0 в бензопирановом цикле)	2.10 (с, 1Н), 4.52 (дд, J=4.46 Гц, 0.99 Гц, 1Н), 5.09 (дд, J=4.51, 0.95 Гц, 1Н), 7.27-7.20 (м, 1Н), 7.40-7.27 (м, 1Н), 7.58-7.51 (м, 1Н), 7.89 (дд, J=7.87, 1.48 Гц, 1Н)
AZ-8	$C_{11}H_9O_3Br$	82	135–136	1720, 1650 (С=О),1500,1610 (–СН=СН–), 1405 (–О–CH_2–), 500-610 (–CH_2–Br)	4,66 (т, J=6,0 Гц, 2Н), 4,33 (т, J=6,0 Гц, 2Н), 6,24 (д, J=9,6 Гц, 1Н), 6,77(д,J=2,4 Гц, 1Н), 6,84 (дд, J=8,4, 2,4 Гц, 1Н), 7,37 (д, J=8,4 Гц, 1Н), 7,62 (д, J=9,6 Гц, 1Н)
AZ-9	$C_{22}H_{14}O_6$	65	239–241	1730 (С=О), 1520, 1630 (–СН=СН–), 1405 (–О–CH_2–)	4,42 (s, 4Н), 6,37 (д, J=9,29 Гц, 2Н), 6,85-6,93 (m, 4Н), 7,40 (д, J=8,28 Гц, 2Н), 7,65 (д, J=9,54 Гц, 2Н)
AZ-10	$C_{11}H_9O_3Br$	65	166–168	1700 (–С=О), 1610, 1570, (–СН=СН–), 1430 (–О–CH_2–), 500-595 (–CH_2–Br)	5,70 (с, Н-3), 7,20–7,80 (м, Н-5 и Н-6), 3,80 (т, Ar-O-CH_2-), 4,50 (т, – CH_2-Br)
AZ-11	$C_{22}H_{14}O_6$	75	234–236	1695 (–С=О), 1650, 1630, 1505 (–СН=СН–), 1450–1390 (–О–CH_2–)	4.72 (с, 4 Н), 6.04 (с, 2 Н) 7.25–7.35 (м, Гц =7.78, 7.78 Гц, 2 Н), 7.38 (д, J=8.28 Гц, 2 Н), 7.57–7.68 (м, J=7.53, 7.53 Гц, 2 Н), 7.78 (д, J=7.78 Гц, 2 Н)
AZ-12	$C_{14}H_{14}O_4$	40	180–181	3460 (–ОН), 1710 (С=0 в бензопирановом цикле), 1635, 1570, 1500 (–СН=СН–)	6.24, 7.60 ((д, J=10 Гц, Н-3 и Н-4), 6.80, 7.30 (с, Н-8 и Н-5), 3.9 (т, J=6 Гц, Н-3′), 3.15 (дд, J_1=17.1 Гц, J_2=4.6 Гц, НА-4′), 2.85 (дд, J_1=17.1 Гц, J_2=6.6 Гц, НВ-4′), 1.9 (д, J=6.6 Гц, -ОН), 1.34, 1.45 (с, $2CH_3$)
AZ-13	$C_{30}H_{30}O_8$	60	236–238	1700 (С=О), 1610, 1560, 1500 (–СН=СН–), 1280 (простая эфирная связь)	6,0 и 7,33 (д, J=10 Гц, Н-3 и Н-4), 6,54 и 6,94 (с, Н-8 и Н-5), 1,26 и 1,28 (с, 4-CH_3), 2,66 и 2,97 (к, J_1=5,0 Гц, J_2=17,0 Гц, 2 Ar-CH_2-), 3,70 (м, 2 -СН-О-), 4,5 (с, -О-CH_2-CH_2-О-)

2. Время удерживания основного пика на хроматограмме раствора действующего вещества, определенного методом ВЭЖХ, должно соответствовать времени удерживания пика стандартного образца (для варфарина: 3,92±0,20, AZ-8: 3,69±0,20; AZ-5: 5,26 ±0,20; AZ-9: 9,88 ±0,20).
3. Спектры ^{1}H-, ^{13}C-ЯМР в области от 0 до 8 м.д. и от 20 до 160 м.д. соответственно должны иметь набор сигналов, характерных для прилагаемых спектров стандартного образца.

Экспериментальная фармакологическая часть

Данный раздел работы выполнен на 24 белых нелинейных половозрелых мышах-самцах массой 18–20 г и на 70 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 160–200 г, полученных из питомника «Рапполово» РАМН.

Содержание экспериментальных животных и проведение исследования осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), а также «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [7].

Антикоагулянтную активность устанавливали путем определения протромбинового времени (таблица 5). Анализируемые субстанции вводили (перорально) группе белых беспородных крыс-самцов массой 180–200 г (10 особей) в течение недели, контрольной группе крыс вводили тот же объем ДМСО, препаратом сравнения являлся варфарин. Расчет доз вводимых веществ осуществляли путем пересчета по молярной эквивалентности дозы субстанции варфарина.

По результатам исследований было установлено, что протромбиновое время субстанций AZ-6 (димер варфарина), AZ-7, -8 и AZ-12 оказалось на уровне контрольного опыта, а AZ-2, -3, -4, -10, -11 и -13 – меньше протромбинового времени препарата сравнения – варфарина. Это свидетельствует о том, что димер варфарина и соединения AZ-7, -8 и -12 не обладают антикоагулянтной активностью, а соединения AZ-2, -3, -4, -10, -11 и -13 проявляют слабое антикоагулянтное свойство. Протромбиновое время веществ AZ-1 (ацетат варфарина), AZ-5 (конъюгат варфарина с фрагментом субстанции диуманкала) и AZ-9 (субстанция диуманкала) оказалось больше протромбинового времени препарата сравнения. При этом стоит отметить, что данный показатель у вещества AZ-9 немного превышает значение показателя веществ AZ-1 и AZ-5.

Из этого можно сделать вывод, что субстанции AZ-1, AZ-5 и AZ-9 обладают более высокой антикоагулянтной активностью в сравнении с варфарином. Таким образом, антикоагулянтная активность исследуемых соединений возрастает в ряду AZ-6, -7, -8, -12 < AZ-2, -3, -4, -10, -11, -13 < варфарин < AZ-1 < AZ-5 < AZ-9 (таблица 5).

Таблица 5.

Результаты определения протромбинового времени

Препараты	Испытуемые дозы, мг/кг	ПТВ, с
Диметилсульфоксид (ДМСО, группа контроля)		17,8±1,7
Варфарин (группа препарата сравнения)	**0,43**	**37,4±2,8**
AZ-1	**0,49**	**40,4±1,4**
AZ-2	0,51	21,2±3,1
AZ-3	0,52	20,3±2,9
AZ-4	0,69	21,8±1,3
AZ-5	**0,65**	**41,2±2,3**
AZ-6	0,89	11,4±0,9
AZ-7	0,41	18,3 ±2,8
AZ-8	0,35	15,2±1,7
AZ-9	**0,49**	**45,18±4,85**
AZ-10	0,35	21,4±1,2
AZ-11	0,49	**27,6±1,6**
AZ-12	0,32	18,3±2,8
AZ-13	0,64	24,2±2,1

В связи с тем, что вещества AZ-1, AZ-5 и AZ-9 проявили наиболее высокую активность, для них по ГОСТ 32296-2013 [7] была определена острая токсичность (LD_{50}), которая превышала 2000 мг/кг, что позволяет отнести данные вещества к малотоксичным (таблица 6). Для указанных соединений также был проведен анализ активированного парциального тромбопластинового времени, концентрации фибриногена и величины протромбинового времени.

Определение острой токсичности субстанции определяли методом фиксированной дозы. Группе животных одного пола, используя пошаговую процедуру, дали фиксированные дозы 5, 50, 300 и 2000 мг/кг (в особых случаях можно рассматривать дополнитель-

ную фиксированную дозу 5000 мг/кг). Начальная доза подбирается на основе прицельного исследования, так как доза предполагает воспроизведение некоторых признаков токсичности, не причиняя сильных токсических действий или летального исхода. Затем группам животных могут вводиться более высокие либо низкие дозы, это зависит от наличия или отсутствия признаков токсичности или летального исхода. Процедура продолжается до тех пор, пока доза не приведет к выраженной токсичности или пока не будет зафиксирован один случай смерти, а также до тех пор, пока не будет наблюдаться отсутствие реакции при введении наибольшей дозы или пока не наступит смерть при наименьшей дозе [8].

Следует отметить, что определение протромбинового времени позволяет тестировать II, V, VII и X факторы тромбинового комплекса. Тромбопластин (фактор III тромбокиназа) превращает протромбин плазмы крови в присутствии ионов кальция в активный фермент тромбин, трансформирующий фибриноген плазмы крови в нерастворимый фибрин.

Как видно из таблицы 6, соединения AZ-1, AZ-5 и AZ-9 имеют сопоставимое с варфарином значение протромбинового времени, Соединение AZ-9 немного активнее. Также тенденция сохраняется при проверке активированного парциального тромбопластинового времени. Концентрацию фибриногена в плазме данные соединения снижали эффективнее варфарина.

Сравнивая электрокардиограммы животных в начале и конце эксперимента, мы заметили, что у крыс, получавших варфарин, существенно снижалось значение зубца R, что свидетельствует о малом наполнении сердца, тогда как у крыс других групп, получавших AZ-1, AZ-5 и AZ-9 такого не наблюдалось.

Исходя из результатов исследования острой токсичности, проведённой на белых беспородных мышах, следует отметить, что исследуемые соединения являются менее токсичными, чем варфарин. Испытания специфической активности на двух видах животных (крысы и кролики) показало более высокий антикоагуляционный эффект, чем у препарата сравнения. Безопасность применения наиболее активных соединений AZ-1, AZ-5 и AZ-9 подтверждена гистологическими исследованиями. В качестве примера представляем результаты изучения вещества AZ-5 (рисунок 1).

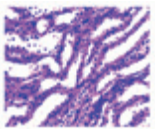
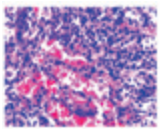
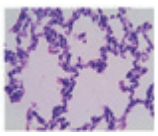
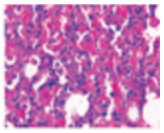
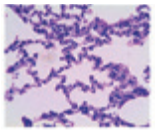
Орган/ препарат	Вода очищенная (группа контроля)	Варфарин (препарат сравнения)	Испытуемое вещество AZ-5
Почки			
Лёгкие			

Рисунок 1. Гистологические срезы внутренних органов крыс

Гистологическое исследование выявило массовые кровоизлияния в лёгких, печени, почках, сердце и желудке «варфариновых» крыс и отсутствие их в других группах, например в случае применения AZ-5 и AZ-9. На рисунке 1 представлены гистологические срезы лёгких и почек крыс.

Материал фиксировался в формалине в течение недели. После фиксации объекты были залиты парафином. Полученные парафиновые блоки нарезали на санном микротоме толщиной 10 мкм. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Исследование проводилось с помощью объектива х40 (увеличение в 600 раз) на 5 областях. При этом в контрольных

Таблица 6.

Сравнительная антикоагулянтная активность наиболее эффективных субстанций

Субстанции	ED_{50}, мг/кг	LD_{50}, мг/кг	ПТВ, с	АПТВ. с	СФ/ТВ
ДМСО			17,8±1,7	124,8±10,3	9,1±1,4/26,95±1,95
Варфарин	0,43	90,0	37,4±2,8	363,5±27,2	7,3±1,5/42,22±3,8
AZ-1	0,50	1570	40,4±1,4	290,3±25,0	4,50±2,0/30±3,5
AZ-5	0,65	1750	41,35±4,35	348,4±19,8	5,8±0,8/35,15±2,15
AZ-9 (Диуманкал)	0,1–0,05	2500	45,18±4,85	368,8±23,5	6,8±1,1/44,80±4,35

органах не наблюдалось отека ткани, а при использовании варфарина наблюдались многочисленные кровоизлияния на всех пяти областях. При применении исследуемых новых веществ AZ-5 выраженных отёков паренхимы тканей и кровоизлияний не наблюдалось.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в процессе проведенных химико-фармакологических исследований установлено, что из числа синтезированных комбинированных соединений некоторые обладают антикоагулянтной активностью. Наиболее выраженной активностью обладают субстанции AZ-5 (конъюгат варфарина с фрагментом субстанции диуманкала) и AZ-9 (субстанция диуманкала). Это свидетельствует о получении структурных аналогов варфарина со схожей антикоагулянтной эффективностью, но гораздо менее токсичных, чем базовая молекула. Поэтому данные соединения рекомендуются для более глубоких доклинических и клинических фармакологических исследований с целью внедрения их в медицинскую практику в качестве новых непрямых антикоагулянтов.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, Р.А. Абышев. Природные и синтетические кумарины и флавоноиды. – Баку: Наука и образование, 2014. 482 с.
2. J. Hirsh, J.E. Dalen et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range // CHEST Journal 108. 1995. № 4. P. 231S–246S.
3. D.N. Salem, P.D. Stein et al. Antithrombotic therapy in valvular heart disease – native and prosthetic: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy // CHEST Journal 126. 2014. № 3. P. 457S–482S.
4. E.A. Nutescu, A. Burnett et.al. Pharmacology of anticoagulants used in the treatment of venous thromboembolism // Journal of thrombosis and thrombolysis. 2016. V. 41. № 1. P. 15–31.
5. M.I. Aguilar, R.G. Hart et al. Treatment of warfarin-associated intracerebral hemorrhage: literature review and expert opinion // Mayo Clinic Proceedings. 2007. V. 82. № 1. P. 82–92.
6. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, Е.В. Семенов. Антагонисты ионов кальция нового поколения. – Баку: АМУ, 2003. 236 с.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
8. ГОСТ 32296-2013. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы. – М.: Стандартинформ, 2014. 12 с.



11–13 ОКТЯБРЯ 2017

БИОИНДУСТРИЯ

КОНГРЕССНО-ВЫСТАВОЧНЫЙ ЦЕНТР **ЭКСПОФОРУМ**

МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА-КОНКУРС

ИННОВАЦИОННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ

Выставка-конкурс проходит в рамках Петербургского международного форума здоровья

РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ

1. **БИОТЕХНОЛОГИИ В СФЕРЕ ИНДУСТРИИ ЗДОРОВЬЯ**
2. **СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ И ПИЩЕВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ**
3. **БИОТЕХНОЛОГИИ В СФЕРЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ**
4. **ЛАБОРАТОРНОЕ И АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

ДЕЛОВАЯ ПРОГРАММА

- КОНКУРС ИННОВАЦИОННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ
- КОНФЕРЕНЦИЯ-ПРЕЗЕНТАЦИЯ ИННОВАЦИОННЫХ РАЗРАБОТОК «БИОИНДУСТРИЯ НА ПУТИ К ТЕХНОЛОГИЯМ БУДУЩЕГО»
- КРУГЛЫЙ СТОЛ ПО ВОПРОСАМ КОММЕРЦИАЛИЗАЦИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ РАЗРАБОТОК

ОРГАНИЗАТОР
EXPOFORUM

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ МЕДИАПАРТНЕР
телеканал САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

12+

ПЕТЕРБУРГСКОЕ ШОССЕ, 64/1
ТЕЛ. 8 (812) 240 40 40, ДОБ. 2225
BIO@EXPOFORUM.RU
YU.VOLODARSKAYA@EXPORORUM.RU
WWW.BIO.EXPOFORUM.RU

УДК 615.45; 615.074

ИЗУЧЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ВИТАМИННОМ СБОРЕ КРАПИВЫ И РЯБИНЫ (ОБЗОР)

В.Ю. Жилкина[1]*, И.А. Ефимова[1], А.И. Марахова[1], О.Н. Донцова[2]

Резюме. В статье представлен химический состав лекарственного растительного сырья поливитаминного сбора. Рассмотрены методы идентификации биологически активных соединений в зависимости от их природы: качественные реакции, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография. Приведены методы количественного определения как отдельных компонентов метаболома крапивы и рябины, так и суммарного содержания биологически активных соединений.

Ключевые слова: поливитаминный сбор, плоды рябины, листья крапивы, флавоноиды, органические кислоты, дубильные вещества, витамины, кумарины, эфирное масло, микроэлементы, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, экстракция, титриметрия.

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF BIOLOGICALY ACTIVE COMPONENTS IN MIXTURE OF MULTIVITAMIN RAW MATERIAL OF FOLIA URTICAE AND FRUCTUS SORBI (REVIEW)

V.Yu. Zhilkina[1]*, I.A. Yefimova[1], A.I. Marakhova[1], O.N. Dontsova[2]

Abstract. The article presents the chemical composition of medicinal plants the mixture of the multivitamin raw material. The methods of identification biologically active compounds, depending on their nature, such as the qualitative of the reaction, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography are considered. Methods of quantitative definition as separate components of a metabolom of folia Urticae and fructus Sorbi, and total content of biologically active connections are given.

Keywords: the mixture of the multivitamin raw material, fructus Sorbi, folia Urticae, flavonoids, organic acids, tannins, vitamins, coumarins, essential oils, microelements, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, extraction, redox titration method.

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

2 – ООО «Натива», 123001, Россия, г. Москва, Ермолаевский пер., 25

1 – Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – LLC «Nativa», 25, Ermolaevsky lane, Moscow, 123001, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: vera20891@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Богатые растительные ресурсы России, многовековые традиции использования в медицине лекарственного растительного сырья (ЛРС) и препаратов на его основе обусловливают интерес к фитотерапии и, соответственно, к фитопрепаратам. Лекарственные растения продолжают оставаться источником получения лекарственных препаратов, которые составляют около 40% номенклатуры лекарственных средств, выпускаемых в нашей стране [1].

В настоящее время из-за неблагоприятной экологической обстановки, неправильного питания, постоянных стрессов и многих других факторов современное население страдает снижением иммунитета и гиповитаминозами. Для решения этих проблем необходимо обеспечить комплексное воздействие на организм путем сочетания различных компонентов лекарственных растений. Характерной особенностью лекарственных растений является разнообразие химического состава, позволяющее одновременно воздействовать на многие системы организма, вовлеченные в патологический процесс [2, 3].

Номенклатура витаминных лекарственных растительных сборов весьма обширна. Одним из источников, богатых биологически активными соединениями (БАС), является сбор листьев крапивы и плодов рябины в равных отношениях (сбор поливитаминный). В настоящее время выпуск этого сбора прекращен ввиду расслаивания компонентов. Однако высокая эффективность данного сбора обусловливает интерес к его химическому составу и методам стандартизации с перспективой создания новой лекарственной формы на основе его компонентов.

Лекарственные средства, в том числе и ЛРС, включены в список продукции, подлежащей обязательной сертификации, что подразумевает

проведение испытаний (контроля качества). Обеспечение надлежащего качества ЛРС во многом зависит от правильной организации контроля, его действенности и эффективности, а также от уровня требований, заложенных в нормативную документацию (НД), и используемых методов анализа [2]. Нормативная документация на поливитаминный сбор не обновлялась с 2004 года, поэтому актуальным является изучение БАС сбора и методов стандартизации сбора по фармакологически активным компонентам.

Все вышесказанное делает актуальным проведение информационно-аналитических исследований по химическому составу листьев крапивы и плодов рябины, а также по методам их качественного и количественного определения.

ОБСУЖДЕНИЕ И РЕЗУЛЬТАТЫ

Химический состав компонентов поливитаминного сбора

Химический состав крапивы двудомной очень разнообразен, она содержит витамины, флавоноиды, дубильные вещества и другие соединения (таблица 1) [5–10].

На сегодняшний день в литературе имеются данные о том, что листья крапивы двудомной содержат от 15 до 19% минеральных веществ [11–14], которые представлены как макро- (K, Ca, Mg, Fe), так и микроэлементами (Mn, Cu, Zn, Co, Mo, Cr, A1, Ba, Se, Ni, Sr, Pb). При изучении золы листьев крапивы двудомной были найдены K_2O – 15,2%, CaO – 36,5%, Na_2O – 2,0%, MgO – 8,4%, Fe_2O_3 – 6,3%, P_2O_5 – 10,3%, SO_3 – 10,6%, Cl_2 – 3,3%, SiO_2 – 8,0% [11].

Ценность плодов рябины по сравнению с крапивой также высока. Они содержат аскорбиновую кислоту, витамины P, K, каротин, органические кислоты (лимонную, яблочную, аскорбиновую), пектиновые соединения, горькие вещества, спирт сорбит, различные сахара. Семена содержат гликозид амигдалин и жирное масло (таблица 2) [4, 18, 19].

Идентификация биологически активных соединений сбора витаминного

Качественный анализ компонентов сбора витаминного основан на идентификации основных групп БАС, оказывающих фармакологический эффект, в компонентах сбора.

Полученное из сбора извлечение подвергают качественному анализу, который в основном представлен тонкослойной хроматографией (ТСХ) с использованием высокоэффективных пластинок Sorbfil ПТСХ-1ВЭ размером 10×10 см с размером частиц сорбента 8–12 мкм. В литературе есть данные по применению этого метода для исследования БАС лекарственных растений и сырья, содержащих витамины: шиповника, чёрной смородины, земляники лесной, календулы лекарственной, облепихи крушиновидной, рябины обыкновенной, крапивы двудомной, калины обыкновенной, липы и душицы, а также сбора, состоящего из плодов шиповника, плодов рябины обыкновенной, плодов облепихи, листьев крапивы и травы мелисы лекарственной.

Таблица 1.

Химический состав листьев крапивы

Название вещества	Содержание, %
Азотсодержащие соединения (ацетилхолин, гистамин, 5-гидрокситриптамин, холин, бетаин)	0,01–0,03
Алкалоиды: • никотин	 0,02–0,30
Аминокислоты Незаменимые аминокислоты: • лейцин • лизин • аргинин • фенилаланин • метионин • изолейцин • валин • треонин • гистидин Заменимые аминокислоты: • аспарагиновая кислота • серин • глютаминовая кислота • пролин • глицин • аланин • цистеин • тирозин	 1,50 1,10 1,10 0,90 0,50 0,80 1,00 0,50 0,60 1,60 0,80 2,20 0,90 1,00 1,10 0,30 0,60
Белки	25,0–30,0
Витамины: • филлохинон (витамин K_1) • аскорбиновая кислота (витамин C) • токоферол (витамин E) • никотиновая кислота (витамин PP) • тиамин (витамин B_1) • пантотеновая кислота (витамин B_3) • фолиевая кислота	 0,003 0,150 0,004 0,001 0,001 0,0002
Гликозид уртицин	0,09
Дубильные вещества	2,5–3,1
Жирное масло	2,0
Каротиноиды: • β-каротин* • гидрокси-α-каротин • лютеоксантин • лютеин-эпоксид • виолоксантин • ксантофилл • ксантофилл-эпоксид и др.	0,57 0,06 0,0009 0,010 0,010 0,015
Клетчатка	20,0
Кумарины: • скополетин • кумарин • умбеллиферон	0,10
Лигнин	11,0
Органические кислоты: галловая, эллаговая, лимонная, линолевая, масляная, молочная, муравьиная, кофейная, п-кумаровая, хинная, хлорогеновая, щавелевая, феруловая, янтарная	2,0–5,0

Окончание табл. 1

Название вещества	Содержание, %
Минеральные элементы (мг/г):	
• калий	2,0
• кальций	1,0–2,0
• магний	0,5–1,0
• натрий	0,3–0,4
• железо	0,01
• цинк	0,003
• хром	
• медь	0,001
• алюминий	
• марганец	0,01
• кобальт	0,00019
• молибден	
• барий	
• селен	
• никель	0,00001
• стронций	
• свинец	
• бор	
Углеводы:	25,0
• крахмал	
• глюкоза	
• сахароза	
• фруктоза	
Флавоноиды:	1,90
• кверцетин	
• диосметин	
• лютеолин	0,65
• рутин	
• кемпферол	
• гиперозид	
• цинарозид	
• 3-О-метилкверцетин	
• 5-О-метиллютеолин	
Хлорофилл**:	2,0–3,9
• α-хлорофилл	
• β-хлорофилл	
Эфирное масло	следы

Примечание: *содержание каротина в листьях крапивы в период цветения составляет 48 мг% (в пересчете на абсолютно сухое вещество), в фазе появления семян – 46,7 мг%, в фазе созревания семян – 34,8 мг%. В.А. Сафинов установил, что содержание каротина в листьях крапивы двудомной, собранной в мае, составляет 60,6 мг%.

** – содержание α-хлорофилла составляет 75%, а β-хлорофилла – 25%.

Исследование фенольных соединений проводится в системе растворителей «этилацетат – метилэтилкетон – муравьиная кислота – уксусная кислота – вода» (50:30:7:3:10), проявитель – 5% раствор фосфорномолибденовой кислоты в 95% этаноле. Результат проявления – 7 зон, идентифицированных со стандартами: Rf≈0,13 (танин), Rf≈0,57 (рутин), Rf≈0,69 (хлорогеновая кислота), Rf≈0,82 (галловая кислота), Rf≈0,95 (розмариновая кислота) [3].

Флавоноиды определяли в системе растворителей «этилацетат – метилэтилкетон – муравьиная кислота – вода» (50:30:10:10), в качестве стандартов используют 5 веществ, Rf которых соответствует: рутину (0,45), гиперозиду (0,68), лютеолин-7-гликозиду (0,74), лютеолину (0,82), кверцетину (0,87) [2].

Таблица 2.

Химический состав плодов рябины

Название вещества	Содержание, %
Кислоты:	3,35
• аскорбиновая	0,121
• яблочная	до 2,8
Сахара:	
• глюкоза	до 3,8
• фруктоза	до 4,3
• сахароза	0,7
Витамины:	
• Р (кверцетин, изокверцетин, рутин)	2,6
• каротиноиды	0,027
• токоферол	0,0044
• рибофлавин	0,008
• антоцианы (в том числе цианидин)	0,795
Дубильные вещества	0,15-0,44
Флавоноиды	0,193
Полисахариды	3,32
Пектиновые вещества	2,0
Шестиатомный спирт сорбит	25,3
Пектиновые вещества	0,65-2,75
Редуцирующие вещества	4,20-6,05
В семенах:	
• амигдалин	до 22
• жирное масло	до 22

При идентификации БАС в крапиве двудомной флавоноиды обнаруживали в этанольной фракции, подвижная фаза – «н-бутанол – уксусная кислота – вода» (4:1:2). В качестве детекторов применяли: 5% спиртовой раствор алюминия хлорида, для сравнения использовали стандартные образцы флавоноидов, по собственной флуоресценции веществ в УФ-свете (при длинах волн 254 и 366 нм). Флавоноиды в УФ-свете обладают собственной флуоресценцией (от желтой, желто-зеленой до коричневой) [5].

Обнаружение оксикоричных и фенолкарбоновых кислот в листьях крапивы проводили методом ТСХ в этилацетатной фракции. Подвижная фаза – система растворителей «хлороформ – уксусная кислота ледяная» (3:1). Детектирование зон проводили по собственной флуоресценции в УФ-свете и после обработки хромогенными реактивами (аммиаком, 5% спиртовым раствором натрия гидроксида и раствором бромтимолового синего), сравнивая с соответствующими стандартными образцами. Оксикоричные и фенолкарбоновые кислоты обнаруживали по ярко-голубой, зеленовато-голубой, фиолетовой флуоресценции, которая становилась интенсивнее после обработки проявляющими реактивами. В листьях крапивы двудомной установлено присутствие кофейной (Rf~0,23, светло-голубая флуоресценция) и хлорогеновой (Rf~0,55, голубая флуоресценция) кислот [5].

При определении токоферолов экстракты элюируются смесью растворителей «петролейный эфир – диэтиловый эфир – уксусная кислота» (40:10:0,5). В ка-

честве стандарта используется раствор α-токоферола. Проявитель – реактив Эммери – Энгеля (α,α-дипиридил – $FeCl_3$). Результат обнаружения – токоферолы – представлены в виде розовых пятен на белом фоне (Rf=0,75–0,81) [20, 21].

Стерины детектируют в системе растворителей «гексан – диэтиловый эфир» (1:1), идентифицируется β-фитостерин – зона, окрашенная в синий цвет, с Rf ≈0,47 [3].

Для идентификации свободных сахаров применяют ТСХ в системе «пиридин – этилацетат – вода» (20:60:40). Результат хроматографирования представлен 8 красно-фиолетовыми зонами. Идентифицированы: Rf≈0,26 (галактоза), Rf≈0,30 (глюкоза), Rf≈0,32 (фруктоза), Rf≈0,74 (рамноза) [3].

Свободные аминокислоты анализируют в системе «n-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода» (40:40:10). Проявитель – 0,2% раствор нингидрина. Результат хроматографирования – 9 окрашенных зон. Идентифицированы: Rf≈0,20 (аспарагиновая кислота), Rf≈0,48 (глицин), Rf≈0,55 (глутаминовая кислота); Rf≈0,67 (метионин), Rf≈0,70 (фенилаланин), Rf≈0,72 (триптофан) [3].

Детекцию аскорбиновой кислоты проводят в УФ-свете при длине волны 254 нм, результат детектирования – фиолетовое пятно (Rf≈0,5); при обработке хроматограммы раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия результат – белое пятно (Rf≈0,5) на розовом фоне; при обработке хроматограммы раствором фосфорно-молибденовой кислоты результат – синее пятно на белом фоне (Rf≈0,5) [5].

Для подтверждения присутствия скополетина (кумарина) в листьях крапивы двудомной применяли ТСХ в системе растворителей «толуол – эфир диэтиловый» (40:60), насыщенной раствором 10% уксусной кислоты. Детектор – 20% раствор аммиака, результат в УФ-свете (длина волны 360 нм) – синяя флуоресцирующая полоса (Rf≈0,25) [5].

Для получения более полных данных о составе БАС в сборе витаминном применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Этот метод успешно использовали при анализе сбора, состоящего из плодов шиповника, плодов рябины обыкновенной, плодов облепихи, листьев крапивы и травы мелисы лекарственной [3].

Для идентификации фенольных соединений в сборе в качестве подвижной фазы использовали систему «метанол – вода – фосфорная кислота (конц.)» (40:60:0,5). Установлено, что метод ВЭЖХ позволяет идентифицировать 18 соединений, в том числе такие, как аскорбиновая, галловая, цикориевая, хлорогеновая, кофейная, феруловая, неохлорогеновая, коричная, розмариновая кислоты, эпигаллокатехина галлат (ЭГКГ), дикумарин, апигенин, эпикатехин, лютеолин-7-гликозид, гесперидин, изорамнетин, рутин, лютеолин (рисунок 1) [3].

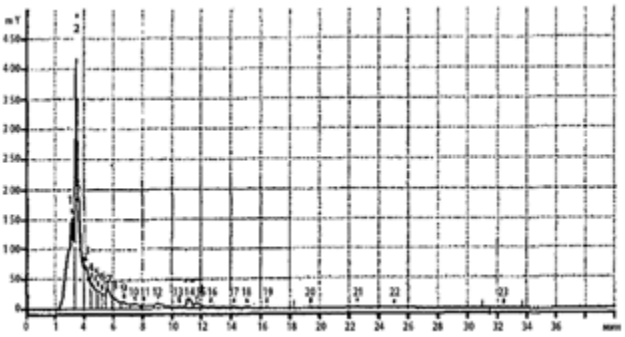


Рисунок 1. ВЭЖХ основных соединений в сборе витаминном (плоды шиповника, плоды рябины, плоды облепихи, листья крапивы, трава мелиссы лекарственной)

1 – аскорбиновая кислота, 2 – галловая кислота, 3 – ЭГКГ, 4 – дикумарин, 5 – цикориевая кислота, 6 – не идентифицировано, 7 – хлорогеноеая кислота, 9 – кофейная кислота, 10 – феруловая кислота, 11 – не идентифицировано, 12 – не идентифицировано, 13 – неохлорогеновая кислота, 14 – апигенин, 15 – эпикатехин, 16 – лютеолин-7-гликозид, 17 – гесперидин, 18 – изорамнетин, 19 – рутин, 20 – лютеолин, 21 – коричная кислота, 22 – не идентифицировано, 23 – розмариновая кислота

С применением метода ВЭЖХ проведена идентификация БАС, относящихся к следующим группам:

- органические кислоты, подвижная фаза – система «0,005 М раствор серной кислоты», результат – 9 органических кислот: щавелевая, лимонная, винная, аскорбиновая, яблочная, янтарная, фумаровая, хлорогеновая, розмариновая;
- сахара, подвижная фаза – «0,01 М раствор серной кислоты», результат детектирования – свободные сахара: мальтоза, глюкоза, фруктоза и рамноза, преобладающими компонентами являются глюкоза и рамноза [3].

Спектрофотометрический метод также применяют для идентификации БАС. Он позволяет провести качественный анализ некоторых групп соединений, содержащихся как в исходном растительном сырье, так и в экстракте из этого сырья.

В литературе встречаются результаты применения этого метода при анализе душицы обыкновенной, липы сердцевидной и крапивы двудомной. Фенольные соединения, в том числе флавоноиды, обнаруживаются при длине волны 250–270, 350–390 нм, оксикоричные кислоты – 310–325 нм, каротиноиды – 430–480 нм, хлорофиллы α и β – 640–670, 410–430 нм (рисунок 2) [20].

При изучении сухого экстракта из плодов рябины сибирской определение кетосахаров проводили по реакции Селиванова [25]: нагревание с хлороводородной кислотой в присутствии резорцина, приводящее к появлению продуктов, окрашенных в красный цвет, альдозы дают более слабую окраску только при длительном нагревании [26].

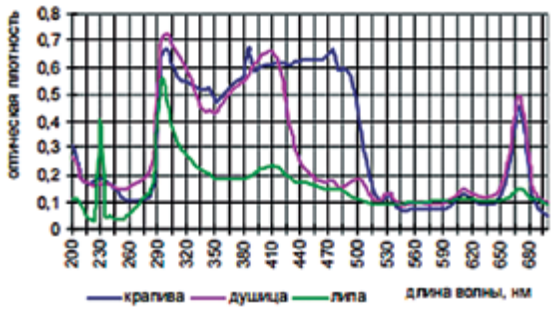


Рисунок 2. Спектры поглощения экстрактов липы, крапивы и душицы в органических растворителях (гексан, ацетон)

Для разделения фенолов применяли метод жидкостной колоночной хроматографии на катионите [27]. Хроматографирование проводили при комнатной температуре, длина колонки – 10 см, диаметр – 10 мм, элюент – 0,2 н. раствор ацетата натрия, скорость элюирования – 0,5 мл/мин, отбор проб проводили по 10 мл, детектировали фотометрически с 4-аминоантипирином при 490 нм [28].

Европейская Фармакопея для качественного обнаружения скополетина и хлорогеновой кислоты в листьях крапивы двудомной предлагает проводить тонкослойную хроматографию в системе растворителей «ангидрид муравьиной кислоты – вода – метанол – этилацетат» (2,5:4:4:50). Детектирование проводят путем нагревания пластинки при 100 °С в течение 5 мин. Результат представлен последовательностью зон на хроматограмме, полученной в результате исследования раствора и растворов сравнения. Слабые синие или желтые флуоресцентные зоны могут находиться в нижней части хроматограммы, полученной с исследуемым раствором (таблица 3).

По методике частной статьи ГФ XI, частной фармакопейной статьи «Листья толокнянки» проводили качественный анализ на дубильные вещества. Результат представлен появлением чёрно-синего окрашивания и осадка, что свидетельствует о присутствии дубильных веществ.

Количественное определение действующих веществ поливитаминного сбора

Определение содержания свободных органических кислот проводят по стандартной методике в соответствии с требованиями ГФ XI, частной фармакопейной статьи «Плоды шиповника» [5, 29].

Содержание аскорбиновой кислоты при исследовании листьев крапивы двудомной и плодов рябины определяют по методике частной фармакопейной статьи «Плоды шиповника» ГФ XI. При анализе субстанции и препаратов аскорбиновой кислоты используют методики йодатометрии и йодометриии и модифицированные методы для анализа листьев крапивы [30–32]. Количественное определение аскорбиновой кислоты в листьях крапивы также проводят гравиметрическим методом по стандартной методике с краской Тильманса [21], но он занимает много времени и очень трудоёмкий. В основном используют метод йодометрии, так как он наиболее легкий в исполнении и воспроизводимый.

Таблица 3.

Результаты тонкослойной хроматографии (по Европейской Фармакопее)

№ пятна	Флуоресценция в УФ-свете		
1	Две красные зоны	1	
2	Интенсивная синяя флуоресцирующая зона (скополетин)	2	
3	Синяя флуоресцирующая зона	3	
4	Синяя флуоресцирующая зона (хлорогеновая кислота)	4	
5	Коричневато-желтая зона	5	
		Исследуемый раствор	Раствор сравнения (скополетин и хлорогеновая кислота)

Представляет интерес количественное содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту и хлорофилла в листьях крапивы. Хлорофилл обусловливает характерную зеленую окраску листьев крапивы и обладает определенными фармакологическими свойствами. Показатель содержания гидроксикоричных кислот введен в Европейскую Фармакопею для стандартизации листьев крапивы двудомной. Для подтверждения подлинности сырья проводят ТСХ со свидетелем – хлорогеновой кислотой.

Содержание данных веществ определяют по методике, разработанной Сибирским государственным медицинским университетом совместно с Первым Московским государственным медицинским университетом имени И.М. Сеченова [33]. Способ позволяет одновременно проводить определение подлинности и количественного содержания биологически активных веществ в листьях крапивы двудомной методом прямой спектрофотометрии и стандартизировать лекарственное растительное сырье и лекарственные препараты по содержанию хлорофиллов и гидроксикоричных кислот при совместном присутствии. Данный метод отличается доступностью, простотой выполнения, экономичностью и малой ошибкой определения.

Количественное содержание дубильных веществ в листьях крапивы двудомной и плодах рябины определяют по стандартной методике в соответствии с тре-

бованиями ГФ XI (статья «Определение содержания дубильных веществ в растительном лекарственном сырье»).

Для определения содержания полисахаридов и восстанавливающих моносахаров в лекарственном растительном сырье в настоящее время разработано множество физических, химических и физико-химических методов.

Сумму полисахаридов определяют по методике, приведенной в статье ГФ XI «Листья подорожника», методом гравиметрии.

Определение моносахаров в листьях крапивы двудомной осуществляют спектрофотометрическими методами, фиксируя измерение оптической плотности окрашенных растворов, образуемых при взаимодействии сахаров с соответствующем реактивом (антроновый, орциновый) или пикриновой кислотой [5, 18]. Содержание сахаров в плодах рябины также определяют по ГОСТ 8756.13-87 (титриметрия). Данный метод основан на способности карбонильных групп сахаров восстанавливать в щелочной среде оксид меди (II) до оксида меди (I) [34].

Наиболее доступным и простым в исполнении является гравиметрический метод, основанный на осаждении полисахаридов из водного извлечения 96% этанолом с последующим взвешиванием сухого остатка.

Определение количественного содержания пектиновых веществ в плодах рябины проводят в соответствии с методикой по ГОСТ 29059-91. Данный метод основан на титровании щелочью предварительно выделенных и подготовленных пектиновых веществ до и после гидролиза. Результаты титрования пропорциональны числу свободных и этерифицированных карбоксильных групп и при умножении на соответствующие эквиваленты дают содержание полиуронидов в пектиновых веществах продукта [34].

Сумму флавоноидов в сырье крапивы двудомной количественно определяют по методике, основанной на их способности образовывать окрашенный комплекс со спиртовым раствором алюминия хлорида, который вызывает батохромный сдвиг в длинноволновую область поглощения и при этом даёт основной максимум поглощения при длине волны 411±2 нм [18, 35].

Для изучения аминокислотного состава растений используют аминокислотные анализаторы, позволяющие определять содержание каждой аминокислоты в исследуемом объекте, находящейся как в свободном, так и в связанном состоянии.

Количественное содержание аминокислот в траве крапивы двудомной проводят на аминокислотном анализаторе ААА-339 (Чехия) в стандартных условиях, используемых обычно для разделения белковых гидролизатов [36]. Внутренний стабилизатор – смесь из 12 аминокислот. Количественную оценку осуществляют по площади пиков удержания идентифицированных аминокислот [37].

Количественное определение кальция (Ca) и магния (Mg). Для определения кальция существует большой выбор методов, как химических, так и физико-химических.

Гравиметрическое определение кальция чаще всего проводят с применением органических осадителей, особенно оксалатов. В некоторых случаях используют и неорганические осадители, в частности серную кислоту и ее соли.

Для титриметрического определения кальция наиболее часто используется комплексонометрия. С ионами кальция комплексон III образует прочное, растворимое в воде бесцветное соединение состава 1:1.

Комплексонометрическое титрование кальция проводят в щелочной среде, при pH=10 определяют сумму кальция и магния, а при pH=12,5 – кальций в присутствии магния. Сумму кальция и магния также можно определять комплексонометрически с индикатором эриохромом черным Т (Шварценбах и Бидерман, 1460, 1461). Также предложено титрование с индикатором кислотным хромовым темно-синим. В отличие от эриохрома черного Т кислотный хром темно-синий позволяет отчетливо фиксировать точку эквивалентности (pH 10) при определении кальция при отсутствии магния [394, 488] или при низких содержаниях последнего.

Для раздельного комплексонометрического определения кальция и магния используют различие значений pH, при которых осаждаются их гидроксиды. Осаждение магния в виде гидроксида начинается при pH=11. Определение кальция в присутствии магния обычно проводят при pH=12,5, когда ионы магния практически полностью осаждаются в виде гидроксида.

При определении кальция методом потенциометрического титрования в качестве титрантов чаще всего используют комплексон III и соли щавелевой кислоты. Находят применение и другие комплексоны, а также соли фосфорной и фтористоводородной кислот, ферроцианид калия. Возможно прямое потенциометрическое титрование кальция комплексоном III с различными индикаторными электродами (мембранные, серебряные). С мембранными электродами кальций можно оттитровать в присутствии магния при pH=12, а с серебряным электродом – при pH=9-10.

По литературным данным, большинство методов амперометрического определения кальция основано на использовании в качестве титранта раствора комплексона III. Для индикации конечной точки титрования используют или «амперометрические индикаторы», в качестве которых применяют активные на электродах катионы, образующие с титрантом менее прочные комплексные соединения, чем кальций, или анодную волну окисления ртути в присутствии избытка комплексона III, также конечную точку определяют по диффузионному току восстановления и окисления титранта.

Благодаря тому, что кальций образует с небольшим числом реагентов окрашенные соединения, возможно его определение фотометрическими методами. Наибольший интерес представляют прямые методы, в которых используются оптические свойства окрашенных комплексов кальция с органическими реагентами, например с мурексидом. При анализе биологических объектов (кровь, моча) применяют нефелометрический метод определения кальция с олеатным реактивом и флуоресцентное определение кальция с флуорексоном. Также радиоактивационное определение кальция по изотопу ^{49}Ca используют при анализе биологических материалов.

Для определения кальция в различных объектах также подходят и спектральные методы. В их основе лежит использование внутренних стандартов, открываемый минимум – 0,02–0,03 мкг. Определение применимо для биологических объектов, ЛРС, почв и т.д.

Атомно-абсорбционная спектроскопия также применима для определения кальция, хотя затруднения создает возможная ионизация определяемого элемента [38].

Для определения содержания эфирного масла в плодах рябины используют метод 1 (метод Гинзберга) ГФ XI.

Методика количественного определения каротина. Согласно литературным данным, определение каротина в плодах рябины основано на его экстракции органическими растворителями (ацетон, бензин), очистке сопутствующих веществ методом хроматографической адсорбции. Количественно каротин в очищенном растворе определяют колориметрически путем сравнения интенсивности жёлтой окраски раствора с окраской раствора азобензола или раствора дихромата калия, который стандартизован по чистому каротину [39].

Определение каротиноидов в листьях крапивы проводят по методике, разработанной Сибирским государственным медицинским университетом совместно с Первым Московским государственным медицинским университетом имени И.М. Сеченова, которая была описана ранее [33].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные информационно-аналитические исследования показали, что методы идентификации и количественного определения БАС поливитаминного сбора весьма разнообразны. Для изучения химического состава наиболее часто используется метод ВЭЖХ, тогда как для стандартизации сырья обычно применяют спектрофотометрические и титриметрические методы. Это обусловлено тем, что, как правило, фармакологический эффект лекарственных растительных препаратов связан с действием суммы БАС. Следовательно, и стандартизацию в этом случае рационально проводить по сумме веществ. Поливитаминный сбор богат разнообразными БАС, а также минеральными компонентами. В случае разработки настойки или жидкого экстракта из компонентов поливитаминного сбора можно рекомендовать стандартизацию данной лекарственной формы по содержанию кислоты аскорбиновой, например, йодометрическим титрованием, кальция – методом потенциометрии с кальцийселективным электродом и суммы флавоноидов – методом дифференциальной спектрофотометрии (таблица 4).

Таблица 4.

Количественное содержание БАС в компонентах сбора витаминного, полученное разными методами определения

Методика	Наименование БАС/вещества	Количественное содержание	
		Крапива	Рябина
ГФ XI	Органические кислоты	1,5031	1,2700
ГФ XI	Аскорбиновая кислота	0,0301	0,5200
Йодатометрия		0,0364	–
Йодометрия		0,0343	–
Гравиметрический метод с краской Тильманса		–	0,1853
СФ-метрия	Гидроксикоричные кислоты	2,4942	–
СФ-метрия	Хлорофилл	6,5015	–
ГФ XI	Дубильные вещества	3,5865	2,3700
ГФ XI	Полисахариды	5,6232	3,3200
СФ-метрия		5,3400	5,3400
ГОСТ 8756.13-87		–	5,0400
ГОСТ 29059-91	Пектиновые вещества	–	2,2900
Со спиртовым раствором алюминия хлорида	Флавоноиды	1,0879	–
Аминокислотные анализаторы	Свободные аминокислоты	0,5925	0,6700
Комплексонометрия	Ca	2,9655 (с мурексидом) 3,1278 (с хромовым темно-синим) 3,0739 (с эриохромом черным Т)	0,0020 (справочные данные)
	Mg	0,2266 (с пирокатехиновым фиолетовым)	0,3310 (справочные данные)
Потенциометрия	Ca	3,0111	–
ГФ XI	Эфирное масло	–	0,11
Справочная методика	Каротин	–	0,027
Дробная экстракция		0,2098	–

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.Г. Валиева. Лекарственные растения – источники биологически активных веществ // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2010. № 203. С. 44–48.
2. И.А. Самылина, А.А. Сорокина, Н.В. Пятигорская. Лекарственные растительные сборы // Фарматека. 2010. № 10. С. 80–82.
3. В.О. Решетова. Разработка и стандартизация сбора витаминного и экстракта сухого на его основе: автореф. дис. … канд. фарм. наук: 14.04.02. – Москва. 2013. 185 с.
4. С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия). – М.: Недра. 1987. 458 с.
5. Т.А. Скалозубова. Изучение метаболома сырья и лекарственных форм крапивы двудомной: дис. … канд. фарм. наук: 14.04.02. – Москва. 2013. 129 с.
6. F. Bucar, D. Britzmann, D. Streit et al. LC-PDA-MS-profiles of phenolic compounds in extracts of aerial parts of Urtica species // Planta Med. 2006. V. 72(11). P. 983.
7. J. Schomakers, D. Bolbach, H. Pagels. Urticae folium // Deutsc. Apoth. Zeit. 1998. V. 135(7), P. 578–584.
8. N.S. Kavtaradze. Anthocyan glucosides from Urtica dioica // Chem. Nat. Comp. 2003. V. 39(3). P. 314.
9. N.S. Kavtaradze, M.D. Alaniya, N. Aneli. Chemical Components of Urtica dioica Growing in Georgia // Chem. Nat. Comp. 2001. V. 37(3). P. 287.
10. О.В. Сошникова. Изучение химического состава и биологической активности растений рода крапива: дис. … канд. фарм. наук: 15.00.02. – Курск. 2006. 16 с.
11. П.А. Кьосев. Полный справочник лекарственных растений. – М.: Эксмопресс, 2000. 992 с.
12. Л.П. Лежнева. Фармакотехнические исследования по расширению области применения крапивы двудомной в медицине: автореф. дисс. … канд. фарм. наук: 15.00.02. – Пятигорск. 1986. 23 с.
13. С.А. Листов. О содержании тяжелых металлов в лекарственном растительном сырье // Фармация. 1990. № 2. С. 19–25.
14. С.А. Листов. Содержание тяжелых металлов в настоях и отварах из лекарственного растительного сырья // Фармация. 1992. № 4. С. 37–41.
15. P.N. Krstic-Pavlovic, R. Dzamic, L. Lemaic. Zastupljenost adstrin-gentnih I mineralnih materija u listu samonikle koprive (*Urtica dioica* L.) raznih prirodnih stanista // Agrohemija. 1985. V. 3. P. 191–198.
16. S. Kulevanova, T. Ristov. Determination of some macroelements in propolis by atomic absorption spectrometry // Acta Pharm. 1995. V. 45(3). P. 481–486.
17. В.С. Пецуха, В.П. Чебыкин, Г.М. Федосеева. Изучение элементного состава крапивы коноплёвой // Сиб. мед. журн. 2008. № 6. С. 88–90.
18. А.С. Аврач. Сравнительное изучение биологически активных веществ плодов (боярышника, рябины, шиповника, малины) различных способов консервации и лекарственных препаратов на их основе: дис. … канд. фарм. наук: 14.04.02. – Москва. 2015. 145 с.
19. И.А. Сафонова. Рябина обыкновенная. Химический состав и аспекты применения в медицине и народном хозяйстве // Труды 4-й международной научной конференции «Актуальные проблемы регионоведения», 28–29 декабря 2009 г. – Курск: VIP, 2009. С. 183–188.
20. С.М. Лупинская, С.В. Орехова, О.Г. Васильева. Изучение биологически активных веществ липы, крапивы и душицы и сывороточных экстрактов на их основе // Химия растительного сырья. 2010. № 3. С. 143–145.
21. В.А. Тутельян, Б.П. Суханов. Биологически активные добавки к пище: современные подходы к обеспечению качества и безопасности // Вопросы питания. 2008. № 4. С. 4–15.
22. И.М. Коренская, Н.П. Ивановская, О.А. Колосова. Лекарственные растения и лекарственное растительное сырьё, содержащие витамины, полисахариды, жирные масла. – Воронеж: ВГУ, 2008. 32 с.
23. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье // МЗ СССР. – 11-е изд. – М.: Медицина, 1989. 398 с.
24. Государственная фармакопея СССР: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье // МЗ СССР. – 10-е изд. – М.: Медицина, 1968. 1080 с.
25. Ю.Б. Филиппович. Практикум по общей биохимии. – М.: Просвещение, 1982. 305 с.
26. Г.Л. Рыжова. Получение сухого экстракта из плодов рябины сибирской и изучение его химического состава // Химия растительного сырья. 1997. № 2. С. 37–41.
27. В.А. Даванков, Дж. Навратил, Х. Уолтан. Лигандообменная хроматография. – М.: Мир, 1989. 296 с.
28. Р. Полюдек-Фабини, Т. Бейрил. Органический анализ. – Л.: Химия. 1981. 622 с.
29. О.В. Тринеева. Определение органических кислот в листьях крапивы двудомной // Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация. 2013. № 2. С. 215–219.
30. А. Артемов. Крапива исцеляющая и омолаживающая. – СПб.: Дила, 2001. 160 с.
31. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР. – Л.: Наука. 1976. 248 с.
32. Г.К. Барашков. Основы медицинской бионеорганики. – М.: ЧеРо, 2007. 516 с.
33. О.В. Тринеева, А.И. Сливкин, Е.Ф. Сафонова. Определение гидроксикоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (Urtica Dioica L.) // Химия растительного сырья. 2015. № 3. С. 105–110.
34. Л.А. Остроумов, О.В. Кригер, К.В. Карчин, М.П. Щетинин. Исследование химического состава плодов рябины обыкновенной (Sorbus Aucuparia), произрастающей в Кемеровской области // Техника и технология пищевых производств. 2014. № 4. С. 38-41.
35. Т.А. Скалозубова, А.М. Марахова, А.А. Сорокина. Содержание суммы флавоноидов в листьях и настое крапивы двудомной // XXI Московская международная гомеопатическая конференция «Развитие гомеопатического метода в современной медицине»: тезисы докладов. Москва, 2011 г. – М.: ГЦ «Здоровье и реабилитация». 2011. С. 196–198.
36. Y.R. Benson. Some recent advances in amino acid sequence analysis // Instrumentation in amino acid sequence analysis. – London; New-York; San-Francisco. 1975. P. 1–40.
37. В.Я. Яцюк, Г.А. Чалый, О.В. Сошникова. Биологически активные вещества травы крапивы двудомной // Российский медико-биологический вестник имени академика Павлова И.П. 2006. № 1. С. 25–29.
38. А.А. Сорокина, Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова. Определение кальция и магния в листьях и настое крапивы двудомной // Фармация. 2013. № 2. С. 5–8.
39. Е.А. Ладыгина, Л.Н. Сафронич, В.Э. Отряшенкова и др. Химический анализ лекарственных растений. – М.: Высшая Школа. 1983. 176 с.

УДК 615.322+615.07

ИССЛЕДОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО ПРОФИЛЯ *ZINGIBER OFFICINALE* (ZINGIBERACEAE) МЕТОДАМИ ТОНКСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Н.И. Савицкий[1]*, А.Б. Легостева[1]

Резюме. Извлечения из корневищ имбиря (*Zingiber officinale*) широко применяются в производстве биологически активных добавок и в пищевой промышленности. В дополнение к эфирным маслам и фенольным соединениям имбирь также богат аминокислотами. Для идентификации аминокислотного профиля проведен качественный и количественный анализ корневищ имбиря. В результате проведенных экспериментов методом тонкослойной хроматографии идентифицированы следующие аминокислоты: аргинин, гистидин, глутаминовая кислота, изолейцин, валин, пролин, лейцин, метионин. Посредством спектрофотометрического анализа определено количество аминокислот – 10,22%. Относительная ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет 1,89%. Таким образом, можно сделать вывод о дальнейшем исследовании и совершенствовании подходов к стандартизации корневищ имбиря, а также создании новых лекарственных форм на его основе.

Ключевые слова: корневище имбиря, аминокислоты, качественный анализ, тонкослойная хроматография, количественный анализ, спектрофотометрия.

INVESTIGATION OF AMINO ACID PROFILE *ZINGIBER OFFICINALE* (ZINGIBERACEAE) BY THE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND SPECTROPHOTOMETRIC METHODS

N.I. Savitskiy[1]*, A.B. Legosteva[1]

Abstract. Extracts from rhizomes of ginger (*Zingiber officinale*) are widely used in the production of biologically active additives and in the food industry. In addition to essential oils and phenolic compounds, ginger is also rich in amino acids. To identify the amino acid profile, a qualitative and quantitative analysis of the rhizomes of ginger was carried out. As a result of the experiments, the following amino acids were identified by thin-layer chromatography: arginine, histidine, glutamic acid, isoleucine, valine, proline, leucine, methionine. By means of spectrophotometric analysis, the number of amino acids was determined to be 10.22%. The relative error of the single definition with a confidence probability of 95% is 1.89%. Thus, we can conclude that further research and improvement of approaches to standardization of rhizomes of ginger, as well as the creation of new dosage forms based on it.

Keywords: ginger rhizome, amino acids, qualitative analysis, thin layer chromatography, quantitative analysis, spectrophotometry.

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

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

*** адресат для переписки:**
E-mail: savizkiy.nikolay@pharminnotech.com
Тел.: 8 (911) 247 82 93

ВВЕДЕНИЕ

Имбирь (*Zingiber officinale*) – многолетнее травянистое растение с мощной корневой системой, широко культивируется в теплых климатических регионах мира, таких как Нигерия, Бангладеш, Тайвань, Индия, Ямайка и США. Корневище содержит комплекс биологически активных соединений, таких как куркумин, 6-гингерол, 6-шогаол, зингиберен, бисаболен и другие вещества, которые придают имбирю целебные свойства [1, 2].

Издревле и до настоящих времен имбирь (рисунок 1) широко применяется как приправа к блюдам благодаря своему пряному аромату и острому вкусу, а также при консервировании пищевых продуктов. Его используют для лечения нарушения обмена веществ, диабета, гипертонии, рака и многих других заболеваний [3]. Включение имбиря в рацион приводит к снижению уровня холестерина, уменьшению образования тромбов и сгустков в крови, а также служит противовоспалительным средством [4]. В медицинской практике имбирь применяют в качестве обезболивающего, противорвотного, противоязвенного, жаропонижающего средства и многих других [5–7].

Таким образом, исследование аминокислотного профиля корневищ имбиря является актуальным с точки зрения производства эффективных биологически активных добавок и лекарственных средств.

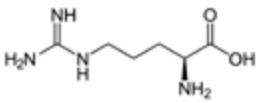
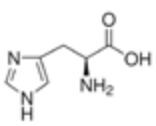
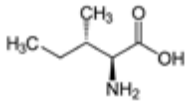
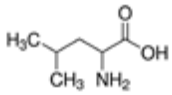
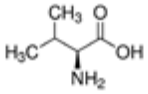
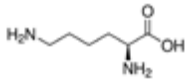
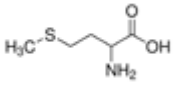
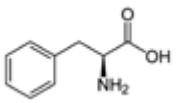
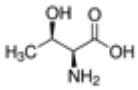
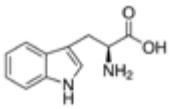


Рисунок 1. Корневище имбиря

В природе аминокислоты встречаются либо в свободной форме, либо в линейных цепях пептидов и белков. В общей сложности в природе встречаются 20 протеиногенных аминокислот, которые кодируются генетическим кодом и включаются в белки в процессе трансляции, а также являются строительными блоками и жизненно важными компонентами всех биологических систем [8, 9]. Человек способен синтезировать 12 из 20 аминокислот, кодируемых универсальным генетическим кодом, остальные 8, названные незаменимыми, должны быть получены с пищей: изолейцин, лизин, лейцин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан и валин. Они должны быть включены в дневной рацион для поддержания оптимальных клеточных и физиологических функций. Поэтому их прием способен оказывать благоприятное воздействие на организм человека. Аминокислоты оказывают большое влияние на людей и животных и обладают сильным терапевтическим потенциалом. В результате анализа научной литературы, а также консультации с фармакологами составлена таблица значения некоторых аминокислот для здоровья человека (таблица 1).

Таблица 1.

Значение ряда аминокислот для здоровья человека

Аминокислота	Действие на организм
Аргинин 	Устраняет токсическое воздействие аммиака в организме и помогает в производстве креатина – аминокислоты, которая преобразуется в аденозинтрифосфат и используется для получения энергии. Также обладает сосудорасширяющим свойством и может помочь в лечении атеросклероза, сосудистых заболеваний, сердечной недостаточности, головной боли [10].
Гистидин 	Необходим для производства гистамина – вещества, помогающего иммунной системе эффективно бороться с патогенами. Также помогает в синтезе клеток крови, лечении ревматоидного артрита и высокого кровяного давления [10].
Изолейцин  Лейцин  Валин 	Изолейцин, лейцин и валин – структурированные аминокислоты. Работая вместе, они обеспечивают мышцы энергией, увеличивают физическую выносливость и участвуют в процессах регенерации поврежденной мышечной и костной тканей. Изолейцин совместно с лейцином также контролирует уровень сахара в крови [10].
Лизин 	Необходим для общего роста и синтеза карнитина – питательного вещества, снижающего уровень холестерина и конвертирующего жирные кислоты в энергию. Помогает усвоению кальция и образованию коллагена, который играет важную роль в структуре костей и соединительной ткани организма [10].
Метионин 	Антиоксидант, помогает процессам детоксикации печени и защите толстой кишки. Разрушает жиры, помогает синтезировать нуклеиновые кислоты, белки и коллаген. Улучшает состояние пациентов с остеопорозом, аллергией, ревматизмом [10].
Фенилаланин 	Замедляет скорость расщепления эндорфинов в организме, тем самым способствует расширенному облегчению боли. Позволяет уменьшить боль от менструации, артрита, травм спины. Лечит депрессию, улучшает память, регулирует аппетит, способствует мозговой активности [10].
Треонин 	Участвует в регуляции настроения, предотвращении накопления жира в печени, а также в стимуляции иммунной системы. Обладает противовоспалительными свойствами. Необходим для формирования зубной эмали, коллагена и эластина [10].
Триптофан 	Помогает младенцам в период роста, поддерживает баланс азота у взрослых. Совместно с ниацином и серотонином стабилизирует настроение и способствует здоровому сну. Участвует в формировании коллагена, зубной эмали, эластина, а также стимулирует иммунную систему [10].

В качестве инструмента обнаружения и идентификации аминокислот выбран метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), обладающий доступностью, наглядностью, информативностью и простотой проведения анализа. Для количественного определения

суммы α-аминокислот в лекарственном растительном сырье использован спектрофотометрический метод определения, основанный на исследовании спектральных характеристик продуктов нингидриновой реакции (реакция Руэманна) (рисунки 2, 3).

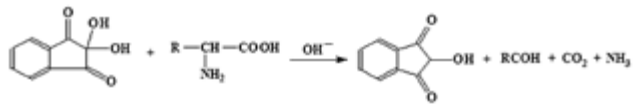


Рисунок 2. Первая стадия нингидриновой реакции

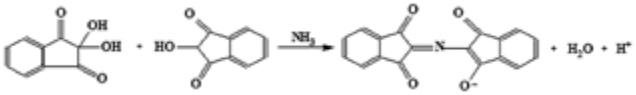


Рисунок 3. Вторая стадия нингидриновой реакции

α-Аминокислоты реагируют с нингидрином (гидрат 1,2,3-ин-дантриона), образуя окрашенный комплекс (пурпур Руэманна), интенсивность окраски которого пропорциональна количеству аминокислоты.

Образующееся соединение имеет фиолетово-голубую окраску. Пролин и гидроксипролин, у которых нет α-аминогруппы, в реакции с нингидрином образуют производные желтого цвета. Реакция с нингидрином используется также для визуального обнаружения α-аминокислот на хроматограммах (на бумаге, в тонком слое).

Целью данной работы является установление качественного состава и количественного содержания аминокислот в ходе комплексного фитохимического исследования сырья – корневищ имбиря.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 5 образцов корневищ имбиря, выращенных и собранных на плантациях Китая в 2016 году. Сушку производили при температуре 40 °С до остаточной влажности не более 12%.

Качественный состав аминокислот корневищ имбиря проводили методом ТСХ в восходящем токе растворителей (ОФС.1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография»). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

По данным научной литературы (таблица 2) для наших исследований подобрана система растворителей с наибольшим значением полярности, позволяющая наиболее полно разделить и идентифицировать аминокислоты: н-бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:1).

Время предварительного насыщения камеры – 60 мин. В качестве неподвижной фазы применяли пластинки марки Sorbfil (ПТСХ-П-А-УФ, 10×15 см) на полимерной основе (полиэтилентерефталат) с нанесенным рабочим слоем фракционированного широкопористого силикагеля. Детектирование проводили 0,1% раствором нингидрина в ацетоне (0,1 г нингидрина смешивали с 60 мл ацетона, добавляли 0,5 мл уксусной кислоты ледяной, перемешивали и доводили объем раствора до 100 мл) с последующим нагреванием пластинок при t=100 °С в течение 2–3 мин. Рабочими стандартными образцами (РСО) аминокислот служили: гистидин, аргинин, глутаминовая кислота, изолейцин, валин, пролин, метионин, лейцин (субстанция-порошок, ч.д.а., ЗАО «Вектон», Россия). 1% растворы аминокислот получали в 0,01 М фосфатном буфере (pH 8,0). Извлечения из исследуемого сырья наносили на стартовую линию микрошприцем в количествах 20 мкл и 10 мкл для рабочих стандартных образцов. Время хроматографирования при температуре 21±1 °С – около 50 мин.

Таблица 2.

Характеристика некоторых систем ТСХ для разделения аминокислот

№	Элюент	Соотношение растворителей	Полярность
1	н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода	8:2:1	4,79
2	н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода	4:1:1	5,13
3	н-бутанол – диэтиловый эфир – ледяная уксусная кислота – вода	18:12:6:2	4,22
4	96% этанол – концентрированный аммиак	32:5	4,54
5	хлороформ – метанол – 10% раствор аммиака	2:2:1	4,41

Для проведения количественного анализа аминокислот спектрофотометрическим методом получали извлечение из корневищ имбиря по предложенной методике: около 2,0 г сырья (точная навеска), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм (ТУ 14-4-16-917), помещали в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 100 мл, добавляли 50 мл воды очищенной. Затем колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 3 ч, после чего содержимое колбы охлаждали до комнатной температуры и фильтровали сначала через вату, а затем через беззольный бумажный фильтр («красная лента») в мерную колбу вместимостью 50 мл. Раствор доводили водой до метки.

0,5 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 1 мл 0,25% раствора натрия карбоната, 2 мл 2% спиртового раствора нингидрина и нагревали 15 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения раствор доводили водой до метки.

Параллельно в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 0,5 мл раствора РСО кислоты глутаминовой и далее поступали, как описано выше. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на однолучевом спектрофотометре UV-mini-1240 (Shimadzu, Япония) в максимуме поглощения при длине волны 568 нм.

Приготовление раствора РСО глутаминовой кислоты: 0,05 г кислоты глутаминовой (ВФС 42-2722-96) (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 30 мл воды и доводили водой до метки (раствор А). Раствор годен в течение 1 мес. при хранении в темном прохладном месте.

Приготовление 2% раствора нингидрина в 96% спирте этиловом: в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 2,0 г нингидрина (ТУ 6-09-10-1384-79), растворяли в 30 мл 96% спирта этилового, затем доводили тем же растворителем до метки. Раствор годен в течение 1 мес. при хранении в темном месте.

Приготовление 0,25% раствора натрия карбоната: 0,25 г натрия карбоната безводного (ГОСТ 83-79) растворяли в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводили объем раствора водой до метки, перемешивали. Срок годности раствора 2 месяца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты ТСХ представлены на рисунке 4.

Для каждого вещества рассчитывали фактор удержания (R_f) и фиксировали цвет (таблица 3). Таким образом, по результатам ТСХ в восходящем токе растворителей обнаружено не менее 10 аминокислот, 8 из которых удалось идентифицировать: аргинин, гистидин, глутаминовую кислоту, изолейцин, валин, пролин, лейцин, метионин.

Для определения суммы аминокислот в сырье использовали методику, основанную на реакции взаимодействия аминокислот с раствором нингидрина и последующем спектрофотометрировании полученного окрашенного комплекса. Содержание суммы свободных аминокислот корневищ имбиря в процентах (X, %) в пересчете на абсолютно сухое сырье и кислоту глутаминовую рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot m_{ст} \cdot 50 \cdot 100}{A_{ст} \cdot m \cdot 0{,}5 \cdot (100 - W)},$$

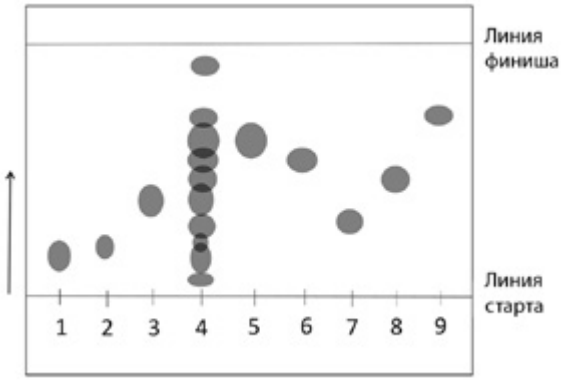


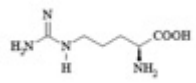
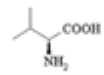
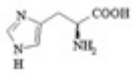
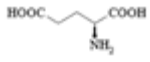
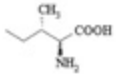
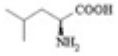
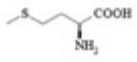
Рисунок 4. Хроматограмма качественного анализа аминокислот корневищ имбиря:

1 – гистидин; 2 – аргинин; 3 – глутаминовая кислота; 4 – извлечение корневищ имбиря; 5 – изолейцин; 6 – валин; 7 – пролин; 8 – метионин; 9 – лейцин

где A_x – оптическая плотность извлечения; $A_{ст}$ – оптическая плотность раствора РСО глутаминовой кислоты; $m_{ст}$ – навеска РСО кислоты глутаминовой, г; m – навеска корневищ имбиря, г; W – содержание влаги, %.

Таблица 3.

Параметры хроматографирования аминокислот методом ТСХ

№ п/п	Аминокислота	Окраска пятен	R_f±0,01	Структурная формула
1	Аргинин	Красно-фиолетовая	0,16	
2	Валин	Розовая	0,44	
3	Гистидин	Бледно-коричневая	0,12	
4	Глутаминовая	Сиренево-розовая	0,31	
5	Изолейцин	Красно-коричневая	0,53	
6	Лейцин	Коричневая	0,61	
7	Метионин	Бледно-коричневая	0,51	
8	Пролин	Желтая	0,24	

Данные количественного анализа аминокислот представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Результаты количественного определения аминокислот корневищ имбиря спектрофотометрическим методом

№ исследуемого извлечения	Сумма аминокислот, %
1	10,31±0,26
2	10,22±0,26
3	10,25±0,25
4	10,20±0,26
5	10,12±0,28
Среднее	10,22±0,26

Изучение качественного и количественного состава сырья показывает, что корневище имбиря содержит значительное количество аминокислот, необходимых для жизнедеятельности организма. Данный растительный материал требует дальнейшего изучения его биологической активности с целью совершенствования подходов к стандартизации корневищ имбиря и возможного расширения показаний к применению лекарственных форм на его основе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые методом тонкослойной хроматографии в восходящем токе растворителей исследован аминокислотный профиль корневищ имбиря. Обнаружено не менее 10 аминокислот, 8 удалось идентифицировать: аргинин, гистидин, глутаминовую кислоту, изолейцин, валин, пролин, лейцин, метионин, 4 из которых незаменимы для взрослого человека, а выявленные аргинин и гистидин способствуют правильному развитию детского организма.
2. Предложена методика количественного определения аминокислот корневищ имбиря спектрофотометрическим методом, впервые установлена сумма последних – 10,22±0,26%.
3. Результаты исследования аминокислотного состава корневищ имбиря свидетельствуют о перспективе создания инновационных биологически активных добавок и лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. B. Tepe, M. Sokmen, H.A. Akpulat, A. Sokmen. Screening of the antioxidant potentials of six Salvia species from Turkey // Food Chemistry. 2006. V. 95(2). P. 200–204.
2. M. Yoshikawa, S. Hatakeyama, N. Chatani, Y. Nishino, J. Yamahara. Qualitative and quantitative analysis of bioactive principles in Zingiberis rhizoma by means of high performance liquid chromatography and gas liquid chromatography. On the evaluation of Zingiberis rhizoma and chemical change of constituents during Zingiberis rhizoma processing // Yakugaku Zasshi. 1993. V. 113(4). P. 307–315.
3. H. Bliddal, A. Rosetzsky, P. Schlichting et al. A randomized, placebo-controlled, cross-over study of ginger extracts and Ibuprofen in osteoarthritis // Osteoarthritis and Cartilage. 2000. V. 8(1). P. 9–12.
4. N. Mascolo, R. Jain, S.C. Jain, F. Capasso. Ethnopharmacologic investigation of ginger (*Zingiber officinale*) // Journal of Ethnopharmacology. 1989. V. 27(1–2). P. 129–140.
5. S. Phillips, R. Ruggier, S.E. Hutchinson. Forum. *Zingiber officinale* (Ginger) –an antiemetic for day case surgery // Anaesthesia. 1993. V. 48(8). P. 715–717.
6. U. Jana, R.N. Chattopadhyay, B.P. Shaw. Preliminary studies on anti-inflammatory activity of *Zingiber officinale* Rosc., *Vitex negundo* Linn. and *Tinospora cordifolia* (Willid) Miers in albino rats // Indian Journal of Pharmacology. 1999. V. 31(3). P. 232–233.
7. J.R. Okalebo, K.W. Gathua, P.L. Woomer. Laboratory Methods of Soil and Plant Analysis: A Working Manual. 2nd ed. – Nairobi, Kenya: TSBF-CIAT and SACRED Africa. 2002.
8. D. Bercovici, F. Fuller. Industrial amino acids in nonruminant animal nutrition // Biotechnology in animal feeds and animal feeding / Ed. by R.J. Wallace, A. Chesson. – Weinheim: VCH. 1995. P. 93–113.
9. A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Söll. Natural expansion of the genetic code // Nat Chem Biol. 2007, V. 3. P. 29–35.
10. E.N. Marieb. Essentials of Human Anatomy and Physiology. 10th ed. – San Francisco: Benjamin Cummings, 2012.
11. О.Ю. Щепочкина, Н.Б. Демина, А.А. Жогова, М.Н. Анурова, О.Ю. Вальчихина, А. Надер. Определение биологически активных веществ в сухом экстракте имбиря лекарственного (*Zingiber officinale* Roscoe) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 2(11). С. 160–164.
12. О.Ю. Вальчихина, А. Надер, Н.Б. Демина. Корневище имбиря как перспективное растительное сырье для создания лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4(13). С. 82–90.

МЕДИМА
СИБИРЬ

Выставка медицинского оборудования, инструментов и материалов

31 октября – 2 ноября 2017
Новосибирск
ул. Станционная, 104







Разделы выставки

- Медицинские изделия и расходные материалы
- Медицинское оборудование и техника
- Программное обеспечение для медицинских учреждений
- Фармацевтические препараты и БАДы

ITE
+7 (383) 363-00-63
medima@sibfair.ru

www.medimaexpo.ru

УДК 615.322; 543.253

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ

С.П. Завадский[1]*, И.И. Краснюк (мл.)[1], Ю.Я. Харитонов[1], В.В. Тарасов[1], А.Н. Кузьменко[1], Д.А. Козин[1], Н.Б. Саидов[2], О.В. Ольшанская[1], А.А. Евграфов[1]

Резюме. В статье описаны и систематизированы актуальные и наиболее широко использующиеся в настоящее время физико-химические методы изучения антиоксидантной активности растительного сырья и продуктов его переработки в области фармации, парфюмерии и пищевой промышленности.

Ключевые слова: антиоксиданты; антиоксидантная активность; методы изучения антиоксидантной активности; растительное сырье.

THE PHYSICAL AND CHEMICAL METHODS FOR TESTING ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF HERBAL RAW MATERIAL AND ITS CONVERSION PRODUCTS

S.P. Zavadskiy[1]*, I.I. Krasnyuk (Jr.)[1], Yu.Ya. Kharitonov[1], V.V. Tarasov[1], A.N. Kuzmenko[1], D.A. Kozin[1], N.B. Saidov[2], O.V. Olshanskaya[1], A.A. Evgrafov[1]

Abstract. In present review the actual and most widely used physical and chemical methods for testing antioxidative activity of herbal raw material and it`s conversion products in pharmacy, perfumery and food industry are discussed and systematized.

Keywords: antioxidants; antioxidative activity; methods for testing antioxidative activity; herbal raw material.

1 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

2 – Национальный университет Таджикистана,734025, Республика Таджикистан, г. Душанбе, пр. Рудаки 17, к. 3

1 – I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – Tajik National University, 17, Rudaki avenue, Dushanbe city, 734025, Tajikistan

*** адресат для переписки:**
E-mail: argus78@bk.ru

ВВЕДЕНИЕ

В организме в результате окислительно-восстановительных реакций постоянно происходит образование активных форм кислорода (АФК) (ионы кислорода, свободные радикалы, перекиси). Избыточное накопление АФК, в частности свободных радикалов, является центральным фактором риска сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний и ряда других патологий. Антиоксиданты (АО) – вещества, замедляющие или предотвращающие окислительные процессы в объектах. Антиоксидантная активность (АОА) – показатель, который позволяет оценить интегральную составляющую, характеризующую потенциальную возможность антиоксидантного действия всех компонентов, находящихся в образце, причем не только по отдельности, а в совокупности их взаимодействия между собой в сложной биологической системе, учитывая возможный синергизм или антагонизм их общего антиоксидантного действия и вклад неизвестных, редко встречающихся или минорных антиоксидантов [1]. Профилактическое потребление соответствующего количества АО защищает организм от окислительного стресса, вызванного дисбалансом между действием АФК и защитными системами организма, восстанавливает до нормы антиоксидантный статус организма и сохраняет здоровье и продолжительность полноценной жизни [2]. Важнейшим экзогенным источником АО для организма человека является растительное сырье и продукты его переработки, которые используются в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности. В настоящей статье рассматриваются наиболее широко используемые физико-химические методы изучения АОА растительного сырья и продуктов его переработки.

АНТИОКСИДАНТЫ

Существуют различные типы классификаций АО [1–5]. Согласно [5] АО подразделяют на эндогенные, которые вырабатываются в организме, и экзогенные, которые поступают с пищей. Согласно [4] антиоксидант – вещество, в малых концентрациях тормозящее процессы окисления органических веществ кислородом по различным механизмам. Многие растительные экстракты об-

ладают антиоксидантными свойствами [6]. Важнейшими АО в растительных экстрактах являются витамины и полифенолы [6, 7].

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АО В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ И ПРОДУКТАХ ЕГО ПЕРЕРАБОТКИ

Существуют различные методы количественного определения антиоксидантов в растительном сырье и продуктах его переработки: спектрофотометрические, гравиметрические, титриметрические, амперометрические, хроматографические.

Широко используется спектрофотометрический метод с реактивом Фолина – Чокальтеу (смесь фосфорномолибденовой и фосфорновольфрамовой кислот) [8–11], с помощью которого определяют общую сумму фенольных соединений.

Фотометрическое титрование по Левенталю [12, 13] – метод количественного определения суммы дубильных веществ перманганатом калия с использованием индигокармина в качестве индикатора. Согласно Государственной фармакопее XI издания количественное определение суммарного содержания флавоноидов в сырье зверобоя проводят с помощью дифференциальной спектрофотометрии на основе реакции их взаимодействия с хлоридом алюминия в пересчете на рутин [14]. Суммарное содержание фенолпропаноидов определяют методом прямой спектрофотометрии в пересчете на хлорогеновую кислоту [15].

Также используются методы классического химического анализа – гравиметрические [16] и титриметрические [17], однако в настоящее время они используются реже).

Известны амперометрические методы определения содержания АО в растительном сырье и фитопрепаратах [18].

Многие методы предполагают предварительное хроматографическое разделение веществ [18–20].

Однако необходимо учитывать, что суммарное содержание АО и их интегральная АОА есть разные понятия, на что обращают внимание авторы [21]. Различные АО могут между собой проявлять как синергизм, так и антагонизм в отношении АОА [22], поэтому для изучения АО тех или иных объектов представляется недостаточным определение суммарного содержания АО.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ

Методы определения АОА растительного и пищевого сырья можно разделить на две большие группы: прямые и косвенные. К прямым относятся методы, основанные на детектировании поглощения генерируемых в среду свободных радикалов, при этом детектирование и генерация могут осуществляться различными способами [23–28]. Косвенные методы включают измерение различных физико-химических параметров растительных экстрактов, масел, вина, соков и других пищевых объектов, связанных с АОА. Методы исследования АОА различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способа измерения окисленного соединения [29]. По способам регистрации АОА растительного сырья можно разделить методы на волюмометрические (газометрические) [30], фотометрические [31–34], хемилюминесцентные [35–37] и флуоресцентные [38, 39], электрохимические [40, 41].

Кинетический газометрический метод

Газометрические методы являются кинетическими методами анализа, относятся к прямым методам. Основаны на мониторинге реакции разложения окислителя (прооксиданта) по уменьшению его концентрации под действием АО после введения в образец.

Авторами [42] представлен манометрический способ построения кинетических кривых свободнорадикального окисления сульфит-иона и разложения пероксида водорода для определения суммарной АОА природных объектов сложного химического состава. Кинетика окисления сульфит-иона контролируется в данном способе по выделению кислорода. АОА образцов определяется по кривым зависимости изменения концентрации кислорода в реакционной смеси от количества добавленного образца.

Е.В. Ермиловой с соавторами [43] представлено высокоточное газометрическое устройство для измерения микрорасхода газа, которое отрабатывалось применительно к анализу АО кинетическим методом на основе модельной реакции инициированного окисления кумола. Проведена сравнительная оценка АОА экстрактов и отдельных фракций, полученных из побегов водяники черной.

Фотометрические методы изучения АОА

Во многих работах АОА оценивают по способности АО ингибировать генерируемые в модельных смесях радикалы, образующиеся при окислении ABTS [2,2′-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоновая кислота)] [19], DPPH (ДПФГ) [2,2-дифенил-1-пикрилгидразил ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)] [44, 45], AIBN (динитрил азобисизомасляной кислоты) [46–48], линолевой кислоты [49], тиобарбитуровой кислоты (ТБК) [50, 51], пероксида водорода [52] и т.д. Методы основаны на измерении восстанавливающей способности АО по отношению к радикалам. Измерения могут проводиться как с помощью ЭПР, так и спектрофотометрически. Существует множество экспериментально используемых методик на основе данного метода. Для оценки АОА используют два параметра: скорость восстановления радикалов и число радикалов, восстановленных одной молекулой АО.

В работе [19] для изучения АРА флавоноидов использованы способы, основанные на способности различных АО снижать концентрацию предварительно генерированных радикал-катионов $ABTS^{\cdot+}$ (деколоризационный способ) и замедлять время начала их образования (кинетический способ).

Одним из способов оценки АОА [53] является колориметрия свободных радикалов, основанная на реакции DPPH [2,2-дифенил-1-пикрилгидразил ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), M=394,33 г/моль], растворенного в метаноле, с образцом АО.

В работе [54] изучалась АОА водных и спиртовых экстрактов лилейника по улавливанию радикалов DPPH и перекисного аниона и сравниванию со стандартами, при этом было обнаружено, что этанол лучше экстрагирует АО-вещества, чем вода. Лиофильно высушенные образцы лучше сохраняли активность, чем высушенные на воздухе.

Однако данные методики имеют существенные недостатки. Они непригодны для веществ-хромофоров, имеющих максимум поглощения, близкий к максимуму поглощения самого радикала. Так как некоторые радикалы имеют высокий коэффициент экстинкции, область применения этого метода ограничена интервалом невысоких концентраций радикала и АО.

Колориметрическое определение общей антиокислительной активности (ТАС) по окислению кроцина впервые былj предложено авторами [55]. Изучена АОА кроцина – красящего вещества желтых стручков плода китайского растения *Gardenia grandiflora*. АОА изучалась спектрофотометрическим методом. Свободнорадикальная реакция инициировалась добавлением 2,2'-азобис-(2-амидинопропан)гидрохлорида.

Метод хелирующей активности (метод FIC). Среди всех металлов железо играет наиважнейшую роль в процессе липидного окисления благодаря своей высокой активности. Бивалентный переход ионов металлов катализирует окислительные процессы, так как приводит к образованию гидроксильных радикалов. Липидное окисление с образованием свободных радикалов ускоряется железом согласно реакции Фентона:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^{-}.$$

Ион Fe^{3+} также катализирует образование радикалов, но в гораздо меньшей степени, чем ион Fe^{2+}. Феррозин используется как индикатор присутствия хелаторов в испытуемых системах. Он образует комплекс со свободным ионом Fe^{2+} и не образует комплекс с Fe^{2+}, связанным АО экстракта. В присутствии хелирующих агентов образование комплекса между железом и феррозином снижается, что отражается на цвете и составляет сущность метода FIC. С помощью экспериментальных данных строят кривые зависимости хелирующей активности от концентрации экстракта.

Часто АОА находят методом FRAP (ferric reducing/antioxidant power). В ходе такого анализа под действием АО (восстановителей) образуются комплексы железа(II) с фотометрическим реагентом. Сущность метода FRAP заключается в восстановлении комплекса Fe(III)-2,4,6-трипиридил-s-триазина в комплекс Fe(II)-2,4,6-трипиридил-s-триазин под действием редуктантов.

Метод FRAP широко применяют в биохимических исследованиях и в технологии пищевых продуктов, имеется множество публикаций, в которых приведены значения АОА, полученные методом FRAP [29, 49, 56]. Преимущества метода FRAP по сравнению с другими вариантами определения АОА следующие: экспрессность и низкая стоимость анализа, простота оборудования, хорошая сходимость результатов.

Известны спектрофотометрические методики, основанные на изучении АОА экстрактов растительного сырья по измерению концентрации комплекса продуктов окисления с ТБК [56].

Флуоресцентные методы изучения АОА

Метод определения адсорбционной емкости по отношению к кислородным радикалам (Oxygen Radical Absorption Capacity, – ORAC) [57] является одним из наиболее применяемых в настоящее время. Применяется при исследованиях антиоксидантов и окислительного стресса [58–60]. Метод основан на измерении интенсивности флуоресценции определенного соединения и ее изменении от времени протекания реакции. В присутствии соединений, связывающих кислородные радикалы, увеличивается время флуоресценции вследствие защитного действия антиокислителей. Количественное определение антиоксидантной активности (АОА) осуществляется по площади между двумя кривыми – свободной реакции и с добавлением антиоксидантов. Степень уменьшения флуоресценции есть мера степени деградации флуоресцирующего соединения под воздействием кислородных радикалов.

Метод ORAC измеряет только АОА против пероксидного и гидроксильного радикалов, но в дальнейшем может быть распространен и на другие вредные реакционноспособные частицы. Указанным методом (ORAC) может быть определена АОА как водорастворимых, так и жирорастворимых объектов, таких как пищевые продукты, химикаты, биологически активные добавки, плазма и сыворотка крови, моча и т.д. При этом не требуется практически никакой предварительной пробоподготовки.

К недостаткам данного метода можно отнести то, что некоторые флюоресцирующие вещества, например белок β-фикоэритрин, могут взаимодействовать не только с радикалами, но и некоторыми АО фенольной природы, что может приводить к систематически заниженным результатам определения АОА.

Хемилюминесцентные методы изучения АОА

В настоящее время для оценки интенсивности свободнорадикальных реакций широко применяется хемилюминесцентный метод. Он основан на открытом в 1961 году новом явлении – спонтанном непрерывном сверхслабом свечении тканей и биосред в видимой области спектра, обусловленном липидными структурами [61]. Установлено, что биохемилюминесценция возникает в результате свободнорадикального окисления липидов. Возникающие при этих процессах кванты видимого участка спектра и соответствующие им электронные возбужденные состояния являются продуктами перекисного окисления липидов. Повышение спонтанной хемилюминесценции имеет место при усилении данных процессов, поскольку основным источником хемилюминесценции является реакция рекомбинации перекисных липидных радикалов. В присутствии ингибиторов свободнорадикальных реакций хемилюминесценция ослабляется, так как при этом снижается концентрация перекисных радикалов.

Высокая эффективность хемилюминесценции связана с тем, что время жизни радикалов чрезвычайно мало, что обусловлено их высокой реакционной способностью, а использование методов регистрации хемилюминесценции позволяет оценивать интенсивность реакций по мере их протекания [62].

Для изучения АОА часто используют модельные системы, основанные на окислении люминола, индуцированном пероксидом водорода [63, 64]. При действии пероксида водорода на белки, аминокислоты, а также на ненасыщенные жирные кислоты образуется сверхслабое свечение, достоверно регистрируемое квантометрическими установками.

Инициатором цепных окислительных реакций также может служить и 2,2'-азо-бис(2-метилпропионамидин)дигидрохлорид. Он претерпевает термоиндуцированную деградацию с образованием пероксильных радикалов, которые могут взаимодействовать с различными перехватчиками, предпочтительно водорастворимыми: люминолом, фикоэритрином, эмульсией линолевой кислоты и др. [65].

В работе [66] проведено исследование АОА сухого экстракта зубчатки обыкновенной в условиях эксперимента с применением метода хемилюминесценции. Экстракт зубчатки в исследованных дозах оказывал существенное ингибирующее влияние на кинетику Fe^{2+}-индуцированной хемилюминесценции в тестируемой системе. Определение уровня люминесценции проводили по общепринятому методу [67].

Метод хемилюминесцентного анализа является одним из наиболее информативных методов и позволяет с большой точностью определить интенсивность протекания свободнорадикальных реакций в биологических системах, а также оценить эффективность работы систем антиоксидантной защиты организма и АОА фармакологических веществ.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ АОА

В настоящее время большое развитие получило применение электрохимических методов анализа. Различные их варианты, предлагаемые в литературе, характеризуются высокой чувствительностью, экспрессностью и простотой в аппаратурном оформлении. Эти методы представляют собой альтернативу применению общеизвестных методов определения АОА (хемилюминесценции и газометрии).

В России электрохимические методы анализа наиболее популярны в связи с их доступностью, удобством анализа, высокой чувствительностью. И конечно, исследование суммарной антиоксидантной активности (емкости) объектов не явилось исключением. Большинство известных школ электрохимических методов анализа России предложили свои варианты определения суммарной антиоксидантной активности объектов. Рассмотрим их более подробно.

Кулонометрическое определение интегральной антиоксидантной емкости объектов

В работах Г.К. Будникова, Г.К. Зиятдиновой (Казанский государственный университет) [68–70] оценка интегральной антиоксидантной емкости различных объектов (фармпрепаратов, фитопрепаратов, биологических жидкостей) проводилась методом кулонометрического титрования с помощью электрогенерированных соединений брома и хлора. Электрохимическое окисление бромид-ионов на платиновом электроде в кислых средах приводит к образованию Br_2, Br_3^-, а также короткоживущих радикалов брома (Br·), адсорбированных на поверхности платинового электрода.

Использование в качестве титранта электрогенерируемых соединений брома обусловлено не только сравнительной простотой их получения, но и их способностью вступать в радикальные и окислительно-восстановительные реакции, а также реакции электрофильного замещения и присоединения по кратным связям, что позволяет охватывать широкий круг биологически активных соединений различной структуры, обладающих антиоксидантными свойствами.

Для количественной оценки введена характеристика интегральной антиоксидантной емкости (АОЕ), выраженная в единицах количества электричества (кулонах), затраченного на титрование 100 г препарата или 1 л крови.

Данный метод несомненно превосходит все известные методы по точности определения, а использование электрогенерируемого титранта делает этот метод доступным и экспрессным.

В работах [71] с помощью кулонометрического метода была изучена интегральная АОА различ-

ных экстрактов: экстрактов имбиря, АОА виноматериалов [72], водных вытяжек чаги [73], водных настоев растительного сырья [74].

Некоторые авторы [75] считают недостатком данного метода то, что при взаимодействии брома с кверцетином происходит бромирование ароматических ядер кверцетина, а не реакция гидроксигрупп кверцетина, отвечающих за его антиоксидантные свойства.

Потенциометрический метод определения суммарной антиоксидантной активности объектов

Потенциометрический метод определения АОА основан на изменении окислительно-восстановительного потенциала системы при добавлении АО.

В Уральском государственном экономическом университете был предложен потенциометрический метод с использованием донорно-акцепторной (медиаторной системы) [76, 77]. Определение антиоксидантных свойств растворов предложенным потенциометрическим методом основано на химическом взаимодействии антиоксидантов с медиаторной системой, в качестве которой используется смесь $K_3[Fe(CN_6)]/K_4[Fe(CN_6)]$. Добавление растворов, содержащих вещества, проявляющие антиоксидантную активность, в электрохимическую ячейку приводит к изменению окислительно-восстановительного потенциала среды в результате взаимодействия антиоксидантов с окисленным компонентом ($K_3[Fe(CN)_6]$) медиаторной системы. Этот метод является разновидностью уже упомянутого FRAP-метода, где восстанавливающую способность АО по отношению к комплексному соединению железа (III) определяют не по изменению оптической плотности в качестве аналитического сигнала, а по изменению окислительно-восстановительного потенциала медиаторной системы.

С использованием данного метода исследована антиоксидантная активность ряда природных и синтетических АО [78]. Показана высокая степень корреляции (80–90%) результатов определения АОА и противорадикальной активности ряда объектов методами потенциометрии, фотохемилюминесценции, фотоколориметрии и др. Установлены метрологические характеристики методики измерения суммарного количества в АО продуктах питания.

Авторами Кубанского государственного университета (г. Краснодар) [79] предложено оценивать антиоксидантную активность коньяка как обобщенный показатель качества продукции, используя потенциометрический метод на основе медиаторной системы о-фенатролиновых или 2,2′-дипиридиловых комплексов Fe(III)/Fe(II). В качестве вещества стандарта предложено использовать аскорбиновую кислоту. Также показана возможность пересчета величин антиоксидантной активности коньяка относительно различных веществ – стандартов (галловой кислоты, кверцетина).

Установлены метрологические характеристики методики измерения суммарного количества АО в продуктах питания.

Разработанная методика позволяет осуществить как идентификацию, так и количественное определение дубильных веществ в широком интервале концентраций. Отмечено, что метод обладает высокой чувствительностью.

Амперометрические и вольтамперометрические методы

Удобным для определения антиоксидантов и их активности является вольтамперометрический метод, так как он, как и антиоксиданты, весьма чувствителен к наличию в среде кислорода и его активных радикалов.

Известен способ циклической вольтамперометрии для оценки суммарной АОА биологических жидкостей, тканевых гомогенатов и экстрактов растений [80, 81]. Он основан на восстановительной способности низкомолекулярных АО, входящих в их состав. Низкомолекулярные антиоксиданты были идентифицированы как аскорбиновая кислота и мочевая кислота, и по их общему содержанию судили об АОА методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием. В качестве параметра оценки суммарной АОА использовали изменение величины площади под анодным пиком окисления низкомолекулярных АО.

В работе [82] разработан вольтамперометрический анализатор «Антиоксидант» для определения антиоксидантной активности объектов искусственного и природного происхождения. Прибор прошел государственные испытания, по результатам которых ему присвоен тип средства измерения – «Анализатор АОА» с приписанными метрологическими и техническими характеристиками. Анализатор прошел международную сертификацию в Чехии и допущен к применению в аналитических и научно-исследовательских лаборатория Европы и Америки.

Предложен экспрессный амперометрический способ определения АОА [83–87]. Измерения проводились на приборе «ЦветЯуза-01-АА» со стеклоуглеродным анодом. Он основан на измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества (или смеси веществ) на поверхности рабочего электрода, находящегося при определенном потенциале. Чувствительность данного метода определяется как природой рабочего электрода, так и потенциалом, приложенным к нему. В качестве основного материала рабочего электрода используется стеклоуглерод. Электрохимическое окисление используется как модельное при измерении активности поглощения свободных радикалов. Таким образом, способность к захвату свободных радикалов флавоноидами или другими полифенолами (их АОА) может измеряться величиной окисляемости этих соединений на рабочем

электроде амперометрического детектора. В условиях амперометрического детектирования хорошо окисляются соединения, содержащие гидроксильные группы, предел их обнаружения – на уровне 10^{-9}–10^{-12} г.

Электрод Кларка получил широкое распространение в 1960-х годах прошлого века [88, 89]. Он предназначался прежде всего для определения концентрации кислорода. Классический способ Кларка представляет собой амперометрическую установку с платиновым индикаторным электродом. Фоновый электролит – раствор KCl. Однако электрод Кларка сильно реагирует на адсорбцию органических соединений, уменьшая ток восстановления кислорода пропорционально их концентрации в растворе.

В связи с этим использовать электрод Кларка для исследования антиоксидантных свойств веществ можно только в случаях, когда исследуемые вещества являются настолько сильными восстановителями, что реагируют только с молекулярным кислородом в объеме раствора, и когда они не обладают поверхностной активностью.

Поэтому в последнее время электрод Кларка в чистом виде практически не используется для исследования антиоксидантных свойств веществ и материалов. Однако данный электрод нашел широкое распространение в биосенсорах, как физический преобразователь сигнала.

Авторами [90] предложено биамперометрическое определение производных фенола с использованием композита лакказа-нафион. Концентрацию фенольных субстратов определяли по току восстановления продуктов ферментативного окисления при E=0.1 В на пироуглеродном электроде с композитом и по расходу кислорода на ферментативное окисление на электроде Кларка с композитной мембраной при E=–0.7 В.

В последнее время для определения антиоксидантной активности широко используются биосенсоры, о чем свидетельствует большое число публикаций. Для электрохимического определения АОА разработан амперометрический биосенсор, модифицированый цитохромом С [91]. В качестве подложки использовался золотой электрод. Образование супероксид-радикала ферментативно контролируется ксантиноксидазой. Добавление антиоксидантов облегчает разложение радикала в дополнение к самопроизвольному диспропорционированию, что приводит к уменьшению тока на электроде. Количественным критерием АОА служила концентрация АО, уменьшающая сигнал на 50% ($IC_{50\%}$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время существует большой арсенал различных методов определения АОА растительного сырья и продуктов его переработки. Широкое применение получают фотометрические, люминесцентные, флуоресцентные, электрохимические методы определения АОА. Трудно отметить метод, получающий наиболее широкое использование. Невозможно предложить общий универсальный метод для оценки АОА. Ученые выбирают конкретный метод исследования, модифицируют его либо создают новый. Выбор метода и методики определяется поставленной целью и имеющимися аппаратурными возможностями.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Bartos. Total antioxidant capacity // Adv. Clin. Chem. 2003. V. 37. P. 219–292.
2. Патент РФ № 2238554. G 01N 33/15, G 01N 27/26. Способ определения суммарной антиоксидантной активности биологически активных соединений / В.П. Пахомов, Я.И. Яшин, А.Я. Яшин, В.Л. Багирова, А.П. Арзамасцев, В.Г. Кукес, Е.В. Ших.
3. В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях. Пособие для врачей. – М.: Медицина, 2001. 78 с.
4. Е.Б. Бурлакова, В.М. Мисин, Н.Г. Храпова, А.Ю. Завьялова. Антиоксиданты. Термины и определения. – М.: РУДН, 2010. 63 с.
5. Н.Д. Бунатян, Е.В. Ших, Г.В. Раменская и др. Исследование антиоксидантных свойств лекарственных препаратов. – М. 2010. 36 с.
6. В. М. Березовский. Химия витаминов. – М.: Пищевая промышленность, 1973. 632 с.
7. В.А. Рогинский. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. – М.: Наука, 1988. 247 с.
8. Т.В. Пилипенко. Изучение качества и функциональных свойств образцов китайского зеленого чая // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. № 4 (2). 2014. С. 64–68.
9. Л.М. Федосеева, Т.А. Харлампович. Изучение некоторых водорастворимых соединений донника лекарственного травы (*Meliotus officinalis* L.) // Химия растительного сырья. 2013. № 2. С. 153–157.
10. В.М. Косман, О.Н. Пожарицкая, А.Н. Шиков, В.Г. Макаров. Изучение состава биологически активных веществ сухих экстрактов эхинацеи узколистной и шалфея лекарственного // Химия растительного сырья. 2012. № 1. С. 153–160.
11. K.U. Yilmaz, Y. Zengin, S. Ercisli, S. Serce, K. Gunduz, M. Sengul, B.M. Asma. Some selected physico-chemical characteristics of wild and cultivated blackberry fruits (*Rubus fruticosus* L.) from Turkey // Romanian Biotechnological Letters. 2009. V. 14(1). P. 4152–4163.
12. К.Н. Разарёнова, Е.В. Жохова. Сравнительная оценка содержания дубильных веществ в некоторых видах рода geranium L. флоры северо-запада // Химия растительного сырья. 2011. № 4. С. 187–192.
13. А.А. Федосеева, О.С. Лебедкова, Л.В. Каниболоцкая, А.Н. Шендрик Антиоксидантная активность настоев чая // Химия растительного сырья. 2008. № 3. С. 123–127.
14. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье // Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. 11-е изд., доп. / МЗ СССР. – М.: Медицина, 1989. 398 с.
15. В.В. Мжаванадзе, И.Л. Таргамадзе, Л.И. Драник. Количественное определение хлорогеновой кислоты в листьях черники кавказской // Сообщения АН Грузинской ССР. 1971. Т 63. № 1. С. 205–207.
16. А. Блажей, Л. Шутый. Фенольные соединения растительного происхождения. –М., 1977. 158 с.
17. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье // Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. 11-е изд., доп. / МЗ СССР. – М.: Медицина, 1989. 398с.

18. Е.Ю. Демченкова. Стандартизация лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов на содержание антиоксидантов амперометрическим методом: дисс. … канд. фарм. наук. – М. 2012. 121 с.

19. Е.В. Романенко, Е.А. Сосюра, А.Ф. Нуднова, Н.А. Есаулко, М.В. Селиванова, К.В. Парусова. Антиоксидантная активность плодов унаби // Пищевая промышленность. 2016. № 9. С. 28–29.

20. А.Н. Кузьменко. Стандартизация лекарственного растительного сырья и растительных сборов методами ионо-эксклюзионной и газо-жидкостной хроматографии: дисс. … докт. фарм. наук. – М. 2013. 319 с.

21. В.М. Мисин, Н.Г. Храпова, А.Ю. Завьялов, Е.Б. Бурлакова, А. М. Кочнев, Г.Е. Заиков. Стандартизация терминов и определений в области «антиоксиданты» // Вестник КНИТУ. 2012. № 17. С. 236–241.

22. И.Р. Ильясов. Исследование антирадикальной активности композиции на базе диквертина: дисс ... канд. фарм. наук. – М. 2009. 139 с.

23. А.А. Лапин, Е.В. Горбунова, В.Н. Зеленков, М.К. Герасимов. Определение антиоксидантной активности вин кулонометрическим методом (Научно-методическое пособие). – М.: РАЕН, 2009. 64 с.

24. M. Sato, N. Ramaratham, Y. Suzuki, M. Ohkuk Takeuchi, H. Ochi. Varietal differences phenolic content and superoxide radical potential of wines from different sources // J. Food Chem. 1996. V. 44 (1). P. 317–322.

25. J.A. Larrauri, C. Sanched-Moreno, F. Saura-Calixto. Free radical scavenging the aging of selected red Spanish wines // J. Food Chem. 1999. V. 47 (1). P. 44–47.

26. V. Fogliano, V. Verde, G. Randazzo. Method for measiring antioxidant activity and plication to minitoring the antioxidant in wines // J. Agr. Food Chem. 1999. V. 47 (2). P. 1035–1040.

27. Y. Kondo, M. Ohnishi, M. Kawaguchi. Deteolipid peroxidation catalyzed by chelated in measurement of antioxidant activity in wine chemiluminescence analyzer // J. Agr. Food Chem. 1999. V. 47 (5). P. 1781–1784.

28. И.Ф. Абдуллин. Разработка аналитического метода определения антиоксидантной способности новых сортов пива с профилактическими свойствами // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: Сборник научных трудов. Вып. 6. – М.: РАЕН, 2002. С. 327–328.

29. В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 63–75.

30. А.В. Письменский, Б.Л. Психа, В.В Харитонов. Механизм и эффективность ингибирующего действия 1,3-ди(4-фениламинофенокси)- 2-пропанола и 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенола при окислении метиллинолеата // Нефтехимия. 2001. Т. 41. № 5. С. 377–383.

31. Н.В. Сизова, О.Ю. Веретникова, А.А. Ефремов. Оценка антиоксидантной активности эфирных масел методом микрокалориметрии // Химия растительного сырья. 2002. № 3. С. 57–60.

32. V. Fogliano, V. Verde, G. Randazzo, A. Ritieni. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines // Journal Agricultural and Food Chemistry. 1999. V. 47. № 3. P. 1035–1040.

33. F. Tubaro, E. Micossi., F. Ursini. The antioxidant capacity of complex mixtures by kinetic analysis of crocin bleaching inhibition // Journal of the American Oil Chemists's Society. 1996. V. 73, № 3. P. 173–176.

34. M. Kampa, A. Nistikaki, V. Tsaousis, N. Maliaraki, G. Notas., E. Castanas. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay // BMC Clinical Pathology. 2002. V. 2. URL: http: // www. biomedcentral. Com / 1472-6890/2/3. (дата обращения 27.02.2017)

35. Д.В. Магин, Д.Ю. Измайлов, И.Н. Попов, Г.А. Левин, Ю.А. Владимиров. Фотохемилюминесценция как метод изучения антиоксидантной активности в биологических системах. Математическое моделирование // Вопросы медицинской химии. 2000. № 4. С. 65–68.

36. S.R. Georgetti, R. Casagrande, V.M Di Mambro, A. Azzolini, M.J. Forseka. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method // AAPS Pharm Sci. 2003. V. 5(2). URL: www.pharmsci.org (дата обращения 27.02.2017).

37. А.П. Потанина, С.Р. Хасанова, Н.В. Кудашкина, Р.Р. Фархутдинов. Исследование антиоксидантной активности сбора «Кардиофит» хемилюминесцентным методом // Медицинский вестник Башкортостана. 2013. Т. 8. № 5. С. 75–77.

38. M.K. Ehlenfeldt, R.L. Prior. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. V. 49. P. 2222–2227.

39. G. Cao, C. Sanchez-Moreno, R.L. Prior. Procyanidins, anthocyanins and antioxidant capacity in wines // Faseb Journal. 2000. V. 14. P. A564–A564.

40. E.I. Korotkova, Y.A. Karbainov, A.V. Shevchuk. Study of antioxidant properties by voltammetry // Journal of Electroanalytical Chemistry. 2002. V. 518. № 1. P. 56–60.

41. B. Yang, A. Kotani, K. Arai, F. Kusu. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials // Analytical Sciences (Japan). 2001. V. 17. P. 599–604.

42. В.В. Хасанов, К.А. Дычко, Г.Л. Рыжова. Кинетический метод свободно радикального окисления сульфит-иона для определения антиоксидантов в биообъектах // Химико-фармацевтический журнал. 2001. Т. 35. № 12. С. 36–37.

43. Е.В. Ермилова, Т.В. Кадырова., Е.А. Краснов, С.И. Писарева, В.И. Пынченков. Антиокислительная активность экстрактов водяники черной. // Химико-фармацевтический журнал. 2000. Т. 34. № 11. С. 28–30.

44. W. Brand-Williams, M.E Cuvelier, C. Berset. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity // Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie. 1995. V. 28(1). P. 25–30.

45. А.А. Торопова, Э.Т. Батоцыренова, Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева, Л.Н. Шантанова, С.М. Николаев. Антиоксидантная активность сухого экстракта подземных органов Astragalus membranaceus и его фракций // Сибирский медицинский журнал. 2012. № 7. С. 107–109.

46. Н.М. Бейлерян, Э.Р. Саруханян, П.Г. Минасян. Кинетика инициированного ДАК автоокисления кумола в хлорбензольных растворах В присутствии диметилсульфоксида // Ученые записки Ереванского государственного университета. Серия Химия, Биология. 2010. № 3. С. 8–12.

47. М.В. Веселова, С.А. Федореев, Н.А. Василевская, В.А. Денисенко. Антиоксидантная активность полифенолов из дальневосточного растения тиса остроконечного // Химико-фармацевтический журнал. 2007. Т. 41. № 2. С. 29–34.

48. Е.Г. Линхоева, А.А. Торопова, Е.В. Петров, С.В. Лемза. Определение антиоксидантной активности противодиабетического средства «Глюковит» // Вестник Бурятского государственного университета. 2013. № 2. С. 147–149.

49. Н.В. Макарова, А.В. Зюзина. Сравнительное исследование антиоксидантных свойств яблочно-ягодных соков // Известия вузов. Пищевая технология. 2012. № 1. С. 22–24.

50. А.Ю. Айрапетова, Е.О. Сергеева, Л.С. Ушакова, С.Г. Тираспольская. Изучение антиоксидантной активности липидной фракции Трутовика лекарственного (*Fomipolis Officinalis* (Vill.) Bond. et Sing.). Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2013. Т. 15. № 3 (2). С. 692–694.

51. П.Б. Лубсандоржиева. Биологически активные вещества и антиоксидантная активность invitro полиэкстракта *Lomatogonium Carinthiacum* (Wulfen) ABR // Химия растительного сырья. 2008. № 1. С. 101–105.

52. Н.Г. Гамбарова, В.К. Гинс. Влияние экзогенного пероксида водорода на антиоксидантную систему хлоропластов у пшеницы // Сельскохозяйственная биология. 2012. № 3. С. 75–79.

53. M.S. Blois. Antioxidant determination by the use of a stable freeradical // Nature. 1958. V. 26. P. 1198–1200.

54. Mao Lin-Chun. Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze-dried daylily flowers // Eur. Food Res. And Technol. 2006. V. 222. № 3–4. P. 236–241.

55. F. Tubaro, A. Ghiselli, P. Rapuzzi, M. Maiorino, F. Ursini. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics // Free Radicalsin Biology and Medicine. 1998. V. 24. P. 1228–1234.

56. M. Antolovich. Methods for testing antioxidant activity // Analyst. 2002. V. 127. P. 183–198.

57. G.H. Cao., H.M. Alessio, R.G. Cutler. Oxygen Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants // Free Radicals In Biology And Medicine. 1993. V. 3. № 14. P. 303–311.

58. M.K. Ehlenfeldt, R.L. Prior. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. V. 49. P. 2222–2227.

59. G. Cao, C. Sanchez-Moreno, R.L. Prior. Procyanidins, anthocyanins and antioxidant capacity in wines // Faseb Journal. 2000. V. 14. P. A564–A564.

60. G.H. Cao, B. Shukitt-Hale, P.C. Bickford, J.A. Joseph, J. McEwen, R.L. Prior. Hyperoxia-induced changes in antioxidant capacity and the effect of dietary antioxidants // Journal of Applied Physiology. 1999. V. 86. P. 1817–1822.

61. U. Devanboyina, R. C. Gupta. Sensitive detection of 8-hydroxy-2'–deoxyguanosine in DNA by 32P-postlabeling assay and the basal levels in rat tissues // Carcinogenesis.1996. V. 17. P. 917–924.

62. K. Nakagawa, M. Kawagoe, M. Yoshimura, H. Arata., T. Minamikawa, M. Nakamura, A. Matsumoto. Differential Effects of Flavonoid Quercetin on Oxidative Damages Induced by Hydrophilic and Lipophilic Radical Generators in Hepatic Lysosomal Fractions of Mice // Journal of Health Science. 2000. V. 46. № 6. P. 509–512.

63. A.N. Glazer. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species // Methods of Enzymology. 1990. V. 186. P. 161–168.

64. A. Abella, C. Messaoudi, D. Laurent, D. Marot, J. Chalas, J. Breux, C. Claise., A. Lindenbaum. A method for simultaneous determination of plasma and erythrocyte antioxidant status. Evaluation of the antioxidant activity of vitamin E in healthy volunteers // British Journal of Clinical Pharmacology. 1996. V. 42. P. 737–741.

65. I.F. Benzie, J.J. Strain. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay // Analitycal Biochemistry. 1996. V. 239. P. 70–76.

66. А.В. Бодоев, П.В. Алексеев. Исследование антиоксидантной активности экстракта зубчатки обыкновенной хемилюминесцентным методом // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2011. № 1 (77), Ч. 2. С. 126–127.

67. Г.И. Клебанов, М.В. Бабенкова, Ю.О. Теселкин. Оценка антиоксидантной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лабораторное дело. 1988. № 5. С. 59–62.

68. И.Ф. Абдуллин, Е.Н. Турова, Г.К. Будников, Г.К Зиятдинова., Г.Х. Гайсина. Электрогенерированный бром – реагент для определения антиоксидантной способности соков и экстрактов // Заводская лаборатория. 2002. Т. 68. № 9. С. 12–15.

69. И.Ф. Абдуллин, Е.Н. Турова, Г.Х. Гайсина., Г.К. Будников. Применение электрогенерированного брома для оценки интегральной антиоксидантной способности лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе // Журнал аналитической химии. 2002. Т. 57. № 6. С. 666–670.

70. Г.К. Зиятдинова. Электрохимические методы оценки интегральной антиоксидантной емкости медико-биологических объектов: дисс. … канд. хим. наук. – Казань. 2005. 187 с.

71. Н.Г. Габрук, Л.В. Тхуан, И.И. Олейникова. Определение интегральной антиоксидантной активности различных экстрактов имбиря с помощью электрохимического детектирования // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Естественные науки. 2012. № 9 (128). Выпуск 19. С. 159–162.

72. Г.Е. Султанова, М.И. Евгеньев, М.К. Герасимов. Методы оценки антиоксидантной активности виноматериалов в процессе их технологической обработки // Вестник Казанского технологического университета: Т. 14. № 6. 2011. С. 262–268.

73. М.А. Сысоева, О.Ю. Кузнецова, В.С. Гамаюрова, П.П. Суханов, Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников // Химия растительного сырья. 2005. №1. С. 41–47.

74. А.А. Лапин, М.Ф. Борисенков, А.П. Карманов, И.В. Бердник, Л.С. Кочева, Р.З. Мусин, И.М. Магдеев. Антиоксидантные свойства продуктов растительного происхождения // Химия растительного сырья. 2007. № 2. С. 79–83.

75. В.М. Мисин, Н.Г. Храпова, А.Ю. Завьялов, Е.Б. Бурлакова, А.М. Кочнев, Г.Е. Заиков. Стандартизация терминов и определений в области «антиоксиданты» // Вестник КНИТУ. 2012. № 17. С. 236–241.

76. Патент РФ № 2235998. Способ определения оксидантной/антиоксидантной активности растворов / Х.З. Брайнина, А.В. Иванова; заявитель и патентообладатель ООО «НПВП «ИВА» УрГЭУ. – Заявл. 14.11.2002, опубл. 10.09.2004. Бюл. № 25. 4 с.

77. Е.Н. Шарафутдинова. Потенциометрический метод определения динова // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2008. Т. 74. № 6. С. 9–14.

78. Е.Н. Шарафутдинова. Потенциометрия в исследовании антиоксидантной активности объектов растительного происхождения: автореф. дис. … канд. хим. наук. – Екатеринбург. 2007. 24 с.

79. Т.Г. Цюпко, О.Б. Воронова, В.В. Перекотий, З.А. Темердашев, Н.В. Храпко, Н.Е. Крутых, А.Ю. Кондарева, Е.В. Переверзева. Оценка качества коньяка по обобщающим показателям // Материалы II Всер. конф. «Аналитика России». 2007. – Краснодар. 2007. С. 475.

80. S. Chevion, M. A. Roberts, M. Chevion. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity // Free Radical Biology And Medicine. 2000. V.28. № 6. P. 860–870.

81. R. Kohen, E. Vellaichamy, J. Hrbac, I. Gati, O. Nirosh. Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues // Free Radical Biology And Medicine. 2000. V.2 8. № 6. P. 871–879.

82. Е.И. Короткова. Вольтамперометрический метод определения суммарной активности антиоксидантов в объектах искусственного и природного происхождения: дисс ... докт. хим. наук. – Томск. 2009. 400 с.

83. А.Я. Яшин, Я.И. Яшин, Н.И. Черноусова, В.П. Пахомов. Экспрессный электрохимический метод определения антиоксидантной активности пищевых продуктов // Пиво и напитки. 2004. № 6. С. 44–46.

84. А.Я. Яшин, Я.И. Яшин. Новый прибор для определения антиоксидантной активности пищевых продуктов, биологически активных добавок, растительных лекарственных экстрактов и напитков // Приборы и автоматизация. 2004. № 11. С. 45–48.

85. В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, П.А. Жандармова, С.Л. Макаревич. Влияние строения антоцианов на их антиоксидантную активность: цианидин-3-рутинозид с гидроксильной группой в положении 6 // Научные ведомости БелГу. Серия Медицина. Фармация. 2014. № 24 (195). Вып. 28. С. 60–64.

86. С.Л. Макаревич, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, В.Н. Сорокопудов. Влияние строения антоцианов на их антиоксидантную активность: 3,5-диглюкозиды относительно 3-глюкозидов // Научные ведомости БелГу. Серия Медицина. Фармация. 2014. № 24 (195). Вып. 28. С. 216–220.

87. Е.Ю. Демченкова, В.П. Пахомов. Определение антиоксидантной активности лекарственных средств, бадов и лекарственного растительного сырья // Биомедицина. 2010. № 5. С. 76–78.

88. M.L. Hitchman. Mesurement of dissolved oxygen. – Geneva.: John Wiley&Sons Inc., 1978. 255 p.

89. Г.К. Будников, В.Н. Майстренко, М.Р. Вяселев. Основы современного электрохимического анализа. – М.: Мир. 2003. 592 с.

90. М.А. Осина, В.А. Богдановская, М.Р. Тарасевич. Биоамперометрическое определение производных фенола с использованием композита лакказа-нафион // Электрохимия. 2003. Т. 39, № 4. С. 450–456.

91. B. Ge, F. Lisdat. Superoxide sensor based on cytochrome C immobilized on mixed-thiol SAM with a new calibration method // Analytica Chimica Acta. 2002. V. 454, № 1. P. 53–64.

УДК 615; 616.33; 616.34; 615.243

ГАСТРОПРОТЕКТИВНЫЕ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ВОЛОДУШКИ ЗОЛОТИСТОЙ ТРАВЫ ЭКСТРАКТА СУХОГО

Е.Н. Курманова[1]*, Е.В. Ферубко[1], Р.К. Курманов[1], И.А. Мартынчик[1]

Резюме. В статье представлены результаты изучения володушки золотистой травы экстракта сухого (ВЗТЭС) на моделях острых экспериментальных язв желудка крыс и на модели формалинового отёка лап мышей. Выявлено достоверно выраженное гастропротективное действие ВЗТЭС и дозозависимый противовоспалительный эффект. На основании проведенных экспериментов установлено, что володушки золотистой травы экстракт сухой перспективен для разработки на его основе лекарственных средств для профилактики и лечения широкого спектра заболеваний.

Ключевые слова: гастропротективное действие, противовоспалительная активность, экстракт володушки.

GASTROPROTECTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF *BUPLEURUM AUREUM* DRY EXTRACT

E.N. Kurmanova[1]*, E.V. Ferubko[1], R.K. Kurmanov[1], I.A. Martynchik[1]

Abstract. The article presents results of study of *Bupleurum aureum* grass dry extract using experimental models of acute gastric ulcer in rats and formalin-induced limb swelling in mice. A significant stomach-protective effect and dose-dependent anti-inflammatory effect of the extract were found. The results show that *Bupleurum aureum* grass dry extract is a promisinig candidate for development of therapeutic agents for prevention and treatment of a wide range of diseases.

Keywords: gastroprotective properties, anti-inflammatory properties, *Bupleurum aureum* L. extract.

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, 7

1 – National Institute of Herbal and Aromatic Plants, 7, Grina str., Moscow, 117216, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: ekaterina-ferubko@rambler.ru
Тел.: 8 (495) 388 11 00

ВВЕДЕНИЕ

Разработка и внедрение новых эффективных и безопасных лекарственных препаратов из растительного сырья, предназначенных для профилактики и лечения широкого спектра заболеваний, является актуальной задачей современной фармакологии. Перспективным объектом для разработки таких лекарственных препаратов являются растения рода володушка, известные человечеству с древнейших времен и до нашего времени активно использующиеся в народной медицине.

Большой интерес представляет володушка золотистая (длиннолистная) (*Bupleurum aureum* Fisch. seu *longifolium* L.), так как на сегодняшний день накоплена большая теоретическая база по биохимическому изучению данного растения, научно доказана его фармакологическая активность как гепатопротекторного средства, а также проведены работы по ботанико-ресурсным исследованиям (рисунок 1) [1].



Рисунок 1. Володушка золотистая (*Bupleurum aureum* Fisch. seu *longifolium* L.)

Володушка золотистая – многолетнее травянистое растение с горизонтальным корневищем, несущим в верхней части много почек. Отличается от остальных видов рода значительной высотой стебля, до 150 см, крупными листьями с сизоватым налетом на нижней стороне. Зонтики крупные, диаметром до 10 см, окружены общей обверткой из 3–5 крупных яйцевидных листочков желтого цвета. Стебель прямостоячий, обычно одиночный, гладкий или в верхней части слабоветвящийся. Плод – двусемянка гладкая, продолговато-эллиптическая, темно-коричневая. Цветет в июне – июле. Плодоносит в июле – сентябре. Растет в негустых лиственных и хвойных лесах, по лесным опушкам и оврагам, по бере-

гам рек. Встречается на Урале, в Западной и Восточной Сибири, заходит в Челябинскую, Самарскую области и Казахстан.

Трава володушки золотистой обладает желчегонной, антисептической, противовоспалительной, ранозаживляющей, жаропонижающей, тонизирующей активностью, также оказывает общеукрепляющее действие и способствует улучшению обменных процессов. Наружно володушка золотистая применяется при заболеваниях глаз и гнойничковых заболеваниях кожи [2].

В ФГБНУ ВИЛАР разработан и стандартизирован володушки золотистой травы экстракт сухой. В составе экстракта содержатся флавоноиды, сапонины, полисахариды, дубильные вещества катехиновой природы. Содержание фенольных соединений в пересчете на рутин составило 8,0±0,5% [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В отделе экспериментальной и клинической фармакологии ФГБНУ ВИЛАР проведено изучение влияния володушки золотистой травы экстракта сухого (В3ТЭС) на состояние слизистой оболочки желудка крыс в условиях острых экспериментальных язв с использованием индометациновой и этаноловой моделей [4]. В качестве препарата сравнения использовался ранитидин, известное противоязвенное средство (блокатор H_2-гистаминовых рецепторов). Также проведено изучение влияния на течение острой экссудативной фазы воспаления володушки золотистой травы экстракта сухого (В3ТЭС) на модели формалинового отёка лап мышей, где в качестве препарата сравнения использовался индометацин.

Эксперименты проводили в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики», Федеральным законом «О лекарственных средствах» (статья 36), «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Москва, 2012).

Экспериментальная работа на моделях острых экспериментальных язв выполнена на 78 нелинейных белых крысах-самцах. Производитель животных – Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Крыс содержали в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе [5].

Гастропротективные свойства экстракта володушки золотистой изучали в опытах *in vivo* при его внутрижелудочном введении крысам в течение трех дней в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг. Ранитидин (таблетки 150 мг, «Софарма», Болгария) также вводили внутрижелудочно в течение трех дней в дозе 100 мг/кг. Для воспроизведения патологического состояния слизистой оболочки желудка использовали следующие экспериментальные модели язвообразования:

- однократное введение крысам этанола 95–96% в дозе 1,0 мл/крысу с последующим забоем крыс через 1 час после введения этанола;
- однократное введение крысам индометацина в дозе 30 мг/кг с последующим забоем крыс через 24 часа после введения индометацина (таблетки 25 мг, «Софарма», Болгария).

Все препараты вводили крысам внутрижелудочно при помощи зонда в утренние часы, за 1 час до кормления; В3ТЭС, ранитидин – в виде суспензии в 1% крахмальном клейстере.

После забоя крыс желудок и двенадцатиперстную кишку извлекали. Желудок (по большой кривизне) и двенадцатиперстную кишку разрезали и промывали в физиологическом растворе. Затем при помощи микроскопа бинокулярного стереоскопического МБС-10 (увеличение 1, миллиметровая шкала) производили подсчет количества и площади язвенных поражений слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, вычисляли индекс Паулса (ИП) и терапевтический эффект (ТЭ – отношение величины ИП контрольной группы к ИП опытной). Изменение величины ИП контрольной группы по отношению к ИП опытной группы до 2 и более единиц свидетельствует о наличии гастропротективной активности у исследуемого вещества [6].

Проведено изучение влияния на течение острой экссудативной фазы воспаления володушки золотистой травы экстракта сухого (В3ТЭС) на модели формалинового отёка лап мышей. В эксперименте использовались белые нелинейные мыши в количестве 40 особей массой 19–20 г. Производитель животных – Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Мышей содержали в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Животным в апоневроз вводили 0,1 мл 1% формалина. Исследование противовоспалительной активности экстракта проводили в дозах 10 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг при введении его внутрижелудочно в течение пяти дней до введения формалина и через 1 час после. Препаратом-референтом являлся индометацин – известное противовоспалительное средство (таблетки 25 мг, «Софарма», Болгария) в дозе 5мг/кг, его также вводили внутрижелудочно в течение пяти дней до введения формалина и через 1 час после [7]. Контрольным животным вводили в эквивалентном объёме дистиллированную воду. Экстракт растворялся в дистиллированной воде, а индометацин – в 1% крахмальном клейстере. Через три часа на пике воспаления животных забивали с помощью углекислого газа и регистрировали прирост объёма экссудата ампутированных конечностей мышей (мг). О развитии отёка

судили по разнице в массе у контрольных и опытных животных и рассчитывали противоэкссудативный эффект по формуле:

$$\% \text{ угнетения отёка} = P_к - P_о/P_к \times 100,$$

где $P_к$ – разность масс лапок с отёком и без отёка у животных контрольной группы; $P_о$ – разность масс лапок с отёком и без отёка у животных опытной группы.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (Stat Soft, США). Достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна – Уитни [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные экспериментов приведены в таблицах 1–3.

Изучение гастропротективной активности В3ТЭС и ранитидина на этаноловой модели поражения слизистой желудка, в которой регистрируются измене-

Таблица 1.

Влияние В3ТЭС и ранитидина на экспериментальные язвы желудка крыс, вызванные введением этанола

Группа животных (доза, мг/кг)	Крысы с язвами, %	Среднее количество язвенных дефектов	Индекс Паулса, отклонение в %	ТЭ	Средняя площадь язвенной поверхности	Индекс Паулса, отклонение в %	ТЭ
Интактные	0	0	0	0	0	0	0
Этанол	100	8,16±1,7	8,16	–	22,07±3,08	22,07	-
Контроль (интактные+ В3ТЭС 10)	0	0	0	0	0	0	0
В3ТЭС 10 + этанол	80	3,6±1,5*	2,88 –64,7%	2,83	3,53±1,62*	2,82 –87,2 %	7,82*
Контроль (интактные+ В3ТЭС 100)	0	0	0	0	0	0	0
В3ТЭС 100 + этанол	66,7	3,0±1,0*	2,0 –75,5%	4,08	4,57±0,79*	3,04* –86,23 %	7,25*
Контроль (интактные+ ранитидин 100)	0	0	0	0	0	0	0
Ранитидин 100 + этанол	100	2,5±0,5*	2,5 –5,6%	3,26	5,14±0,79*	5,14* –76,7 %	4,29*

Примечание: * – различия статистически достоверны по сравнению с контролем при p≤0,5.

Таблица 2.

Влияние В3ТЭС и ранитидина на экспериментальные язвы желудка крыс, вызванные введением индометацина

Группа животных (доза, мг/кг)	Крысы с язвами, %	Среднее количество язвенных дефектов	Индекс Паулса, отклонение в %	ТЭ	Средняя площадь язвенной поверхности	Индекс Паулса, отклонение в %	ТЭ
Интактные	0	0	0	0	0	0	0
Индометацин	100	7±3,27	7,0	–	12,26 ± 2,57	12,26	–
Контроль интактные + В3ТЭС 10	0	0	0	0	0	0	0
В3ТЭС 10 + индометацин	100	2,33±0,47*	2,33 –70,5%	3,0	1,35±0,27*	1,35 –89%	9,08*
Контроль интактные + В3ТЭС 100	0	0	0	0	0	0	0
В3ТЭС 100 + индометацин	66,7	1,75±0,43*	1,16 –83,4%	6	0,76±0,3*	0,5 –96%	24,52*
Контроль интактные + ранитидин 100	0	0	0	0	0	0	0
Ранитидин 100 + индометацин	100	6,17±1,07*	6,17 –11,7%	1,13	3,76±0,76*	3,76 –69,3 %	3,26*

Примечание: * – различия статистически достоверны по сравнению с контролем при p≤0,5.

ния через 1 час после воздействия (таблица 1), показало, что ранитидин защищает слизистую желудка от поражающего фактора этанола, происходит уменьшение площади язв на 76,7%, ТЭ=4,29 (P>0,05). В дозе 10 мг/кг В3ТЭС также оказывает достоверный выраженный гастропротективный эффект, происходит уменьшение площади язв на 87,2%, ТЭ=7,82 (P<0,05). С увеличением дозы до 100 мг/кг гастропротективный эффект В3ТЭС не увеличивается, то есть не наблюдается выраженный дозозависимый эффект, происходит уменьшение площади язв на 86,23%, ТЭ=7,25 (P<0,05). Таким образом, экстракт володушки лучше защищает слизистую желудка от поражающего фактора этанола, чем ранитидин.

Изучение гастропротективной активности В3ТЭС и ранитидина на индометациновой модели поражения слизистой желудка, в которой регистрируются изменения через 24 часа после воздействия, показало, что ранитидин защищает слизистую желудка от поражающего фактора индометацина, происходит уменьшение площади язв на 69,3%, ТЭ=3,26 (P<0,05). При введении В3ТЭС в дозе 10 мг/кг проявляется выраженный гастропротективный эффект, происходит уменьшение площади язв на 89%, ТЭ=9,08 (P<0,05). С увеличением дозы до 100 мг/кг гастропротективный эффект В3ТЭС увеличивается, происходит уменьшение площади язв на 96%, ТЭ=24,52 (P<0,05). На индометациновой модели поражения слизистой желудка экстракт володушки лучше защищает слизистую желудка, чем ранитидин.

Таблица 3.

Влияние володушки золотистой травы экстракта сухого на течение экссудативной фазы воспаления у мышей при пятидневном введении

Препарат	Доза, внутрь, мг/кг	Прирост объема экссудата на пике воспаления, мг	Противо-воспалительный эффект, % к контролю
Контроль	–	38.3±4,65	–
В3ТЭС	10	34,1±5,52	11
	50	34,5±5,6	10
	100	24,6±1,6*	35,8*
Индометацин	5	20,80±4,2	45,69

Примечание: * – различия статистически достоверны по сравнению с контролем при p≤0,5.

Как видно из таблицы 3, экстракт при пятидневном введении обладает дозозависимым противовоспалительным эффектом. В дозе 10 мг/кг и 50 мг/кг экстракт обладает незначительным противовоспалительным эффектом, а в дозе 100 мг/кг достоверно подавляет развитие экссудативной фазы воспаления, вызванной формалином, на 35,8% по сравнению с контрольной группой животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В условиях экспериментальных моделей язв желудка крыс, вызванных введением этанола и индометацина, выявлено достоверно выраженное гастропротективное действие В3ТЭС, проявляющееся уже в дозе 10 мг/кг и превышающее гастропротективную активность ранитидина.
2. Проведенные фармакологические исследования показали, что экстракт володушки золотистой при пятидневном введении обладает дозозависимым противовоспалительным эффектом. В дозе 10 мг/кг и 50 мг/кг препарат обладает незначительным противовоспалительным эффектом, а в дозе 100 мг/кг достоверно подавляет развитие экссудативной фазы воспаления, вызванной формалином, на 35,8% по сравнению с контрольной группой животных, но уступает противовоспалительному действию индометацина.
3. На основании проведенных экспериментов володушки золотистой травы экстракт сухой перспективен для разработки на его основе лекарственных средств для профилактики и лечения широкого спектра заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Р.М. Баширова, Р.С. Мингазов, А.М. Мингажаева. Применение растений рода володушка (*Bupleurum*) в гепатологии // Практическая фитотерапия. 2003. № 3. С. 4–6.
2. А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. Дикорастущие полезные растения России. – СПб.: СПФХА, 2001. 663 с.
3. Ю.С. Канунникова. Фармакогностическое изучение и стандартизация травы и экстракта сухого володушки золотистой (*Bupleurum aurei* Fisch.): дис. … канд. фарм. наук. – М., 2014.
4. А.И. Багинская, Е.В. Ферубко, Е.Н. Курманова, И.В. Воскобойникова, В.К. Колхир, Н.И. Сидельников. Экспериментальное моделирование в гастроэнтерологии. Практические рекомендации. Ч. 3. Экспериментальные модели язв желудка, вызванных нестероидными противовоспалительными препаратами и некротирующими агентами // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016. № 4. С. 36–39.
5. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Страсбург, 18 марта 1986 года.
6. Г.В. Оболенцева, С.В. Гладченко, И.Г. Бутенко. К механизму ульцерогенного действия нестероидных противовоспалительных средств // Актуальные вопросы клинической фармакологии. Тезисы докладов XV конференции по клинической фармакологии с международным участием. Волгоград. 1990. С. 96–97.
7. Ф.Н. Тринус. Методы скрининга и фармакологического изучения противовоспалительных, анальгезирующих и жаропонижающих веществ. – Киев. 1974. 28 с.
8. В.П. Боровиков. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA. – М.: Горячая линия. Телеком, 2014. 288 с.

УДК 615.273.53; 547.587.51; 615.322; 544.165

ПРИРОДНЫЕ КОВАЛЕНТНО КОМБИНИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 2Н-1-БЕНЗОПИРАН-2-ОНА

А.З. Абышев[1], К.Б. Нгуен[1]*

Резюме. Кумарины, известные как производные 2Н-1-бензопиран-2-она (или 2Н-хромен-2-она), присутствуют в значительных количествах в растениях, они также обнаружены в микроорганизмах и продуктах животного происхождения. Структурное разнообразие, найденное в этом семействе соединений, привело к их разделению на различные классы, от простых кумаринов до разных видов полициклических кумаринов, обладающих чрезвычайно важной фармакологической активностью. В данной работе представлены результаты полного анализа отечественной и иностранной литературы в области исследования ковалентно комбинированных производных 2Н-1-бензопиран-2-она природного происхождения. При этом показано, что в настоящее время исследователи уделяют исключительное внимание данному клас¬су соединений исходя из многих точек зрения и интенсивно расширяют области их практического применения, особенно при профилактике и лечении заболеваний сердечно-сосудистой и иммунной системы организма.

Ключевые слова: кумарины, природные комбинированные кумарины, лекарственные прерараты, «структура – активность».

NATURAL COVALENTLY COMBINED DERIVATIVES OF 2H-1-BENZOPYRAN-2-ONE

A.Z. Abyshev[1], C.B. Nguyen[1]*

Abstract. Coumarins, known as 2H-1-benzopyran-2-one (or 2H-chromen-2-one), are present in remarkable amounts in plants, also have been detected in microorganisms and animal sources. The structural diversity found in this family of compounds led to the division into different categories, from simple coumarins to many other kinds of polycyclic coumarins, which possess extremely important pharmacological activity. This paper presents the results of a full analysis of domestic and foreign literature in the field of research on the combined covalent derivatives 2H-1-benzopyran-2-one of natural origin. It is shown that at the present time, researchers are paying extraordinary attention to this class of compounds, based on the many points of view and actively expand the area of their practical application, especially in the prevention and treatment of diseases of the cardiovascular and immune systems.

Keywords: coumarins, combined natural coumarins, drugs, «structure – activity» relationship.

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

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

* адресат для переписки:
E-mail: nguyencongbang.ru@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Природные кумарины и их многочисленные производные являются гетероциклическими соединениями, в основе химического строения которых лежит скелет кумарина. Сюда также относят фурокумарины и пиранокумарины, 4-фенилкумарины (или неофлавоноиды), терпеноидные кумарины, лигнанокумарины и множество других природных соединений, содержащих в своих структурах ядро кумарина. Кумарины характерны в основном для растений семейств сельдерейных, рутовых, бобовых и др. В них они находятся преимущественно в свободном виде и очень редко – в форме гликозидов [1, 2].

В зависимости от химического строения кумарины обладают широким спектром уникального биологического действия: спазмолитической, капилляроукрепляющей, кураreподобной, успокаивающей, мочегонной, противоглистной, обезболивающей, противомикробной активностью и др. [1, 3]. Некоторые из них стимулируют функции центральной нервной системы, понижают уровень холестерина в крови, препятствуют образованию тромбов в кровеносных сосудах и способствуют их растворению. Имеются кумарины, повышающие чувствительность кожи к ультрафиолетовым лучам (их используют для лечения лейкодермии), обладающие спазмолитическим и коронарорасширяющим действием, ускоряющие заживление язв, стимулирующие дыхание и повышающие артериальное давление [2, 3]. Некоторые кумарины и фурокумарины задерживают деление клеток и поэтому обладают противоопухолевой активностью. Наиболее выражено это у некоторых кумаринов и фурокумаринов, например остола, пейцеданина, ксантотоксина, прангенина и др. [1–3].

Необходимо отметить, что, хотя первое вещество – родоначальник данного ряда 2Н-1-бензопиран-2-он (кумарин) – выделен

H.A.Vogel [4] из *Coumarouna odorata* (*Dipteryx odorata*) более 196 лет тому назад, химия и фармакология соединений кумаринового ряда получила интенсивное развитие лишь в течение последних 15–20 лет. Это связано с тем, что в последние годы все большее число крупнейших химиков-биооргаников и фармакологов различных стран направляют свои усилия на развитие этой интереснейшей области химии природных соединений, используя при этом самые современные методы исследования физической и органической химии: все разновидности хроматографии, спектроскопии, классической биоорганической химии и рентгеноструктурного анализа. За это время учеными различных стран было выделено и изучено более 2500 индивидуальных соединений данного ряда, многие из них получены встречным синтезом, что чрезвычайно важно при внедрении их субстанций в практическую медицину и организации производства лечебных препаратов [5–7].

В связи с тем, что более подробная информация по химии и фармакологии различно замещенных производных кумарина представлена в некоторых монографиях профессора А.З. Абышева с соавторами [8–12], в данной статье мы рассматриваем только данные последних лет по ковалентно комбинированным производным кумарина, встречающимся в растениях и микроорганизмах.

Природные комбинированные производные 2-Н-1-бензопиран-2-она (кумарина)

Следует отметить, что в зависимости от конденсации цикла кумарина с другими гетероциклами (фурановым, пирановым и их дигидроаналогами) и степени замещенности (алифатическими или циклическими заместителями) данного ядра в растениях и микроорганизмах встречается ряд ковалентно комбинированных димерных и тримерных производных кумарина, обладаю-щих чрезвычайно важной фармакологической активностью [1, 3, 13]. Некоторые из таких соединений представлены на рисунке 1.

Простые кумарины, как природные соединения, обладают ароматным запахом, характерным для многих растений. Они широко распространены в растительном мире, особенно в представителях более чем 30 семейств, например сельдерейных (Apiaceae), рутовых (Rutaceae), включающих приблизительно 150 видов растений. Очевидно поэтому, что почти все имеющиеся в литературе обзорные работы в основном посвящены исследованию именно этих семейств. Однако в настоящее время производные кумарина обнаружены в растениях других семейств: Leguminosae, Saxifragaceae, Solanaceae, Olceaceae, Guttiferae, Thymelaeceae, Compositae, Orchidaceae, Graminaceae, Myrtaceae, Melastomaceae, Rosaceae, Araliaceae, Acanthaceae,

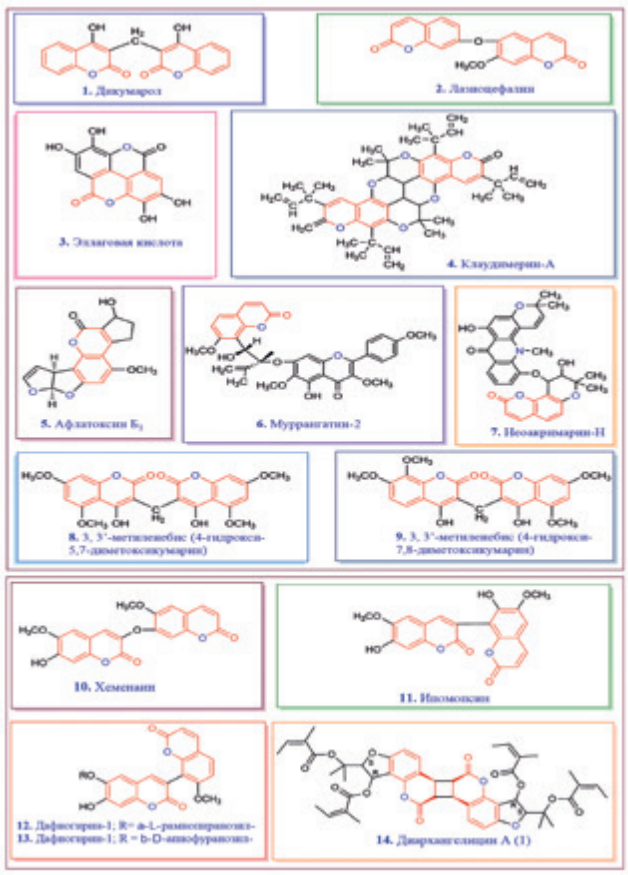


Рисунок 1. Структуры некоторых ковалентно комбинированных производных кумарина, найденных в растениях и микроорганизмах

Carifoliaceae, Rubiaceae, Apocynaceae, Polypodiaceae, Casuarrinaceae, Betulaceae, Fagaceae, Nymphaeaceae, Dipterocarpaceae, Theaceae, Hamamelidaceae – и микроорганизмах: *Streptomyces chartreuse, Streptomyces viridis, Streptomyces niveus, Aspergillus flavus, Aspergillus melleus, Aspergillus ochraceus, Penicillum canescens* и др. [1–4].

Комбинированные с другими гетероциклическими соединениями кумарины часто встречаются в растениях семейства Rutaceae, Thymelaeaceae и Myrtaceae [14–19]. Например, из корней *Citrus paradise* Macf. недавно выделена целая группа комбинированных кумаринов, названных неоакримаринами (акридонкумаринами) [18], в плодах *Murraya exotica* L. найдены комбинированные кумарины – муррангатины 1 и 2 (флавоноидокумарины) [19], а в корнях *Citrus hassaku* обнаружены новые производные кумарина, имеющие октациклическую структуру (клаудимерин-А и -В) [17]. В данном семействе встречаются и другие производные кумарина, но с более простой структурой (фебалин и кетанин) (рисунок 2).

В растениях семейства Myrtaceae преимущественно распространены производные эллаговой кислоты [16], а для Guttiferae и Clusiaceae характерны 3- или 4-алкил- и фенилкумарины (рисунок 3).

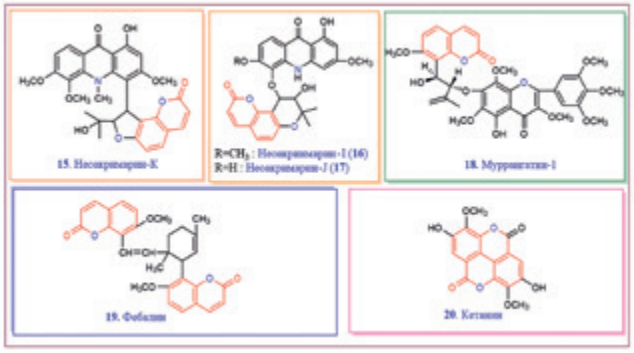


Рисунок 2. **Структуры некоторых неоакримаринов**

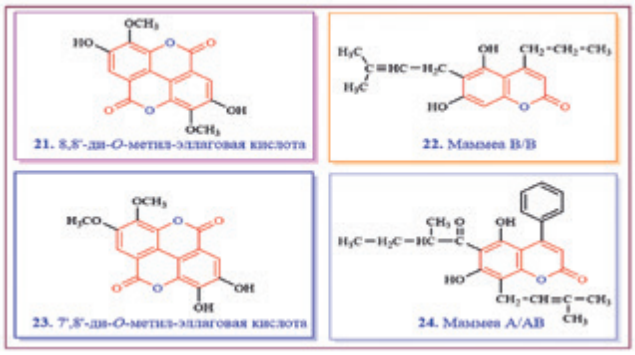


Рисунок 3. **Структуры производных эллаговой кислоты и алкилкумаринов**

Комбинированные производные 4-гидроксикумарина встречаются в растениях и микроорганизмах. Например, многие природные антибиотики кумаринового ряда, такие как новобиоцин (**25**), клоробиоцин (**26**) и коумерацин А1 (рисунок 4), получены из различных видов Streptomyces. Все они обладают противоопухолевой активностью, которая обусловлена наличием в их молекулах углеводного компонента новиозила. Это семейство антибиотитиков оказывает антибактериальное действие путем ингибирования ДНК-топоизомеразы типа II и ДНК-гиразы. Удаление карбамоильной группы из молекулы новобиоцина или его перенесение к 2-гидроксильной группе новобиозы приводит к полной потере активности [20, 21]. Тем не менее замена карбамоильной группы 5-метил-2-пирролилкарбамоильной группой, которая присутствует в структуре коумерацина, приводит к увеличению антибактериальной активности в отношении ДНК-гиразы в 10 раз в обоих антибиотиках. Аминокумариновые антибиотики новобиоцин и клоробиоцин содержат фрагмент 3-амино-4,7-дигидроксикумарина (ADHC), который находится на одной плоскости L-новиозы, а на другой плоскости – фрагмент 3-диметилаллил-4-гидроксибензоила (DMAHB). Оба, ADHC и L-новиоза, имеют важное значение для антибактериальной активности рассматриваемых антибиотиков, и заместители, присоединенные к этим фрагментам, оказывают значительное влияние на их биологическую активность.

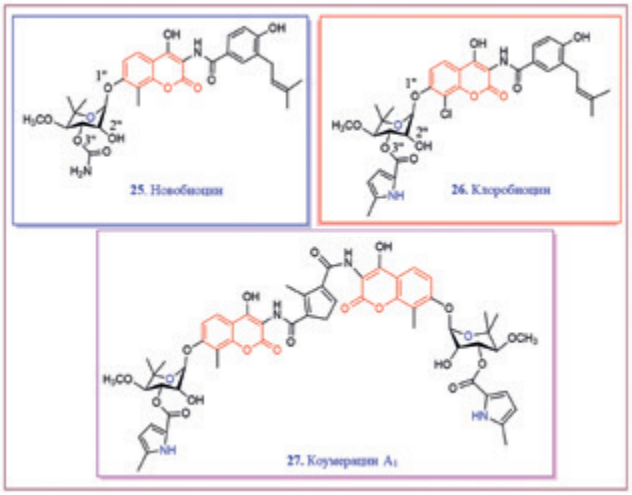


Рисунок 4. **Структуры и стереохимия новобиоцина (25), клоробиоцина (26) и коумерацина A_1 (27)**

Рентгеноструктурное исследование антибиотик-ферментных комплексов показал, что каждый из этих фрагментов – и ADHC и L-новиоза – участвуют в процессе связывания антибиотиков с B-субъединицей ДНК-гиразы [22].

Димерные кумарины альтернариолового типа – веррулактоны А и Б (рисунок 5) выделены из культуры грибов *Penicillium verruculosum* F375. Они, в отличие от производных 4-гидроксикумарина, активно и селективно ингибируют редуктазу *Staphylococcus aureus* в концентрации 1,41 μM и IC50 = 0,92 соответственно. Также показано, что антибактериальная активность веррулактонов А и Б против S. aureus, включая MRSA с MICs, находится в интервале от 8 до 16 мг/мл соответственно [23] (рисунок 5).



Рисунок 5. **Структуры веррулалактонов А и Б**

В последние годы в некоторых растениях были обнаружены новые типы комбинированных дикумаринов, например бискоумастехамин, выделенный из корней *Stellera chamaejasme* (или «Ланга Дю», применяемый в китайской народной медицине), в котором две молекулы кумарина связаны между собой непосредственно в положениях 8-6' [24]. Книдимонал и

книдимарин выделены из традиционной китайской лекарственной травы *Cnidium monnieri* [25]. В них две молекулы кумарина связаны между собой в положениях 8–8′ и 8–5′ соответственно. При изучении химического состава растений *Fatoua pilosa* были выделены новые дикумарины: (+)-фатоуанин G и -фатоуанин H, в которых две молекулы замещенных кумаринов связаны между собой через кислородный мостик [26] (рисунок 6).

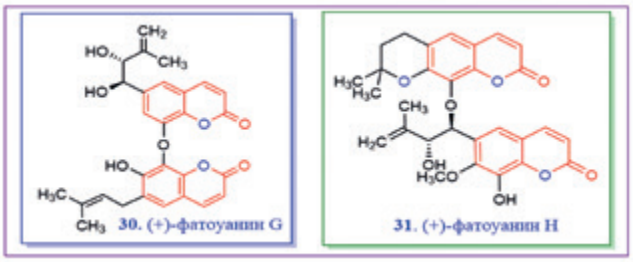


Рисунок 6. Структуры комбинированных кумаринов: (+)-фатоуанинов G и H

Обычно природа связи в таких дикумаринах формируется между двумя простыми кумаринами или пиранокумаринами в линейно-линейной или линейно-ангулярной форме через кислород, метиленовой или другие группы. Например, для дикумарола связывающей единицей является -C-3-CH_2-C-3′.

Однако в растительном мире много дикумаринов, которые связаны через C-8 одной единицы кумарина с C-3, C-5, C-6, C-7 или C-8 другой единицы кумарина.

Например, в трех основных комбинированных кумаринах – эдгеворине (EDN) (32), эдгеворозиде A (EdeA) (**32**) и эдгеворозиде C (EdeC) (**34**) (см. рисунок 7), изолированные из *Edgeworthia chrysantha* L., кумариновые циклы связаны между собой через связи C-3 – 0 – C-7 и C-8 – C-8′. При испытании указанные соединения

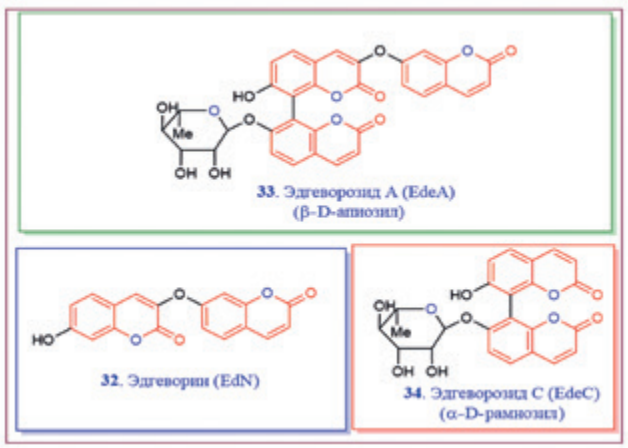


Рисунок 7. Структуры эдгеворина и эдгеворозидов A и C

32-34 проявляли противовоспалительное и обезболивающее действие. Результаты исследования показали, что EDN и ЭдеA проявляют противовоспалительное действие при p<0,05–0,01, а обезболивающее – при p<0,001, в то время как EdeC показывал только обезболивающий эффект [20].

Недавно один из производных 4-гидроксикумарина сесквитерпеноидного типа – пренилфурокумарин (**35**) был выделен из *Ferula ferulaeoides*, в котором гидроксильная группа в положении 4 связана с пренильной боковой цепью в положении 3, формируя при этом фурановый цикл [27]. Гидроксильная группа в 4-м положении может также формировать хромонокумарин в 3,4-положениях, как, например, фрутинон A (**36**) (рисунок 8), выделенный из *Polygala fruticosa*. Фрутинон A проявляет выраженную противобактериальную активность и представляет большой интерес для медицинской практики [28].

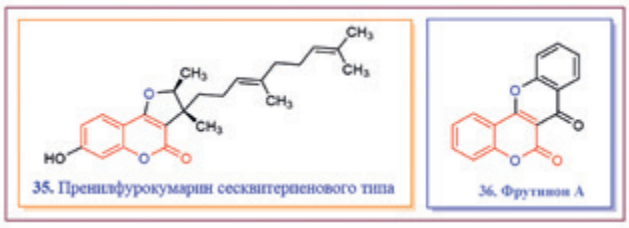


Рисунок 8. Структуры пренилфурокумарина и хромонокумарина (фрутинона A)

Два димерных монотерпеновых производных, связанных с глюкозидом кумарина, – паратримерины A (**37**) и B (**38**) – были выделены из корней и стеблей *Paramignya trimera* (Олив.) Guill., Rutaceae, собранных в провинции Кханьхоа, Вьетнам [29]. Стебли и корни данного растения применяются в народной медицине для лечения заболеваний печени, особенно при циррозе. Соединение 37 состоит из двух 7-O-β-D-глюкопиранозидов кумарина, связанное в положениях 6,6 через 1,3,4,4-тетразамещенного циклогексена, в качестве монотерпеновый мостик, тогда как соединение 38 представляет собой β-D-апиофуранозил (1 → 6)-β-D-глюкопиранозил производнымм (рисунок 9).

В данном случае комбинированные соединения **37** и **38** являются первыми монотерпенами, связанными с кумарином в виде гликозидов – бискумаринов, выделенных из растений.

Каланолиды – дипиранокумарины, широко представленные в различных видах *Calophyllum* L. Это новый класс пиранокумаринов ненуклеозидного типа, ингибиторов транскриптазы (NNRTIs) ВИЧ-1. Они относятся к трем основным структурным типам: (a) тетра-

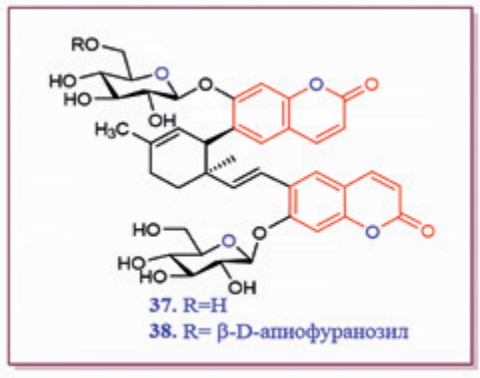


Рисунок 9. Структуры паратримеринов А (37) и В (38)

циклические дипиранокумарины, в которых у кольца С имеется гемдиметильная группа, такая как у (+)-каланолида А (**39**); (б) тетрациклические дипиранокумарины с полностью измененными пирановыми циклами С и D, то есть гемдиметильная группа присутствует в кольце D, как в (+)-псевдокордатолиде С (**40**); (с) трициклические пиранокумарины, такие как калофиллолид (**41**), который содержит нециклическую цепь, эквивалентную циклу D в структуре каланолида. Отдельные представители данной группы веществ содержат в положении 4 лактонного цикла такие группы заместителей, как метильная, пропильная или фенильная, подобно калофиллолиду (рисунки 10 и 11).

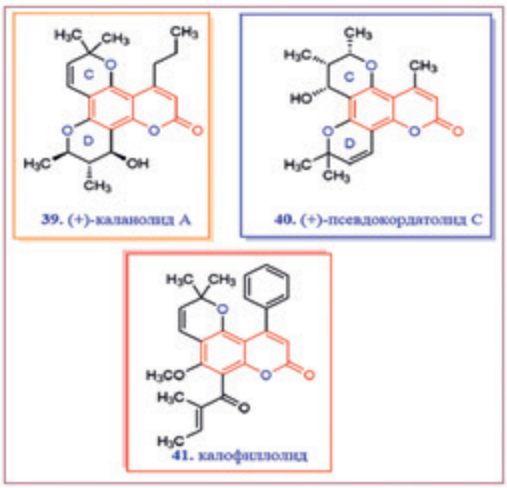


Рисунок 10. Структуры (+)-каланолида А (39), (+)-псевдокордатолида С (40) и калофиллолида (41)

Два диастереомерных тетрациклических комбинированных кумарина – каланолид A_1 (**43**) и каланолид B_2 (остатолид) (**44**), выделенных из *Calophyllum lanigerum*, также оказались ингибиторами обратной транскриптазы ВИЧ-1 [30]. Они проявляют новый механизм ингибирования RT в двух различных шаблонах: праймера системы рибосомальной РНК и гомополимерного поли(rA)-oligo(dT)12-18 [30].

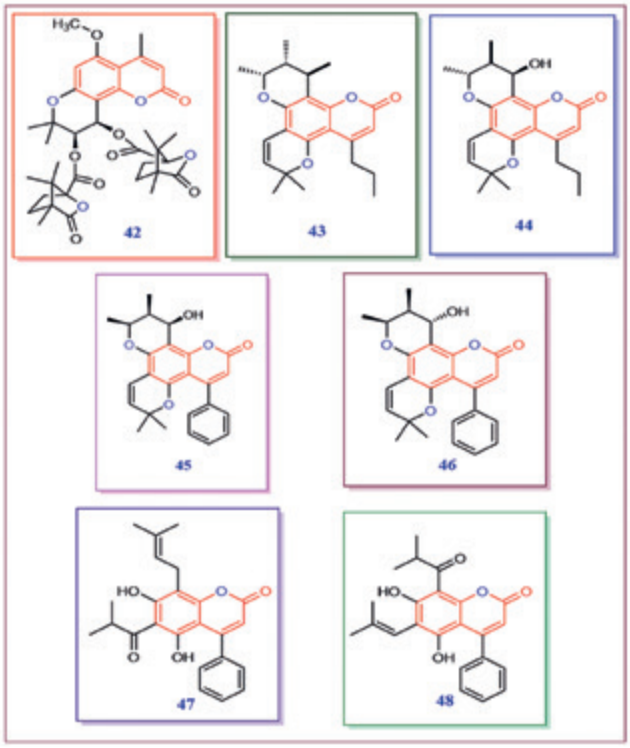


Рисунок 11. Структуры некоторых тетрациклических комбинированных кумаринов, выделенных из *Calophyllum lanigerum* и *Calophyllum ionophyllum*

Представители другой группы тетрациклических комбинированных пиранокумаринов, выделенных из *Calophyllum ionophyllum*, способны более активно ингибировать транскриптазы ВИЧ-1. Они, (**45**) и (**46**), имеют другую стереохимию (см. рисунок 11) [30]. Необходимо отметить, что исследования взаимосвязи **«структура – активность»** показывают, что в их молекулах в положении С-4 должны быть более объемные заместители, а в кольце хроманола в положениях С-10 и С-11 необходимо наличие метильных групп в транс-диаксиальной конфигурации и оба требуют акцептора водородной связи в положении С-12. В случае каланолидов гидроксильная группа при С-12 должна быть в S-конфигурации [31].

Таким образом, можно заключить, что (+)-каланолид А, выделенный из *Calophyllum lanigerum austrocoriaceum*, обладает выраженной избирательной антиВИЧ-активностью. Проведенные исследования показали, что транс-ориентация заместителей (метильных групп) в положениях 10, 11 и 12 β-ОН насыщенного кольца D имеет важное значение для биологической активности (+)-каланолида А, который в настоящее время находится в фазе II клинических испытаний. Однако его содержание в растительном сырье не обеспечивает практических нужд. Поэтому в настоящее время осуществлен полный синтез рацемического каланолида А и его оптически активного изомера – (+)-каланолида.

Также были выполнены структурные модификации (+)-каланолида А. Однако пока не найдены соединения, которые показали бы антиВИЧ-1-активность выше исходного каланолида. Хотелось бы надеяться, что каланолид А будет многообещающим антиВИЧ-препаратом в ближайшем будущем.

Совсем недавно в литературе появилось сообщение [32] о выделении из австралийского эндемичного вида *Geijera parviflora* (Rutaceae) двух новых производных умбеллиферона – парвифлоранина А (**49**) и парвифлоранина В (**50**), обладающих необычным 11-углеродным скелетом, связанным с аминокислотами. Как видно из нижепредставленных структур, рассматриваемые соединения **49** и **50** являются аналогами известного противоракового препарата гейпарварина (**51**) (рисунок 12).

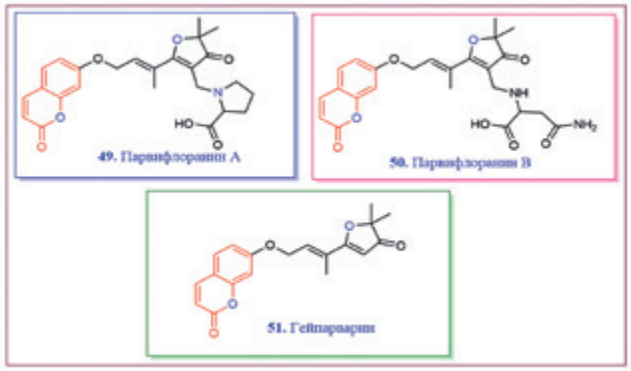


Рисунок 12. Структуры некоторых производных умбеллиферона

Димер 7-изопентенилоксикумарина **(52)** (рисунок 13) был выделен из надземных частей *Haplopappus deserticola* [1, 12].

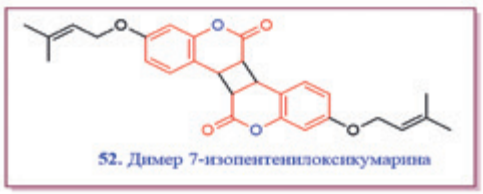


Рисунок 13. Структура димера 7-изопентенилоксикумарина (52)

При изучении фармакологических свойств *in vivo*, димер 7-изопентенилоксикумарина **(52)** показал химическую защиту в ответ на инфекции, вызванные фитопатогенными грибами, поскольку он специфически биосинтезируется после грибковой обработки раздражителя (**elicitor**) *in vitro* [1, 33]. Он эффективно затормозил рост человеческой патогенной плесени *Epidermophyton floccosum* в концентрации 10 μг/мл, так что можно сопоставить его потенциал с потенциалом **миконазола** [34]. Когда тестировали его в качестве антимутагенного и противоопухолевого агента, его активность оказалось обыкновенной: он давал защиту только на 19–36% от мутации, вызванной **бензо-α-пиреном (не замещенным кумарином)**, у *Salmonella typhimurium* штамма TA 100, и значения IC_{50} цитостатической активности против клеточных линий NSCLC-N6 (человеческий носоглоточный рак) и KB (человеческая эпидермоидная карцинома) были 10.6 и 9.9 μг/мл соответственно [34].

По сравнению с фурокумаринами, имеющими прениловую цепь в пятом положении, 8-геранилоксифурокумарины менее распространены в природе. Наиболее интересным из них является бергамоттин (BG) **(53)**, два его насыщенных кислородом производных – 6′,7′-эпоксибергамоттин (EBG) **(54)** и 6′,7′-дигидроксибергамоттин (DHB) **(55)** – и три димера, которые известны в литературе под названиями **парадизины** A **(56)**, B **(57)** и C **(58)** (рисунок 14). Все ими изобилуют различные виды рода *Citrus* (в частности, сок грейпфрута) [35], также они обнаружены в *Ferulago* [36] и *Glehnia* [37].

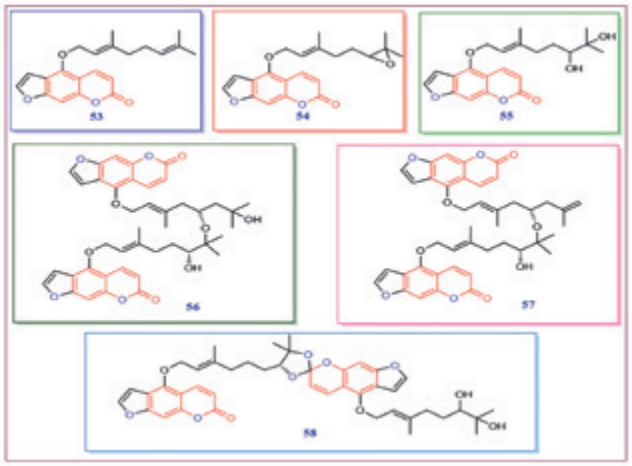


Рисунок 14. Структуры некоторых 5-геранилоксифурокумаринов

Совсем недавно в литературе появилась статья [38], в которой сообщается о выделении из этилацетатного экстракта кожицы плодов *Citrus hystrix*, наряду с другими компонентами **(59, 60, 60a и 61a)**, нового диглюкозида, названного **цитрусозидом-О (61)**. Последний представляет собой бесцветную жидкость ($[a]_D$ – 19,0 (c, 0,06, MeOH)) и имеет достаточно сложную структуру (рисунок 15, **61**), а именно является конъюгатом диоксипроизводного пренилфуранокумарина (оксипейцеданина) с 3-гидрокси-3-метилглутаровой кислотой и диглюкозидом 7-оксикумарина (умбеллиферона). Некоторые из выделенных соединений оценивали на ингибирующую активность в от-

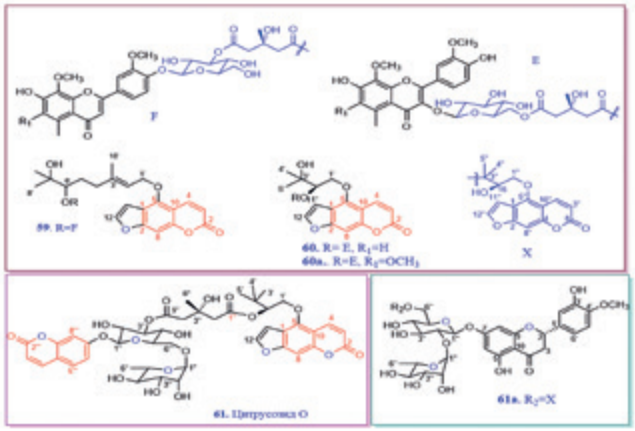


Рисунок 15. Структуры некоторых комбинированных соединений, выделеных из экстракта кожицы плодов Citrus hystrix

ношении холинэстеразы, но только конъюгат 3-O-β-D-глюкопиранозил-3,5,7,4′-тетрагидрокси-6,8,3′-триметоксифлавонола с пренилфуранокумарином-HMGA (**59**) показал высокую активность.

Два геракленоловых производных, а именно O-[b-D-апиофуранозил-(1,6)-D-глукопиранозил]-геракленол **(62)** и соответствующий эфир **(63)**, были выделены из *Heracleum rapula* [39] (рисунок 16).

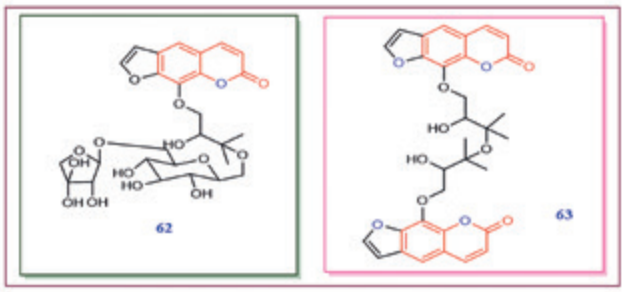


Рисунок 16. Структуры соединений 62 и 63

В процессе тестирования соединений **62** и **63** против скопления тромбоцитов было установлено, что они менее активны, чем геракленол. Другие, более сложные димерные фурокумарины были найдены в *Pleurospermum rivulorum* [ривулобирин **(64)**, C **(65)**, D **(66)]** [40, 41] и в *Heracleum candidans* [кандиканин **(67)]** [42] (рисунок 17).

Афлатоксины (микотоксины) по своим структурным особенностям также принадлежат к группе ковалентно комбинированных фурокумаринов [1, 20], поскольку все они содержат ядро кумарина, сконденсированное с фурановым циклом (рисунок 18).

В настоящее время к группе афлатоксинов, кроме основных их представителей – афлатоксинов $Б_1$, $Б_2$, $Г_1$ и $Г_2$, относят ряд их производных (афлатоксины M_1, M_2, $Б_{2a}$, $Г_{2a}$, ГМ, P_1, Q и др.) (рисунок 19), выделенных из различных природных источников. В отличие от других производных кумарина афлатоксины главным образом продуцируются грибами рода *Aspergillus*.

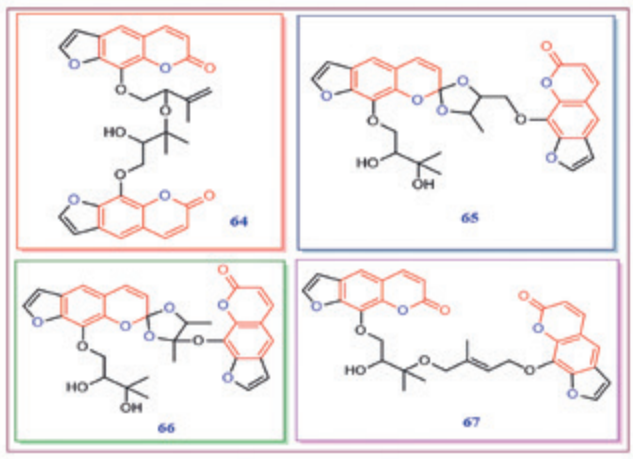


Рисунок 17. Структуры димерных фурокумаринов 64-67

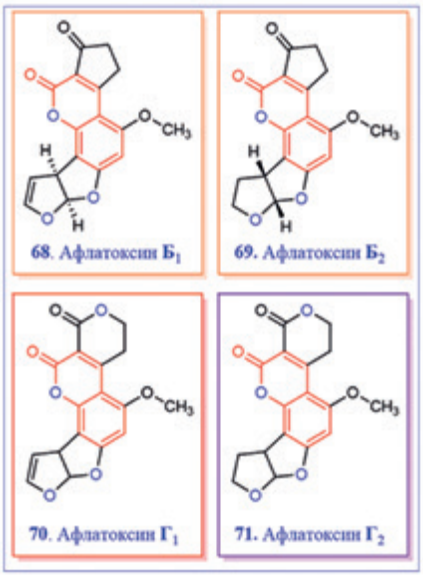


Рисунок 18. Структуры афлатоксинов $Б_1$, $Б_2$, $Г_1$ и $Г_2$

К настоящему времени, кроме арахиса, афлатоксины найдены в пшенице, кукурузе, ячмене, рисе, овсе, горохе, в различных орехах, бобах, зернах, какао, кофе, в семенах хлопка, в копчёной и сушеной рыбе, а также в некоторых овощах [1–12, 19]. Очевидно, это объясняется тем, что различные виды рода *Aspergillus* (*A. flavus, A. effusus, A. pasiticus*) широко распространены на пищевых продуктах. Поэтому, вероятно, загрязнение указанных продуктов, в первую очередь арахиса, афлатоксинами является следствием как климатических условий, так и практики сбора и хранения урожая, так как установлено, что основными факторами, влияющими на образование афлатоксин-

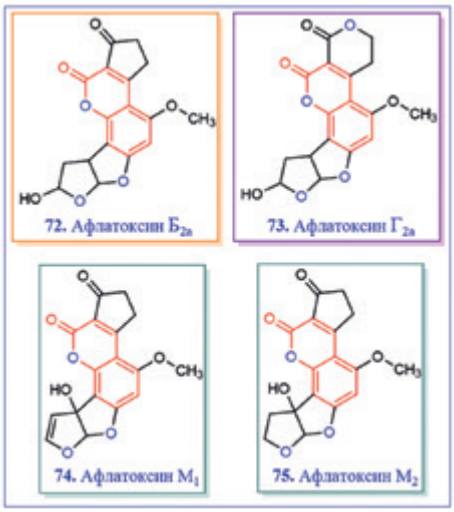


Рисунок 19. **Структуры афлатоксинов $Б_{2a}$, $Г_{2a}$, M_1 и M_2**

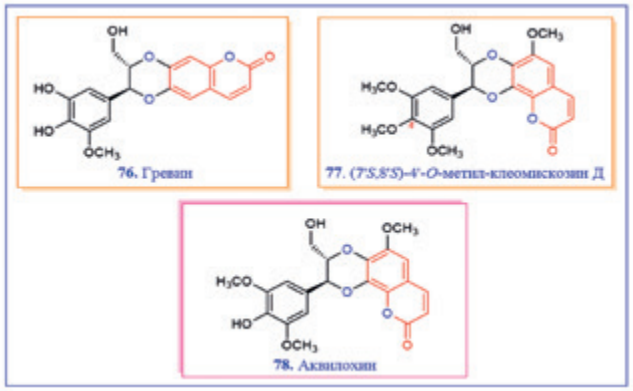


Рисунок 20. **Структуры некоторых комбинированных кумаринолигнанов**

синов, являются влажность и температура окружающей среды [1].

Кумаринолигнаны широко распространены в растениях семейств Aceraceae, Asclepiadaceae, Bombacaceae, Burseraceae, Capparaceae, Chenopodiaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Hippocastanaceae, Malvaceae, Meliaceae, Ranunculaceae, Putaceae, Sapindaceae, Simaroubaceae, Solanaceae, Thymelaeaceae, Tiliaceae, Verbenaceae и др. [1].

Приблизительно в 44 видах растений, принадлежащих 19 различным семействам, обнаружены кумаринолигнаны, например гревин, (7′*S*,8′*S*)-4′-*O*-метилклеомискозин D, аквилохин и др. (рисунок 20).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видно из представленной в данной обзорной статье информации, ковалентно комбинированные производные кумарина широко распространены в растительном мире и в микроорганизмах. Они имеют достаточно разнообразные химические структуры и поэтому проявляют множество разнонаправленных фармакологических свойств, включая противораковую, антилейкозную, противовоспалительную, антиВИЧ-, антикоагулянтную, антибактериальную, обезболивающую активность и сравнительную иммуно-модуляцию.

Поэтому они являются важными фармакологически высокоактивными средствами и, следовательно, могут служить перспективными источниками для разработки разнообразных лекарственных препаратов для профилактики и лечения некоторых тяжелых заболеваний, особенно болезней сердечно-сосудистой системы, рака, СПИДа и многих других.

Для того чтобы полностью описать достигнутый в настоящее время прогресс во взаимосвязи отношения между **структурой и активности** рассматриваемого класса комбинированных соединений, экспериментальных данных пока недостаточно, и этот вопрос не является легкой задачей и целью данной обзорной статьи. Тем не менее полезно определить некоторые корреляции с доступными данными, чтобы помочь исследователям в раскрытии и дальнейшем развитии новых активных соединений. Таким образом, достаточно сложная химическая структура комбинированных производных кумарина позволяет создать на их основе важные и высокоактивные субстанции для клинических исследований, особенно комбинированные с другими субстанциями, в попытке улучшить эффективность, безвредность и растворимость искомого вещества.

Из вышепредставленных данных вытекает, что исследование ковалентно комбинированных производных 2H-1-бензопиран-2-она является чрезвычайно перспективным научным направлением разработки новых высокоактивных субстанций и их лекарственных форм, необходимых для профилактики и лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы и вирусных инфекций, особенно ВИЧ-1.

ЛИТЕРАТУРА

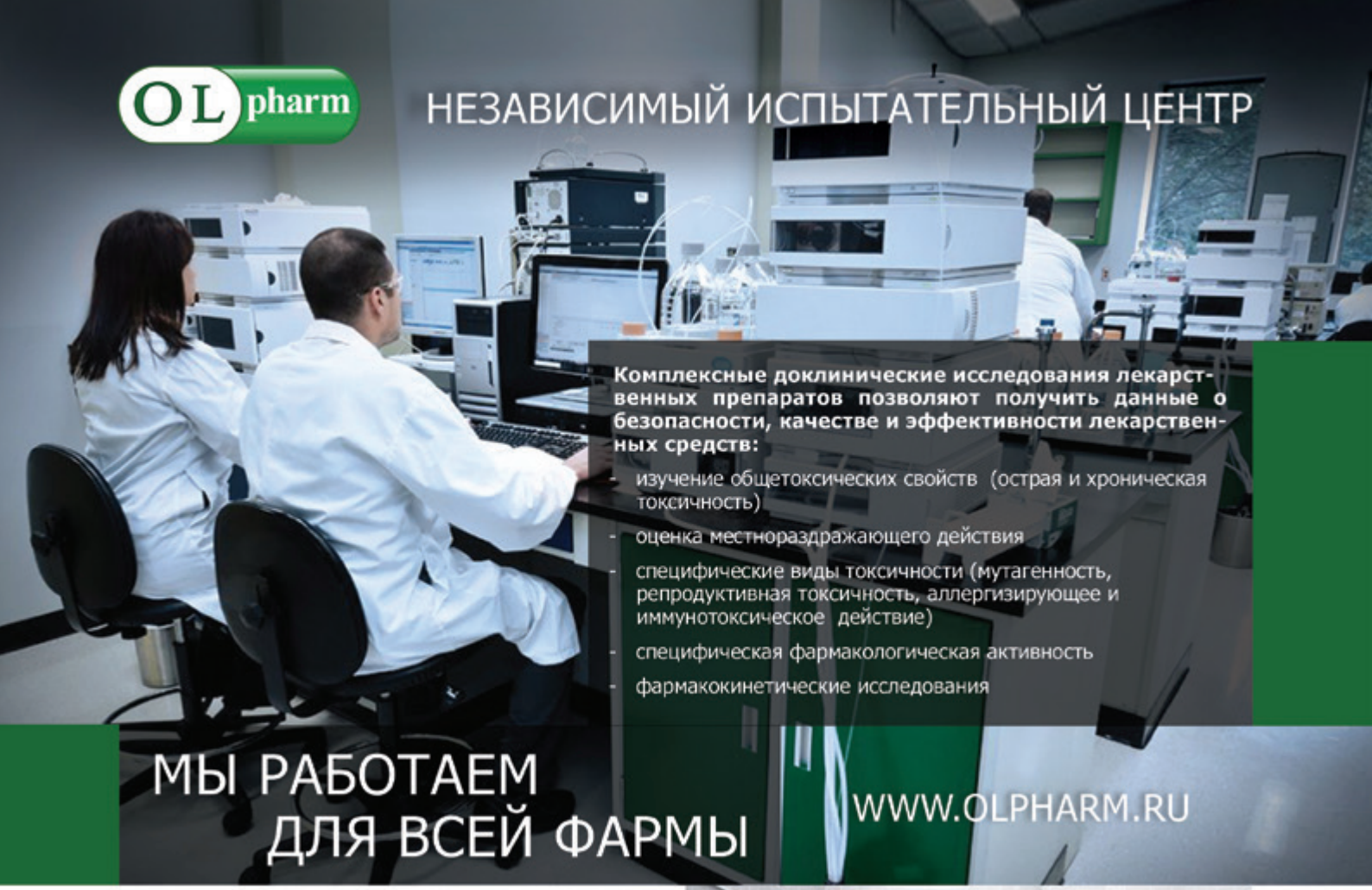
1. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, Р.А. Абышев. Природные и синтетические ку-марины и флавоноиды. – Санкт-Петербург; Баку: Прима, 2014. 463 с.
2. M.J. Matos et al. Coumarins – an important class of phytochemicals // Phytochemicals-Isolation, Characterisation and Role in Human Health. 2015. P. 113–140.
3. K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity // BioMed Research International. 2013.
4. R.D. Murray. The naturally occurring coumarins // Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. 2002. V. 83. P. 654.
5. R.A. Bernhard. Occurrence of coumarin analogues in Lemon luice // Nature. 1958. V. 182. № 11. P. 1171–1174.
6. A.G. Gonzalez, R.J. Moreno, L.F. Rodriguez. Nuevas fuentes de cumarinas XXY. Cumarinas del *Haplophyllum hispanicum* Spach.

(*H.linifolium* L.) // Anales de Quim. 1973. V. 63. № 6. P. 781–786.

7. D.L. Dreyer. Coumarins and alkaloids of the genus Ptelea // Phytochem. 1969. V. 8. № 6. P. 1013.
8. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, Ю.Б. Керимов. Химия и фармакология природных кумаринов. – Баку: Caspian Supplies, 2003. 112 с.
9. А.З. Абышев, Р.А Абышев., С.В. Гадзиковский, В.Х. Нгуен, В.А. Морозова. Противовирусная активность соединений кумаринового ряда. Ч. 1 // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2013. Т. 5. № 1. С. 34–41.
10. А.З. Абышев, Р.А Абышев, С.В. Гадзиковский, В.Х. Нгуен, В.А. Морозова. Противовирусная активность соединений кумаринового ряда. Ч. 2 // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2013. Т. 5. № 2. С. 25–34.
11. А.З. Абышев, Р.А. Абышев, С.В. Гадзиковский, В.Х. Нгуен, В.А. Морозова. Современное состояние синтеза и исследования антиВИЧ-активности соедине-ний ряда 2Н-1-бензопиран-2-она // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 33. № 1. С. 1-21.
12. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, Е.В. Семенов. Антагонисты ионов кальция нового поколения. – Баку: АМУ, 2003. 236 с.
13. R.D. Murray. Coumarins // Natural product reports. 1989. V. 6. № 6. P. 591–624.
14. Л.И. Тихомирова, М.Г. Пименов, Г.А. Кузнецова. Кумарины из *Haplophyllum dzhungaricum* и *H. multicaule* // Химия природ. соедин. 1974. Т. 10. № 3. С. 401–405.
15. Л.И. Тихомирова, М.Г. Пименов, Г.А. Кузнецова. Кумарины из *Haplophyllum alberti-regelii* и *H. dubium* // Химия природ. соедин. 1977. Т. 13. № 6. С. 859–863.
16. A.J. Sepulveda, L.J. Viguera, P.J. Sanchez. Aislamientoe identificacion de chalepensina y chalepina de la *Ruta montana* // Anales de Quim. 1974. V. 70. № 12. P. 1020–1022.
17. J.F. Fisher, H.S. Nordby. Two new cournarins from Grapefruit peel oil // Tetrah. 1966. V. 22. № 8. P. 1489–1493.
18. R.E. Reyes, A.G. Gonsalez. Chemistry of Rutaceae. Part YI. Coumarins from the essential oil of the leavs of *R. pinnata* L. Fil. and *R. oroojasme* Webb. New systems for the paper chromatography of coumarins // Anales de Quim. 1966. V. 62. № 10. P. 981–988.
19. R. Storer, D.W. Young. Constituents of the root of *Dictamnus albus* L. (Rutaceae) // Tetrah. 1973. V. 29. № 9. P. 1217.
20. L. Wu, X. Wang et.al. The Structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives // Current Medicinal Chemistry. 2009. № 16. P. 4236–4260.
21. A. Maxwell. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase // Mol. Microbiol. 1993. V. 9. № 4. P. 681–686.
22. R.J. Lewis, O.M. Singh et al. The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography // EMBO J. 1996. № 15. P. 1412–1420.
23. Ya.L. Garazd, M.M. Garazd. Natural Dibenzo [b, d] Pyran-6-Ones: Structural Diversity and Biological Activity // Chemistry of natural compounds. 2016. V. 52. № 1. P. 1–18.
24. L. Jie et al. A New Dicoumarinyl Ether from the Roots of *Stellera chamaejasme* L. // Molecules. 2014. V. 19. № 2. P. 1603–1607.
25. J.N. Cai, P. Basnet et al. Coumarins from the fruits of *Cnidium monnieri* // Journal of natural products. 2000. V. 63. № 4. P. 485–488.
26. C.C. Chiang et al. Prenyl coumarins from *Fatoua pilosa* // Journal of natural products. 2010. V. 73. № 10. P. 1718–1722.
27. H. Meng, G. Li et al. Sesquiterpene coumarin and sesquiterpene chromone derivatives from *Ferula ferulaeoides* (Steud.) Korov. // Fitoterapia. 2013. V. 86. P. 70–77.
28. R.S. Thelingwani, K. Dhansay et.al. Potent inhibition of CYP1A2 by Frutinone A, an active ingredient of the broad spectrum antimicrobial herbal extract from *P. fruticosa* // Xenobiotica. 2012. V. 42. № 10. P. 989–1000.
29. N.M. Cuong et al. Paratrimerins A and B, Two New Dimeric Monoterpene-Linked Coumarin Glycosides from the Roots and Stems of *Paramignya trimera* // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 2015. V. 63. № 11. P. 945–949.
30. Y. Kashman, K.R. Gustafson, W.R. Fuller et al. The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum* // J. Med. Chem. 1992. № 35. P. 2735.
31. D. Yu, M. Suzuki, L. Xie et al. Recent progress in the development of coumarin derivatives as potent anti-HIV agents // Med. Res. Rev. 2003. № 23. P. 322–345.
32. K. Kawabata, T. Tanaka et al. Suppression of N-Nitrosomethylbenzyl-Amine-induced rat esophageal tumorigenesis by dietary feeding of auraptene // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2000. V. 19. № 1. P. 45–52.
33. L.B. Weymarn, S.E. Murphy. CYP 2A13-catalyzed coumarin metabolism, Comparison to CYP2A5 and CYP2A6 // Xenobiotica. 2003. № 33. P. 73–81.
34. J.D. Vassallo, S.M. Hicks et al. Metabolic detoxification determines species differences in coumarin-induced hepatotoxicity // Toxicol. Sci. 2004. № 80. P. 249–257.
35. T. Saita, H. Fujito, M. Mori. Screening of furanocoumarin derivatives in citrus fruits by enzyme-linked immunosorbent assay // Biol. Pharm. Bull. 2004. V. 27. № 7. P. 974–977.
36. B. Jimenez, M.C. Grande et al. Coumarins from *Ferulago capillaris* and *F. brachyloba* // Phytochem. 2000. V. 53. № 8. P. 1025–1031.
37. N. Hiraoka, J.I. Chang, L.R. Bohm et al. Furanocoumarin and polyacetylenic compound composition of wild *Glehnia littoralis* in North America // Biochem. System. Ecol. 2002. V. 30. № 4. P. 321–325.
38. C. Seeka, P. Sutthivaiyakit et al. Prenylfuranocoumarin-HMGA – flavonol glucoside conjugates and other constituents of the fruit peels of *Citrus hystrix* and their anticholinesterase activity // Phytochemistry. 2016. V. 127. P. 38–49.
39. O. Thastrup, J. Lemmich. Furocoumarin glucosides of *Angelica archangelica* subsp. Litoralis // Phytochem. 1983. V. 22. № 9. P. 2035–2037.
40. Y.Q. Xiao, X.H. Liu et al. Bicoumarins from *Pleurospermum rivulorum* // Phytochem. 1997. V. 45. № 6. P. 1275–1277.
41. M. Taniguchi, Y.Q. Xiao, X.H. Liu et al. Chemistry of α-fluoro-α-amino acids: The first synthesis of α-fluoroglycine-containing dipeptides // Chem. Pharm. Bull. 1998. V. 46. № 6. P. 1065–1077.
42. M. Bandopadhyay, S.B. Malik, T.R. Seshadri. Candicanin, a novel bicoumarinyl derivative from the roots of *Heracleum candicans* // Tetrahedron Lett. 1971. V. 12. № 45. P. 4221–4222

OL pharm

НЕЗАВИСИМЫЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР



Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутагенность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее и иммунотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

WWW.OLPHARM.RU

Исследования в области микробиологии

- исследование и тестирование чувствительных патогенных микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам
- изучение антимикробного действия лекарственных средств в отношении определенных видов микроорганизмов во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту и стерильность
- анализ антагонистической активности пробиотических штаммов и препаратов на их основе методом отсроченного антагонизма на плотной среде в чашках Петри





Исследования в области разработки лекарственных средств

- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФЛ10 от 08.10.2014

Лицензия № 77.01.13.001.Л.000142.04.09 от 30.04.2009 на выполнение работ с микроорганизмами 3–4 групп патогенности

ООО «ОЛФАРМ»
117105, Г. МОСКВА,
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36
E-MAIL: INFO@OLPHARM.RU

УДК 612.884; 615.211

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА ДЕКСМЕДЕТОМИДИН НА БОЛЕВУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

О.И. Рудько[1,2], Е.А. Климов[1,2]*, В.В. Соболев[1,3], А.В. Соснов[4], К.А. Руфанов[4], Ф.М. Семченко[4]**

Резюме. Разработка новых антиноцицептивных средств и новых подходов к купированию боли на основе сильнодействующих ненаркотических анальгетиков является одной из наиболее практически востребованных и актуальных тем современной фармакологии. В данной работе обоснован выбор клинически наиболее актуального представителя ненаркотических анальгетиков из класса агонистов α_2-адренорецепторов – дексмедетомидина, действующего в низких дозах и демонстрирующего высокие значения терапевтического индекса при различных способах введения. Проведена оценка анальгетической эффективности дексмедетомидина при однократном интраназальном введении, в составе оригинальной экспериментальной лекарственной формы, на моделях острой термической и висцеральной боли на лабораторных животных (самках беспородных белых мышей). Выявлен выраженный дозозависимый анальгетический эффект препарата дексмедетомидин в дозах 10 и 50 мкг/кг в тестовой модели висцеральной боли. Анальгетический эффект дексмедетомидина в использованных дозах сопровождался дозозависимым седативным (но не анестезирующим) эффектом у мышей, максимальная выраженность седации наблюдалась через 30 минут после интраназального введения препарата в дозе 50 мкг/кг. В использованных дозах дексмедетомидин не оказывал острого токсического действия на мышей.

Ключевые слова: дексмедетомидин, болевая чувствительность, анальгезия, мыши, интраназальное введение, α_2-адреномиметики.

THE STUDY OF EFFECTS OF THE INTRANASAL DEXMEDETOMIDINE ADMINISTRATION ON PAIN SENSITIVITY

O.I. Rudko[1,2], E.A. Klimov[1,2]*, V.V. Sobolev[1,3], A.V. Sosnov[4], K.A. Rufanov[4], F.M. Semchenko[4]**

Abstract. The development of new antinociceptive agents and new approaches to pain relief based on potent non-narcotic analgesics is one of the most in demand and urgent directions of modern pharmacology. This work substantiates the choice of the clinically most relevant representative of non-narcotic analgesics from the α_2-adrenoreceptor agonist class – dexmedetomidine, which acts at low doses and demonstrates high therapeutic index for various modes of administration. An analgesic efficacy of dexmedetomidine in single intranasal administration of the original experimental pharmaceutical formulation was evaluated in models of acute thermal and visceral pain in laboratory animals (female outbred white mice). A pronounced dose-dependent analgesic effect of the dexmedetomidine preparation in the 10 and 50 μg/kg dosage was revealed in the test models of visceral pain. The analgesic effect of dexmedetomidine was accompanied by a dose-dependent sedative (but not anesthetic) effect in mice, with peak at 30 minutes for intranasal administration of 50 μg/kg of drug. In the doses used, dexmedetomidine did not exert any acute toxic effects in mice.

Keywords: dexmedetomidine, pain sensitivity, analgesia, mice, intranasal administration, α_2-adrenomimetics.

1 – ООО «Университетская диагностическая лаборатория», 119331, Россия, Москва, просп. Вернадского, 29

2 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

3 – Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, 119334, Россия, Москва, Ленинский просп., 38А, к. 1

4 – ФГУП «Государственный завод медицинских препаратов» (ФГУП «ГосЗМП»), 111024, Россия, г. Москва, ш. Энтузиастов, 23

1 – University Diagnostic Laboratory LLC, 29, Vernadskogo prosp., Moscow, 119331, Russia

2 – Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 1/12, Leninskiye gory, Moscow, 119234, Russia

3 – Centre of Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, 38A/1, Leninskiy prosp., Moscow, 119334, Russia

4 – Federal State Unitary Enterprise «State Pharmaceutical Plant» (FSUE «GosZMP»), 23, sh. Entuziastov, Moscow, 111024, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: klimov_eugeney@mail.ru
** адресат для переписки:
E-mail: andrey.sosnov@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

В развитых странах боль является одним из самых распространённых симптомов и одной из наиболее частых причин обращения за медицинской помощью [1–3]. Поэтому разработка новых ненаркотических антиноцицептивных средств и новых подходов к купированию боли является одним из наиболее востребованных и актуальных направлений развития современной практической фармакологии. В последние годы наблюдается выраженный интерес исследователей и разработчиков анальгетических и седативных препаратов к специфическим агонистам α_2-адренорецепторов. К настоящему времени на доклинических и более высоких стадиях подробно исследовано более 200 агонистов альфа-2-адренорецепторов ЦНС (α_2-AR-агонист). Области

исследования агонистов альфа-2-адренорецепторов представлены на рисунке 1. Основные усилия в области исследований и разработок α_2-AR-агонистов направлены на создание ненаркотических анестетиков и анальгетиков, а также офтальмологических препаратов.

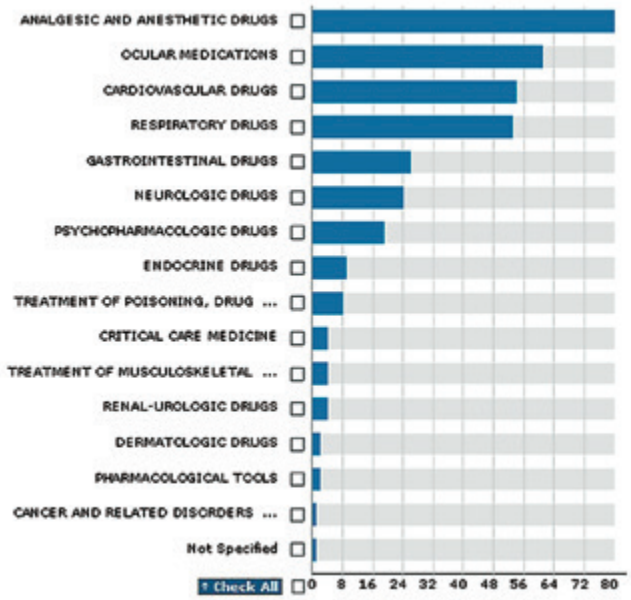


Рисунок 1. Распределение агонистов альфа-2-адренорецепторов по основным терапевтическим группам [4]

Из анализа данных следует, что агонисты альфа-2-адренорецепторов центрального действия исследуются и используются в клинической практике как самостоятельно, так и в составе комплексных схем терапии, например:

- мощных седативных анестетиков или компонентов комплексной анестезии [5] (клонидин, дексмедетомидин, тизанидин);
- компонентов комплексной анальгезии (клонидин);
- офтальмологических средств, включая терапию глаукомы (Dapiprazole, Brimonidine, Aplonidine, Tetrahydrozoline);
- средств терапии синдрома дефицита внимания и гиперактивности (клонидин);
- компонентов препаратов для терапии зависимостей и купирования отмены опиатов, например композиции налтрексон/клонидин [6].

Всего в клинической практике в настоящее время используются 14 α_2-AR-агонистов (рисунок 2), из них только два вещества – клонидин и дексмедетомидин (DEX) – в настоящее время используются в качестве медицинских анальгетиков и анестетиков центрального действия (рисунок 3).

Создание ненаркотических анестетиков, анальгетиков и седативных средств, а также ветеринарных препаратов на основе агонистов α_2-адренорецепторов

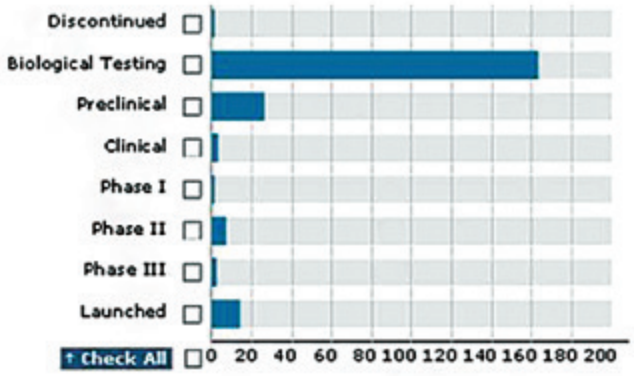


Рисунок 2. Распределение фармацевтически актуальных агонистов альфа-2-адренорецепторов по стадиям исследований и разработок [4]

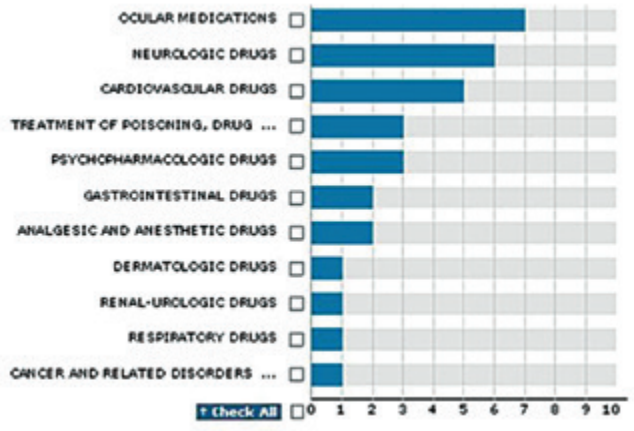


Рисунок 3. Терапевтическое применение агонистов альфа-2-адренорецепторов [4]

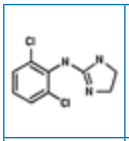
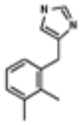
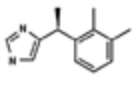
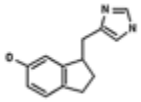
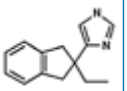
прошло классический для сильнодействующих препаратов путь разработки и внедрения. Исторически первым был клонидин (клофелин), с 1970 г. используемый в качестве мощного антигипертензивного средства (таблица 1). Разработка коммерческих препаратов анестетиков и анальгетиков шла по двум направлениям: создание лекарств и разработка ветеринарных препаратов. Один из первых седативных препаратов данного типа на основе детомидина (таблица 1) был разработан и запатентован в конце 1970-х и введен в клиническую и ветеринарную практику в 1984 г. финской фирмой Orion (FI) под названием Domosedan. Фирмой Bayer AG был выпущен ветеринарный препарат Rompun на основе ксилазина, являющегося структурным аналогом клонидина. Клонидин (клофелин) в том числе используется для терапии нейропатической боли (препарат Duraclon). Комбинация фиксированного состава (КФС) клонидин/налтрексон (ATNC-05) проходит вторую клиническую фазу исследования на возможность ее применения для лечения постгерпетической невралгии [7].

Ветеринарный препарат на основе аналога детомидина – медетомидина был запатентован фирмой Orion в 1983 г., в настоящее время широко использу-

ются ветеринарные препараты на его основе. Медетомидин подробно исследовался в качестве медицинского препарата, в результате в 2000 г. препарат на основе его наиболее активного и безопасного S-стереоизомера – дексмедетомидин (DEX) был одобрен для внутривенного использования в качестве анестетика сначала в США, затем в 2011 г. в ЕС и в 2013 г. в Японии.

Таблица 1.

Агонисты альфа-2-адренорецепторов, используемые в качестве медицинских и/или ветеринарных анальгетиков и анестетиков

				
Клонидин (клофелин)	Детомидин	Дексмедетомидин (DEX, S-(+)-медетомидин)	Фадолмидин	Атипамезол (антиседан)

Дексмедетомидин (таблица 1), не проявляющий выраженного антигипертензивного эффекта, используется в качестве седативного и анксиолитического средства, его лекарственные формы (назальная, трансдермальная и сублингвальная) исследуются на возможность применения в качестве анальгетиков [8]. DEX – один из наиболее селективных агонистов α_2-адренорецепторов ЦНС с широким спектром фармакологических свойств – является одним из наиболее мощных и безопасных анестетиков, одобренных для медицинского применения [9]. DEX в 8 раз более селективен в отношении α_2- (относительно α_1-) адренорецепторов по сравнению с клонидином. Показано, что селективность именно к α_2A-подтипу андренорецепторов определяет седативные и анальгетические свойства DEX.

Фадолмидин (таблица 1) – один из наиболее мощных агонистов всех подтипов альфа-2-адренорецепторов, не проникающий через ГЭБ, активно исследуется в качестве анальгетика при интратекальном и местном введении, в том числе и в комбинации с бупивакаином. Вследствие благоприятного профиля побочного действия фадолмидин может иметь терапевтическое значение для целевой спинальной аналгезии в различных клинических проявлениях, таких как послеоперационная и хроническая боль, а также при глаукоме [10]. В процессе поиска агонистов α_2-AR был получен сравнимый с DEX по мощности и селективности аналог – S(+)-4-NEMD [11], однако он не имеет в настоящее время клинического применения. В качестве антидота и средства для устранения седативного и анальгезирующего действия ветеринарного анестетика домитора (препарат на основе медетомидина) используется мощный антагонист альфа-2-адренорецепторов ЦНС атипамезол (антиседан) (таблица 1) [12, 13]. Интересно отметить, что интратекальное введение малых доз атипамезола (1–10 нг) усиливает антиноцицептивный эффект морфина у нативных и толерантных крыс и снижает толерантность к морфину у толерантных животных [14].

По соотношению эффективности и безопасности DEX (ненаркотическое вещество центрального действия) превосходит наиболее мощные наркотические анестетики и анальгетики, используемые в клинической практике. Эффективные клинические дозы седативного препарата при внутривенном введении человеку начинаются от 0,5 мкг/кг [15]. Терапевтический индекс препарата при использовании в качестве анестетика и гипнотика – более 1000, что является уникальным для данного типа действия. DEX не вызывает респираторную депрессию. Показана высокая эффективность вещества при других путях введения (внутримышечном, пероральном, буккальном, назальном). Препараты на основе DEX исследуются на различных клинических стадиях для купирования послеоперационной тошноты и рвоты [16, 17], а также бессонницы [18]. К настоящему времени завершены либо находятся в активной фазе около 570 клинических исследований препаратов на основе DEX. Дексмедетомидин в инъекционной форме является эффективным седативным и анксиолитическим средством в отделениях интенсивной терапии, также возможно его использование во время диагностических и лечебных процедур. Накоплено значительное количество доказательств эффективности α_2-адреномиметиков при нейроаксиальном (эпидуральном и интратекальном) введении. Свойства дексмедетомидина могут быть особенно востребованы в случае необходимости анальгезии и седации при выполнении малоинвазивных или неинвазивных процедур в детской практике. Традиционно применяемые в таких случаях пропофол и бензодиазепины способны вызывать существенную депрессию дыхания, создавая опасность для пациента при фактически безопасных процедурах. В этом случае особо актуальной представляется возможность использования дексмедетомидина при набирающих популярность у детских анестезиологов альтернативных путях введения препаратов – буккальном и интраназальном – для премедикации и короткой седации у детей [19–21].

Ранее уже была показана возможность и эффективность интраназального введения селективных α_2-агонистов в клинической практике: например, первый селективный α_2-агонист Клофелин был впервые внедрен именно как капли для носа [22]. Разработанный фирмой Recro Pharma препарат DEX-IN в виде назального спрея для анальгезии находится во второй фазе стадии клинических исследований [8]. Отмечено, что именно при назальном введении наиболее выражены анальгетические свойства DEX. Все вышеизложенное позволяет надеяться, что внедрение инт-

раназальной формы дексмедетомидина в российскую клиническую практику будет способствовать повышению качества лечения больных.

Поэтому целью данной работы было изучение анальгетических эффектов оригинального экспериментального препарата дексмедетомидина при однократном интраназальном введении на моделях острой термической и висцеральной боли у лабораторных животных (самок беспородных белых мышей).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на интактных белых мышах (самках), вес 18–20 г, возраст – 6 недель, питомник – Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, общее количество – 70 особей. Животные содержались группами по 10 особей в клетке, в условиях свободного доступа к воде и корму при световом режиме 12/12. За 2 часа до эксперимента у животных убирали корм. Содержание и работы с животными осуществлялось в соответствии с ГОСТ 31886-2012 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Применение Принципов GLP к краткосрочным исследованиям» и приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Дексмедетомидин вводили животным интраназально в дозах 2 мкг/кг, 5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 25 мкг/кг и 50 мкг/кг. Введение осуществлялось попеременно в обе ноздри, объем введения составлял не более 0,5 мл/кг (»10 µл/мышь). Контрольным животным вводили растворитель в том же объёме.

Оценка анальгетической активности дексмедетомидина производилась с использованием методики «tail flick», основанной на оценке изменения рефлекторной активности животного в ответ на термическое раздражение хвоста [23], и метода «уксусных корч», позволяющего регистрировать изменение порога болевой чувствительности к висцеральным болевым раздражителям [24].

Тест «tail flick»

Животное иммобилизовывали с помощью рестрейнера, погружали хвост животного в воду температурой 55 °С и измеряли время до отдергивания хвоста из воды (максимальная длительность измеряемого латентного периода отдергивания хвоста для мышей составляет 15 секунд). Повторяли измерение 3 раза с интервалом 5 мин. Находили среднее значение латентного периода (ЛП) для каждого животного и формировали экспериментальные группы. Тестирование животных проводили через 30 мин после введения дексмедетомидина, измерение ЛП производили аналогично первому; три полученных результата также усредняли. Вычисляли дельту латентного периода – значение разности между ЛП после эксперимента и ЛП до эксперимента.

Тест «Уксусные корчи»

Через 25 минут после введения дексмедетомидина животному внутрибрюшинно вводили 1% раствор уксусной кислоты из расчёта 10 мкл/г веса. Через 5 мин (время, необходимое для развития местной воспалительной реакции) после введения 1% раствора уксусной кислоты и в течение 10 минут подсчитывали количество «корчей» – непроизвольных сокращений абдоминальной мускулатуры, заметных по удлинению тела и вытягиванию ног животного.

Статистически результаты обрабатывали по t-критерию Стьюдента для независимых групп и по U-критерию Вилкоксона – Манна – Уитни. Программа Wilcoxon U-test (автор Д.Д. Воронцов ООО «НПК Открытая Наука», специально для биологического факультета МГУ, 2003) осуществляет расчет достоверности различий двух выборок по непараметрическому критерию в сравнении с табличными значениями. Для сравнения изменений внутри группы использовался t-критерий Стьюдента для связанных групп. Для сопоставления выборок по частоте встречаемости признака (развитие корчей) также использовался φ-критерий Фишера. Обсчёты по t-критерию и по φ-критерию проводили в программе Excel 2010 (Microsoft Office 2010).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты предварительного исследования токсических эффектов интраназального введения дексмедетомидина показали, что выживаемость животных при использовании доз в диапазоне от 2 до 50 мкг/кг составила 100% в течение 72 ч после введения, препарат не оказывал острого токсического действия. Введение дексмедетомидина в использованных дозах сопровождалось дозозависимым седативным (но не анестезирующим или снотворным) эффектом у мышей, максимальная выраженность седации наблюдалась через 30 мин после интраназального введения препарата в дозе 50 мкг/кг.

Тестирование соматической болевой чувствительности животных в ответ на термическое воздействие проводилось с использованием дозы 10 мкг/кг. Для теста «tail flick» за основной показатель анальгетического действия вещества принимается увеличение латентного периода отдергивания хвоста животного при погружении его в горячую воду. Изменение латентного периода оценивали, сравнивая латентный период до и после введения препарата и вычисляя изменение продолжительности (дельту) латентного периода по формуле

$$\Delta_{ЛП} = ЛП_{(после\ введения)} - ЛП_{(до\ введения)},$$

где $ЛП_{(после\ введения)}$ – это латентный период отдёргивания хвоста животным после введения исследуемого препарата (в секундах), а $ЛП_{(до\ введения)}$ – исходный

латентный период отдёргивания хвоста животным до введения исследуемого препарата (в секундах).

Интраназальное введение препарата в дозе 10 мг/кг не оказывало статистически значимых эффектов на продолжительность латентного периода отдёргивания хвоста у опытной группы в тесте «tail flick» (изменение порога соматической болевой чувствительности к острым болевым раздражителям) (таблица 2).

Увеличение латентного периода отдёргивания хвоста у контроля составило 0,17 с (108,7% первого измерения), у опыта – 0,32 с (116% первого измерения), t-критерий Стьюдента для связанных групп не выявил статистически значимых отличий между латентным периодом отдёргивания хвоста до введения препарата и после внутри групп.

Таблица 2.

Влияние интраназального введения дексмедетомидина на продолжительность латентного периода отдёргивания хвоста у мышей

Группа	Число мышей	$ЛП_{до}$ (± дов. инт.)	$ЛП_{после}$ (± дов. инт.)	$Δ_{ЛП}$
Контроль	10	1,95±0,45 с	2,12±0,39 с	+0,17 с
Дексмедетомидин, 10 мкг/кг	10	2,00±0,42 с	2,32±0,55 с	+0,32 с

Сравнение средних значений дельты латентного периода между группами (t-критерий для независимых групп и U-критерий) также не выявило статистически значимых отличий опытной группы от контроля.

В модели хронической боли («уксусные корчи») основным показателем анальгетического действия вещества является изменение (уменьшение) числа непроизвольных сокращений абдоминальной мускулатуры («корчей») животного, вызванных введением слабого раствора уксусной кислоты. Эффекты препарата дексмедетомидин в тесте «уксусных корчей» исследовались в дозах 10 и 50 мг/кг (таблица 3).

Как видно на рисунке 4 и в таблице 3, нами наблюдалась выраженная дозозависимость воздействия дексмедетомидина на уменьшение среднего числа корч у опытных групп. Интраназальное введение препарата в дозе 50 мкг/кг вызывало хорошо выраженное, статистически значимое снижение числа корчей по сравнению с группой контроля (44,54% контроля, p<0,005 по U-критерию и p<0,001 по t-критерию для независимых выборок). Введение препарата в дозе 10 мкг/кг также вызывало статистически значимое снижение числа корчей по сравнению с группой контроля (70,30% контроля, p<0,05 по t-критерию для независимых выборок).

Интересно отметить, что, в то время как в контроле все 100% животных испытывали корчи, вызванные введением слабого раствора уксусной кислоты, у части мышей в опытных группах корчи полностью отсутствовали (таблица 4). У некоторых мышей из опытных групп картина была смазанной: часть корчей (10–15%) сопровождалась менее выраженным сокращением абдоминальной мускулатуры и меньшим удлинением тела без вытягивания ног животного. Таким образом, в обеих использованных дозах препарат оказывает устойчивый анальгетический эффект в модели висцеральной боли.

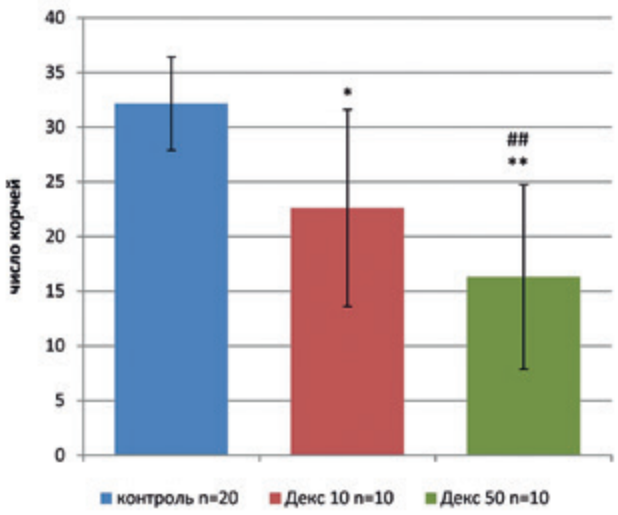


Рисунок 4. Влияние интраназального введения дексмедетомидина на порог хронической болевой чувствительности у мышей в тесте «уксусных корч» через 30 мин после введения препарата.

 # – p<0,005 относительно значений группы контроля по U-критерию; * – p<0,05; ** – p<0,001 относительно значений группы контроля по t-критерию для независимых выборок

Таблица 3.

Влияние интраназального введения дексмедетомидина на порог хронической болевой чувствительности у мышей в тесте «уксусных корч» через 30 мин после введения препарата

Группа	Число мышей	Число корч (± дов. инт.)	Число корч (% контроля)	% мышей с развившимися корчами
Контроль	20	32,15±4,25		100%
Дексмедетомидин, 10 мкг/кг	10	22,60±9,01*	70,30%	90%
Дексмедетомидин, 50 мкг/кг	10	16,30±8,42**#	50,70%	70%$

Примечание: # – p<0,005 относительно значений группы контроля по U-критерию;

* – p<0,05,

** – p<0,001 относительно значений группы контроля по t-критерию для независимых выборок;

$ – p<0,01 относительно значений группы контроля по φ-критерию Фишера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано влияние интраназального введения дексмедетомидина на чувствительность мышей к висцеральным и соматическим болевым раздражителям. Обнаружен выраженный дозозависимый анальгетический эффект препарата дексмедетомидин в дозах 10 и 50 мкг/кг в тестовой модели висцеральной боли у самок беспородных белых мышей. Дексмедетомидин в дозе 10 мкг/кг не оказывал анальгетического эффекта в тестовой модели соматической боли в ответ на термическое воздействие у самок беспородных белых мышей. Анальгетический эффект дексмедетомидина в использованных дозах сопровождался дозозависимым седативным (но не анестезирующим или снотворным) эффектом у мышей, максимальная выраженность седации наблюдалась через 30 мин после интраназального введения препарата в дозе 50 мкг/кг. В использованных дозах дексмедетомидин не оказывал острого токсического действия на мышей.

Описанные в настоящей статье исследования были проведены в 2015 г. с использованием экспериментального препарата дексмедетомидин, разработанного ФГУП «ГосЗМП» в рамках работ по созданию новых лекарственных форм сильнодействующих ненаркотических анальгетиков. Уникальность дексмедетомидина обусловлена сочетанием свойств ненаркотического седативного анальгетика и анестетика с высоким терапевтическим индексом, действующего в низких дозах и не вызывающего депрессию дыхания, с возможностью потенцирования других сильнодействующих анальгетиков и анестетиков центрального действия. Полученные экспериментальные результаты коррелируют с результатами исследований интраназальной формы препарата DEX-IN, находящейся на второй стадии клинических исследований в США и ЕС, и создают задел для дальнейших доклинических и клинических исследований отечественного интраназального препарата дексмедетомидин в качестве самостоятельного анальгетика со свойствами анксиолитика, а также компонента терапии средней и сильной боли и средства для премедикации.

ЛИТЕРАТУРА

1. K.P. Grichnik, P.M. Ferrante. The difference between acute and chronic pain // Mount Sinai Journal of Medicine. 1991. V. 58. № 3. P. 217–220.
2. Болевой синдром. Клинические рекомендации / Общероссийская общественная организация «Ассоциация врачей общей практики (семейных врачей) Российской Федерации». – Москва–Санкт-Петербург–Ростов-на-Дону. 2014. 27 с.
3. 3. А.В. Соснов, С.С. Голубев, Б.С. Пункевич, С.В. Садовников, Ф.М. Семченко, В.Н. Тохмахчи, А.А. Соснова. Оценка потребности Российской Федерации в сильнодействующих анальгетиках // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 2(15). С. 202–215.
4. База данных Thomson Reuters Integrity. URL: http://ip-science.thomsonreuters.com/ pharma/integrity_whatsnew/ (дата обращения 17.03.2017).
5. J.A. Giovannitti, S.M. Thoms, J.J. Crawford. Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonists: A Review of Current Clinical Applications // Anesth Prog. 2015. V. 62(1). P. 31–38.
6. P. Mannelli, K. Peindl, L.T. Wu, A.A. Patkar, D.A. Gorelick. The combination very low-dose naltrexone-clonidine in the management of opioid withdrawal // Am J Drug Alcohol Abuse. 2012. V. 38 (3). P. 200–205.
7. S. Attarian, J.M. Vallat, L.Magy et al. An exploratory randomised double-blind and placebo-controlled phase 2 study of a combination of baclofen, naltrexone and sorbitol (PXT3003) in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A // Orphanet J Rare Dis. 2014. V. 9. P. 199.
8. Recro Pharma reports positive phase II data for Dex-IN in postsurgical pain // Thomson Reuters Drug News. 2015. July 20.
9. R. Gertler, H.C. Brown, D.H. Mitchell, E.N. Silvius. Dexmedetomidine: a novel sedative-analgesic agent // Proc (Bayl Univ Med Cent). 2001. V. 14(1). P. 13–21.
10. J. Lehtimäki, T. Leino, A. Koivisto, T. Viitamaa et al. In vitro and in vivo profiling of fadolmidine, a novel potent alpha(2)-adrenoceptor agonist with local mode of action // Eur J Pharmacol. 2008. V. 599(1–3). P. 65–71.
11. S.S. Hong, K.J. Romstedt, D.R. Feller et al. A structure-activity relationship study of benzylic modifications of 4-1-(1-naphthyl) ethyl-1H-imidazoles on alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors // Journal of Medicinal Chemistry. 1994. V. 37(15) P. 2328–2333.
12. H. Scheinin, R. Aantaa, M. Anttila et al. Reversal of the sedative and sympatholytic effects of dexmedetomidine with a specific alpha2-adrenoceptor antagonist atipamezole: a pharmacodynamic and kinetic study in healthy volunteers // Anesthesiology. 1998. V. 89(3). P. 574–584.
13. A. Pertovaara, A. Haapalinna, J. Sirviö, R. Virtanen. Pharmacological properties, central nervous system effects, and potential therapeutic applications of atipamezole, a selective alpha2-adrenoceptor antagonist // CNS Drug Rev. 2005. V. 11(3). P. 273–88.
14. T.O. Lilius, P.V. Rauhala, O. Kambur et al. Intrathecal atipamezole augments the antinociceptive effect of morphine in rats. // Anesth Analg. 2012. V. 114(6). P. 1353–8.
15. K. Sudheesh, S. Harsoor. Dexmedetomidine in anaesthesia practice: A wonder drug? // Indian Journal of Anaesthesia. 2011. V. 55 (4). P. 323–324.
16. Xiao Liang, Miao Zhou, Jiao-Jiao Feng, Liang Wu, Shang-Ping Fang. Efficacy of dexmedetomidine on postoperative nausea and vomiting: a meta-analysis of randomized controlled trials // Int J Clin Exp Med. 2015. V. 8(6). P. 8450–8471.
17. Shenhui Jin, Dong Dong Liang, Chengyu Chen. Dexmedetomidine prevent postoperative nausea and vomiting on patients during general anesthesia // Jin et al. Medicine. 2017. V. 96. P. 1–7.
18. C. Alexopoulou, E. Kondili, E. Diamantaki, C. Psarologakis. Effects of dexmedetomidine on sleep quality in critically ill patients: a pilot study // Anesthesiology. 2014. V. 121(4). P. 801–807.
19. C.W. Cheung, K.F. Ng, J. Liu, M.Y. Yuen, M.H. Ho, M.G. Irwin. Analgesic and sedative effects of intranasal dexmedetomidine in third molar surgery under local anaesthesia // Br. J. Anaesth. 2011. V. 107. № 3. P. 430–437.
20. Y. Sakurai, T. Obata, A. Odaka, K. Terui, M. Tamura, H. Miyao. Buccal administration of dexmedetomidine as a preanesthetic in children // J. Anesth. 2010. V. 24. P. 49–53.
21. V.M. Yuen, T.W. Hui, M.G. Irwin, M.K. Yuen. A comparison of intranasal dexmedetomidine and oral midazolam for premedication in pediatric anesthesia: a double-blinded randomized controlled trial // Anesth. Analg. 2008. V. 106. P. 1715–1721.
22. A. Mukherjee, A. Das, S.R. Basunia, S. Chattopadhyay, R. Kundu, R. Bhattacharyya. Emergence agitation prevention in paediatric ambulatory surgery: A comparison between intranasal Dexmedetomidine and Clonidine // J. Res. Pharm. Pract. 2015. V. 4. P. 24–30.
23. J. Ben-Bassat, E. Peretz, F.G. Sulman. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method // Arch. Int. Pharmacodyn. 1959. V. 122. P. 434–447.
24. R. Koster, M. Anderson, E.J. de Beer. Acetic acid for analgesic screening // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1959. V. 18. P. 412.

УДК 615.224, 615.216.001, 891.53

ОЦЕНКА АНТИАРИТМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МОРФОЛИНОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

И.П. Рудакова[1]*, О.В. Гашкова[1]

Резюме. Целью настоящего исследования явилось изучение антиаритмического действия новых продуктов органического синтеза. Изучена острая токсичность, антиаритмическая и проаритмическая активность этих соединений. Наиболее выраженный эффект был обнаружен при использовании соединений М-0 и М-18. Они проявили наибольшую антиаритмическую активность и минимальную токсичность. Соединение М-18 показало себя менее опасным, чем М-0, так как не выявило достоверно выраженного побочного аритмогенного действия.

Ключевые слова: аритмия, острая токсичность, эффективная антиаритмическая доза, аритмогенный эффект.

ASSESSMENT OF ANTIARRHYTHMIC ACTIVITY AND SAFETY OF NEW DERIVATIVES OF MORPHOLINOACETIC ACID

I.P. Rudakova[1]*, O. V. Gashkova[1]

Abstract. Study of the anti-arrhythmic influence of the new organic synthesis's products was the purpose of an actual research. Such characteristics of these compounds as acute toxicity, anti-arrhythmic and pro-arrhythmic activity were studied. The mostly strongly marked effect was discovered while using M-0 and M-18. These compounds showed the highest anti-arrhythmic activity and the lowest toxicity. It was also discovered that M-18 compound is less dangerous than M-0 one due to absence of the certainly expressed spill-over effect of an arrhythmogenic action.

Keywords: arrhythmia, acute toxicity, effective antiarrhythmic dose, arrhythmogenic effect.

1 – ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, 2

1 – Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of Russia, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: perm@pfa.ru
Тел.: 8 (342) 233 55 01, 236 90 50

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения сердечного ритма представляют собой одно из наиболее частых проявлений заболеваний сердечно-сосудистой системы. Они могут быть обусловлены как органическими поражениями сердца, так и его функциональными расстройствами. Механизмы развития аритмий различны, поэтому для их лечения необходимы лекарственные средства с широким спектром антиаритмического действия. В связи с этим совершенствование фармакологических методов устранения и предупреждения аритмий является важным направлением в борьбе с расстройствами ритма сердца [1]. При этом лечение нарушений ритма сердца с помощью антиаритмических препаратов нередко сопровождается побочными эффектами, так как многие антиаритмические средства в большей или меньшей степени характеризуются аритмогенным действием. Причиной могут быть большие дозы препарата, увеличение скорости его введения, взаимодействие с другими лекарственными средствами, заболевания печени и почек, нарушения электролитного баланса. По данным клинических наблюдений, вероятность развития аритмогенного эффекта составляет в среднем 10%. При этом проаритмическое действие может выражаться в усилении имеющейся аритмии и инициировании нового, до сих пор не наблюдаемого у данного пациента нарушения ритма [2, 3].

Целью настоящею исследования явилось изучение влияния новых производных морфолиноуксусной кислоты, синтезированных на кафедре общей и органической химии ПГФА и проявивших антиаритмические свойства, на наличие у них аритмогенного действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценку биологической активности соединений проводили в опытах на животных, полученных из питомника «Андреевка» Московской области. Животные содержались в типовом виварии с естественным 12-часовым светотеневым циклом при температуре воздуха 20±2 °С. Их питание осуществлялось в соответствии с нормами кормов для экспериментальных животных. У животных был неограниченный доступ к воде благодаря специальным поилкам для грызунов.

Предварительно производился санитарно-химический и бактериологический анализ воды. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и приказу МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 «Правила надлежащей лабораторной практики».

В опытах на мышах определяли острую токсичность соединений при внутривенном способе введения. Скрининговую оценку антиаритмической активности проводили на модели аритмии, вызванной внутривенным введением мышам обоего пола массой 22–25 г 3% раствора хлорида кальция [10% раствор в ампулах по 10 мл (ООО Фирма «БиоХимФарм», Россия)] в дозе 280 мг/кг [4]. Среднесмертельные и эффективные антиаритмические дозы определяли экспресс-методом по Прозоровскому [5]. Активность соединений оценивали по средней эффективной дозе ($ЭД_{50}$) и антиаритмическому индексу ($АИ=ЛД_{50}/ЭД_{50}$). Для дальнейшего изучения антиаритмической активности опыты проводились на модели явного нарушения сердечного ритма у бодрствующих крыс, вызванного внутривенным введением химического вещества; с этой целью была использована аконитиновая модель аритмии. Животным внутривенно вводили аконитин [порошок кристаллический во флаконах по 100 мг (Sigma-Aldrich, Китай)] в дозе 20 мкг/кг через 2 минуты после введения исследуемого вещества в дозе, равной $ЭД_{50}$. В ходе эксперимента оценку реакции сердца регистрировали с помощью электрокардиографа (ЭКГ) во II стандартном отведении [6]. Учитывали частоту гибели животных и продолжительность аритмии после введения соединения.

Для исследования аритмогенного действия соединения опыты проводились на нелинейных крысах обоего пола массой 180–250 г. Наркотизированные этиловым эфиром крысы фиксировались на операционном столе в положении на спине, затем у них регистрировалась ЭКГ во II стандартном отведении. Животные разделялись на 4 группы, в каждую из которых было включено 10 крыс. В 1-ю (контрольную) группу входили крысы, которым внутривенно вводили физиологический раствор по 0,2 мл в течение 2 с. ЭКГ регистрировали в момент введения раствора и в течение следующих 30 с. Во 2-ю группу включались животные, которым внутривенно вводили 1,5% раствор KCl [4% раствор для инъекций (ООО Фирма «БиоХимФарм», Россия)] в минимальной аритмогенной дозе 20 мг/кг в течение 2 с. ЭКГ у них регистрировалась непрерывно с момента введения KCl до восстановления синусового ритма. Крысам 3-й группы внутривенно вводили исследуемое соединение в эффективной антиаритмической дозе, а через 5 мин – 1,5% раствор KCl в дозе 20 мг/кг. ЭКГ регистрировали до восстановления синусового ритма. Крысам 4-й группы за 5 мин до введения 1,5% раствора KCl проводили инфузию препарата сравнения в эффективной антиаритмической дозе. ЭКГ также регистрировали до восстановления синусового ритма [6]. Учитывали частоту развития аритмий, их продолжительность и смертность животных.

В качестве препаратов сравнения использовались «Лидокаин» [2% раствор для инъекций (ОАО «Биохимик», Россия)] и «Верапамил» [раствор для внутривенного введения (ОАО «Биосинтез», Россия)].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием ЭВМ на базе программы STATISTICA 8.0. Результаты исследований обработаны статистически с определением t-критерия Стьюдента [7]. Данные представлены в виде выборочного среднего M, ошибки среднего m и достигнутого уровня значимости p. Минимальный уровень значимости различий принимали соответствующим $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Острая токсичность была исследована у 20 соединений в ряду производных морфолиноуксусной кислоты. Определение $ЛД_{50}$ позволило выявить вещества с минимальной токсичностью. При оценке антиаритмической активности на модели хлоридкальциевой аритмии для них были определены эффективные антиаритмические дозы. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Острая токсичность и антиаритмическая активность производных морфолиноуксусной кислоты при хлоридкальциевой аритмии у мышей

Соединение	$ЛД_{50}$, мг/кг	$ЭД_{50}$, мг/кг	АИ ($ЛД_{50}$ / $ЭД_{50}$)
М-0	231,0 (213,0±254,0)	6,4 (4,9±8,6)	36,1
М-1	32,5 (28,0±38,0)	Неактивно	
М-2	32,5 (28,0±38,0)	Неактивно	–
М-3	103,0 (88,0±118,0)	44,7 (37,0±59,0)	2,3
М-4	65,0 (53,0±80,0)	Неактивно	–
М-5	73,0 (53,0±100,0)	Неактивно	–
М-6	12,9 (11,0±15,0)	5,5 (4,0±7,5)	2,3
М-7	30,0 (24,0±38,0)	4,6 (3,3±6,3)	6,5
М-8	129,0 (110,0±150,0)	60,0 (48,0±74,0)	2,2
М-9	28,2 (23,0±34,0)	5,5 (4,0±7,5)	5,1
М-10	34,6 (25,0±48,0)	4,4 (3,2±6,0)	7,8
М-11	65,0 (53,0±80,0)	13,7 (10,0±19,0)	4,7
М-12	69,0 (50,0±95,0)	12,0 (10,0±15,0)	5,8
М-14	178,0(150,0±210,0)	54,7 (40,0±75,0)	3,3
М-15	103,0 (88,0±118,0)	29,3 (22,0±30,0)	3,5
М-16	129,0 (110,0±150,0)	89,0 (75,0±106,0)	1,4
М-17	129,0 (100,0±160,0)	44,7 (37,0±59,0)	2,9
М-18	146,0 (110,0±200,0)	11,2 (9,2±13,4)	13,0
М-19	258,0 (210,0±320,0)	35,5 (31,0±40,0)	7,2
М-20	65,0 (56,0±75,0)	Неактивно	–
Лидокаин	39,3 (34,2±44,5)	7,7 (5,9±9,4)	5,1
Верапамил	10,5 (8,5±12,5)	2,5 (1,8±3,5)	4,2

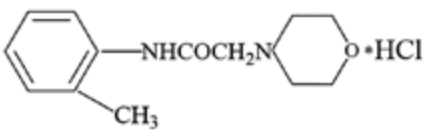
При исследовании острой токсичности соединений было установлено, что наиболее токсичным является соединение М-6, его $ЛД_{50}$ при внутривенном введении составила 12,9 мг/кг, что сравнимо с токсичностью верапамила, но на уровне лидокаина оно показало себя как более токсичное.

Вещества М-0, М-14, М-15, М-16, М-17, М-18 и М-19, относящиеся к производным морфолиноуксусной кислоты, проявили меньшую токсичность. $ЛД_{50}$ этих соединений составила 129-258 мг/кг, что значительно превосходило показатели препаратов сравнения. Минимальной оказалась токсичность соединения М-19, его среднесмертельная доза равнялась 258 мг/кг и превышала $ЛД_{50}$ лидокаина в 6,6 раза, а верапамила – в 24,6 раза.

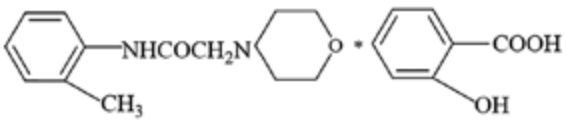
На основании показателей $ЛД_{50}$ и $ЭД_{50}$ определялся антиаритмический индекс изучаемых соединений. Из 20 исследованных соединений 5 веществ совсем не проявили антиаритмической активности, лишь у 8 из них (М-0, М-6, М-7, М-9, М-10, М-11, М-12, М-18) средние эффективные дозы были минимальны и составляли 4,4-13,7 мг/кг, остальные имели $ЭД_{50}$ в пределах от 35,5 до 60,0 мг/кг.

В результате максимальная широта терапевтического действия была обнаружена у соединений М-0 и М-18 [8], их АИ оказались наибольшими и равнялись 36,1 и 13,0 соответственно. Относительная активность большинства веществ по сравнению с лидокаином и верапамилом оказалась невысокой. Однако антиаритмический эффект соединения М-0 превосходил действие лидокаина в 7,1 и действие верапамила в 8,6 раза. Активность соединения М-18 оказалась выше в 2,5 раза по сравнению с лидокаином и в 3,1 раза по сравнению с верапамилом.

Для дальнейшего исследования были выбраны соединения, проявившие наибольшую антиаритмическую активность на модели хлоридкальциевой аритмии и обладающие наименьшей токсичностью, – орто-толуидид морфолиноуксусной кислоты (М-0) и синтезированная на его основе соль салициловой кислоты (М-18).



М-0



М-18

Данные, полученные при изучении антиаритмической активности соединений на аконитиновой модели, представлены в таблице 2.

В результате исследования было установлено, что после введения аконитина у всех животных возникало нарушение ритма сердца, продолжительность аритмии при этом составила 626,5 с. Предварительное введение препарата сравнения – лидокаина несколько увеличивало длительность аритмии по сравнению с контрольным результатом. Кроме того, лидокаин не предупреждал гибель крыс, смертность животных, погибших на фоне развившейся аритмии в среднем через 15 мин, составила 40%, что оказалось достоверно больше, чем в контроле. Введение верапамила также не предупреждало развитие аритмии, ее продолжительность не отличалась от контрольного показателя, однако данный препарат сравнения полностью предупреждал гибель животных в опыте.

Таблица 2.

Антиаритмическая активность исследуемых соединений в условиях аконитиновой аритмии у крыс

Соединения	Количество животных в опыте	Доза ($ЭД_{50}$), мг/кг	Продолжительность аритмии, с	Гибель, %
Контроль	10	–	626,5±95,2	10
М-0		6,4	508,0±67,2 p > 0,05 p′ > 0,05 p» > 0,05	0
М-18	10	11,2	650,5±138,6 p>0,05 p′>0,05 p′′>0,05	10
Лидокаин	10	7,7	929,7±263,5 p>0,05	40
Верапамил	10	2,5	561,0±92,7 p>0,05	0

Примечание: p – достоверность в сравнении с контролем;
p′ – достоверность в сравнении с лидокаином;
p′′ – достоверность в сравнении с верапамилом.

Средняя продолжительность аритмии, вызванной введением раствора аконитина, после предварительного введения соединений М-0 и М-18 также практически не отличалась от контрольного уровня. При этом при использовании соединения М-18 гибель животных на фоне развившейся аритмии наступала в 10% случаев, что несколько меньше по сравнению с данным показателем, полученным при введении ли-

докаина. Соединение М-0 показало результат, сопоставимый по данному показателю с активностью верапамила.

Именно у этих соединений была проведена оценка выраженности аритмогенного действия. Данные, полученные в результате опытов, отражены в таблице 3.

Установлено, что введение физиологического раствора животным не вызывало у них изменений ЭКГ. После внутривенного введения крысам 1,5% раствора хлористого калия у всех животных возникало нарушение ритма сердца, продолжительность которого достигала 36,5 с. При этом в контрольной серии опытов гибель на фоне развившейся аритмии не наступала.

Таблица 3.

Влияние исследуемых соединений на K^+-индуцированные нарушения ритма сердца у крыс

Соединение	Частота аритмии, %	Продолжительность аритмии, с	Выживаемость, %
Контроль (физиол. р-р)	0	0	100
Контроль (1,5% р-р KCl)	100	36,5±5,6	100
М-0	100	75,0 ± 15,7 p<0,05 p'>0,05 p''<0,05	100
М-18	100	53,0±18,9 p>0,05 p'>0,05 p''<0,05	100
Лидокаин	100	110,0±31,9 p<0,05	80
Верапамил	100	185,6±44,2 p<0,002	20

Примечание: p – достоверность по сравнению с контролем;
p' – достоверность по сравнению с лидокаином;
p'' – достоверность по сравнению с верапамилом.

На фоне предварительного введения и лидокаина, и верапамила аритмии, вызванные гипополяризацией плазматических мембран кардиомиоцитов, регистрировались в 100% случаев. При этом период от момента появления первых отклонений от нормы до восстановления синусового ритма по сравнению с контролем достоверно увеличивался. При использовании лидокаина время аритмии удлинялось в 3 раза, а при введении верапамила – в 5 раз, то есть эти препараты в значительной степени провоцировали усиление аритмии у подопытных животных. Кроме того, в этих сериях опытов отмечался низкий уровень выживаемости животных. Аритмии, усиливавшиеся при использовании лидокаина, заканчивались гибелью 20%, а верапамила – 80% животных.

При введении соединения М-0 частота появления аритмий, вызванных введением KCl, также не уменьшалась, а их продолжительность увеличивалась, данное вещество удлиняло время аритмии в 2 раза по сравнению с контрольными результатами, что было сопоставимо с эффектом лидокаина. В опытах с соединением М-18 частота появления аритмий снизилась на 20%, кроме того, не происходило достоверного по сравнению с контролем увеличения продолжительности нарушений ритма, этот показатель для исследуемого вещества оказался в 2 раза меньше, чем для лидокаина, а по сравнению с верапамилом был меньше в 3,5 раза. В опытах с введением животным соединений М-0 и М-18 смертность на фоне хлоридкалиевой аритмии не регистрировалась.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, было установлено, что новые производные морфолиноуксусной кислоты – М-0 и М-18 проявили выраженный антиаритмический эффект на модели хлоридкальциевой аритмии. При этом соединение М-18 показало себя как менее опасное по сравнению и с соединением М-0, и с известными противоаритмическими препаратами, так как не проявило достоверно выраженного побочного аритмогенного действия. Полученные результаты указывают на целесообразность проведения дальнейших углубленных фармакологических исследований для выявления механизмов действия данных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патофизиология сердечно-сосудистой системы / Под ред. Л. Лилли – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. 672 с.
2. О.Л. Бокерия. Медикаментозное лечение внезапной сердечной смерти // Анналы аритмологии. 2013. № 2. С. 101–110.
3. Руководство по кардиологии / Под ред. В. Н. Коваленко. – К.: Морион, 2008. 1424 с.
4. В.В. Горбунова, Н.П. Горбунов. Сравнительное изучение активности антиаритмическикх средств при хлоридкальциевой аритмии у мышей // Фармакология и токсикология. 1983. № 3. С. 48–50.
5. В.Б. Прозоровский, М.П. Прозоровская, В.М. Демченко. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакология и токсикология. 1978. Т. 41. № 4. С. 497–502.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
7. В.Б. Прозоровский. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований // Психофармакология и биологическая наркология. 2007. Т. 7. № 3–4. С. 2090–2120.
8. И.П. Рудакова, О.В. Гашкова, Б.Я. Сыропятов, С.В. Чащина, Л.А. Чекрышкина. Исследование антиаритмической активности производных морфолиноуксусной кислоты // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2015. № 11. С. 33–36.

УДК 615.014.42; 615.45; 543

СПОСОБЫ СТАБИЛИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПРИ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (ОБЗОР)

И.И. Яичков[1]*, А.Л. Хохлов[1], Ю.А. Джурко[2], Л.Н. Шитов[1,2], А.А. Трубников[1]

Резюме. В статье рассмотрены основные способы предотвращения разложения химически нестабильных лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях в процессе хранения после отбора у пациентов, что необходимо для точного количественного определения данных соединений.

Ключевые слова: стабилизация, биоэквивалентность, фармакокинетика.

METHODS OF STABILIZATION OF DRUG SUBSTANCES AND THEIR METABOLITES IN BIOLOGICAL FLUIDS DURING BIOANALYTICAL STUDY (REVIEW)

I.I. Yaichkov[1]*, A.L. Khokhlov[1], Y.A. Dzhurko[2], L.N. Shitov[1,2], A.A. Trubnikov[1]

Abstract. This article describes main methods of preventing degradation of chemically unstable drugs and their metabolites in biological fluids during storage after collection from patients. It is necessary for accurate quantitative determination of these compounds.

Keywords: stabilization, bioequivalence, pharmacokinetics.

1 – ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, 150000, Россия, Ярославль, ул. Революционная, 5

2 – ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», 150045, Россия, Ярославль, Ленинградский пр-т, 52Г

1 – Yaroslavl State Medical University of the Ministry of health of the Russian Federation, 5, Revolutionnaya str., Yaroslavl, 150000, Russia

2 – Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, 52G, Leningradskiy pr., Yaroslavl, 150045, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: ilya_1993_08@mail.ru
Тел.: 8 (4852) 73 40 53

ВВЕДЕНИЕ

Идентификация и количественное определение лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях является основным этапом изучения фармакокинетики, биоэквивалентности, а также обязательной частью судебно-химических и химико-токсикологических исследований. Некоторые соединения содержат нестабильные функциональные группы и могут разрушаться при хранении образцов или в процессе анализа. Примерами данных веществ являются фенолы, тиолы, сложные эфиры, лактоны, N-оксиды, конъюгированные формы лекарственных веществ (глюкурониды, сульфаты и т.д.) [1, 2]. Также известно явление интерконверсии стереоизомеров. Изменение химической структуры может происходить как под действием внешних факторов – температуры, света, так и под влиянием самой биологической матрицы, прежде всего активности её ферментных систем и величины pH. Предотвратить разложение можно путём изменения условий хранения и при помощи добавления стабилизаторов: антиоксидантов, буферных растворов, растворов кислот и оснований для коррекции pH, ингибиторов ферментов – в зависимости от особенностей структуры анализируемого вещества.

Согласно руководству по валидации аналитических методик EMA [3] и руководству ФГБУ «НЦЭСМП» (том 1) [4] при наличии у лекарственного вещества нестабильных метаболитов, таких как глюкурониды, N-оксиды, сложные эфиры и лактоны, необходимо изучать обратную конверсию данных веществ в процессе хранения, экстракции и проведения аналитических процедур. Данная оценка проводится либо путём добавления метаболита к биологической матрице с последующей оценкой точности количественного определения аналита, либо посредством повторного анализа проанализированных ранее образцов (ISR-теста).

Целью данной работы является выявление методических подходов к стабилизации биологических проб при биоаналитических исследованиях на основании анализа и обобщение данных литературы.

СТАБИЛИЗАЦИЯ ЛЕГКООКИСЛЯЮЩИХСЯ И ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К СВЕТУ СОЕДИНЕНИЙ

Фенольные соединения, особенно двухатомные и многоатомные фенолы, достаточно легко подвергаются окислительным процессам [6]. Предотвратить их разложение можно путём добавления к биологическим жидкостям растворов антиоксидантов. Так, для стабилизации молекулы метилдопы, которая содержит два фенольных гидроксила, в плазме крови применялся 5% раствор аскорбиновой кислоты [7], для стабилизации аналогичного по структуре допамина авторами был использован 5% раствор натрия метабисульфита [8]. При количественном определении полифенольных соединений – катехинов к моче добавляли смесь растворов хлористоводородной кислоты в концентрации 1 моль/л и аскорбиновой кислоты в концентрации 10% [9].

Производные птеридина, количественное определение которых в биологических средах имеет большое значение при диагностике некоторых инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, также способны легко окисляться. Для их стабилизации [10] рекомендуют использовать дитиоэритреитол (ДТЭ), дитиотреитол, аскорбиновую кислоту и диэтилентриаминпентауксусную кислоту. Например, предупреждение окисления тетрагидробиоптерина до дигидробиоптерина после отбора цереброспинальной жидкости достигалось с помощью смеси растворов ДТЭ и диэтилентриаминпентауксусной кислоты при температуре хранения –70 °С [11], а после отбора плазмы – с помощью смеси растворов аскорбиновой кислоты в концентрации 0,04% и ДТЭ в концентрации 0,1% при температуре хранения –80 °С [12].

Предотвращения димеризации легкоокисляющихся тиолов можно достигнуть путём дериватизации. Так, для стабилизации меркаптогруппы активного метаболита прасугрела R-138727 в качестве дериватизирующего агента использовался 2-бромо-3′-метоксиацетофенон (рисунок 1) [13], при количественном определении каптоприла – N,N,N′,N′-тетраметил-2-бутендиамин [14]. Для предупреждения окисления омапатрилата применяли метилирующий агент – метилакрилат [15]. В качестве замены метилакрилата можно использовать N-этилмалеимид [2].

Стабилизации также можно достигнуть без добавки антиоксиданта, с помощью подбора условий хранения и антикоагулянта. Так, 4β-гидроксихолестерол в процессе хранения при температуре не выше –20 °С был подвержен значительной деградации, а при глубокой заморозке до температуры не выше –70 °С был относительно стабилен. При этом кровь у пациентов отбирали в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта [16].

N-оксиды способны быстро разлагаться до исходных лекарственных веществ при хранении, при повышенных температурах, в процессе пробоподготовки и проведения анализа. Степень их обратной конверсии зависит от pH среды при экстракции: они относительно нестабильны при щелочной pH среды [1, 2]. Важную роль играет и природа раствора, который используют для коррекции pH. Так, при подщелачивании плазмы крови раствором натрия гидроксида N-оксид хлорпротиксена почти полностью разлагался (рисунок 2), а при подщелачивании раствором натрия гидрокарбоната был относительно стабилен. Для предотвращения разложения данного метаболита пробы плазмы необходимо стабилизировать раствором аскорбиновой кислоты. В процессе экстракции также следует избегать воздействия высоких температур.

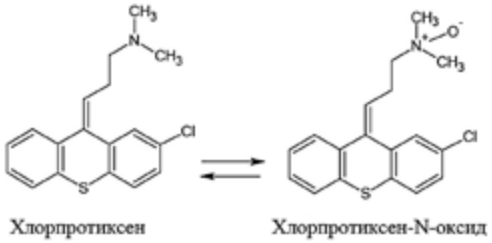


Рисунок 2. Схема разложения N-оксида хлорпротиксена

В качестве метода анализа при количественном определении веществ, которые в процессе метаболизма образуют N-оксиды, предпочтительно использовать ВЭЖХ-МС/МС из-за мягких условий хроматографического разделения и ионизации [1].

Некоторые лекарственные вещества способны разрушаться под действием света. Примерами таких соединений являются витамины группы D, нифедипин, бендрофлуметиазид, монтелукаст [9, 17, 18]. Для предотвращения их разложения в составе биологических проб необходимо использовать пробирки, обёрнутые алюминиевой фольгой либо изготовленные из тёмного стекла или окрашенного полипропи-

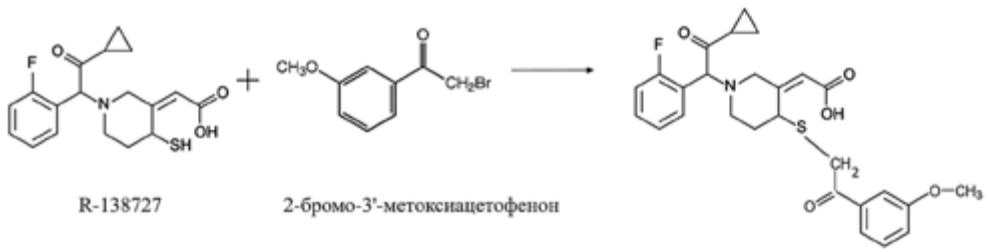


Рисунок 1. Схема дериватизации метаболита прасугрела R-138727

лена, не пропускающие свет. Кроме того, целесообразно применять специальные источники освещения, не выделяющие излучения в УФ-диапазоне. Хранение при пониженной температуре также снижает скорость протекания фотохимических реакций [9].

Таким образом, для предотвращения окисления лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях можно использовать растворы антиоксидантов, наиболее распространённым из которых является раствор аскорбиновой кислоты. Для стабилизации тиолов также возможно применение дериватизации. При работе со светочувствительными веществами необходимо избегать прямого попадания ультрафиолетового излучения на образец. Также хранение биологических объектов, содержащих легкоокисляющиеся вещества, необходимо осуществлять при температуре не выше –70 °С, а в некоторых случаях – не выше –90 °С.

ЗАВИСИМОСТЬ СТАБИЛЬНОСТИ ЛВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ ОТ РН СРЕДЫ. ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ГИДРОЛИЗА СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ И ЛАКТОНОВ

Уровень pH биологической жидкости оказывает значительное влияние на стабильность таких соединений, как глюкурониды, лактоны и сложные эфиры. Значение данного показателя сказывается на активности ферментных систем и скорости протекания pH-зависимых реакций. Добавление к образцу растворов кислот, оснований и буферных растворов может существенно повысить стабильность перечисленных выше классов веществ [19].

О-ацилглюкурониды лекарственных веществ по химической структуре являются сложными эфирами. В биологических средах может протекать как полный гидролиз данных метаболитов, так и их изомеризация. При этом происходит миграция сложноэфирной связи в положения С-2, С-3, С-4 глюкуронового кольца с образованием α- и β-аномеров [9]. Примерами таких соединений являются 1-О-ацилглюкуронид телмисартана и 1-О-ацилглюкуронид диклофенака [20]. Стабилизации данных конъюгатов можно добиться путём коррекции pH до значения ниже 6,0; при щелочных значениях pH биологической жидкости проходит их быстрый гидролиз [2]. Так как данный вид сложноэфирной связи разрушается при воздействии высоких температур, количественное определение данных соединений рекомендовано проводить с использованием в качестве метода анализа ВЭЖХ-МС/МС [1].

При хранении образцов плазмы и сыворотки крови, содержащей статины и их метаболиты, может наблюдаться как явление гидролиза лактонного кольца (рисунок 3), так и циклизация β-гидроксикислоты в лактон (рисунок 4) [9, 21–24]. Для предотвращения обратной конверсии данной группы веществ к пробам, полученным от добровольцев, добавляют буферные растворы со значением pH от 4,0 до 5,0 (см. таблицу 1).

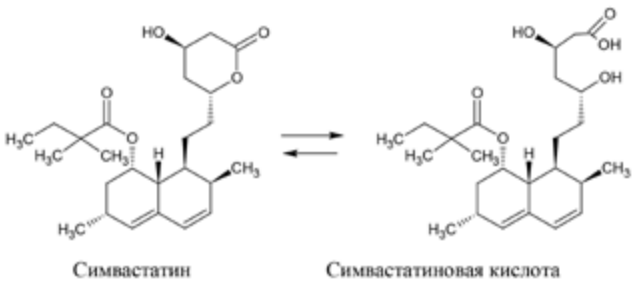


Рисунок 3. **Схема гидролиза симвастатина**

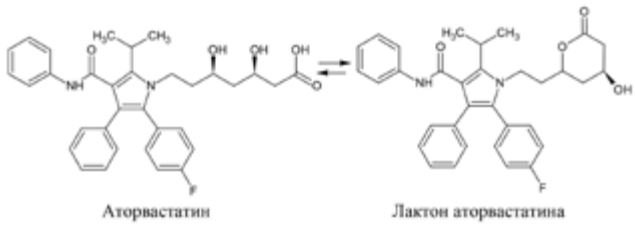


Рисунок 4. **Схема циклизации аторвастатина**

Таблица 1.

Способы стабилизации статинов в биологических жидкостях

Название лекарственного вещества	Биологическая жидкость	Стабилизатор	Условия хранения	Источник
Правастатин	сыворотка	раствор ацетата аммония с pH 4,5 (500 мМ) (0,3 мл раствора на 0,5 мл сыворотки)	Не выше –70 °С	22
Розувастатин	плазма	раствор ацетата натрия с pH 4,0 (в соотношении 1:1 с плазмой)	Не выше –20 °С и –70 °С	21
Аторвастатин	сыворотка	раствор ацетата натрия с pH 5,0 (в соотношении 1:1 с сывороткой)	Не выше –70 °С	23
Симвастатин	плазма	раствор ацетата натрия с pH 4,2 (0,1 М) (25 мкл раствора на 0,1 мл плазмы)	Не выше –70 °С	24
	плазма	раствор ацетата аммония с pH 4,5 + натрия фторид и калия оксалат в качестве антикоагулянта	Сухой лёд (в эксперименте)	9
	плазма	раствор ацетата аммония с pH 4,5 + K_2 ЭДТА, натрия фторид и калия оксалат в качестве антикоагулянта		

Для предупреждения гидролиза сложных эфиров и лактонов применяют также и ингибиторы эстераз. К ним относятся натрия фторид и его смеси с калия оксалатом и K_2 ЭДТА, параоксон, фенилметансульфонилфторид (ФМСФ), бис-(4-нитрофенил)-фосфат (БНФФ), эзерин, теноилтрифторацетон (ТТФА), диизопропилфторфосфат (ДПФФ), дихлофос и т.д. Причём карбоксиэстеразы способны блокировать БНФФ, ФМСФ, ТТФА, ДПФФ, дихлофос и параоксон, ацетилхолинэстеразы блокируют параоксон, дихлофос и эзерин, фосфодиестеразы блокирует БНФФ. Натрия фторид является неспецифическим ингибитором данной группы ферментов [25]. Так, для стабилизации симвастатина в плазме крови применялись смеси натрия фторида и калия оксалата, смеси натрия фторида, калия оксалата и K_2 ЭДТА [9], параоксон [26], для устранения гидролиза в плазме осельтамивира (см. рисунок 5) использовался дихлофос [27], для стабилизации селективного ингибитора аденозина 2A B-068645 – ДПФФ [28]. При работе с пробами, содержащими ацетилсалициловую кислоту, необходимо использовать охлаждённые реактивы [29]. В качестве ингибитора эстераз при биоаналитических исследованиях данного соединения обычно используют натрия фторид [30] или его смесь на K_2 ЭДТА [31].

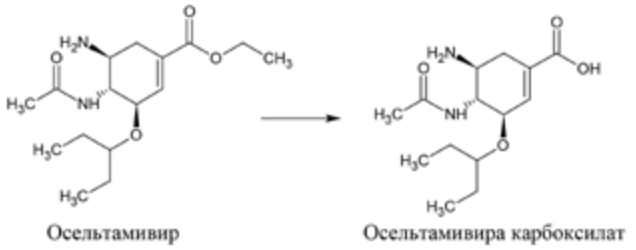


Рисунок 5. Схема гидролиза осельтамивира

Таким образом, для предотвращения гидролиза глюкуронидов, лактонов и сложных эфиров в биологических жидкостях можно использовать ингибиторы ферментных систем и коррекцию значения pH.

Предупреждение интерконверсии энантиомеров и диастереомеров

Известно явление интерконверсии стереоизомеров в плазме крови в процессе хранения. На протекание данного процесса оказывают влияние температура, свет, pH среды и активность ферментов [2]. Так, оксазепам [32], росиглитазон и пиоглитазон [33] подвергаются рацемизации, а 13-транс-ретиноевая кислота способна переходить в 13-цис-ретиноевую кислоту (см. рисунок 6) [34].

Предотвращение рацемизации глитазонов было достигнуто путём коррекции pH среды до 2,5. При значении pH 7,4 и 9,3 рацемизация данных соединений проходила полностью, причём при pH 9,3 процесс завершился намного быстрее – в течение 24 часов [33]. Для стабилизации оксазепама пробы плазмы подкисляли 0,1 н. раствором хлористоводородной кислоты [32], а для предотвращения интерконверсии ретиноидов использовалась смесь натрия аскорбината и N-этилмалеимида [34].

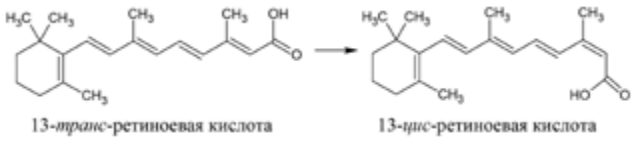


Рисунок 6. Схема изомеризации ретиноевой кислоты

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При разработке биоаналитической методики для количественного определения легкоразлагающихся веществ выбор условий хранения биологической жидкости необходимо начинать с использования более глубокой заморозки до температуры не выше –70 °C или не выше –90 °C. В случае получения неудовлетворительных результатов необходимо применять растворы стабилизаторов (таблица 2).

Таким образом, для стабилизации легкоокисляющихся соединений необходимо использовать антиокисданты или дериватизацию, для предотвращения гидролиза сложных эфиров, лактонов – ингибиторы эстераз и коррекцию pH, для предотвращения гидролиза глюкуронидов – коррекцию pH, для предупреждения интерконверсии стереоизомеров – закисление среды до pH 2-2,5. Отбор биологических проб при исследованиях светочувствительных веществ необходимо осуществлять в не пропускающую свет тару.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. Dell. Labile Metabolites // Chromatographia Supplement. 2004. № 59. C. 139–148.
2. M. Hilhorst et al. Stabilization of clinical samples collected for quantitative bioanalysis – a reflection from the European Bioanalysis Forum // Bioanalysis. 2015. № 3 (7). P. 333–343.
3. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use, London, 2013.
4. А.Н. Миронов. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. – М.: Гриф и К. 2013. 322 с.
5. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза», 2016.
6. Органическая химия. Кн.1: Основной курс / Под ред. Н.А. Тюкавкиной. – М.: Дрофа. 2003. 640 с.
7. A.L. Khokhlov et al. The Pharmacokinetic Properties and Bioequivalence of Methyldopa Formulations: Results of an Open-label, Randomized, Two-period, Crossover, Single-dose Study // Journal of Bioequivalence & Bioavailability. 2016. № 8. P. 185–190.
8. N.C. van de Merbel et al. Quantitative determination of free and total dopamine in human plasma by LC-MS/MS: the importance of sample preparation // Bioanalysis. 2011. № 3(17). P. 1949–1961.
9. W. Li et al. Handbook of LC-MS Bioanalysis. – New Jersey: Jonh Wiley and Sons. 2013. 675 p.
10. H. Tomšíková. Determination of pteridines in biological samples with an emphasis on their stability // Bioanalysis. 2013. № 5(18). P. 2307–2326.

Таблица 2.

Основные способы стабилизации аналитов в биологических жидкостях

Группа веществ	Способ стабилизации	Примеры
Легкоокисляющиеся соединения	Добавление антиоксидантов (растворов аскорбиновой кислоты, натрия метабисульфита и др.)	метилдопа, допамин, тетрагидробиоптерин
	Дериватизация	метаболит прасугрела R-138727, омапатрилат, каптоприл
	Хранение при температуре не выше –70 °С	4ß-гидроксихолестерол
N-оксиды	Добавление антиоксидантов	хлорпротиксен
Светочувствительные соединения	Хранение в светонепроницаемой таре	витамин D, нифедипин, бендрофлуметиазид, монтелукаст
Глюкурониды	Коррекция pH биологической пробы до значений ниже 6,0	телмисартан, диклофенак
Сложные эфиры	Коррекция pH, использование ингибиторов эстераз (фторида натрия, параоксона, эсерина и др.)	осельтамивир, селективный ингибитор аденозина 2A B-068645, ацетилсалициловая кислота
Лактоны		статины
Стереоизомеры	Создание сильнокислой pH среды	оксазепам, росиглитазон и пиоглитазон
	Добавление раствора аскорбиновой кислоты и N-этилмалеимида	ретиноевая кислота

11. D.W. Howells, K. Hyland. Direct analysis of tetrahydrobiopterin in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with redox electrochemistry: prevention of autoxidation during storage and analysis // Clinica Chimica Acta. 1987. V. 167. P. 23–30.
12. B. Fiege et al. Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration // Molecular Genetics and Metabolism. 2004. V. 81. P. 45–51.
13. E.R. Wickremsinhe et al. Stereoselective Metabolism of Prasugrel in Humans Using a Novel Chiral Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method // Drug Metobalism and Disposition. 2007. № 6(35). P. 917–921.
14. K.H. Abu-Shandi, E. Redel. Quantification and Stability Evaluation of the Highly Specific Angeotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor in Human Plasma Using a Gas Chromatography Method with N,N,N′,N′-teteramethyl-2-butenediamine Derivatizing Agent // Jordan Journal of Chemistry. 2009. № 2(4). P. 183–194.
15. M. Jemal et al. LC/MS/MS Determination of Omapatrilat, a Sulfhydryl-Containing Vasopeptidase Inhibitor, and Its Sulfhydryl- and Thioether-Containing Metabolites in Human Plasma // Analytical Chemistry. 2001. № 22(73). P. 5450–5456.
16. N.C. Van de Merbel et al. A validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of 4β-hydroxycholesterol in human plasma // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2011. V. 55. P. 1089–1095.
17. M.Y. Katteboina, N.R. Pilli, S.R. Salta. LC-MS/MS Method Development and Validation of Montelukast in human plasma and its clinical application// American Journal of Pharmaceutical Research. 2015. № 5 (3). P. 646–657.
18. Z. Bartoszewicz et al. Can we accurately measure the concentration of clinically relevant vitamin D metabolites in the circulation? The problems and their consequences // Endokrynologia Polska. 2013. № 3(64). P. 238–245.
19. A. Fura et al. Shift in pH of biological fluids during storage and processing: effect on bioanalysis // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2003. V. 32. P. 513–522.
20. T. Ebner et al. Disposition and Chemical stability of Telmisartan 1-O-acylglucuronide // Drug Metabolism and Disposition. 1999. № 10(27). P. 1143–1149.
21. C.K. Hull et al. Quantification of rosuvastatin in human plasma by automated solid-phase extraction using tandem mass spectrometric detection // Journal of Chromatography B. 2002. V. 772. P. 219–228.
22. D. Mulvana, M. Jemal , S.C. Pulver. Quantitative determination of pravastatin and its biotransformation products in human serum by turbo ion spray LC/MS/MS // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2000. № 23. P. 851–866.
23. M. Jemal et al. Quantitation of the Acid and Lactone Forms of Atorvastatin and its Biotransformation Products in Human Serum by High-performance Liquid Chromatography with Electrospray Tandem Mass Spectrometry // Rapid Communications in Mass Spectrometry. 1999. V. 13. P. 1003–1015.
24. M. Jemal, Z. Ouyang, M.L. Powell. Direct-injection LC-MS-MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2000. V. 23. P. 323–340.
25. E.N. Fung et al. Effective screening approach to select esterase inhibitors used for stabilizing ester-containing prodrugs analyzed by LC-MS/MS // Bioanalysis. 2010. № 2(4). P. 733–743.
26. Z. Suchocka et al. RP-HPLC determination of paraoxonase 3 activity in human blood serum // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006. V. 42. P. 113–119.
27. N. Lindegardh et al. Importance of Collection Tube during Clinical Studies of Oseltamivir // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007. № 5(51). P. 1835–1836.
28. J. Zeng et al. Simultaneous determination of a selective adenosine 2A agonist, BMS-068645, and its acid metabolite in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry – Evaluation of the esterase inhibitor, diisopropyl fluorophosphate, in the stabilization of a labile ester-containing drug // Journal of Chromatography B. 2007. V. 852. P. 77–84.
29. B. Nigori et al. Simulation extraction of acetylsalicylic acid and Salicylic acid from human plasma and simultaneous estimation by liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization / tandem massspectrometry detection // Arzneimittelforschung. 2011. № 5(61). P 301–311.
30. S.K. Bae et al. Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolite, salicylic acid in human plasma using liquid chromatography – tandem massspectrometry: application to pharmacokinetic study of Astrix in Korean healthy volunteers // Biomedical Chromatography. 2008. V. 22. P. 590 –595.
31. X. Xu et al. Rapid and sensitive Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma using liquid chromatography – tandem massspectrometry: application to pharmacokinetic study // Biomedical Chromatography. 2009. V. 23. P. 973–979.
32. C. Pham-Huy, G. Villain-Pautet, H. Hua. Separation of oxazepam, lorazepam, and temazepam enantiomers by HPLS on a derivatizated cyclodextrin-bonded phase: application to the determination of oxazepam in plasma // Biochemical and biophysical methods. 2002. V. 54. P. 287–299.
33. B. Jamali et al. Investigation of racemisation of the enantiomers of glitazone drug compounds at different pH using chiral HPLC and chiral CE // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008. V. 46. P. 82–87.
34. C.J. Wang et al. Novel inhibition of cis/trans retinoic acid interconversion in biological fluids – an accurate method for determination trans and 13-cis retinoic acid in biological fluids // Journal of Chromatography B. 2003. V. 796. P. 283–291.

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

УДК 615.01

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР НОРМАТИВНОЙ БАЗЫ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ НАДЛЕЖАЩЕГО КАЧЕСТВА ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В РОССИИ

А.И. Селезнева[1]*, С.В. Глембоцкий[1], С.В. Поляков[1], М.Н. Макарова[2], В.Г. Макаров[2], А.А. Чурин[3]

Резюме. Главной целью доклинических исследований является создание эффективных, качественных и безопасных лекарственных средств (ЛС). Задача доклинических исследований – получение исчерпывающей информации, достоверных и воспроизводимых результатов. В статье представлен обзор современных нормативных документов, регламентирующих качество доклинических исследований, акцентировано внимание на наиболее важной информации, содержащейся в этих документах, и даны рекомендации специалистам. Внимательное и обоснованное применение правил, рекомендаций и исполнение требований нормативных документов специалистами, вовлеченными в процесс разработки лекарственных средств, позволяют получить достоверные, полные и качественные результаты доклинических исследований. Это исключительно важно как для планирования и проведения последующих клинических испытаний, так и с точки зрения целесообразности продолжения разработки.

Ключевые слова: доклинические исследования, разработка лекарственных средств, качество.

ANALYTICAL REVIEW OF THE NORMATIVE BASE TO PROVIDE THE GOOD QUALITY OF PRECLINICAL STUDIES IN RUSSIA

A.I. Selezneva[1]*, S.V. Glembotsky[1], S.V. Polyakov[1], M.N. Makarova[2], V.G. Makarov[2], A.A. Churin[3]

Abstract. The main goal of preclinical studiesis the development of effective, high-quality and safe drugs. The task of preclinical studiesis to obtain exhaustive information, reliable and reproducible results. The article presents an overview of modern normative documents regulating the quality of preclinical studies, focuses attentionon the most important information in these documents and gives recommendations to specialists. A careful and reasonable application of the rules, guidelines and implementation of requirements of regulatory documents by experts involved in the process of drug development, allow to obtain reliable, complete and qualitative results of preclinical studies. This is extremely important both for planning and conducting subsequent clinical trials, and for evaluation of the desirability of continuing the project of development.

Keywords: preclinical studies, drug development, quality.

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП»), 109044, Россия, Москва, Лавров переулок, 6

2 – ЗАО «НПО «Дом фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмоловский, ул. Заводская, 3, к. 245

3 – НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, 634028, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 3

1 – State Institute of Drugs and Good Practices, 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia

2 – Scientific and Production Association «House of Pharmacy», 3, bd. 245, v. Kuzmolovsky, Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

3 – E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, 3, Lenin av., Tomsk, 634028, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Современная фармацевтическая отрасль получила интенсивное развитие в этом и в прошлом веках. Однако, помимо выдающихся открытий в области медикаментозной терапии, в истории фармацевтики нашлось место и серьезным трагедиям, связанным с недостаточно полным изучением безопасности лекарственных средств. Так, в 1937 году произошла лекарственная трагедия в США: погибло 107 человек при использовании жидкого сульфаниламида, содержащего полиэтиленгликоль. В 1954 году во Франции погибло 100 человек в результате использования сталинона, содержащего свинец, при лечении ожогов. В начале 1960-х годов в Европе и США разыгралась «талидомидовая трагедия», в результате которой пострадало более 10 тысяч человек [1]. В результате этих событий стала очевидна необходимость совершенствования регулирования качества и полноты исследований лекарственных средств и началось формирование нормативной базы для доклинических и клинических исследований. Специалисты ФБУ «ГИЛС и НП» в области разработки и регистрации лекарственных средств совместно с партнерскими исследовательскими центрами ЗАО «НПО «Дом фармации» и НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольд-

берга осуществили обзор современных нормативных документов, регламентирующих качество доклинических исследований. Был проведен анализ отечественных и некоторых зарубежных требований, выделены главные указания, содержащие информацию о надлежащем качестве доклинических исследований. Данный обзор не затрагивает область доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов, качество которых также регулируется ГОСТ 33044-2014 [2], так как рекомендации и требования к этому виду лекарственных средств (ЛС) продолжают модифицироваться и дополняться.

Надлежащее качество доклинических исследований обеспечивается не только соблюдением ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», который является основополагающим, но также возможностью и способностью российских испытательных лабораторий выполнять исследования и подтверждать их достоверность качественными отчетными документами, ценными для последующих этапов разработки и регистрации лекарственных средств.

Высокое качество доклинических исследований обеспечивает безопасность добровольцев, снижает затраты на следующие этапы и страховые риски, обеспечивает качество ЛС, их эффективность и безопасность. Грамотное обращение с нормативными документами позволяет обеспечить высокое качество доклинических исследований с минимальными вложениями.

Главной целью доклинических исследований является создание эффективного, качественного и безопасного ЛС. Задачей доклинических исследований является получение достоверного и воспроизводимого результата. Ведущий нормативный документ РФ в этой области – 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [3]. Пункты 1 и 2 ст.11 данного закона гласят: «Доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения проводится путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства», «Доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения проводится в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти» [3]. Таким образом, основополагающими нормативными документами в области разработки ЛС являются ФЗ-61 и ГОСТ 33044-2014. Однако ответы на вопросы, не освещенные в этих документах, могут быть получены из других национальных и международных стандартов, смысл которых не противоречит ФЗ-61 и ГОСТ 33044-2014.

Основные факторы, влияющие на качество доклинических исследований и описанные в нормативных документах, – это помещения, оборудование, тест-системы, качество тестируемых объектов и методы работы с ними, система управления персоналом и его квалификация, организация внутреннего и внешнего контроля и обеспечения качества исследований, правила документооборота, а также гуманное обращение с животными. Эти и некоторые другие факторы рассмотрены ниже с точки зрения применимых к ним нормативных документов и исполнения их рекомендаций на практике.

ПОМЕЩЕНИЯ И ОБОРУДОВАНИЕ

Для обеспечения надлежащего качества доклинических исследований необходимо наличие вивария, способного обеспечить оптимальное содержание животных и отсутствие влияния условий содержания и состояния оборудования вивария на ход исследования и его результаты.

Основные требования и рекомендации к помещениям для содержания животных, для проведения экспериментов, хранения данных, образцов, кормов и других материалов, помещениям для персонала регулируются с помощью следующих документов: ГОСТ 33044-2014 [2], ГОСТ 33215-2014 [3], ГОСТ 33216-2014 [4], ГОСТ 33217-2014 [5], ГОСТ 33218-2014 [6], ГОСТ 33219-2014 [7], СП 2.2.1.3218-14 [8], Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза [9] и отчасти постановлением Правительства РФ от 17 декабря 2013 г. № 1172 «О признании и об оценке соответствия испытательных лабораторий (центров) принципам надлежащей лабораторной практики, соответствующим принципам надлежащей лабораторной практики Организации экономического сотрудничества и развития» [10].

Помещения должны быть устроены таким образом, чтобы влияние на ход исследований отсутствовало или было минимальным. Требования к помещениям, соблюдение которых может повлиять на качество доклинических исследований, следующие.

1. Условия содержания животных: в помещениях по обслуживанию и содержанию животных температура воздуха обеспечивается в пределах 20–26 °С (для мышей, крыс, песчанок, морских свинок), 16–22 °С (для кроликов), 18–29 °С (для кошек, собак и приматов), относительная влажность воздуха – в пределах 30–70 процентов, воздухообмен – 15–20 воздухообменов в час.
2. Площадь пола на одно животное нормируется исходя из минимальной для каждого вида животного определенной массы тела. Актуальные площади пола представлены в Директиве 2010/63/EU.

3. Максимальное разделение помещений по принципу «чистое/грязное», исключающее встречные или перекрестные потоки перемещения оборудования, инвентаря, материалов, персонала вивария, лабораторных животных. К «грязным» помещениям относятся: помещения изоляторов, предназначенные для содержания подозрительных по инфекционным заболеваниям животных или больных животных; помещение (или отделение) для мойки и дезинфекции оборудования и инвентаря; холодильное помещение или холодильная камера для сбора и хранения трупов животных, отходов; помещения для персонала вивария (душевая, туалет и гардеробная).
4. Обеспечение раздельной вентиляции «чистых» и «грязных» помещений.
5. Максимальная изоляция отдельных комнат/зон по направлению деятельности: архив (тестируемые объекты, биологические образцы, документация), комнаты для хранения кормов, подстила, инвентаря для содержания и обеспечения животных, комнаты для хранения химических веществ и реагентов, помещения для получения и хранения тестируемых объектов и приготовления их растворов с носителем, помещения для содержания животных (по видам отдельно), помещения для проведения экспериментальных манипуляций и диагностических процедур у животных, помещения для исследования биологических образцов, изолятор для больных животных. Офисные помещения для работы персонала должны предполагать автономный вход и выход без захода в виварий.

Отдельные комнаты/зоны помещений должны быть маркированы на входе и иметь ограниченный список сотрудников, имеющих доступ.

6. Рекомендуется изоляция помещений не только по направлению деятельности внутри организации, но и изолированное проведение каждого исследования и/или проекта. Помещения для экспериментальных животных должны позволять раздельное содержание различных видов животных и животных одного вида, используемых для исследования различных лекарственных средств.
7. С точки зрения устройства вивария важны требования к материалам отделки, главные из которых безвредность для человека и животных, возможность качественной очистки/мытья, дезинфекции и устойчивость к механическому повреждению. Материалы, из которых изготовлены поверхности, не должны наносить вреда здоровью животных и должны исключать возможность ранения животных.
8. Безопасными должны быть также все реагенты, применяемые для мытья и обеззараживания помещений. Уборка помещений должна осуществляться ежедневно с применением закрепленного за конкретным помещением инвентаря с соответствующей маркировкой для предотвращения перекрестной контаминации.
9. Несовместимые виды животных, например хищники и жертвы, или животные с различными требованиями к среде обитания не должны содержаться в одном помещении. Хищники и жертвы должны содержаться за пределами видимости, слышимости или распространения запахов друг друга.
10. При организации сбора, временного хранения, обеззараживания, обезвреживания и транспортировки отходов, образующихся при осуществлении деятельности в виварии, должны соблюдаться санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими и биологическими отходами. Необходимо обеспечить соответствующие условия для сбора, хранения и вывоза отходов, а также процедур их обезвреживания и последующей транспортировки, так чтобы выполнение этих процедур не могло повлиять на ход и результат исследований.
11. Оборудование, используемое при проведении доклинических исследований, должно своевременно проходить техническое обслуживание, калибровку, поверку и при необходимости валидацию. На каждый прибор необходим индивидуальный журнал. Вместе с тем у исследователей, как правило, отсутствует четкое понимание необходимости применения валидации к тому или иному оборудованию (процессу), так как отсутствуют четкие и понятные руководства на этот счет. По этой причине в разных исследовательских центрах данный вопрос имеет разную трактовку.

Следует отметить, что в последних ГОСТах, а именно в ГОСТ 33215-2014 [3], ГОСТ 33216-2014 [4], ГОСТ 33217-2014 [5], ГОСТ 33218-2014 [6], ГОСТ 33219-2014 [7], наиболее детально и полно описаны требования к помещениям, условиям содержания и ухода за животными соответственно виду животных с обоснованием этих требований.

ТЕСТ-СИСТЕМЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение достоверных, информативных и качественных результатов зависит от грамотного выбора тест-системы для доклинических исследований ЛС. При разработке инновационного ЛС выбор

тест-системы начинается еще с момента поиска мишеней фармакологического действия. Это могут быть модели *in vitro, in silico, ex vivo* и *in vivo*. В соответствии с выбранной мишенью необходимо осуществлять и выбор тест-системы для оценки эффективности ЛС. Для исследования безопасности, как правило, важен выбор релевантных видов животных. При правильном подборе тест-системы результаты доклинических исследований позволяют вовремя определить будущий потенциал (польза/риск) нового ЛС, выбрать наиболее перспективных кандидатов в ЛС, грамотно экстраполировать дозы в клинические исследования.

Выбор тест-системы и методов исследования определяется (но не ограничивается) рекомендациями следующих документов:

- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая [11];
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть вторая [12];
- Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I [13];
- Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том II [14];
- H. Vogel (ed.). Drug discovery and evaluation: pharmacological assays [15];
- ГОСТ Р 57146-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Изучение канцерогенности лекарственных средств и вспомогательных веществ [16];
- ГОСТ Р 57130-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Исследование генотоксичности и интерпретация полученных данных [17];
- ГОСТ Р 57147-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования противоопухолевых лекарственных средств [18].

В перечисленных выше документах описаны возможные для выбора тест-системы и методы исследований, анализа данных, варианты экстраполяции данных на человека и некоторые рекомендации по представлению результатов исследований.

Особое внимание следует уделить выбору доз для исследования и способу применения ЛС.

Качество доклинических исследований, их информативность и полнота во многом определяются уровнем квалификации специалистов, определяющих дизайн исследования, выбор тест-систем и методов.

Многие тест-системы (в особенности это касается моделей *in vitro*, *in silico* и *ex vivo*) должны быть валидированы или верифицированы.

В соответствии с принципами Good Manufacturing Practic (GMP) принято определение, согласно которому валидация – это формулирование доказательства того, что реализация или использование всех процессов, процедур, оборудования, сырья, продуктов, видов деятельности или систем позволяет достигать ожидаемых результатов. Валидация необходима для аналитических методик, которые используются в ходе доклинических исследований ЛС. И здесь мы вплотную подходим к нормативным требованиям Международной организации по стандартизации, ИСО (International Organization for Standardization, ISO), документы которой также регламентируют качество доклинических исследований. Валидация аналитических методов, используемых в доклинических исследованиях, определяется ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» [19]. Согласно ГОСТу аналитическую методику оценивают по следующим параметрам: правильность, сходимость, межлабораторная воспроизводимость, устойчивость, линейность, предел количественного определения, предел обнаружения, специфичность.

При выборе в качестве тест-системы лабораторных животных для обеспечения надлежащего качества исследований важно, чтобы выборка была равномерной и результаты исследований не зависели от индивидуальных различий параметров животных, а также от человеческого фактора. Ключевую роль в обеспечении оптимальной выборки животных играет рандомизация. Правильно проведенная рандомизация экспериментальных животных обеспечивает репрезентативность выборки и позволяет с уверенностью распространять результаты конкретного исследования на генеральную совокупность [20, 21].

Здоровье животных (исходное состояние животных при поступлении из питомника и поддержание здоровья животных после поступления) является одним из ведущих факторов, определяющих качество доклинических исследований.

Согласно «Ветеринарно-санитарным правилам содержания опытных (лабораторных) животных в виварии научно-исследовательских институтов, станций, лабораторий, учебных заведений, а также в питомниках» [22] пополнение вивария животными разрешается только из питомников и виварий, благополучных по инфекционным болезням. Благо-

получие животных, завозимых для пополнения вивария из других городов или районов, подтверждается ветеринарным свидетельством. На животных, приобретенных в том же городе или районе, получают справку главного ветеринарного врача города (государственного ветеринарного инспектора района).

В требованиях ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» нет указаний о необходимости использования для доклинических исследований SPF-животных (Specific Pathogen Free). Рекомендации по использованию животных с SPF-статусом озвучены организацией Federation for Laboratory Animal Science Associations (FELASA) [23].

Доклинические исследования могут осуществляться с использованием конвенциональных животных. Мониторирование состояния их эпидемиологического благополучия и здоровья необходимо для обеспечения качества доклинических исследований. Составление и выполнение программы необходимых для этого мероприятий должно быть обеспечено главным ветеринарным врачом вивария.

Здоровье животных зависит от многих факторов их содержания. Например, необходимо подвергать нормированию корма, которые животные получают в пищу. Одним из ключевых нормативных документов, используемых для выбора оптимального корма для грызунов, является ГОСТ Р50258-92 «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия» [24].

Необходимые требования к качеству воды для животных описаны в ГОСТ 51232-98 «Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества» [25]. Необходимо создание условий в виварии, обеспечивающих запас питьевой воды для животных на случай экстренных ситуаций.

Немаловажным фактором качественного выполнения исследования, помимо соблюдения условий воздухообмена, светового и температурного режима, количества животных на единицу площади, является обеспечение оптимальных зоосоциальных условий. Необходимо наблюдение за индивидуальным и групповым поведением животных в условиях содержания ежедневно [26]. При обнаружении признаков агрессии или других отклонений индивидуального поведения животное необходимо немедленно изолировать от других особей. Для обеспечения оптимальных условий содержания лабораторных животных рекомендуется обогащение среды.

Часто для выполнения некоторых диагностических процедур (измерение АД, регистрация ЭКГ и др.) эффективным является проведение предварительного тренинга животных с целью приучения их к взятию на руки, фиксации в посадочном домике и др. Это важно для получения данных физикальных исследований без влияния на них тревожности животного [27]. Как с точки зрения гуманного обращения с животными, так и с позиций возможного влияния на результаты исследований необходимо обеспечить отсутствие возможности наблюдения находящимися в клетках содержания животными производимых над другими животными болезненных процедур и эвтаназии.

КАЧЕСТВО ТЕСТИРУЕМЫХ ОБЪЕКТОВ И МЕТОДЫ РАБОТЫ С НИМИ

Согласно ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», для обеспечения надлежащего качества доклинических исследований в испытательном центре необходимо оформление регистрационных записей, в которых должны быть указаны характеристики объектов испытаний и стандартных объектов исследования, даты их получения, сроки годности, первоначальное количество и сведения об учете расхода. Для планирования и проведения доклинических исследований исследователям необходима максимально полная информация о тестируемом и стандартном объекте, включая данные о составе, сертификат анализа, паспорт безопасности и др.

Качество доклинических исследований в значительной степени определяется обеспечением и контролем поддержания стабильности тестируемого и стандартного объекта во время получения, хранения и введения в тест-систему. Для облегчения введения объектов в тест-систему, как правило, используется носитель. Необходимо выбирать инертный носитель, применение которого не повлияет на свойства тестируемого и стандартного объектов и оставит без изменений свойства тест-системы.

Важно использование таких методов работы с тестируемым и стандартным объектами, которые не повлияют на их свойства.

ГУМАННОЕ ОБРАЩЕНИЕ С ЖИВОТНЫМИ

ГОСТ 33044-2014 прописано: «…принципы надлежащей лабораторной практики направлены на обеспечение приемлемости результатов научных исследований. Приемлемость в данном случае означает, с одной стороны, доказательность и надежность данных, с другой – соблюдение принципов гуманного обращения с лабораторными животными». На сегодняшний день в России отсутствует актуальное законо-

дательство, регламентирующее гуманное обращение с лабораторными животными, в связи с чем необходимо опираться на международную нормативную документацию и опыт. Для обеспечения гуманного обращения с животными при исследовательских центрах необходимо создание комитета по содержанию и использованию животных» (IACUC) или биоэтической комиссии, целью которых является оценка целесообразности и гуманности каждого из исследований. Основной актуальный документ, описывающий оптимальное содержание, правила проведения болезненных процедур, методы устранения боли и дистресса у лабораторных животных и описание гуманных методов эвтаназии, – Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях [9].

УПРАВЛЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЕМ И ПЕРСОНАЛОМ

Согласно ГОСТ 33044-2014, полную ответственность за качество доклинических исследований несет администрация исследовательского центра. Управление исследованием осуществляется руководителем исследования, который назначается приказом администрации исследовательского центра. Руководитель исследования осуществляет общее руководство проведением исследования, отвечает за подготовку заключительного отчета, взаимодействует с персоналом с целью обеспечения надлежащего качества исследований. Весь персонал, вовлеченный в исследование или имеющий косвенное отношение к качеству исследований, должен знать принципы надлежащей лабораторной практики и иметь профессиональную квалификацию, соответствующую роду деятельности.

Для обеспечения качества важна предварительная подготовка к доклиническому исследованию. Такая подготовка включает обзор литературы по предполагаемым методам исследований и информации о планируемых к исследованию веществах (данные о безопасности и эффективности), а также выбор методов анализа данных. Предварительная подготовка может быть частично проведена заранее путем формирования информационных баз с данными об отдельных группах соединений и стандартными воспроизводимыми методами исследований.

Обоснование дизайна и подготовка плана исследования в зависимости от его вида непременно осуществляется в соответствии с национальными и/или международными стандартами, руководствами и рекомендациями [11–18, 28–31].

Важно обеспечение доступа задействованного в исследовании персонала к необходимой документации, литературе и стандартным операционным процедурам (СОП).

Перед началом исследования необходимо донесение до вовлеченного персонала заранее разработанного плана действий в случаях непредвиденных ситуаций.

Для обеспечения непредвзятости доклинических исследований возможно, но не регламентировано проведение слепого исследования, с целью чего при получении тестируемых объектов им могут быть присвоены коды.

ПРАВИЛА ДОКУМЕНТООБОРОТА

В каждом испытательном центре должен регулярно обновляться реестр проводимых доклинических исследований. Каждому исследованию должен быть присвоен индивидуальный номер. Подготовка плана исследования, как правило, осуществляется непосредственно после согласования дизайна исследования с разработчиком ЛС (спонсором исследования) на этапе заключения договора. Параллельно согласовывается и основной план-график, где указываются сроки выполнения основных этапов исследования, график его проведения и шаблоны первичной документации. В процессе подготовки плана исследования важно уделить внимание оформлению шаблонов первичной документации, основная цель которых – максимально исключить техническую ошибку и/или фальсификацию результатов. Шаблоны первичной документации должны быть четкими и понятными для лаборантов и исследователей. При необходимости перед началом исследования необходимо проводить инструктаж.

Для обеспечения надлежащего качества исследований необходимо в полном объеме обеспечить персонал информативными СОП. Персонал исследовательского центра должен быть ознакомлен с данными СОП и обучен их выполнению.

Оформление отчетов и приложений к ним является неотъемлемой частью обеспечения качества доклинических исследований и осуществляется в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 [32], ГОСТ Р 7.0.5-2008 [33] и ГОСТ Р 7.0.12-2011 [34], описывающими основную структуру отчета о НИР, правила оформления текста, требования к библиографическим ссылкам и сокращениям.

В процессе оформления отчета необходимо уделять особое внимание полноте полученных данных, их качеству, выбору метода обработки и анализа. При обсуждении результатов необходимо использовать до-

стоверные и актуальные источники литературы, желательно опубликованные в последние 5 лет. К каждому отчету о доклинических исследованиях в обязательном порядке прикладывается заключение службы по обеспечению качества.

Особое место в обеспечении качества доклинических исследований занимает архивирование и хранение образцов и документов. Архивирование должно обеспечивать сохранность и конфиденциальность, четкую систематизацию и ограничение доступа, а также возможность ретроспективного анализа результатов исследования в течение установленного периода времени.

КВАЛИФИКАЦИЯ ПЕРСОНАЛА

Профессиональная и слаженная работа команды исследовательского центра напрямую влияет на качество доклинических исследований. Высокий уровень квалификации сотрудников позволяет обеспечить оптимальную систему управления исследованиями и персоналом, разработать грамотный дизайн исследования, сохранить ресурсы времени и средств как для исследовательского центра, так и для разработчика ЛС (спонсора исследования).

Квалификация персонала определяется уровнем и профилем образования, дополнительным внешним, а также внутренним (в пределах исследовательского центра) образованием и опытом профильной деятельности.

Для обеспечения надлежащего качества исследований со стороны исследовательского центра необходим периодический контроль знаний и практических навыков персонала, внутреннее и внешнее обучение, периодическое качественное повышение квалификации.

ОРГАНИЗАЦИЯ ВНУТРЕННЕГО И ВНЕШНЕГО КОНТРОЛЯ И ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ

Согласно ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» исследовательский центр должен иметь в своей структуре группу специалистов, независимых от проведения исследований, – службу по обеспечению качества. Данное подразделение совместно с администрацией разрабатывает и внедряет документированную программу обеспечения качества, целью которой является обеспечение администрацией испытательного центра соблюдения принципов надлежащей лабораторной практики. Работа службы качества должна быть направлена не только на контроль исполнения правил (инспекции отдельных исследований, испытательного центра, отдельных процессов), но и на обеспечение необходимых ресурсов для надлежащего проведения исследований.

Принципы и методы работы службы обеспечения качества испытательного центра регламентируются ГОСТ Р ИСО 9001-2015 [35] и ГОСТ 31883-2012 [36].

ОБРАТНАЯ СВЯЗЬ С РАЗРАБОТЧИКОМ ЛС (СПОНСОРОМ ИССЛЕДОВАНИЯ)

Для обеспечения надлежащего качества доклинических исследований немаловажным является также взаимодействие с разработчиком ЛС (спонсором исследования). Как правило, разработчик ЛС обладает опытом и знаниями, уникальными для тестируемого объекта [37]. В связи с этим важным является не только соблюдение договорных условий между разработчиком ЛС (спонсором исследования) и испытательным центром, но и постоянное взаимодействие на всех промежуточных этапах.

Данное взаимодействие должно осуществляться всеми доступными современными способами коммуникации и по возможности протоколироваться в документации по текущему исследованию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, существующие нормативные документы представляют преимущественно полную информацию о правилах обеспечения надлежащего качества доклинических исследований и способах их исполнения. Внимательное и обоснованное применение правил, рекомендаций и требований специалистами, вовлеченными в процесс разработки лекарственных средств, позволяют получить достоверные, полные и качественные результаты доклинических исследований, что исключительно важно как для планирования и проведения последующих клинических испытаний, так и с точки зрения целесообразности продолжения разработки. Существуют вопросы обеспечения надлежащего качества, требующие дополнительной детализации и разъяснения для испытательных центров, что является приоритетным направлением профессионального сообщества в области разработки лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.Т. Бурбелло и др. Неблагоприятные побочные реакции лекарственных средств // Пособие для врачей. – СПб. 2008. Т. 28.
2. ГОСТ 33044-2014. Межгосударственный стандарт «Принципы надлежащей лабораторной практики».

3. Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (редакция, действующая с 1 января 2017 года).
4. ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур.
5. ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.
6. ГОСТ 33218-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за нечеловекообразными приматами.
7. ГОСТ 33219-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за рыбами, амфибиями и рептилиями.
8. СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденные Постановлением от 29 августа 2014 г. № 51.
9. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.
10. Постановление Правительства РФ от 17 декабря 2013 г. № 1172 «О признании и об оценке соответствия испытательных лабораторий (центров) принципам надлежащей лабораторной практики Организации экономического сотрудничества и развития».
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения РФ. – М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 2 / ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения РФ. – М.: Гриф и К, 2012. 536 с.
13. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I / ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения РФ. – М.: Гриф и К, 2013. 328 с.
14. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II / ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения РФ. – М.: Гриф и К, 2013. 280 с.
15. H. Vogel (ed.). Drug discovery and evaluation: pharmacological assays // Springer Science & Business Media, 2007. № 5. P. 18–26.
16. ГОСТ Р 57146-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Изучение канцерогенности лекарственных средств и вспомогательных веществ.
17. ГОСТ Р 57130-2016. Лекарственные средства для медицинского применения исследование генотоксичности и интерпретация полученных данных.
18. ГОСТ Р 57147-2016. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования противоопухолевых лекарственных средств.
19. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.
20. J.E. de Aguilar-Nascimento. Fundamental steps in experimental design for animal studies // Acta Cirúrgica Brasileira. 2005. V. 20(1). P. 2–8.
21. А.И. Селезнева, М.Н. Макарова, А.В. Рыбакова. Методы рандомизации животных в эксперименте // Международный вестник ветеринарии. 2014. № 2. С. 84–90.
22. Ветеринарно-санитарные правила содержания опытных (лабораторных) животных в виварии научно-исследовательских институтов, станций, лабораторий, учебных заведений, а также в питомниках (утв. Минсельхозом СССР 26.08.1964).
23. Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. Recommendations of the European Laboratory Animal Science Associations 2014 (FELASA).
24. ГОСТ Р50258-92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия.
25. ГОСТ 51232-98. Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества.
26. В.П. Пошивалов. Этологический атлас для фармакологических исследований на лабораторных грызунах. – М.: Деп. В ВИНИТИ, 1978. С. 3164–3178.
27. А.И. Селезнева, А.В. Рыбакова, М.Н. Макарова, М.А. Ковалева, С.В. Ходько, В.Г. Макаров. Психоэмоциональное состояние и подготовка лабораторных крыс к диагностическим и лечебным процедурам // Международный вестник ветеринарии. 2013. № 3. С. 72–78.
28. ГОСТ Р 56702-2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические токсикологические и фармакокинетические исследования безопасности.
29. ГОСТ Р 56701-2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств.
30. ГОСТ Р 56700-2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические фармакологические исследования безопасности.
31. ГОСТ Р 56699-2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. Общие рекомендации.
32. ГОСТ 7.32-2001. Межгосударственный стандарт. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. «Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».
33. ГОСТ Р 7.0.5-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая ссылка. Общие требования и правила составления.
34. ГОСТ Р 7.0.12-2011. Национальный стандарт Российской Федерации. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись сокращение слов и словосочетаний на русском языке. Общие требования и правила.
35. ГОСТ Р ИСО 9001-2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Системы менеджмента качества. Требования.
36. ГОСТ 31883-2012. Межгосударственный стандарт. Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Обеспечение качества в соответствии с принципами GLP.
37. ГОСТ 31888-2012. Роль и обязанности спонсора в соответствии с принципами GLP.
38. 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. 218–221.

УДК 615.1+378

АНАЛИЗ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЦЕНТРОВ ПО РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, СОЗДАВАЕМЫХ НА БАЗЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

А.А. Семин[1]*, И.А. Наркевич[1]

Резюме. Выполнен анализ развития материально-технической базы образовательных организаций, осуществляющих прикладные исследования и разработки в области создания инновационных лекарственных средств. Предложены направления интенсификации и интернационализации инновационной деятельности созданных центров по разработке инновационных лекарственных средств, одним из которых является учреждение сетевого центра фармацевтики стран БРИКС. Создание такого центра позволит объединить усилия ведущих университетов и научных организаций стран БРИКС в подготовке высококвалифицированных кадров для фармацевтической отрасли, а также развить научно-техническое сотрудничество стран БРИКС в сфере разработки лекарственных средств.

Ключевые слова: доклинические исследования, лекарственное средство, сетевой центр фармацевтики стран БРИКС, центр по разработке лекарственных средств.

THE ANALYSIS OF THE ACTIVITIES OF THE CENTERS FOR THE DEVELOPMENT OF DRUGS, CREATED ON THE BASIS OF EDUCATIONAL ORGANIZATIONS

A.A. Semin[1]*, I.A. Narkevich[1]

Abstract. The analysis of educational institutions' material and technical base, that implement applied research and development in the field of innovative medicines, was released. The directions for intensification and internationalization of such centers of innovative drugs development were offered, one of these directions is the establishment of Network Center for pharmaceutics of BRICS countries. The formation of this center will bring together leading universities and research institutions of the BRICS countries in the preparation of highly qualified personnel for the pharmaceutical industry, as well as to develop the scientific and technical BRICS cooperation in the field of drug development.

Keywords: pre-clinical trials, drugs, Network Center for pharmaceutics of BRICS countries, Center for Drug Development.

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 – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 14 A, Professora Popova str., St. Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: semin-aa@mon.gov.ru

ВВЕДЕНИЕ

Обеспечение населения лекарственными средствами является важнейшей составляющей социальной политики государства и одним из показателей состояния здравоохранения. Среди приоритетных направлений модернизации и технологического развития фармацевтика занимает особое место в экономической системе Российской Федерации, что также обусловливается социальной значимостью производимой продукции, наукоемкостью производства и высокой степенью государственного регулирования. Основной задачей достижения этих целей является ускоренное развитие российской фармацевтической промышленности и создание условий для ее перехода на инновационную модель развития, что должно поднять уровень обеспеченности организаций здравоохранения и граждан Российской Федерации лекарственными препаратами, в первую очередь российского производства.

Поставленная задача по переходу фармацевтической промышленности на инновационную модель развития имеет все предпосылки для успешного выполнения. В первую очередь это связано с реализацией федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (ФЦП «Фарма-2020»), в рамках выполнения которой в том числе выполняются мероприятия по технологическому перевооружению государственных учреждений науки и образования [1].

В настоящее время в рамках указанных мероприятий выполнены работы по 5 инвестиционным проектам, направленным на создание

центров по разработке лекарственных средств на базе вузов, подведомственных Минобрнауки России и Минздраву России.

РЕЗУЛЬТАТЫ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЦЕНТРОВ ПО РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Нами были проанализированы этапы становления 4 центров по разработке лекарственных средств на базе вузов, подведомственных Минобрнауки России (КФУ, УрФУ, МФТИ и ЯГПУ), и одного центра на базе вуза Минздрава России (СПХФА). При проведении анализа также были рассмотрены индивидуальные возможности каждого центра по разработке инновационных лекарственных средств и подготовке кадров для фармацевтической отрасли. Особое внимание было уделено анализу кооперационных связей созданных центров с организациями академического сектора и предприятиями реального сектора экономики в своем регионе.

В рамках реконструкции и технического перевооружения Казанского (Приволжского) федерального университета (г. Казань) было запланировано создание научно-образовательного центра и опытного производства по разработке и организации производства инновационных лекарственных средств и субстанций [2].

В настоящее время Научно-образовательный центр фармацевтики (НОЦ фармацевтики) создан и является структурным подразделением КФУ. В НОЦ фармацевтики работает более 90 сотрудников – специалистов в области химии, биологии, медицины и ветеринарии. Основная задача центра – разработка инновационных лекарственных средств, включая синтез фармсубстанций, их скрининг на специфическую активность *in vitro*, определение механизмов действия, доклинические исследования на безопасность и эффективность *in vivo*, а также изготовление готовых лекарственных форм. В 2014 году введены в эксплуатацию чистые помещения для временного содержания мелких лабораторных животных и микробиологическая лаборатория с классами чистоты C и D, позволяющие проводить работы в области фармацевтики по стандартам GLP.

С 2014 года в НОЦ фармацевтики КФУ реализуются проекты по разработке и доклиническим исследованиям инновационных лекарственных средств по заказу Минобрнауки России.

Целью создания опытного производства является организация производства инновационных противовоспалительных, противоопухолевых, антибактериальных, противогрибковых и других лекарственных препаратов.

Структура опытного производства включает два блока: технологический – для отработки технологии производства готовых лекарственных форм и производственный – для выпуска опытных партий фармсубстанций и инновационных лекарственных препаратов для проведения клинических исследований. Опытное производство спроектировано и построено в полном соответствии со стандартами GMP.

Планируется, что созданная инфраструктура (научно-образовательный центр фармацевтики и опытное производство КФУ) объединит усилия разработчиков лекарственных средств, клиницистов и стратегического партнера проекта ОАО «Татхимфармпрепараты» и приведет к созданию медико-фармацевтического кластера Республики Татарстан [3, 4].

В рамках создания научно-технологического и инновационного центра химико-фармацевтических технологий Уральского федерального университета имени первого Президента России Б.Н. Ельцина (г. Екатеринбург) был сформирован учебно-научный и инновационный комплекс, работа которого направлена на разработку инновационных лекарственных средств и реализацию взаимосвязанных практико-ориентированных образовательных программ по подготовке высококвалифицированных специалистов [2].

В настоящее время в центре выполняются работы по разработке инновационных лекарственных средств, в том числе по организации и проведению клинических исследований инновационного лекарственного препарата из группы триазидов для лечения гриппа [3, 4].

Основными задачами центра являются:

- формирование инновационной научно-образовательной среды для подготовки востребованных научных и инженерно-технологических кадров химико-фармацевтического профиля;
- проведение взаимосвязанных фундаментальных и прикладных исследований по поиску биологически активных соединений и создание на их основе препаратов, эффективных в отношении социально значимых заболеваний различной этиологии, скрининг и исследование механизма их действия, создание сенсоров и приборов для био- и фарммониторинга, клеточных культур, а также транспортных систем для целевой доставки лекарственных средств;
- создание опытного химико-фармацевтического производства субстанций для проведения скрининга молекул-лидеров на токсичность и активность, масштабирование технологических процессов;

- организация трансфера результатов научно-исследовательских работ в инновации, коммерциализация готовых инженерно-технологических решений, а также взаимодействие с предприятиями реального сектора экономики, основанное на принципах технологического предпринимательства.

Созданный центр станет связующим звеном между академическими институтами и промышленными предприятиями Уральского фармацевтического кластера (Свердловская область).

В рамках строительства научно-образовательного центра по разработке инновационных лекарственных средств и технологий в области живых систем Московского физико-технического института (Московская область, г. Долгопрудный) планировалось создание научно-образовательного центра мирового уровня по разработке инновационных лекарственных средств и технологий в области живых систем [2].

Научно-образовательный центр введен в эксплуатацию в июле 2015 г., оснащен всеми необходимыми системами технического и инженерного обеспечения, позволяющими организовать работу по своему функциональному предназначению, и включает:

1) бизнес-инкубатор лабораторного типа в составе лаборатории химического синтеза; лаборатории биотехнологического синтеза; лаборатории биологических исследований (*in vitro*), лаборатории доклинических исследований (*in vivo*); патентного офиса; офисного центра коллективного пользования;

2) лабораторию по разработке готовых лекарственных форм;

3) учебные помещения для подготовки специалистов для фармацевтической отрасли.

Научно-образовательный центр должен стать ядром формируемого фармацевтического кластера «Северный», в который войдут исследовательские и производственные предприятия фармацевтической промышленности, что позволит, с одной стороны, объединить усилия разработчиков лекарственных средств, а с другой стороны, обеспечить загрузку производственных мощностей [3, 4].

В рамках строительства центра трансферта технологий, разработки инновационных и импортозамещающих лекарственных средств и подготовки кадров для фармацевтической промышленности на базе Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского (г. Ярославль) предусматривалось строительство центра по типу бизнес-инкубатора, позволяющего разместить химические и биоскрининговые исследовательские лаборатории, помещения для проведения доклинических исследований по стандартам GMP, разнообразные технологические и внедренческие платформы, административные сопровождения [2].

Центр введен в эксплуатацию в начале 2015 года и оснащен современной материально-технической базой и высокотехнологичной инженерной инфраструктурой в соответствии с международными требованиями фармацевтической индустрии к организации научно-исследовательского процесса.

ЯГПУ им. К.Д. Ушинского выходит на рынок оказания широкого спектра образовательных, научно-исследовательских, опытно-конструкторских, технологических, инфраструктурных и прочих услуг, а также будет проводить совместные проекты с заинтересованными компаниями и организациями. Для этого в университете создан необходимый кадровый потенциал для функционирования центра.

В настоящее время в центре проводятся доклинические исследования инновационного противовоспалительного лекарственного средства на основе амида 3-имидазол-замещенной-4,5-дигидроизоксазолкарбоновой кислоты для лечения ревматоидного артрита и других хронических воспалительных процессов при поддержке Минобрнауки России в рамках ФЦП «Фарма-2020».

Еще одним важным и перспективным направлением является реализация профильных образовательных программ высшего образования и дополнительного профессионального образования с использованием инфраструктуры центра.

Создаваемый центр станет ключевым объектом Ярославского фармацевтического кластера [3, 4].

В рамках реконструкции и технического перевооружения Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии (г. Санкт-Петербург) было запланировано создание центра экспериментальной фармакологии [2].

Центр экспериментальной фармакологии введен в эксплуатацию в 2015 году и является структурным подразделением СПХФА, включает в себя лабораторию фармакологических исследований и виварий, оснащённые современным оборудованием. Здесь же размещена операционная, оснащённая системой искусственной вентиляции лёгких и приборами прижизненной диагностики для мелких лабораторных животных и системой постоперационной реабилитации, а также комната эвтаназии с CO_2-камерой для гуманного выведения из эксперимента.

Силами высококвалифицированных сотрудников и привлекаемых сторонних специалистов центр осуществляет доклинические испытания лекарственных препаратов, проводит научные изыскания по токсичности и специфической активности соединений, предоставленных внутренними структурными подразделениями академии и внешними заказчиками. Также в рамках возмездного оказания услуг ведётся постоян-

ное сотрудничество с ведущими отечественными и зарубежными производителями дженериковых препаратов. Таким образом, центр в сотрудничестве с другими подразделениями СПХФА может осуществить все этапы разработки новых лекарственных препаратов, от химического и микробиологического синтеза лекарственных субстанций или выделения их из растительного и животного сырья, последующего скрининга до внедрения в производство, за исключением клинических испытаний. Ассоциацией по сертификации «Русский регистр» проведена аккредитация научной работы центра по стандарту ИСО 9001.2008, запланирована аккредитация по стандартам GLP.

Основными задачами созданного центра являются:

- проведение научно-исследовательской работы по доклиническому изучению перспективных молекул и фитоэкстрактов;
- подготовка высококвалифицированных кадров для фармацевтической отрасли;
- моделирование патологических состояний.

В настоящее время в центре выполняются доклинические исследования лекарственного средства на основе солей органических кислот с диэтиламиноэтанолом, обладающего нейропротекторным действием, и лекарственного средства на основе производного тиадиазола, обладающего противогрибковой активностью по заказу Минобрнауки России.

Таким образом, центр активно занимается разработкой новых лекарственных средств и тесно связан с предприятиями Санкт-Петербургского фармацевтического кластера.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЦЕНТРОВ ПО РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Проведенный анализ показал, что в настоящее время созданные центры обладают всеми возможностями для разработки инновационных лекарственных средств и подготовки высокопрофессиональных кадров для отрасли, активно участвуют в работах по доклиническим исследованиям инновационных лекарственных средств в рамках мероприятия «Доклинические исследования инновационных лекарственных средств» ФЦП «Фарма-2020» и играют ведущую роль в формировании региональных медико-фармацевтических кластеров.

В то же время для активизации инновационной деятельности указанных центров, учитывающей интересы производителей лекарственных средств, предлагается предусмотреть следующие меры.

1. Выход на внешние рынки, поскольку внутри России недостаточное количество новых лекарственных кандидатов для проведения доклинических исследований, что, в свою очередь, потребует международной сертификации указанных центров.

Кроме того, аккредитация созданных центров по разработке лекарственных средств по стандартам GLP позволит стимулировать инновационное направление развития российской фармацевтической отрасли в части разработки лекарственных препаратов. За счет снижения стоимости проведения этапа доклинических исследований по стандартам GLP у большего числа фармпроизводителей появляется возможность разработки экспортно ориентированной продукции.

2. С целью развития научно-технологического сотрудничества стран БРИКС в фармацевтической области целесообразно создать сетевой центр фармацевтики стран БРИКС (СЦФ БРИКС), который будет объединять на добровольных началах ведущие университеты и научные организации стран БРИКС, являющиеся лидерами в своих странах в этой области науки и технологий.

Для обеспечения управляемости процессом на стадии создания предлагается развивать СЦФ БРИКС в несколько этапов. На первом этапе планируется включить в состав сетевого центра университеты / научные организации, определенные профильными министерствами стран из числа ведущих организаций в сфере фармацевтики, имеющих базу исследовательского и технологического оборудования, которая может быть использована другими членами в качестве распределенного центра коллективного пользования научным оборудованием. При этом от Российской Федерации целесообразно включить центры по разработке лекарственных средств, рассмотренные в настоящей статье. На втором этапе необходимо будет разработать документы, регламентирующие все аспекты работы центра фармацевтики, апробировать механизм работы и правила приема новых членов и увеличить число организаций – членов центра фармацевтики до оптимального.

Для достижения цели в перечень основных задач центра фармацевтики могут быть включены следующие:

- организация международного сотрудничества организаций – членов центра фармацевтики в учебно-методической и научно-исследовательской деятельности в области фармацевтики;
- подготовка предложений по приоритетным тематикам научных исследований в области фармацевтики для совместных международных научных проектов, для определения тематики объявляемых в странах БРИКС конкурсов на получение поддержки научных исследований по разработке лекарственных средств;

- привлечение финансовых и материальных ресурсов государственных органов власти, общественных организаций, государственных предприятий и частных фирм для развития исследований, технологий и инновационных разработок в области фармацевтики;
- координация работы распределенного центра коллективного пользования уникальным научным оборудованием организаций – членов СЦФ БРИКС с целью обеспечения возможности работы на этом оборудовании ученых из организаций – членов центра фармацевтики;
- организация и проведение международных научно-методических конференций, в частности организация Ежегодного международного партнеринг-форума «Life Sciences Invest. Partnering Russia»; проведение семинаров и телемостов, научно-исследовательских работ, практик и стажировок; содействие интеграции науки;
- проведение сравнительного анализа систем образования разного уровня (бакалавриат, магистратура, аспирантура) в области фармацевтики, организация обмена опытом подготовки кадров в этой сфере деятельности, развитие стабильного сотрудничества членов центра фармацевтики в образовании;
- организация совместного обучения PhD-студентов (совместного руководства PhD-студентами) в сфере фармацевтики;
- организация работы по привлечению в центр фармацевтики новых членов из числа ведущих университетов и научных организаций стран БРИКС, являющихся лидерами в своих странах в сфере фармацевтики;
- организация повышения квалификации лиц, ответственных за учебно-методическую и научно-методическую, международную деятельность в организациях – членах Центра фармацевтики.

3. Пересмотр государственными заказчиками, финансирующими разработку лекарственных средств, приоритетности стадий разработки лекарственных средств с целью устранения дисбаланса в их финансировании:

- увеличение объема поддержки исследований, направленных на поиск новых лекарственных кандидатов, поскольку в настоящий момент существует высокий риск исчерпания имеющихся заделов;
- увеличение объема поддержки клинических исследований и его синхронизация с объемом поддержки доклинических исследований, активно поддерживаемых в последние годы;
- постановка и поддержка длительных перспективных научных проектов, направленных на создание биобанков, а также проектов, направленных на проведение эпидемиологических исследований, являющихся основой выявления новых биомаркеров и мишеней для лекарственных препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Государственная поддержка в рамках ФЦП «Фарма-2020» позволяет не только технически перевооружить государственные учреждения науки и образования, обеспечить их высококвалифицированными кадрами, но одновременно стимулировать в Российской Федерации разработку и производство наукоемкой фармацевтической и медицинской продукции.

Можно констатировать, что созданные центры по разработке лекарственных средств активно включились в работу, и прежде всего в рамках осуществляемой Минобрнауки России поддержки доклинических исследований инновационных лекарственных средств.

Однако для активизации и интернационализации инновационной деятельности указанных центров предлагается выполнить ряд первоочередных шагов, рассмотренных в настоящей статье.

Одним из таких возможных шагов является создание сетевого центра фармацевтики стран БРИКС, который в том числе позволит обеспечить реализацию инициатив, включенных министрами стран БРИКС 28 октября 2015 года в Рабочий план БРИКС по науке, технологиям и инновациям 2015–2018 (сотрудничество в области биотехнологий и биомедицины, включая здоровье человека и нейронауки; создание фармакологических консорциумов с целью решения проблемы «лекарственной безопасности», устойчивости к антибиотикам и реагирования на эпидемии и возникающие болезни; создание реестра центров коллективного пользования уникальным исследовательским оборудованием в главных областях сотрудничества).

ЛИТЕРАТУРА

1. А.А. Сёмин. Системные меры развития фармацевтической науки и образования// Медицина: целевые проекты. 2015. № 21. С. 18–19.
2. Постановление Правительства Российской Федерации от 17 февраля 2011 года № 91 «О федеральной целевой программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».
3. А.А. Сёмин, Е.Б. Андреева, О.Е. Ваизова. Системные меры развития фармацевтической науки и образования в России. – М.: Министерство образования и науки Российской Федерации, 2016. 66 с.
4. А.А. Сёмин, И.А. Наркевич. Роль Минобрнауки России в государственной поддержке перехода фармацевтической промышленности на инновационный путь развития // Фармация. 2017. Т. 66. № 1. С. 3–8.

ЭКСПОФОРУМ

11-13 ОКТЯБРЯ 2017

ПЕТЕРБУРГСКИЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ ЗДОРОВЬЯ

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ ВЫСТАВКИ:

- МЕДИЗ СПб. МЕДИЦИНА И ЗДОРОВЬЕ
- БИОИНДУСТРИЯ
- ФАРМАЦИЯ
- ЛЕЧЕБНО-ОЗДОРОВИТЕЛЬНЫЙ ТУРИЗМ
- ЭСТЕТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

ОРГАНИЗАТОРЫ:

EXPOFORUM primexpo ITE Messe Düsseldorf Moscow

12+

PMFZ.EXPOFORUM.RU

УДК 614.35

АНАЛИЗ КЛЮЧЕВЫХ ТЕНДЕНЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИНСПЕКТИРОВАНИЯ ЗАРУБЕЖНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ЗА 2016 ГОД

В.А. Орлов[1]*

Резюме. В статье представлен анализ результатов работы российского GMP-инспектората за 2016 год в отношении зарубежных производителей лекарственных средств, в том числе с применением их статистической обработки с использованием диаграммы Парето. Приведены описания основных выявляемых критических несоответствий, а также произведён анализ возможных причин их возникновения.

Ключевые слова: GMP, инспектирование, гармонизация, фармацевтическая система качества, уполномоченное лицо, валидация, перекрестная контаминация, ЕАЭС, ЕМА, регистрация лекарственных средств, ФБУ «ГИЛС и НП».

KEY TRENDS ANALYSIS OF RESULTS OBTAINED FROM INSPECTING THE FOREIGN MANUFACTURERS OF MEDICINAL PRODUCTS IN 2016

V.A. Orlov[1]*

Abstract. The matter presents a statistical evaluation of results obtained from GMP inspections of foreign pharmaceutical manufacturers held by Russian GMP- inspectorate in the year 2016. Overview and analysis of critical discovered non-conformities and their possible causes are given.

Keywords: GMP, inspections, harmonization, Pharmaceutical Quality System, Qualified Person, validation, cross-contamination, EAEU, EMA, Marketing Authorization, State Institute of Drugs and Good Practices.

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП») Министерства промышленности и торговли РФ, 109044, Москва, Лавров пер., 6

1 – – State Institute of Drugs and Good Practices, 6, Lavrov per., Moscow, 109044, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: orlov@gilsinp.ru

ВВЕДЕНИЕ

В 2016 году со стороны Российской Федерации была начата работа по инспектированию зарубежных производственных площадок производителей лекарственных средств на соответствие требованиям надлежащей производственной практики – GMP [5]. Данная задача была делегирована Государственному институту лекарственных средств и надлежащих практик (ГИЛС и НП) Министерства промышленности и торговли Российской Федерации. Необходимость создания российского GMP-инспектората, в частности, в отношении контроля зарубежных производителей лекарственных средств обсуждалась в фармацевтическом сообществе уже в течение многих лет, однако реализация данной задачи стала осуществима лишь после принятия в 2014–2016 годах ряда законопроектов, а именно:

- внесения изменений в Федеральный закон № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [1], согласно которым было введено требование к наличию у зарубежных производителей заключения о соответствии производителя лекарственных средств требованиям правил надлежащей производственной практики при осуществлении первичной регистрации лекарственных средств на территории Российской Федерации, а также при подаче изменений к регистрационному досье;
- постановления Правительства РФ № 1314 «Об определении соответствия производителей лекарственных средств требованиям правил надлежащей производственной практики» [2], в котором был прописан порядок проведения процедуры инспектирования и подготовки к нему, требования к инспекторам и пр.;
- приказа Минпромторга России от 21.12.2015 № 4184 «Об определении федерального бюджетного учреждения «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации уполномоченным учреждением на проведение инспектирования» [3], в соответствии с которым ГИЛС и НП получил право на проведение инспектирования производителей лекарственных средств для медицинского применения, производство которых осуществляется за пределами РФ;

- приказа Минпромторга России № 261 от 04.02.2016 «Об утверждении форм заявления о выдаче заключения о соответствии производителя (иностранного производителя) лекарственных средств для медицинского применения требованиям правил надлежащей производственной практики, инспекционного отчета по результатам инспектирования производителя и иностранного производителя лекарственных средств для медицинского применения на соответствие требованиям правил надлежащей производственной практики и заключения о соответствии производителя (иностранного производителя) лекарственных средств для медицинского применения требованиям правил надлежащей производственной практики» [4]. В данном нормативном акте отражены требования к содержанию документов по инспектированию производителей лекарственных средств.

Фактически первые проверки зарубежных производственных площадок состоялись только в апреле минувшего 2016 года, поскольку потребовалось время на подачу заявления со стороны производителей, утверждение плана-графика инспекций, составление плана инспектирования производственных площадок и осуществления всех необходимых подготовительных мероприятий. В общей сложности за минувший 2016 год ФБУ «ГИЛС и НП» провело инспектирование 188 производственных площадок зарубежных производителей, при этом было выдано 88 заключений о соответствии требованиям надлежащей производственной практики. Среди проинспектированных зарубежных производителей были представлены площадки из 40 стран.

Таблица 1.

Страны с наибольшим числом проинспектированных площадок за 2016 год

Страна	Количество проведённых инспекций
Индия	31
Германия	14
Венгрия	11
Словения	10
Польша	8
Франция	8
Дания	5
Испания	5

Согласно данной таблице «лидером» по количеству проинспектированных площадок является Индия (31 площадка), на втором месте – Германия (14 площадок), затем следуют Венгрия (11 площадок) и Словения (10 площадок).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИНСПЕКТИРОВАНИЯ

Всего по результатам инспектирования 188 зарубежных производственных площадок было выявлено 1801 несоответствие, из которых 126 (7%) были классифицированы как критические, 770 (43%) – как существенные и 905 (50%) – как несущественные (прочие). В среднем соответственно по результатам одной проведённой инспекции выявлялись 0,67 критических, 4,1 существенных и 4,8 несущественных несоответствий.

Таблица 2.

Классификация выявленных несоответствий по основным категориям правил надлежащей производственной практики (GMP)

Категория	Классификация выявленных несоответствий		
	Критические	Существенные	Несущественные
Фармацевтическая система качества	5	48	180
Персонал	2	21	44
Процедуры выпуска продукции уполномоченным лицом	8	7	7
Рекламации и отзывы	3	7	13
Помещения и оборудование	12	96	136
Документация		32	177
Технологические процессы	4	111	97
Контроль качества	6	121	112
Валидация процессов и квалификация оборудования	12	90	71
Меры по предотвращению перекрёстной контаминации	10	107	43
Риски микробиологической контаминации и вопросы обеспечения стерильности	16	101	25
Несоответствия требованиям регистрационного досье	48	29	–
Всего	126	770	905

При анализе представленных результатов проведённых инспекций ключевым показателем является количество выявленных **критических** несоответствий, так как чаще всего именно их наличие либо отсутствие имеет определяющее значение для признания успешности (или соответственно неуспешности) прохождения инспектирования предприятием.

В целях визуализации представленных статистических данных по количеству и категоризации выявленных критических несоответствий используем диаграмму Парето. Данный метод статистического анализа является общепризнанным для многих областей менеджмента процессов, в том числе часто находит применение при анализе результатов инспекций, проведённых регуляторными органами различных стран. В частности, Ю.В. Подпружников и В.Н. Шестаков [6] применяют данный приём в ходе риск-анализа несоответствий, выявленных по результатам работы инспек-

торатов Европейского агентства по лекарственным средствам (EMA) и GMP-инспектората Украины.

Построение диаграммы Парето позволяет определить, какие из категорий выявленных критических несоответствий вносят максимальный вклад в их общее количество. Для этого оценим, какие из категорий выявленных несоответствий, согласно построенной диаграмме Парето, дают общий кумулятивный эффект, превышающий 80%. Используя данные таблицы 1 в отношении критических несоответствий, выявленных по результатам инспектирования зарубежных производителей в 2016 году, получаем диаграмму Парето (рисунок 1).

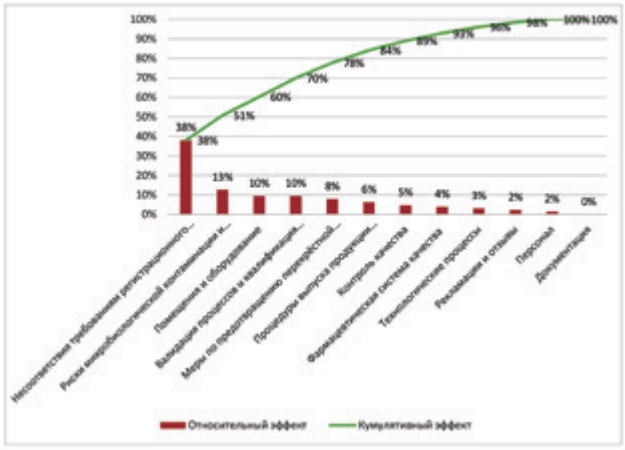


Рисунок 1. Диаграмма Парето для критических несоответствий, выявленных по результатам инспектирования зарубежных производителей в 2016 году

Диаграмма показывает, что совокупность шести основных категорий критических несоответствий составляет общий кумулятивный эффект, превышающий 80% в формировании всего спектра выявленных критических несоответствий по результатам инспектирования зарубежных производителей за 2016 год. В число указанных шести основных категорий критических несоответствий входят:

1) процедуры выпуска продукции уполномоченным лицом,
2) меры по предотвращению перекрёстной контаминации,
3) валидация процессов и квалификация оборудования,
4) помещения и оборудование,
5) риски микробиологической контаминации и вопросы обеспечения стерильности,
6) несоответствия требованиям регистрационного досье.

Подробнее остановимся на некоторых из указанных категорий.

Процедуры выпуска продукции уполномоченным лицом

В соответствии с базовыми требованиями первой главы GMP выпуску готового лекарственного средства в гражданский оборот должна предшествовать процедура его «сертификации» уполномоченным лицом («Qualified Person») согласно GMP ЕС [7] или авторизованным лицом («Authorised Person») согласно GMP PIC/S [8]. Данная процедура включает в себя комплексную оценку условий производства конкретной серии лекарственного средства, соответствующих записей, а также всех иных возможных факторов, способных повлиять на его качество, следовательно, на жизнь и здоровье пациента.

Среди выявленных критических несоответствий при инспектировании зарубежных площадок относительно данного требования фигурируют, например, такие:

- несоблюдение принципа независимости уполномоченного лица от других подразделений при выполнении своих непосредственных обязанностей;
- отсутствие должного взаимодействия и прослеживаемости в обмене информацией между уполномоченными лицами различных производственных площадок в том случае, когда указанные площадки совместно участвуют в производстве определённого лекарственного средства.

Меры по предотвращению перекрёстной контаминации

Предотвращение возможной перекрёстной контаминации традиционно является одним из ключевых аспектов производства лекарственных средств уже на протяжении многих лет. Особенно остро данный вопрос встаёт при оценке возможностей осуществления производственных операций с «высокоактивными» видами продукции в зонах, совмещённых с «обычной» продукцией. Стоит отметить, что в последние годы общемировые (в том числе европейские) подходы к оценке данных вопросов существенно изменились. Нововведения расширили возможности осуществления производства таких лекарственных средств, как, в частности, средства, обладающие цитостатическим и цитотоксическим действием, а также содержащие в своём составе половые гормоны, на совмещённом оборудовании и в общих помещениях с остальными лекарственными средствами. Формализованные нововведения нашли своё отражение в опубликованных в 2014 году обновлениях глав «Помещения и оборудование» [9] и «Производство» [10] правил GMP ЕС, а также в принятых правилах надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза (ЕАЭС) [11]. Тем не менее требование к выделению производственных мощностей сохранилось для продукции, обладающей сенсибилизирующими свойствами, например антибиотиков бета-лактамной группы.

Несмотря на некоторое «ослабление» регуляторных требований в отношении организации выделенного производства для некоторых видов продукции, существенно изменились и дополнились подходы к осуществлению мероприятий по валидации очистки. Прежде всего они были связаны с принятой EMA концепцией необходимости применения токсикологической оценки при осуществлении совмещённого производства различных видов продукции.

Очевидно, что выполнение указанных требований могло потребовать выделения значительных материальных и временных ресурсов со стороны производителей. Поэтому с момента их официальной публикации в ЕС производителям был дан так называемый переходный период, в течение которого производственные площадки имели возможность адаптировать свою существующую внутреннюю систему подходов к валидации очистки с учётом новых требований.

Справка: обновлённые требования относительно применения подходов токсикологической оценки были опубликованы в главах 3 и 5 GMP ЕС, которые вступили в силу с 1 марта 2015 года. При этом в указанных документах был прописан следующий переходный период для внедрения подходов токсикологической оценки:

- *до 1-го июня 2015 г.: для новых лекарственных средств, внедряемых в уже существующую схему совмещённого производства любых лекарственных средств;*
- *до 1-го декабря 2015 г.: для существующих совмещённых производств лекарственных средств для медицинского применения;*
- *до 31 мая 2015 г.: для существующих совмещённых производств лекарственных средств для медицинского и ветеринарного применения;*
- *до 1 января 2016 г.: для существующих совмещённых производств лекарственных средств исключительно для ветеринарного применения.*

Необходимо констатировать, что по итогам инспектирования за 2016 год не все проинспектированные зарубежные производственные площадки, в том числе на территории ЕС, сумели в полной мере реализовать указанные требования и предпринять все необходимые меры для исключения риска перекрёстной контаминации между производимыми видами продукции.

Здесь важно отметить следующее: несмотря на то, что в тексте российских правил надлежащей производственной практики [5] указанные выше нововведения, касающиеся проведения токсикологической оценки, ещё не внедрены в явном виде, существует ряд пунктов правил, в которых напрямую говорится о необходимости проведения комплексной оценки возможных рисков перекрёстной контаминации. Следовательно, существует необходимость внедрения всех существующих современных подходов к проведению валидации очистки, в том числе и указанных подходов токсикологической оценки.

Помимо несоответствий, связанных с фактическим неисполнением требований к токсикологической оценке при проведении валидации очистки оборудования, в ходе инспектирования указанных процедур нередко выявлялись и другие несоответствия. Были выявлены случаи, когда в комплексе мероприятий по проведению валидации очистки без должного на то основания не задействовались те или иные единицы оборудования, задействованные в технологическом процессе. Помимо этого, иногда в программу валидации очистки не были включены все производимые на совмещённом оборудовании виды лекарственных средств. Очевидно, что указанные несоответствия могут напрямую повлиять на риск возникновения перекрёстной контаминации, соответственно, критичность данных несоответствий ожидаемо оценивается как высокая.

Валидация процессов и квалификация оборудования

Планирование и реализация валидационных мероприятий – одни из ключевых аспектов, оцениваемых при инспектировании производственных площадок. Помимо прочего, необходимо учитывать тот факт, что регуляторные требования в отношении проведения указанных мероприятий за последнее время подверглись ряду изменений. Как уже упоминалось выше, в определённой мере были пересмотрены подходы к валидации очистки; кроме того, изменились и требования к проведению валидации процессов: например, ретроспективная валидация больше не считается приемлемым подходом. Можно подробно не останавливаться на этих вопросах, так как они уже были освещены в основном тексте приложения № 15 GMP ЕС [12].

Проводя оценку наиболее значимых несоответствий, выявленных за минувший год на зарубежных площадках в отношении валидации и квалификации, следует обратить особое внимание на следующие:

- наличие существенных отклонений в период валидационных мероприятий, которые не были расследованы должным образом;
- ненадлежащая оценка последующих изменений и их влияния на валидированный статус процессов/помещений/оборудования.

Риски микробиологической контаминации и вопросы обеспечения стерильности

В данный раздел обзора выявленных несоответствий были включены те из них, которые способны напрямую повлиять на микробиологическую безопасность лекарственных средств. Это может касаться как базовых принципов предотвращения микробной кон-

таминации сырья, материалов и готовой продукции, так и обеспечения соблюдения основных требований приложения № 1 правил надлежащей производственной практики при производстве стерильных лекарственных средств.

Обращают на себя внимание выявленные несоответствия, касающиеся прежде всего вопросов обеспечения стерильности для лекарственных средств, производимых путём **асептического** наполнения, в том числе:

- несоблюдение требований правил к разделению производственных зон по классам чистоты. Например, при асептическом наполнении флаконов с последующей лиофилизацией содержимого не на всём протяжении асептического процесса (когда продукт является фактически открытым) осуществляется его защита производственной зоной класса чистоты А. В частности, это зачастую касается операций по перемещению не окончательно укупоренных флаконов между зонами розлива, лиофилизации и укупорки;
- отсутствие проведения или проведение ненадлежащим способом мониторинга производственной среды. Данные несоответствия затрагивают, в частности, процедуры микробиологического мониторинга, такие как ненадлежащие условия (например, заниженная температура) инкубации образцов, что может привести к недостоверности полученных результатов.

В отношении мониторинга производственной среды в части контроля содержания механических частиц в воздушной среде чистых помещений нельзя обойти стороной и такие часто выявляемые факты, как отсутствие или существенные отклонения в системе непрерывного мониторинга частиц в зонах класса чистоты А/В. Наиболее часто данные отклонения были выявлены на уже давно существующих производственных площадках, которые не подвергались надлежащей реконструкции и переоснащению, учитывающих современные требования к проведению асептических операций.

- несоблюдение требований правил к проведению валидации асептического наполнения (известного как «media fill test»). Одним из наиболее значимых выявленных отклонений здесь является недостоверность оценки полученных результатов, в том числе на этапе инкубации образцов. Неоднократно были зафиксированы случаи документально не подтверждённой потери образцов при учёте по завершении инкубации, при этом такие случаи не подлежали необходимому расследованию и оценке. Соответственно, у инспекторов возникали обоснованные сомнения в достоверности полученных результатов валидации данного процесса, что в случае асептического производства лекарственных средств является необходимым условием обеспечения стерильности продукции.

Несоответствия требованиям регистрационного досье

И наконец, последний из пунктов, на который хотелось бы обратить внимание и который фактически оказался наиболее значимым в числе критических несоответствий, выявленных по результатам инспектирования зарубежных производственных площадок в 2016 году, – это выявленные факты несоответствия требованиям регистрационного досье при производстве лекарственных средств, подлежащих поставке в Российскую Федерацию. Данное явление зачастую имеет достаточно широкое распространение и затрагивает как технологические процессы производства, так и вопросы контроля качества лекарственных средств, поставляемых в нашу страну.

На наш взгляд, истоки этой проблемы тесно связаны, прежде всего, с особенностями отечественной регуляторной системы в области обращения лекарственных средств, в том числе в части возможности отслеживания соблюдения зарубежными площадками-производителями соответствия регистрационным требованиям. Следует признать, что фактически именно начало активной деятельности отечественного GMP-инспектората послужило стартом детальной работы в данном направлении. Как известно, соблюдение требований регистрационного досье при производстве лекарственных средств является одним из ключевых требований надлежащей производственной практики. В глобальном смысле задачей производителя является обеспечение реализации тех необходимых показателей качества лекарственного средства, которые были заложены при его разработке и соответственно нашли своё отражение в его регистрационном досье. Именно поэтому соблюдение требований регистрационного досье наряду с выполнением непосредственно самих принципов надлежащей производственной практики является необходимым условием получения качественного, эффективного и безопасного лекарственного средства.

Среди наиболее значимых несоответствий в данной категории необходимо отметить следующие:

- осуществление производства лекарственных средств (в том числе отдельных технологических стадий) на площадках, не указанных в документах регистрационного досье;
- использование методик контроля качества, не согласованных с требованиями регистрационного досье;
- выпуск лекарственных средств для реализации на территории РФ без проведения полного спектра испытаний, указанных в нормативной документации на лекарственное средство.

Отдельным пунктом необходимо отметить те случаи, когда в составе нормативной документации ука-

зываются некоторые показатели качества продукции, потенциально не включаемые в окончательный сертификат анализа готового лекарственного средства, но тем не менее отмеченные как «гарантируемые» производителем. При этом в ходе проведённых инспекций неоднократно наблюдались ситуации, когда указанные показатели качества фактически не могли быть надлежащим образом «гарантированы» производителем ввиду отсутствия какого-либо их контроля, в том числе при тестировании перед выпуском лекарственного средства в обращение. При этом не были представлены и другие возможные способы «гарантии» соответствия требуемым показателям качества, например, методами внутрипроизводственного контроля, дополнительными испытаниями при последующем изучении стабильности и т. д.

Примечательным является тот факт, что во многих подобных ситуациях, связанных с выявленными несоответствиями требованиям регистрационного досье, непосредственные производители лекарственных средств – зарубежные площадки – не располагали полным спектром информации, содержащейся в составе досье, подаваемого при регистрации лекарственных средств на территории Российской Федерации. Соответственно уполномоченные лица указанных производственных площадок фактически не имели возможности надлежащим образом оценить соответствие условий производства и контроля качества лекарственных средств требованиям регистрационного досье при осуществлении выпуска серий готовой продукции в обращение.

При этом для сравнения следует отметить, что согласно наблюдениям инспекторов, при выпуске на указанных производственных площадках идентичных препаратов для рынков других стран соответствующие требования в полной мере отслеживались и соблюдались.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов первого года работы российского GMP-инспектората в отношении зарубежных производителей лекарственных средств выявляет ряд закономерностей в категориях и классификации выявленных несоответствий. На основе систематизации выявленных несоответствий была проведена статистическая обработка с целью определения наиболее значимых из их числа.

Материалы, представленные в данной статье, создадут вспомогательную базу для зарубежных производителей лекарственных средств и их представителей в Российской Федерации в работе по подготовке к прохождению GMP-инспектирования. Кроме того, их использование позволит более эффективно распределять свои усилия как в случае устранения возможных несоответствий требованиям надлежащей производственной практики, так и в случае предупреждения их возникновения, тем самым обеспечивая поставку на отечественный рынок исключительно качественных, эффективных и безопасных лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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). URL: www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/ (дата обращения 16.03.2017).
2. Постановление Правительства РФ от 3 декабря 2015 г. № 1314 «Об определении соответствия производителей лекарственных средств требованиям правил надлежащей производственной практики». URL: www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_190256/ (дата обращения 16.03.2017).
3. Приказ Минпромторга России от 21.12.2015 № 4184 «Об определении федерального бюджетного учреждения «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации уполномоченным учреждением на проведение инспектирования». URL: www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_194250/ (дата обращения 16.03.2017).
4. Приказ Минпромторга России № 261 от 04.02.2016 «Об утверждении форм заявления о выдаче заключения о соответствии производителя (иностранного производителя) лекарственных средств для медицинского применения требованиям правил надлежащей производственной практики, инспекционного отчета по результатам инспектирования производителя и иностранного производителя лекарственных средств для медицинского применения на соответствие требованиям правил надлежащей производственной практики и заключения о соответствии производителя (иностранного производителя) лекарственных средств для медицинского применения требованиям правил надлежащей производственной практики» (зарегистрирован в Минюсте России 09.03.2016 № 41341). URL: www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_195085/ (дата обращения 16.03.2017).
5. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 (ред. от 18.12.2015) «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики» (зарегистрировано в Минюсте России 10.09.2013 № 29938). URL: www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_152004/ (дата обращения 16.03.2017).
6. Ю.В. Подпружников, В.Н. Шестаков. Риск-анализ несоответствий, выявляемых при проведении GMP-инспекций // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. V. 1(14). URL: www.pharmjournal.ru/assets/files/february2016/28.pdf (дата обращения 16.03.2017).
7. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Volume 4. Chapter 1. Pharmaceutical Quality System. URL: www.ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/vol4-chap1_2013-01_en.pdf (дата обращения 16.03.2017).
8. Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products. Part I. URL: www.picscheme.org/layout/document.php?id=976 (дата обращения 16.03.2017).
9. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Volume 4. Part 1. Chapter 3. Premises and Equipment. URL: www.ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/chapter_3.pdf (дата обращения 16.03.2017).
10. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Volume 4. Part 1. Chapter 5. Production. URL: www.ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/chapter_5.pdf (дата обращения 16.03.2017).
11. Совет Евразийской экономической комиссии. Решение от 3 ноября 2016 года № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». URL: www.docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411921/cncd_21112016_77 (дата обращения 16.03.2017).
12. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Volume 4. Annex 15. Qualification and Validation. URL: www.ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2015-10_annex15.pdf (дата обращения 16.03.2017).

УДК 615.243.4

АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА НА ПРИМЕРЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГРУППЫ ИНГИБИТОРОВ ПРОТОННОЙ ПОМПЫ

Н.В. Мазова[1]*, А.Л. Марченко[1], Н.В. Марченко[1]

Резюме. В статье проведен анализ российского фармацевтического рынка и сравнительная характеристика препаратов группы ингибиторов протонной помпы. Представлены данные о производстве, регистрации и продажах данной группы лекарственных средств в период 2007–2016 гг.

Ключевые слова: ингибиторы протонной помпы, российский фармацевтический рынок, биодоступность, вспомогательные вещества.

THE ANALYSIS OF THE PHARMACEUTICAL MARKET ON THE EXAMPLE OF MEDICINES OF GROUP OF INHIBITORS OF THE PROTON POMP

N.V. Mazova[1]*, A.L. Marchenko[1], N.V. Marchenko[1]

Abstract. In this research is carried out the review of the Russian pharmaceutical market and the comparative characteristic of medicines of group of inhibitors of a proton pomp. Data on production, registration and sales of this group of medicines are provided during 2007–2016.

Keywords: inhibitors of a proton pomp, Russian pharmaceutical market, bioavailability, excipients.

1 – ФГБОУ ВО "Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия" Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

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

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

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные препараты группы ингибиторов протонной помпы (ИПП) являются представителями эффективных средств лечения кислотозависимых заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). ИПП относятся к классу антисекреторных препаратов, действующих на протонную помпу париетальной клетки, ингибируют ее активность и обеспечивают выраженный антисекреторный эффект независимо от природы кислотостимулирующего фактора [1, 2]. Уникальность ИПП состоит в том, что они высокоселективно блокируют молекулу кислотопродукции – H_+/K_+-АТФ-азу, при этом в кислой среде (pH≤1) происходит преобразование их в активную форму (сульфенамид). Сульфенамид соединяется с цистеиновыми группами протонной помпы, что приводит к ингибированию H_+/K_+-АТФ-азы и угнетению секреции соляной кислоты. Применение лекарственных препаратов на основе ИПП позволяет поддерживать оптимальный уровень кислотности среды желудка в течение длительного времени [3, 4]. При этом препараты группы ИПП, как правило, редко проявляют побочные эффекты, и это обусловливает их популярность в медицинской практике при лечении таких заболеваний, как гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ, рефлюкс-эзофагит, неэрозивная ГЭРБ), язва желудка и двенадцатиперстной кишки (ДПК), симптоматические язвы (синдром Золлингера – Эллисона), атрофический гастрит, гастропатия, функциональная диспепсия, инфекция *Helicobacter pylori* [5].

В связи с тем, что препараты ИПП применяются для лечения широкого круга заболеваний ЖКТ, рынок данных препаратов представлен большим количеством торговых наименований лекарственных препаратов на основе различных представителей группы ИПП.

Различают две группы ингибиторов протонной помпы. Первая группа лекарственных средств на основе рацематов: омепразол (выход на рынок – 1988 г.), лансопразол (1991 г.), пантопразол (1994 г.), рабепразол (1998 г.). Вторая группа ЛС на основе энантиомеров: эзомепразол (S-омепразол; выход на рынок – 2001 г.), декслансопразол (R-лансопразол; 2009 г.) [5].

Механизм действия различных представителей препаратов этого класса одинаков, так как все ИПП являются производными бензимидазола. Они отличаются друг от друга структурой радикалов на пиридиновом и бензимидазольных кольцах, различия проявляются в основном

в фармакокинетике и фармакодинамике [6, 7]. Номенклатура препаратов группы ИПП, зарегистрированных в РФ, представлена в таблице 1.

Ассортимент лекарственных средств ИПП на российском фармацевтическом рынке включает препараты как отечественного (38%), так и зарубежного (62%) производства. В общей номенклатуре на долю оригинальных препаратов приходится 12%. Отечественные компании выпускают только дженерики препаратов ИПП. Наибольшую долю среди зарубежных препаратов занимают препараты фармацевтических компаний Индии (26%) и Словении (11%) [8].

Стоит отметить, что распространённость различных препаратов ИПП на рынке лекарственных препаратов зависит от ряда факторов, таких как степень изученности, стоимость, технология производства, фармакологическая активность и прочее [9].

В ходе исследования был проведен анализ динамики регистрации препаратов ИПП на отечественном рынке производителями различных стран в рассматриваемый период времени (2009-2015 годы). Данные представлены на рисунке 1.

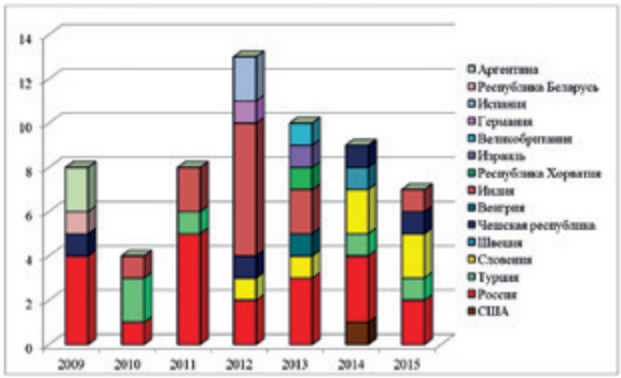


Рисунок 1. Динамика развития номенклатуры препаратов на основе ингибиторов протонной помпы в РФ в период 2009–2015 гг.

Общий ассортимент ИПП на сегодняшний день – около 100 торговых наименований лекарственных препаратов, среди которых препараты на основе перечисленных выше активных фармацевтических субстанций занимают следующие доли: 52% – омепразол, 16% – пантопразол, 12% – рабепразол, 11% – лансопразол, 1% – декслансопразол.

Среди российских производителей самым популярным является производство препаратов омепразола, родоначальника группы ИПП. Возможно, это связано с устоявшейся, проработанной годами технологией их производства и высоким спросом на наиболее известный и изученный препарат.

Омепразол часто используют для создания композиций многокомпонентных препаратов в комбинации с антибиотиками. Препараты «тройной терапии», соответствующие дневной дозе приема каждого действующего вещества, «Пилобакт» с комбинацией действующих веществ «омепразол + тинидазол + кларитромицин», и «Пилобакт АМ» с комбинацией действующих веществ «омепразол + амоксициллин + кларитромицин» – предназначены для использования в эрадикационной терапии *Helicobacter pylori* при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки [10].

В настоящее время большую популярность среди гастроэнтерологов и пациентов с кислотозависимыми заболеваниями приобретают препараты рабепразола. Это связано с более высокой абсолютной биодоступностью препарата – у рабепразола она равна 52% в сравнении с 40% биодоступности омепразола [11]. Но с технологической точки зрения субстанция рабепразола является очень неустойчивой к любым воздействиям, поэтому используется отечественными производителями намного реже и занимает меньшую долю в номенклатуре рынка.

Из зарегистрированных в России препаратов ИПП 16% приходится на пантопразол. При этом для перорального применения его производят исключительно в виде таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой. Популярность субстанции пантопразола среди производителей обусловлена двумя основными причинами: первая – у него высокая и постоянная биодоступность вне зависимости от приема пищи (77%), вторая – пантопразол является наиболее химически устойчивой субстанцией группы ИПП. Отметим, что активность российских производителей по разработке и регистрации лекарственных препаратов на основе пантопразола сопоставима с активностью производителей препаратов из Индии.

Наиболее эффективным препаратом среди ИПП является выпущенный в 2000 году эзомепразол [3]. Эзомепразол первым из данной группы был синтезирован с помощью технологии стереоселективного синтеза и представляет собой оптический изомер омепразола. Эзомепразол имеет особенности метаболизма, его антисекреторная эффективность превосходит таковую у других представителей этой группы. Доказано, что эзомепразол обеспечивает лучший контроль за секрецией соляной кислоты по прошествии 6 ч после приема уже в первый день применения, так как обладает хорошей абсорбирующей способностью, а значит, более длительным по сравнению с омепразолом и рабепразолом действием в течение суток после приема [11]. При ежедневном приеме в течение 5 дней в дозировке 20 мг один раз в сутки средняя максимальная концентрация соляной кислоты в ЖКТ снижается на 90%. Лечение эзомепразолом дозировкой 20 мг 2 раза в сутки в комбинации с антибактериальными средствами (антибиотиками) в течение всего лишь недели приводит к эрадикации *Helicobacter pylori* примерно у 90% пациентов [12]. На данный момент препараты на основе эзомепразола занимают 8% в номенклатуре фармацевтического рынка препаратов ИПП.

Таблица 1.

Зарегистрированные в РФ препараты группы ингибиторов протонной помпы

Наименование действующего вещества (МНН)	Лекарственная форма	Наименование препаратов
Омепразол	Лиофилизат для приготовления раствора для инфузий	Ортанол® («Сандоз д.д.», Словения); «Желкизол» («Юкеа Фармасьютикал групп Ко., Лтд.», Китай); «Омал» (ЗАО «Фармгид», Россия); Лосек® («АстраЗенека АБ», Швеция), «Хелицид» («Зентива к.с.», Чешская республика); «Омез» («Д-р Редди`с Лабораторис Лтд.,» Индия); «Ультоп» («КРКА, д.д.», Ново место, Словения); «Улкозол» («Лабораториос Баго С.А.», Аргентина)
	Капсулы или капсулы кишечнорастворимые	«Омепразол-Тева» («Тева», Израиль); Омизак® («Торрент Фармасьютикалс Лтд.», Индия), «Омепразол» (ООО «БЗМП», Россия); Омез® («Д- р Редди`с Лабораторис Лтд.», Индия); Ультоп® («КРКА, д.д.», Ново место, Словения); «Омепразол-Зентива» («Зентива к.с.», Чешская Республика); «Цисагаст» («ПРО.МЕД.ЦС Прага а.о.», Чешская Республика); «Омепразол-Рихтер» («Лабораториос Ликонса А.О.», Испания); «Омепразол» (СООО «Лекфарм», Республика Беларусь); «Омепразол» (ЗАО «Канон Продакшн», Россия; «Омепразол» (ООО «Озон», Россия); Ромесек® («Ранбакси Лабораториз Лимитед», Индия); «Омепразол-OBL» (ЗАО «Оболенское», Россия); «Омепразол» (ОАО «Биосинтез», Россия); «Омепразол» (ЗАО «Северная звезда», Россия); «Омепразол» (ОАО «Валента Фармацевтика», Россия); «Омитокс» («Шрея Лайф Саенсиз Пвт.Лтд.», Индия); Ортанол® («Сандоз д.д.», Словения); «Омепразол» (ОАО «Синтез», Россия); «Омипикс» («М. Дж. Биофарм Пвт. Лтд.», Индия); «Омепразол» («Мосхимфармпрепараты» им. Н. А. Семашко, Россия); «Плеом-20» («Плетхико Фармасьютикалз Лтд.», Индия); «Омепразол» (ООО «Производство медикаментов», Россия); «Омепразол» (Скопинский фармацевтический завод, Россия); «Омепразол – ШТАДА» (ОАО «Нижфарм», Россия); Омез®Д («Торрент Фармасьютикалс Лтд.», Индия); «Омепразол» (ОАО «АВВА РУС», Россия); «Омепразол–Акри» (ОАО «Акрихин ХФК», Россия); «Гастрозол» (ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия); «Улкозол» («Лабораториос Баго С.А.», Аргентина); «Промез» («Протекх Биосистемс Пвт.Лтд.», Индия); «Омекапс» («Аджанта Фарма Лтд.», Индия); «Оцид» («Кадила Хэлткэр Лтд.», Индия); «Омепразол» («Олайнфарм АО», Латвия); «Зероцид» («Сан Фармасьютикал Индастриз Лтд.», Индия); «Омепразол» (ООО «ГМ Фармацевтикалс», Грузия), «Сопрал» (АО «Софарма», Болгария)
	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	Лосек® МАПС® («АстраЗенека АБ», Швеция)
Рабепразол	Лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения	«Рабелок» («Кадила Фармасьютикалз Лтд.», Индия)
	Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой	«Рабелок» («Кадила Фармасьютикалз Лимитед», Индия); Разо® («Д-р Редди`с Лабораторис Лтд.», Индия), «Берета» («ВЕРОФАРМ», Россия); «Хайрабезол» («Хайгланс Лабораториз Пвт. Лтд.», Индия); «Золиспан» («Лабораториос Ликонса С.А.», Испания); «Нофлюкс® (ЗАО «Фармацевтический завод ЭГИС», Венгрия), Зульбекс® (ООО «КРКА-РУС», Россия); «Онтайм» (ООО «Тева», Россия); «Париет» (ООО «Джонсон & Джонсон», Швейцария)
	Капсулы или капсулы кишечнорастворимые	«Рабепразол-OBL» (ЗАО «Фармацевтическое предприятие «Оболенское», Россия); «Рабепразол» (ЗАО «Северная звезда», Россия)
Лансопразол	Капсулы или капсулы кишечнорастворимые	«Лансопразол Штада» (ОАО «Нижегородский химико-фармацевтический завод» Россия); «Лоэнзар-сановель» («Сановель», Турция), «Ланзабел» («Нобел Илач Санайи Ве Тиджарет А.Ш.», Турция), «Ланзоптол» («КРКА, д.д.», Ново место, Словения); «Эпикур» (ЗАО «Фармацевтическое предприятие«Оболенское», Россия); «Ланцид» («Микро Лабс Лимитед», Индия); Ланзап® («Д-р Редди`с Лабораторис Лтд.», Индия); «Геликол» («Эджзаджибаши Ильяч Санайи ве Тиджарет А.Ш.», Турция); «Лансопразол» (ЗАО «Медисорб», Россия); «Наклофен Протект» (ООО «КРКА-РУС», Россия)
Пантопразол	Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой	«Пантопразол Канон» (ЗАО «Канонфарма продакшн», Россия); Пулореф® («Нобел Илач Санайи ве Тиджарет А.Ш.», Турция); «Кросацид» («Микро Лабс Лимитед», Индия); «Пиженум – сановель» («Сановель» Турция); «Ультера» (ЗАО «Сотекс», Россия); «Санпраз» («Сан Фармасьютикал Индастриз Лтд», Индия); «Пантаз» («Медлей Фармасьютикалз Лтд.», Индия); «Нольпаза» («КРКА, д.д.», Ново место, Словения); Контролок® («Никомед ГмбХ», Германия); «Пептазол» («Кимика Монтпеллиер С.А.», Аргентина); «Зипантола» («Плива Хрватска д.о.о.», Республика Хорватия); «Панум» («Юник Фармасьютикал Лабораториз», Индия)
	Лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения	Панум® «Юник Фармасьютикал Лабораториз», Индия); «Санпраз» («Сан Фармасьютикал Индастриз Лтд», Индия); «Нольпаза» («КРКА, д.д.», Ново место, Словения); «Контролок» («Такеда ГмбХ», Германия)

Окончание табл. 1

Наименование действующего вещества (МНН)	Лекарственная форма	Наименование препаратов
Эзомепразол	Таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой	«Эзомепразол Зентива» («Зентива к.с.», Чешская республика); «Эзомепразол Канон» (ЗАО «Канонфарма продакшн», Россия); «Нео-зекст» («Сандоз д.д.», Словения); «Вимово» («АстраЗенека ЮК Лимитед», Великобритания); Нексиум® («АстраЗенека АБ», Швеция)
	Капсулы кишечнорастворимые	Эманера® (АО «КРКА, д.д., Ново место», Словения)
	Лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения	Нексиум® («АстраЗенека АБ», Швеция)
	Пеллеты/гранулы, покрытые кишечнорастворимой оболочкой	Нексиум® («АстраЗенека АБ», Швеция)
Декслансопразол	Капсулы с модифицированным высвобождением	Дексилант® («Такеда Фармасьютикалс США Инк», США)

Результаты анализа номенклатуры показывают, что ИПП нашли широкое применение в виде твердых лекарственных форм: 53% препаратов представляют собой кишечнорастворимые капсулы, 30% – таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, 6% – порошок, пеллеты или гранулы для приготовления суспензии для приема внутрь и лишь 11% – лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения.

Пероральная ЛФ стала наиболее приемлемой для препаратов ИПП в связи со свойствами субстанций, которые активно взаимодействуют с кислородом и влагой из воздуха, легко окисляются под воздействием влажности, нагревания, подвергаются разрушению или трансформации в кислой и нейтральной водной среде. Поэтому ИПП в виде твердой лекарственной формы для перорального применения должен быть защищен от контакта с кислым желудочным соком и доставлен в верхние отделы кишечника в неизмененном виде, где pH близок к нейтральному. При этом необходимо обеспечение быстрого всасывания и максимальной биодоступности в этом отделе кишечника. Твердые лекарственные формы с модифицированным высвобождением, а в частности таблетки или капсулы, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, способны обеспечивать выполнение этих условий [9, 13].

Для разработки данных лекарственных форм при производстве препаратов группы ИПП используется множество различных вспомогательных веществ. Составы готовых лекарственных препаратов содержат разнообразные наполнители, связующие и антиоксиданты. Проанализированные композиции препаратов отечественных и зарубежных производителей включают около 30 наименований разных эксципиентов. При этом российские составы многообразны, тогда как за рубежом предпочитают классические примеры рецептур. Для сравнения ниже представлены сведения об использовании вспомогательных веществ в составах препаратов ИПП, производимых в Чешской Республике и в Российской Федерации. Были проанализированы составы всех зарегистрированных препаратов исследуемой страны и рассчитана доля каждого вспомогательного вещества от общего количества используемых в составах препаратов эксципиентов. Так, например, доля сахарозы в трех зарегистрированных препаратах Чешской Республики составляет 14% от всех вспомогательных веществ этих препаратов. Данные анализа представлены на рисунках 2 и 3.



Рисунок 2. Использование вспомогательных веществ в рецептурах препаратов – ингибиторов протонной помпы, выпускаемых производителями Чешской Республики

Также необходимо отметить тенденцию роста интереса к использованию новых вспомогательных веществ в составах с течением времени. То есть композиции, зарегистрированные в период 2007–2009 годов, не отличались разнообразием, в то время как с каждым годом увеличивалось применение нестандартных компонентов в рецептурах. Так как в 2007 году насчитывалось 12 вспомогательных ве-



Рисунок 3. Использование вспомогательных веществ в рецептурах препаратов ингибиторов протонной помпы, выпускаемых отечественными производителями

ществ в разных составах, а в 2014 году уже около 30. Это, без сомнения, связано с ростом рынка вспомогательных веществ и степени изученности свойств субстанций ИПП.

Наиболее распространенными вспомогательными компонентами, входящими в состав препаратов ИПП в качестве наполнителей, можно назвать маннитол, который используется в 45%[1] случаев как основной наполнитель, сахарозу (30%), сорбитол (10%), что, вероятно, связано с инертными свойствами полиолов. В качестве связующих веществ наиболее часто применяют повидон – 46% от всех связующих веществ, гипромеллозу (17%), гидроксипропилцеллюлозу (25%). Практически в каждом составе имеется какой-либо антиоксидант (стабилизатор) в виде солей кальция (22%), магния (58%) или натрия (18%) (магния гидрокарбонат, магния оксид и т.д.).

Модифицированное высвобождение действующих веществ ИПП в отделе кишечника достигают за счет покрытия кишечнорастворимой оболочкой. В качестве кишечнорастворимой оболочки могут быть использованы различные типы полимеров, которые растворяются при различных значениях pH – от 4,8 до 7,2 [14].

В состав кишечнорастворимых покрытий могут входить различные полимеры: фталаты (гипромеллозы фталат, поливинилацетофталат и т.д.), шеллак, производные метакриловой кислоты (полиметакрилаты). Эти полимеры, как правило, не используются самостоятельно. В рецептуру покрытия могут дополнительно входить функциональные вспомогательные вещества: другие полимеры, пластификаторы (полисорбат, триэтилацетат), структурообразователи и пигменты. Для получения качественной оболочки используют указанные вещества в виде растворов в этаноле, изопропаноле, этилацетате, толуоле и других растворителях. Существует также технология покрытия таблеток водно-аммиачными растворами шеллака или полиметакрилата, представленными компаниями в виде водных дисперсий или редиспергируемых порошков (Eudragit, AcrylEZE, Kollicoat® MAE, Surelease®). Данные кишечнорастворимые покрытия могут быть использованы как в виде монокомпонентов, так и в виде готовых смесей различных компаний (Ashland, BASF, Colorcon), что значительно облегчает процесс производства [15, 16]. Наиболее часто в составах препаратов ИПП используют кишечнорастворимые оболочки на основе полимеров метакриловой кислоты (75%), реже – различные фталаты (18%).

Российские производители активно выводили на рынок новые продукты на основе ИПП практически каждый год. Однако в 2012 году появилось много дженериков, произведённых в Индии [8]. Необходимо отметить, что ежегодно регистрируются новые препараты на основе субстанций группы ИПП, что свидетельствует об актуальности разработки данных лекарственных средств.

Известно, что в случае появления все большего количества дженериков на рынке возрастает конкуренция. При этом происходит активное перераспределение долей рынка лекарственного средства (ранее целиком принадлежавшего оригиналу), и это, как правило, приводит к снижению продаж более дорогого оригинального препарата. Однако, как показали результаты наших исследований, рынок препаратов ИПП растет в целом и при этом объемы продаж оригинальных препаратов этой группы остаются практически стабильными в натуральных показателях, а увеличение происходит за счет выхода дженериковых версий, что обеспечивает повышение доступности данной группы лекарственных средств для населения. Так, например, в группе омепразола оригинальный препарат «Лосек» занимает в продажах около 1% (в упаковках), при этом прирост группы препаратов омепразола за шесть лет (2008–2014 гг.) составил 118%, а прирост показателя продаж оригинального препарата – 69%. У более новых ИПП, например рабепразола, изменений в показателях продаж до выхода дженериков практически не было (продажи составляли около 770 тысяч упаковок в год). За первые два года после выхода дженериков рынок препаратов рабепразола вырос в 1,5 раза, а продажи оригинального препарата остались прежними[2]. Стоимость дженериков гораздо ниже, чем оригинальных препа-

[1] Здесь и далее указаны доли препаратов ИПП из общей номенклатуры (табл. 1), в состав которых входит соответствующее вспомогательное вещество.

[2] В расчетах использованы данные базы DSM-group (по Российской Федерации).

ратов, что имеет немаловажное значение для пациента и часто определяет выбор препарата исходя из финансовых возможностей, особенно для длительного приема. Поэтому выход каждого нового дженерика создает дополнительную конкуренцию, в первую очередь другим дженерикам.

К примеру, стоимость оригинального препарата на основе эзомепразола варьирует в диапазоне от 1 тыс. до 3,5 тыс. руб. за упаковку, тогда как его аналог можно приобрести по цене от 200 руб. за упаковку № 14. Вышедшие же гораздо раньше дженериковые лекарственные средства на основе омепразола имеют еще более низкую розничную цену (около 40 руб. за упаковку).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лекарственные средства группы ИПП являются эффективными и современными препаратами для лечения целого ряда кислотозависимых заболеваний. На фармацевтическом рынке присутствует обширная номенклатура препаратов данной группы, но он продолжает активно расти и развиваться. Основной задачей производителей является совершенствование процесса производства препаратов ИПП за счет применения новых вспомогательных веществ. Разработка современных технологий получения препаратов ИПП позволяет снизить цену и делает доступными современные лекарственные препараты.

Таким образом, на примере структуры рынка препаратов ИПП проведенное исследование демонстрирует не только развитие технологии и инноваций в препаратах данной группы, но и отмечает общие тенденции развития номенклатуры лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.А Самсонов. Ингибиторы протонной помпы – препараты выбора в лечении кислотозависимых заболеваний // Фарматека. 2007. № 6. С. 10–15.
2. Патент РФ № 2172170. Лекарственное средство для улучшения пищеварения / Н.Б. Демина, Н.Н. Катаева, В.А. Кеменова, В.А. Быков, Г.Б. Бравова. – Опубл. 20.08.2001.
3. И.В. Маев, Д.Н. Андреев, Д.Е. Дичева, А.Ю. Гончаренко. Фармакотерапевтические аспекты применения ингибиторов протонной помп // Медицинский вестник МВД. 2013. № 3(64). С. 9–14.
4. Э.Н. Платошкин. Ингибиторы протонной помпы — эталон лечения кислотозависимых заболеваний // Медицинские новости. 2007. № 10. С. 25–30.
5. Т.Л Лапина. Ингибиторы протонной помпы: как оптимизировать лечение кислотозависимых заболеваний // Русский медицинский журнал. 2003. Т. 11. № 5. С. 53–57.
6. М.Р. Конорев, Г.Д. Тябут. Ингибиторы протонной помпы: свойства и применение // Медицинские новости. 2011. № 9. С. 58–60.
7. Т.Л. Лапина. Ингибиторы протонной помпы: от фармакологических свойств к клинической практике // Фарматека. 2002. № 9. С. 11–16.
8. Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ (дата обращения 17.01.2017).
9. Н.В. Мироньчева, А.Л. Марченко. Обоснование выбора полимера для композиции таблеток-ядер препаратов – ингибиторов протонной помпы // Сборник материалов IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 20–21 апреля 2015 г. – СПб.: СПХФА, 2014. С. 308–310.
10. L.E. Gustavson. Effect of omeprazole on concentrations of clarithromycin in plasma and gastric tissue at stady state// Antimicrob. Agents Chemother. 1995. № 39(9). P. 2078–2083.
11. С.В. Морозов. Сравнительная эффективность антисекреторного действия рабепразола и эзомепразола у лиц, быстро метаболизирующих ингибиторы протонного насоса // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2003. № 6. С. 58–63.
12. Д.С. Демьяненко. Нексиум (эзомепразол) – новое слово в лечении кислотозависимых заболеваний желудочно-кишечного тракта // Здоровье Украины. 2008. № 6(1). С. 36–37.
13. Д.П. Чувашова, С.Н. Егорова. Характеристика и ассортимент ингибиторов протонной помпы, а также субстанций для их производства // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 5. С. 41–46.
14. Патент РФ № 2356540. Капсулы, содержащие пеллеты с действующими веществами, различающиеся между собой профилями высвобождения из них действующих веществ / С. Аншютц, Р. Шнайдер. – Опубл. 27.05.2009.
15. Н.Б. Демина. Современные тенденции развития технологии матричных лекарственных форм с модифицированным высвобождением (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2016. Т. 50. № 7. С. 47–53.
16. R.C. Rowe, P.J. Sheskey, M.E. Quinn. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Sixth edition. – London; Chicago: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009. 907 p.

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Статья приведена в авторской редакции

УДК 615.01

ПРОБЛЕМЫ СООТВЕТСТВИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ ЗАПИСЕЙ ТРЕБОВАНИЯМ НАДЛЕЖАЩЕЙ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ПРАКТИКИ. СООБЩЕНИЕ I. АКТУАЛЬНОСТЬ СОХРАНЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ ЗАПИСЕЙ

И.А. Осмоловская[1]*, О.В. Зарочинская[1], М.О. Емельянов[1], Д.В. Сомов[1]**

Резюме. Целостность записей или целостность данных – самое «горячее» требование при оценке систем документации на соответствие требованиям надлежащей производственной практики (GMP). Именно на неё нацелен фокус внимания при проведении инспектирования фармацевтических предприятий. Эта статья первая из цикла статей, посвящённых данной теме. В ней объясняются причины важности сохранения целостности записей и приводятся примеры выявляемых несоответствий.

Ключевые слова: целостность данных, записи, данные, инспекции, GMP, FDA.

PROBLEMS OF CONFORMITY OF THE RECORDS INTEGRITY WITH THE REQUIREMENTS OF GOOD MANUFACTURING PRACTICE. REPORT 1. ACTUALITY OF THE RECORDS INTEGRITY CONSERVATION

I.A. Osmolovskaya[1]*, O.V. Zarochinskaya[1], M.O. Emelianov[1], D.V. Somov[1]**

Abstract. Integrity of records or data integrity is the most «hot» requirement when assessing documentation systems for compliance with Good Manufacturing Practice (GMP). It's in the center of focus of attention during inspections of pharmaceutical companies. This article is the first of a series of articles devoted to this topic. In it explains the reasons for the importance of preserving the integrity of records and provides examples of identified deviations.

Keywords: data integrity, records, data, inspections, GMP, FDA.

1 – ООО «ЛексФАРМА», 127422, Россия, Москва, ул. Тимирязевская, д. 1, стр. 3

1 – LLC «LexPHARMA», 1/3, Timiryazevskaya str., Moscow, 127422, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: info@lexpharma.org

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

ВВЕДЕНИЕ

Статистически доказанным фактом является стремительное развитие российской фармпромышленности за последние годы. При этом и общество, и производители, и регуляторные органы хорошо понимают, что в вопросе лекарственного обеспечения соответствие производимых лекарственных препаратов установленным требованиям по качеству, эффективности и безопасности является строго обязательным. А контроль качества можно рассматривать только как один из элементов подтверждения этого соответствия. Для обеспечения качества, эффективности и безопасности препаратов все участники их жизненного цикла должны соблюдать требования соответствующих надлежащих практик (GxP), а регуляторные органы проверять их соблюдение. Однако международный опыт показывает, что на сегодняшний момент даже наличие у производителя различных сертификатов GMP не является гарантией стабильного качества выпускаемых им лекарственных средств. Почему так происходит? Есть две основные причины. Первая – инспекция проводится в течении нескольких дней с интервалом в три года и не может досконально изучить все аспекты деятельности предприятия, относящиеся к фармацевтической системе качества. Вторая – предприятия не всегда открыты для взаимодействия с регулирующими органами. Поэтому несколько лет назад при проведении проверок фокус внимания сместился на целостность записей. Сейчас целостность записей и способы её реализации являются самой обсуждаемой темой в мировом фармацевтическом сообществе. За всю историю

GMP ещё не было ни одной проблемы, которой было бы посвящено столько нормативных документов, рекомендаций профессиональных сообществ, статей в периодических изданиях и обсуждений в интернете.

Этой статьёй мы начинаем цикл публикаций, в которых планируем рассказать о статистике зарубежных регуляторных инспекций, о многих новых терминах и понятиях (например, ALCOA+), о требованиях и рекомендациях нормативных документов (в том числе рекомендуемой методике инспектирования), относящихся к целостности записей и управлению данными.

НЕМНОГО О ТЕРМИНАХ

Понятия «запись/отчёт» (record/report) и «целостность» (integrity) были введены в главу 4 «Документация» GMP ЕС при её пересмотре в 2011 году.

*«93. Существуют два основных вида документации: для выполнения требований настоящих Правил, то есть регламентирующая документация, и для регистрации их соблюдения, то есть **регистрирующая документация**».*

*«98. **Регистрирующая документация (записи и (или) отчеты)** включает в себя следующие виды документов: записи; документы, подтверждающие качество (паспорта, аналитические листки и иные аналогичные документы); отчеты».*

*«94. Производитель осуществляет контроль для обеспечения точности, **целостности**, доступности и однозначности документов».*

*«99. (4.1) …Должны проводиться соответствующие контрольные мероприятия для обеспечения **целостности записей** в течение срока хранения.»*

*«108. (4.10) …Необходимо предусмотреть меры контроля, которые обеспечивают **целостность записей** на протяжении всего срока их хранения» [1].*

Однако в словарь GMP эти термины добавлены не были. И если, что такое «запись», более-менее понятно на интуитивном уровне (да и то не всегда!), то с понятием «целостность» всё намного сложнее. Но для правильного выстраивания диалога «производитель – регулятор» нужно чёткое однозначное понимание терминов и требований. Для этого ведущие национальные и международные организации разработали ряд документов (уже утверждённых или находящихся в стадии проектов), посвящённых целостности данных и управлению данными.

Сравнительная оценка этих документов будет представлена в отдельной статье, а сейчас возьмём только наиболее полное определение «целостности» данных:

> *«Целостность данных является степенью, с которой данные являются полными, последовательными, точными, заслуживающими доверия и надежными, при условии сохранения этих характеристик на протяжении всего жизненного цикла данных. Данные должны быть собраны и поддерживаться в безопасном режиме таким образом, что они могут быть отнесены, понятны, точны, одновременно записаны, быть оригиналом или заверенной копией. Обеспечение целостности данных требует надлежащего качества и систем управления рисками, в том числе и строгого соблюдения разумных научных принципов и надлежащей практики документации»* [3].

Уже из одного этого определения видно, что одно такое понятие, как «целостность данных», включает в себя большое количество требований.

ЗАПИСИ – ЭТО ОБЪЕКТИВНОЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВО

Аксиомой проведения любой проверки является поиск объективных доказательств соответствия или несоответствия. Согласно терминологии ИСО (ISO), *«объективная информация – информация, которая может быть доказана, что она правдива, основана на фактах и получена путем наблюдения, измерения, испытания или других средств».*

Если инспектор своими глазами видит, что отсутствует оборудование для стерильной фильтрации растворов для уборки в стерильном производстве, – это объективное доказательство несоответствия, полученное путём наблюдения, сколько бы его ни убеждали в том, что растворы профильтрованы. Если термометр в реакторе показывает температуру раствора 40 °С (вместо регламентированных, например, 30–35 °С) – это объективное доказательство несоответствия, полученное путём измерения. Если при попытке протереть поверхность якобы «безворсовой» салфеткой из неё выделяются волокна – это объективное доказательство несоответствия, полученное путём испытания.

А что подразумевается под «другими средствами»? Это прежде всего проверка записей или регистрирующих документов (согласно терминологии GMP). Но записи без подтверждения их достоверности не являются объективным доказательством. Жизнь показала, что данные в записях можно удалять, подменять или подделывать (что и делалось тысячи лет назад и делается сейчас). Как говорит русская пословица (имеющая тысячелетнюю предысторию и являющаяся переводом строчек из письма Цицерона «Epistola non erubescit»): «Бумага всё стерпит». Проблема «терпения бумаги» или, прямо говоря, манипуляции с записями была впервые широко озвучена в США в 1980-х годах в связи с так называемым дженериковым скандалом. Тогда в ходе расследования жалобы на действия офицеров FDA было обнаружено,

что ряд производителей фальсифицировали данные, представленные для получения разрешения на вывод на рынок некоторых дженерических препаратов. Нью-йоркская компания Vitarine Pharmaceuticals представила для испытаний не свой произведённый дженерик, а оригинальный препарат Dyazide. После масштабного расследования FDA выявило 13 компаний, фальсифицировавших данные в записях, что привело к отзыву с рынка десятков препаратов. В результате этого скандала было сделано два вывода: во-первых, только при тщательной проверке записей можно делать обоснованное заключение о соответствии надлежащим практикам; во-вторых, записям нельзя безусловно доверять и всегда необходимо проверять их достоверность.

ФОКУС ПРИ ПРОВЕРКАХ – НА ЗАПИСИ

С тех пор сначала в США, а теперь уже и в Европе, и во всём мире целостности данных/записей стали уделять особое внимание при различных проверках со стороны регулирующих органов. Причём это касается как записей, выполняемых вручную, так и записей в электронной форме. Первое предупреждающее письмо FDA (форма 483), касающееся несоответствий, выявленных в электронных записях и электронных подписях, было выпущено в 1997 году. С тех пор количество писем, касающихся целостности записей, возрастает с каждым годом (таблица 1) [4].

Таблица 1.

Статистика предупреждающих писем FDA за 2013–2016 гг.

483 форма FDA	2013	2014	2015	2016
Общее количество писем	38	22	19	46
Количество писем, относящихся к целостности данных, направленных производителям, находящимся на территории США	0 из 13 (0%)	0 из 4 (0%)	0 из 3 (33%)	8 из 11 (73%)
Количество писем, относящихся к целостности данных, направленных производителям, находящимся вне территории США	10 из 25 (40%)	12 из 18 (67%)	13 из 16 (81%)	29 из 35 (73%)
Общее количество писем, относящихся к целостности данных	10 из 48 (26%)	12 из 22 (55%)	14 из 19 (74%)	37 из 46 (79%)

Очевидно, что количество писем, относящихся к целостности данных, составляет около 80% как для производителей, расположенных в США, так и для производителей, находящихся за их пределами.

Часть выявленных несоответствий, по мнению инспекторов FDA, можно было отнести к «вопиющим упущениям», но были выявлены и преднамеренные манипуляции с записями, такие как недокументированные отклонения, оформление данных задним числом, уничтожение исходных данных, преднамеренно неверные вычисления.

Выборочные данные, иллюстрирующие, в каких процессах GMP выявляются несоответствия по целостности записей, а также формулировки наблюдений из отчётов по инспекциям, проведённым FDA, EMA и WHO, приведены в таблице 2 [5].

Таблица 2.

Несоответствия по целостности записей

Год	Компания	Формулировка несоответствия
2000	Schein Pharmaceuticals	Неадекватный контроль над лабораторной компьютеризированной системой, включая контроль пароля и полномочия на изменение данных
2005	Able Laboratories, Cranbury NJ	Очень широкий спектр замечаний по целостности данных (на 15 страницах). По результатам инспекции отозвано около 50 наименований препаратов, и фирма прекратила свое существование
2006	Ranbaxy, Paonta Sahib	Неспособность поддерживать документацию в рабочем состоянии, неполное сохранение исходных данных; в СОП предусмотрено отбрасывание данных
2006	Wockhardt	Неспособность поддерживать полные и точные записи, повторяющееся несоответствия с предыдущей инспекции; журнал не содержит полной и достоверной информации; данные не регистрировались в момент выполнения процедуры
2007	Actavis Totowa LLC, NJ	Электронные файлы данных не проверяются на точность; зафиксировано расхождение между электронными данными и данными, зарегистрированными в лабораторных тетрадях
2008	Ranbaxy, Paonta Sahib	Рукописные записи были подписаны лицами, которые не присутствовали на объекте в день подписания
2009	Ranbaxy, Ohm Laboratories in Gloversville NY	Аналитики получили доступ к удалению данных, привилегии учетной записи пользователя были неадекватными
2013	Wockhardt Ltd.	Практика проведения пробных инжекций до «официального» ввода пробы; записи, выполняемые не по мере проведения работ; данные ВЭЖХ на отдельных приборах могут быть исключены
2013	Wockhardt Ltd.	Второе письмо за 2013 год; в отходах инспекторы нашли разорванными отчеты по производству 75 серий; ВЭЖХ исходные данные могут быть удалены с жесткого диска с помощью единого входа в систему на компьютере, который используют все аналитики
2014	Trifarma S.p.A.	Фирма не сохраняет лабораторные исходные данные; отсутствует контроль доступа к компьютеризированным системам

Окончание табл. 2

Год	Компания	Формулировка несоответствия
2014	Apotex Pharmachem India Pvt Ltd.	Отсутствие исходных данных; партии тестировали до тех пор, пока не получали соответствующий результат; случаи результатов за пределами спецификации не регистрировались и не расследовались
2015	Hospira S.p.A.	Хроматографические системы не имели адекватных средств контроля для предотвращения удаления или модификации файлов с исходными данными; контрольные следы не были включены в папки «Тест», и фирма не смогла подтвердить, какие типы тестовых инжекций были сделаны, кто их сделал и дату или время их удаления
2015	GVK Biosciences	Французское управление по контролю лекарственных средств провело осмотр этого завода в Хайдарабаде (Индия) и выявило очевидные манипуляции с данными проводимых в течение 5 лет клинических исследований
2015	Quest Lifesciences Pvt. Ltd.	Уведомление ВОЗ об обеспокоенности в отношении недостатков в записях по клиническим испытаниям
2015	Svizera Labs Private Limited	Уведомление ВОЗ об обеспокоенности в отношении недостатков в записях

Как уже было показано, формулировка термина «целостность данных» включает в себя много различных требований. Статистическое распределение наблюдений по различным ситуациям, касающимся целостности данных, сделанное на основании результатов проверок 24 предприятий, проведённых американскими и европейскими инспекторами в 2014 году, приведено в таблице 3 [6].

Тенденция к увеличению выявления несоответствий, связанных с записями, продолжилась в 2017 году. С начала года FDA выпустило 73 предупреждающих письма, в которых снова и снова отмечается нарушение целостности записей. Наиболее часто эти нарушения обнаруживаются при инспектировании фармпроизводителей в Индии и Китае [7].

В письме, адресованном «USV Private Limited, Daman» (Индия), перечислены следующие проблемы:

- Фирма не осуществляла надлежащего контроля над компьютеризированными системами, гарантирующего, что только авторизованный персонал может вводить изменения в записи по производству и контролю качества и другие записи.
- Фирма не в состоянии гарантировать, что в лабораторные записи включены полные данные в отношении всех испытаний, необходимых для обеспечения соответствия установленным спецификациям и стандартам.

Таблица 3.

Распределение наблюдений по целостности записей

Ситуации, относящиеся к целостности записей	Количество наблюдений
Отсутствие адекватного контроля для предупреждения некорректного изменения данных	11
Потеря данных	5
Общее отсутствие управления полнотой и точностью записей	5
Общий логин для входа в систему, используемый несколькими лицами	5
Отсутствие критических исходных данных	4
Измененные файлы	4
Настройка системы для автоматической отмены негативных результатов тестирования	2
Фальсифицированные данные	1
Распечатка или регистрация критической информации на персональном компьютере	1
Отсутствие валидации компьютеризированных систем	1
Отсутствие уверенности в качестве данных клинических исследований	1
Электронные записи не соответствуют записям на бумаге	1

В связи с тем, что подобные нарушения уже были обнаружены и на других заводах этой компании, FDA были сделаны выводы о том, что контроль компании за производством лекарственных средств является недостаточным. Теперь эта фирма, чтобы восстановить соответствие требованиям GMP, должна провести немедленную и всеобъемлющую оценку глобальных производственных операций.

В отношении китайского производителя фармацевтических субстанций, компании Jinan Jinda были выявлены схожие несоответствия:

- Неспособность должным образом расследовать нестандартные результаты.
- Неспособность предотвращения несанкционированного доступа или изменения данных, а также неспособность обеспечить адекватный контроль, чтобы предотвратить исключение данных.

В письме в качестве объективных доказательств приводятся следующие факты: «Аналитик манипулировал и удалял записи в журнале регистрации событий. Вам не хватало адекватного контроля для всех ВЭЖХ, газовой хроматографии и УФ-спектрометрических систем. Например, аналитик удалял записи в журнале регистрации событий для газового хрома-

тографа № YQ-07-10 с 15 сентября 2015 г. до 24 апреля 2016 г. и полностью удалил данные с 6 по 13 ноября 2015 года. Кроме того, наш инспектор заметил, что ваш специалист по контролю качества и заместитель руководителя по контролю качества имеют полные административные права на все ваши компьютеризованные системы, что позволяет им манипулировать данными и отключать журналы аудита».

Последствия выявления таких несоответствий могут иметь очень серьёзное негативное влияние на будущее фармкомпаний. Например, многочисленные нарушения в процессе сбора и хранения данных, найденные инспекторами FDA на заводе индийской компании Mylan в городе Нашик, привели к тому, что в предупреждающем письме формы № 483 был сделан вывод о неспособности предприятия обеспечить точность и достоверность данных, предоставляемых для подтверждения качества, эффективности и безопасности выпускаемых лекарственных препаратов. В связи с этим FDA приняло решение воздержаться от одобрения препаратов, выпускаемых на данном заводе, пока компания не докажет соответствие текущим стандартам по производству лекарственных средств [8].

Но было бы заблуждением думать, что проблемы с целостностью записей касаются только индийских и китайских фирм. FDA выслал форму № 483 в адрес компании BBT Biotech (Германия), в которой, в частности, было указано на несоответствие в отношении компьютерных систем и целостности данных: «Неосуществление необходимого контроля над компьютеризированными системами для предотвращения несанкционированного доступа или изменения данных, а также отсутствие контроля предотвращения удаления данных» [9].

Затем в письме приведены фактические данные, подтверждающие это несоответствие:

- Системы не имеют контроля доступа и функции аудита.
- Все работники имеют права администратора и одно общее имя пользователя. Таким образом, действия нельзя отнести к конкретному пользователю. Электронными данными можно было манипулировать или удалять их без возможности отслеживания.
- Исходные данные были скопированы на компакт-диск и затем удалены с жесткого диска. Скопированные данные были отобраны вручную без наблюдения за процессом отбора. Действия выполнялись без аудита и надзора, не было никакой гарантии, что все исходные данные были скопированы, прежде чем они были удалены.

Серьёзные нарушения в управлении данными выявляются не только в компьютеризированных системах, но и при ведении отчётности на бумажном носителе. Например, в 2016 году в ходе инспекции на заводе компании Teva Pharmaceutical Works, расположенном в Венгрии, в баке для отходов были обнаружены разорванные, частично заполненные листы лабораторного контроля на стерильность [10].

ГОТОВНОСТЬ К ПЕРЕМЕНАМ

Все факты об иностранных инспекциях, приведённые выше, говорят о том, что строгая проверка целостности данных – это тренд современного инспектирования. Следовательно, к этому надо готовиться и российским фармпроизводителям. Сейчас можно посоветовать им оценить ситуацию с управлением данными у себя на предприятии и возможность получения замечаний, примеры которых приведены в этой статье. При выявленной необходимости улучшений выстроить у себя на предприятии культуру данных (тоже один из недавно появившихся терминов!), а это процесс, требующий времени и знаний. Надеемся, что в этом может помочь следующая статья из цикла, посвященная принципам ALCOA+ и сравнению различных международных нормативных документов по управлению записями и данными.

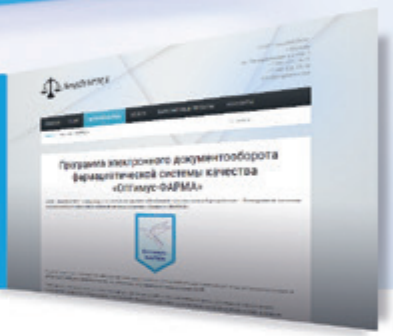
ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 (ред. от 18.12.2015) «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики» (зарегистрировано в Минюсте России 10.09.2013 № 29938).
2. WHO Technical Report Series № 996. Annex 5 Guidance on good data and record management practices. 2016.
3. ИСО 8402. Управление качеством и обеспечение качества. Словарь.
4. B. Unger. An Analysis Of FDA FY2016 Drug GMP Warning Letters. URL: https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/an-analysis-of-fda-fy-drug-gmp-warning-letters-0001 (дата обращения 27.04..2017).
5. B.W. Unger. Data integrity and data management for GxP regulated firms. URL: https://ungerconsulting.net/wp-content/uploads/2016/01/Data-Integrity-White-Paper-BLOG.pdf (дата обращения 27.04.2017).
6. J. Moldenhauer. Data Integrity Issues in Pharmaceutical Companies: Part 2. URL: http://www.ivtnetwork.com/article/data-integrity-issues-pharmaceutical-companies-part (дата обращения 27.04.2017).
7. FDA: More Warning Letters for Lack of Data Integrity. URL: https://www.gmp-publishing.com/en/gmp-news/gmp-aktuell/fda-warning-letters-data-integrity-ema-china-india.html (дата обращения 27.04.2017).
8. FDA усомнилась в качестве лекарственных средств, выпускаемых Mylan. URL: http://pharmjournal.ru/novosti-regulyatorov/fda-usomnilas-v-kachestve-lekarstvennyh-sredstv-vypuskaemyh-mylan (дата обращения 27.04.2017).
9. Warning Letter 320-16-12. URL: https://www.fda.gov/iceci/enforcementactions/warningletters/2016/ucm502347.htm(дата обращения 27.04.2017).
10. Warning Letter 320-17-01. URL: https://www.fda.gov/ICECI/EnforcementActions/WarningLetters/2016/ucm525640.htm (дата обращения 27.04.2017).

Электронная система документооборота ФСК «Оптимус-ФАРМА»

Оптимус-ФАРМА

Для получения Демо-версии электронной системы документооборота Фармацевтической системы качества "Оптимус-ФАРМА", направьте запрос по адресу: **info@lexpharma.org**

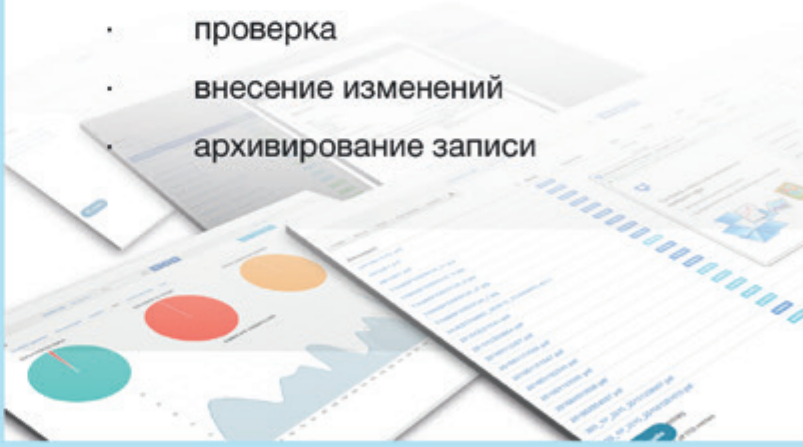


Полная автоматизация всех этапов жизненного цикла документов:

- оформление
- кодирование
- разработка
- согласование
- утверждение
- введение в действие
- изготовление контролируемых копий
- контроль изменений
- архивирование

Автоматизация жизненного цикла записей:

- создание бланка
- ввод данных
- проверка
- внесение изменений
- архивирование записи



«Оптимус-ФАРМА» - прозрачная визуализированная процессная модель Фармацевтической системы качества, разработанная в соответствии со структурой GMP

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 615.1

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ РЕГИСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

А.Г. Цындымеев[1,2], Р.И. Ягудина[3], Г.Т. Абдрашитова[4]*, П.А. Крупнов[2]

Резюме. Данная статья посвящена истории становления системы регистрации лекарственных средств в Российской Федерации. В статье рассмотрены основные этапы формирования законодательной основы регулирования обращения лекарственных средств в Российской Федерации, выделены ключевые положения Соглашения о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза.

Ключевые слова: лекарственное средство, регистрация, Евразийский экономический союз, государственная фармакопея.

IMPROVING THE SYSTEM OF REGISTRATION OF MEDICINES IN RUSSIAN FEDERATION

A.G. Tsyndymeyev[1,2], R.I. Yagudina[3], G.T. Abdrashitova[4]*, P.A. Krupnov[2]

Abstract. This article is devoted to the history of the system of registration of medicines in Russian Federation. The article describes the main stages of formation of the legislative basis of regulation of circulation of medicines in the Russian Federation, highlights the key provisions of the Agreement on common principles and rules of circulation of medicines within the Eurasian economic Union.

Keywords: the medicine, registration, Eurasian Economic Union, the state pharmacopoeia.

1 – Совет Министерства здравоохранения Российской Федерации по государственной фармакопее, 127994, ГСП-4, г. Москва, Рахмановский пер, д. 3

2 – Департамент государственного регулирования обращения лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации, 107045, Россия, г. Москва, Колокольников пер., 21

3 – ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127018, Россия, г. Москва, ул. Складочная, 1, стр. 17

4 – РОО «Московское фармацевтическое общество», 115280, Россия, г. Москва, ул. Ленинская Слобода, 19

1 – The Council of the Ministry of Health of the Russian Federation for the State Pharmacopoeia, 3, Rakhmanovsky per., Moscow, GSP-4, 127994, Russia

2 – Department of state regulation of medicines circulation of the Ministry of Health of the Russian Federation, 21, Kolokolnikov per., Moscow, 107045, Russia

3 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University under the Ministry of Health of the Russian Federation, 1, b. 17, Skladochnaya str., Moscow, 127018, Russia

4 – Regional public organization «Moscow pharmaceutical society», 19, Leninskaya Sloboda, Moscow, 115280, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Одной из ключевых функций, составляющих основу государственного регулирования лекарственных средств (ЛС), является регистрация.

В этой связи кратко рассмотрим историю создания и развития контрольно-разрешительной системы ЛС в России с акцентом на функцию по регистрации ЛС, представленную на рисунке 1.

Одной из отправных точек развития организации контроля качества ЛС в России является принятие Аптекарского устава в сентябре 1789 года, значительная часть положений которого была посвящена вопросам обеспечения качества ЛС. В дальнейшем вопросы контроля качества ЛС вошли во Врачебный устав (1892 г.). Следует отметить, что в царской России все положения, касающиеся контроля качества ЛС, имели законодательно закрепленную силу, утверждаясь на самом высоком уровне государственной власти. Система государственного контроля качества ЛС была ориентирована на надзор за соблюдением условий изготовления и реализации ЛС.

Изменившиеся после 1917 года в России социально-экономические условия повлекли за собой полную реорганизацию сложившейся системы государственного контроля качества ЛС. Важным шагом было издание декрета Всероссийского Центрального Исполнительного Комитета от 21 июля 1918 года «Об утверждении Народного Комиссариата Здравоохранения» (НКЗ). С целью осуществления контроля качества разрешенных для применения ЛС НКЗ поручил специально созданной в 1923 году Фармакопейной комиссии подготовить проект новой советской фармакопеи. С июля 1926 года первое издание советской фармакопеи, названное VII изданием Государственной фармакопеи СССР, было введено в действие.



Рисунок 1. Становление и развитие службы регулирования эффективности, безопасности и качества ЛС в Российской Федерации

В 1937 году Совет Народных Комиссаров СССР принял специальное решение «О производстве и выпуске новых фармацевтических препаратов». Таким образом, уже более 80 лет назад в Советском Союзе был установлен определенный порядок апробации новых ЛС, а их разрешение к медицинскому применению и производству было поставлено на государственный контроль.

Следует отметить, что в 1960 году процедура регистрации новых ЛС была несколько модифицирована. В частности, право выдачи разрешений на применение новых ЛС было предоставлено Управлению специализированной медицинской помощи Министерства здравоохранения СССР.

В 1963 году Минздрав СССР создал специальное Управление по внедрению новых ЛС и медицинской техники, к компетенции которого были отнесены процедуры организации и проведения испытаний, разработка и контроль необходимых документов и проектов приказов министра здравоохранения СССР о разрешении производства и применения в медицинской практике новых лекарственных препаратов (ЛП) и медицинской техники. Также с целью обеспечения качества поступающих в обращение ЛС в 1966 году в Минздраве СССР была создана Государственная инспекция по контролю за качеством лекарственных средств и изделий медицинской техники.

В 1991 году, после распада СССР, союзное министерство было ликвидировано, а республиканское преобразовано в Министерство здравоохранения Российской Федерации. Изменившаяся в 1990-е годы в России ситуация в сфере лекарственного обращения явилась основанием для реорганизации действовавшей ранее системы государственного регулирования эффективности, безопасности и качества ЛС. В связи с этим приказом МЗ РФ № 200 от 10 июля 1992 г. было организовано Управление по стандартизации и контролю качества ЛС. А в 1998 г. был создан департамент государственного контроля ЛС и медицинской техники Минздрава РФ.

Также в ноябре 1990 года был создан Всесоюзный научный центр экспертизы лекарственных средств Минздрава СССР, который стал предшественником Научного центра экспертизы в его сегодняшнем варианте. С того момента произошел ряд преобразований. Так, в мае 1999 года Минздрав России учредил Государственное учреждение науки «Научный центр экспертизы и государственного контроля лекарственных средств» (НЦЭГКЛС), который впоследствии, в 2002 году, был преобразован в Федеральное государственное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (ФГУ «НЦЭСМП» Минздрава России).

Создание ФГУ «НЦЭСМП» Минздрава России было проведено с целью дальнейшего совершенствования процедуры предрегистрационной экспертизы ЛС, организации пострегистрационного мониторинга качества, эффективности и безопасности ЛС и обеспечения всех участников сферы обращения ЛС всесторонней информацией об их качестве, эффективности и безопасности.

В ходе проведения административной реформы в период с 2004 по 2010 год функция по регистрации вместе с полномочиями по надзору в сфере обращения ЛС были переданы Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения, находящейся в ведении Минздрава России.

После того как в 2010 году был принят Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Минздрав России вновь был наделен полномочиями по регистрации ЛС. Так, начиная с 1 сентября 2010 года начал функционировать департамент государственного регулирования обращения лекарственных средств [4].

Далее рассмотрим основные этапы формирования законодательной основы регулирования обращения ЛС в РФ.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ФОРМИРОВАНИЯ ЗАКОНОДАТЕЛЬНОЙ ОСНОВЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ ОБРАЩЕНИЯ ЛС В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Введенный в действие в 1998 году Федеральный закон «О лекарственных средствах» № 86-ФЗ определил законодательную базу в сфере регулирования обращения ЛС и установил приоритет государственного контроля производства, изготовления, качества, эффективности и безопасности ЛС [3]. Согласно этому закону на территории РФ могли производиться, продаваться и применяться ЛС, только зарегистрированные федеральным органом контроля качества ЛС. Также данный федеральный закон ввел ряд основополагающих терминов: лекарственное средство, лекарственный препарат, качество ЛС, безопасность ЛС, эффективность ЛС, фармакопейная статья, государственная фармакопея и т.д.

В 2010 году в связи с принятием государственных программ по развитию отечественной фармацевтической промышленности были проведены значительные изменения в сфере государственного регулирования обращения ЛС и принят Федеральный закон от 12 апреля 2010 года № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», регулирующий отношения, возникающие в связи с обращением – разработкой, доклиническими исследованиями, клиническими исследованиями, экспертизой, государственной регистрацией, со стандартизацией и с контролем качества, производством, изготовлением, хранением, перевозкой, ввозом в РФ, вывозом из РФ, рекламой, отпуском, реализацией, передачей, применением, уничтожением ЛС.

Затем 25 ноября 2013 года были приняты поправки к Федеральному закону «Об обращении лекарственных средств» (Федеральный закон от 25 ноября 2013 года № 317-ФЗ), в которых уточнен порядок осуществления экспертами экспертного учреждения запросов необходимых и недостающих материалов и введен механизм приостановления регистрационных процедур в случае таких запросов взамен ранее существовавшей практики отказов в регистрации [5].

В результате проводимой Минздравом России реализации принятых поправок число отказов в государственной регистрации лекарственных препаратов (ЛП) сократилось за счет оптимизации экспертных процедур почти в 4 раза **(с 53% в 2012 году до 12% в 2016 году)**, что увеличивает доступность ЛС, соответствующих установленным требованиям.

В дальнейшем в рамках реализации Федерального закона от 22.12.2014 № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств», внесшего изменения в Федеральный закон № 61-ФЗ [4, 6]:

- оптимизированы процедуры регистрации ЛП на основе разделения процедуры регистрации и процедуры получения разрешения на проведение клинического исследования ЛП;
- предусмотрена возможность проведения ускоренной процедуры регистрации для отдельных ЛП (первых трех регистрируемых воспроизведенных ЛП, ЛП для педиатрии, орфанных ЛП – экономия до 40 рабочих дней);
- гармонизированы нормы в соответствии с международным законодательством по надлежащим практикам доклинических и клинических исследований, формирования регистрационного досье, фармаконадзора и др;
- созданы условия для выведения с рынка неэффективных или малоэффективных ЛП;
- устранены пробелы в области терминологии и процедурных вопросов регистрации биологических ЛП и биоаналогов, референтного ЛП, установления взаимозаменяемости ЛП.

Гарантия качества как производимых в России, так и ввозимых из-за рубежа ЛС является одной из основных задач государства в области охраны здоровья населения. К числу важнейших задач следует отнести не только насыщение собственного фармацевтического рынка этими ЛС, но и выход на международный фармацевтический рынок, что может быть достигнуто путем обеспечения соответствия отечественных ЛС требованиям мировых стандартов. Основная цель, которую преследует Государственная фармакопея Российской Федерации – нормирование качества ЛС, находящихся в обращении на отечественном фармацевтическом рынке. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 октября 2015 г. № 771 с 1 января 2016 года введены в действие общие фармакопейные статьи и фармакопейные статьи, включенные в Государственную фармакопею XIII издания.

В Государственную фармакопею РФ XIII издания вошло 229 общих фармакопейных статей и 179 фармакопейных статей, которые состоят как из пересмотренных статей предыдущих изданий отечественных фармакопей, действующих на территории РФ (X–XII изданий), так и разработанных впервые. Следует отметить, что часть из них разработана впервые в практике не только отечественного, но и мирового фармакопейного анализа.

Необходимо отметить, что значительные изменения в регулировании обращения ЛС предстоит имплементировать российским регуляторным органам совместно с коллегами из других государств – членов Евразийского экономического союза.

Президентами России, Белоруссии и Казахстана 29 мая 2014 года подписан договор о создании Евразийского экономического союза (ЕАЭС) и начаты системные изменения в сфере обращения ЛС. В октябре и декабре того же года Республикой Армения и Киргизской Республикой подписаны договоры о присоединении указанных сторон к ЕАЭС [1].

Статья 30 данного договора предусматривает создание в рамках Союза общего рынка ЛС, соответствующих стандартам надлежащих фармацевтических практик. Также частью 1 статьи 100 договора определено, что функционирование общего рынка ЛС в рамках Союза осуществляется в соответствии с международным договором, определяющим единые принципы и правила обращения ЛС.

Соглашение о единых принципах и правилах обращения ЛС в рамках ЕАЭС заключено 23 декабря 2014 года в Москве [2]. Пунктом 1 статьи 3 Соглашения предусмотрено: «Регулирование обращения лекарственных средств в рамках Союза осуществляется в соответствии с настоящим Соглашением, другими международными договорами, входящими в право Союза, решениями Комиссии и законодательством государств-членов. Решения Комиссии, регулирующие обращение лекарственных средств, разрабатываются на основе международных норм».

Можно выделить следующие ключевые положения Соглашения об обращении ЛС:

- устанавливает единые принципы и правила обращения ЛС в рамках Союза в целях формирования общего рынка ЛС;
- формирует общий рынок ЛС, соответствующих требованиям надлежащих фармацевтических практик, согласно принципам, указанным в договоре о ЕАЭС;
- определяет взаимодействие уполномоченных органов в сфере обращения ЛС государств – членов ЕАЭС;
- предусматривает переходные положения и периоды, обеспечивающие последовательную смену от национального регулирования к единым наднациональным требованиям.

В целях подготовки к запуску общего рынка ЛС в рамках Союза Евразийской экономической комиссией совместно с государствами – членами Союза проведена масштабная работа по подготовке нормативных правовых актов, необходимых для реализации положений Соглашения. По состоянию на первый квартал 2017 года приняты 27 нормативных правовых актов Комиссии.

В июле 2016 года был утвержден перечень проектов документов Евразийской экономической комиссии по вопросам регулирования общего рынка ЛС в рамках ЕАЭС, планируемых к разработке в 2016–2018 годах. Следует также отметить, что ЛС, зарегистрированные в государствах-членах в соответствии с национальными требованиями, должны быть приведены в соответствие с требованиями Евразийского экономического союза до 31 декабря 2025 года.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей статье кратко представлена история создания и развития контрольно-разрешительной системы ЛС в России с акцентом на функцию по регистрации ЛС. Нами были рассмотрены основные этапы формирования законодательной основы регулирования обращения ЛС в РФ, а также выделены ключевые положения Соглашения о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Договор о Евразийском экономическом союзе (подписан в г. Астане 29.05.2014).
2. Соглашение о единых принципах и правилах обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза (заключено в г. Москве 23.12.2014).
3. Федеральный закон от 22.06.1998 г. № 86-ФЗ «О лекарственных средствах».
4. Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
5. Федеральный закон от 25.11.2013 г. № 317-ФЗ «О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации и признании утратившими силу отдельных положений законодательных актов Российской Федерации по вопросам охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
6. Федеральный закон от 22.12.2014 г. № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств».



УДК 615.11

ПРОИЗВОДСТВО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ: КРИЗИС НА РУБЕЖЕ XX И XXI ВЕКОВ

Е.В. Денисова[1]*

Резюме. Проанализированы тенденции развития производства фармацевтических субстанций на рубеже XX и XXI веков в России. В этот период производство фармацевтических субстанций оказалось в состоянии глубокого кризиса, выразившегося в резком сокращении объемов производства, производственных мощностей и уровня их загрузки, практическом прекращении научно-исследовательских работ по созданию и внедрению новых отечественных оригинальных лекарственных средств. Раскрыты макроэкономические и специфические для отрасли причины этого кризиса. Поскольку рыночные механизмы на рубеже XX и XXI веков в России оказались не способны обеспечить вывод разработки и производства фармацевтических субстанций из кризисного состояния, стали необходимыми меры государственной поддержки, которые и были предусмотрены федеральной целевой программой «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» и реализуются в процессе ее выполнения.

Ключевые слова: фармацевтический рынок, фармацевтическая промышленность, производство активных фармацевтических субстанций, история фармацевтической промышленности.

THE MANUFACTURING OF PHARMACEUTICAL INGREDIENTS IN RUSSIAN FEDERATION: THE CRISIS AT THE TURN OF XX TO XXI CENTURIES

E.V. Denisova[1]*

Abstract. The tendencies of development of the pharmaceutical ingredients production at the turn of the XX century in Russia were analysed. During this period, the production of pharmaceutical ingredients turned into a state of deep crisis. The reason for crisis were the sharp decrease of production volumes, production capacities and the level of their load, the practical termination of R&D in creation and introduction of new domestic original drugs. The macroeconomic and industry-specific causes of this crisis were identified. Since market mechanisms at the turn of the XX and XXI centuries in Russia were not able to ensure the withdrawal of the development and production of pharmaceutical ingredients from the crisis, therefore, government support measures that were provided for by the Federal Target Program «Development of the pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period Until 2020 and a further perspective» and are implemented in the process of its effectuation.

Keywords: pharmaceutical market, pharmaceutical industry, production of active pharmaceutical ingredients, the history of the pharmaceutical industry.

1 – Департамент развития фармацевтической и медицинской промышленности Министерства промышленности и торговли Российской Федерации, 109074, Россия, г. Москва, Китайгородский проезд, 7

1 – Department of Pharmaceutical and Medical Industry Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation, 7, Kitaygorodskiy proezd, Moscow, 109074, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: denisova@minprom.gov.ru
Тел.: 8 (495) 632 85 89

ВВЕДЕНИЕ

Переход фармацевтической промышленности России в условия рыночной экономики показал ее уязвимость, связанную в первую очередь с выполнением социальной функции – лекарственного обеспечения населения. Наибольшие проблемы возникли в производстве фармацевтических субстанций (ФС), без которого невозможно достижение лекарственной безопасности страны. Уроки глубокого и затяжного кризиса в производстве отечественных ФС на рубеже XX и XXI веков должны быть учтены в современных условиях для разработки стратегии локализации производства ФС в России.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ СССР И ПРОИЗВОДСТВО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ

Производственный потенциал фармацевтической промышленности в СССР сложился в основном к середине 1970-х годов. Отрасль по производству лекарств в СССР представляла собой сложный научно-производственный комплекс, включавший в себя производства, выделяемые по технологическому принципу:

- синтетические лекарственные средства;
- готовые лекарственные средства (ГЛС);

- витамины и медицинские препараты на их основе;
- антибиотики;
- лекарственные средства и диагностикумы, получаемые биотехнологическими методами.

Предприятия фармацевтической промышленности были подчинены Министерству медицинской промышленности СССР, а с 1985 г. – Министерству медицинской и микробиологической промышленности СССР.

Данные о некоторых показателях развития фармацевтической промышленности СССР в период с 1975 по 1990 гг. представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Показатели развития фармацевтической промышленности в СССР в 1975–1990 гг. [1]

Регион	Показатели*	Год			
		1975	1980	1985	1990
СССР, всего	1	77	77	77	77
	2	1334,5	2044,6	2839,5	3874,0
	3	101,6	109,9	114,0	127,0
	4	13,1	18,6	24,9	30,5
В том числе: РСФСР	1	45	45	45	45
	2	867,2	1296,0	1876,9	2483,0
	3	74,5	80,8	83,9	90,0
	4	11,6	16,0	22,4	27,6
Украина	1	18	18	18	18
	2	282,7	451,2	628,5	801,7
	3	18,7	19,7	21,0	22,3
	4	15,1	22,9	29,9	35,9
Белоруссия	1	2	2	2	2
	2	29,6	49,1	74,8	118,0
	3	2,7	2,8	2,9	3,3
	4	10,8	17,4	25,8	35,4
Республики Балтии	1	4	4	4	4
	2	42,9	79,5	103,0	133,3
	3	3,2	3,8	4,0	4,1
	4	13,5	20,8	25,6	32,3

Примечание: * Показатели:
1 – количество фармацевтических предприятий,

2 – товарная продукция, млн руб.**,

3 – численность промышленно-производственного персонала (тыс. чел.),

4 – производительность труда (тыс. руб./чел.).

** В оптовых ценах на 01.01.1982.

Как следует из данных таблицы 1, в период с 1975 до 1990 гг., несмотря на то что в СССР не было создано ни одного нового фармацевтического предприятия, темпы роста объема товарной продукции в отрасли были достаточно высокими. За этот период выпуск лекарственных средств возрос почти в 3 раза. Следует отметить, что непродуманное объединение в 1985 г. двух отраслей (фармацевтической и микробиологической промышленности) в одну отрасль привело к снижению темпов роста объемов производства фармацевтической продукции, основной причиной которого явились внутриотраслевые диспропорции, в частности перераспределение капитальных вложений не в пользу фармацевтических предприятий. Численность промышленно-производственного персонала в отрасли за анализируемый период увеличилась с 101,6 тыс. чел. в 1975 г. до 127 тыс. чел. в 1990 г. Высокими темпами возрастала производительность труда. Так, с 1975 по 1990 гг. она выросла в 2,3 раза. В целом фармацевтическая промышленность развивалась темпами, превышающими темпы развития экономики СССР.

Что касается доли предприятий фармацевтической промышленности, размещенных в РСФСР, то сведения об этом представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Доля РСФСР в объеме товарной продукции и численности промышленно-производственного персонала фармацевтической промышленности СССР (%) [1]

Показатель	Годы			
	1975	1980	1985	1990
Товарная продукция	65,0	63,4	66,1	64,1
Численность промышленно-производственного персонала	73,3	73,5	73,6	70,9

Как следует из данных, приведенных в таблице 2, в период с 1975 по 1990 гг. на долю РСФСР приходилось около 65% товарной продукции фармацевтической промышленности и более 70% промышленно-производственного персонала, занятого в этой отрасли. При этом в России были сосредоточены практически все крупнотоннажные фармацевтические предприятия, выпускающие ФС, тогда как в других республиках бывшего союза (особенно на Украине) были построены предприятия по выпуску главным образом готовых лекарственных средств (ГЛС).

Таблица 3.

Мощности по производству фармацевтической продукции в РСФСР на 01.01.1991 г. [1]

№ п/п	Наименование продукции	Ед. изм.	Мощности	Доля от суммарной мощности по СССР, %
1.	Витамины, всего	тонн	4642,5	74,8
2.	Антибиотики медицинские	усл. тонн	заданная	88,8
3.	Синтетические лекарственные средства, всего	тонн	25123	86,9
4.	ГЛС в упаковках	млн упак.	3390	49,3
5.	ГЛС в ампулах	млн ампул	2738,9	44,3

Как следует из данных, приведенных в таблице 3, основные мощности по производству ФС в СССР были локализованы в России, и, поскольку их доля от суммарной мощности по СССР значительно превышала долю в производстве ГЛС, можно сделать вывод, что именно РСФСР специализировалась на выпуске ФС.

До начала радикальных экономических реформ в России производство ФС отвечало требованиям той эпохи. Технический уровень производств, выпускавших ФС, кадровое обеспечение, тесные контакты с научными учреждениями в сфере синтеза химических веществ и биотехнологии обеспечивали выпуск продукции, в основном удовлетворяющий потребности производителей ГЛС. Отечественная фармацевтическая промышленность не только обеспечивала ФС свои заводы по выпуску ГЛС, но и осуществляла экспорт ФС и даже оказывала техническую помощь в создании соответствующих производств в других странах. Например, согласно межправительственному соглашению между СССР и Индией в 1968–1969 гг. в г. Хайдарабаде был построен и введен в эксплуатацию завод по производству ГЛС и ФС мощностью 850 т ФС в год, в том числе противотуберкулезных и сульфаниламидных препаратов, барбитуратов и антипиретиков, противопаразитарных средств и витаминов и т.д. [2].

ХАРАКТЕРИСТИКИ КРИЗИСА В ПРОИЗВОДСТВЕ ФС

Радикальные рыночные реформы 1990-х годов прошлого века сопровождались глубоким кризисом в производстве ФС. Первым и ощутимым результатом вступления в рыночную экономику фармацевтической промышленности стало катастрофическое падение объемов реализации ФС, выпускаемых на отечественных заводах, ориентированных на их производство, о чем свидетельствую данные, приведенные в таблице 4.

Самой острой фазой кризиса явился период с 1992 по 1995 гг., когда производство ФС в России сократилось почти в 3 раза, что привело к тому, что по ряду позиций (сердечно-сосудистые средства, противотуберкулезные препараты, стимуляторы центральной нервной системы, препараты, применяемые в онкологической практике) потребность в ФС удовлетворялось менее чем на 10% (таблица 5).

Как показал анализ удовлетворения потребности в основных ФС в 1995 г., из 43 проанализированных наименований ФС лишь дибазол и тауфон выпускались в количествах, превышающих объемы заявленной потребности, а бензонал, кальция пангамат, нитроксолин, фенобарбитал и эуфиллин производились в необходимых количествах. Производство остальных ФС существенно отставало как от объемов, заявленных Министерством здравоохранения и медицинской промышленности Российской Федерации, так и от необходимых для производства ГЛС.

В последующие годы, как следует из данных, приведенных в таблице 6, производство ФС в натуральных показателях в России продолжало неуклонно снижаться вплоть до 2002 г. Затем, в 2003 г., начался медленный рост объема производства ФС в натуральных показателях. Вместе с тем в 2005 г. оно достигло размера

Таблица 4.

Динамика производства ФС в РФ в 1992–2005 гг. [3]

Наименование показателей	Ед. изм.	1992 г.	1995 г.	2000 г.	2001 г.	2002 г.	2003 г.	2004 г.	2005 г.
1. Объем производства ФС, всего	усл. т	17489,8	6434,5	2930,9	1951,7	1735,8	1936,7	2803,5	2860,0
Темпы роста: – цепной	%	–	73,32	86,71	66,59	88,94	111,57	144,76	102,01
– базисный	%	100,0	36,79	16,76	11,16	9,92	11,07	16,03	16,35
в том числе:									
1.1. Синтетические лекарственные средства	т	11287,0	3735,8	1387,2	764,5	801,9	1087,4	2558,85	2600,0
Темпы роста: – цепной	%	–	76,48	81,66	55,11	104,89	135,60	235,32	101,61
– базисный	%	100,0	33,10	12,29	6,77	7,10	9,63	22,67	23,04
1.2. Витамины	т	3783,2	1513,3	642,7	317,3	377,5	574,0	193,0	200,0
Темпы роста: – цепной	%	–	54,91	77,65	49,37	118,97	152,05	33,62	103,65
– базисный	%	100,00	40,00	16,99	8,39	9,98	15,17	5,10	5,29
1.3. Антибиотики	усл. т	2419,6	1185,4	901,0	869,9	556,4	275,3	51,690	60,0
Темпы роста: – цепной	%	–	104,47	105,55	96,55	63,96	49,48	18,78	116,08
– базисный	%	100,00	48,99	37,24	35,95	23,00	11,38	2,14	2,48

только 2860 тонн, что составляет около 16% от уровня производства 1992 г. Наиболее тяжелая ситуация сложилась в производстве антибиотиков, которое к 2005 г. упало более чем в сорок раз по сравнению с 1992 г., при том что именно эти лекарственные средства крайне нужны для лечения многих социально значимых заболеваний, в первую очередь туберкулеза. К 2007 г. практически прекратилось производство товарных ФС антибиотиков [4].

Таблица 5.

Удовлетворение потребности в ГЛС и ФС (по полной номенклатуре) в 1995 г. [1]

№	Основные торговые группы лекарственных средств	% удовлетворения потребности в номенкл. ед.	% удовлетворения потребности в ФС
1	2	3	4
1	Сердечно-сосудистые средства	42,0	16,7
2	Противотуберкулезные препараты	33,3	0,7
3	Стимуляторы центральной нервной системы, психотропные и противосудорожные	59,8	7,9
4	Средства для наркоза, анестезин, курареподобные и снотворные	40,7	41,8
6	Анальгезирующие и противовоспалительные средства	128,0	74,3
7	Препараты, применяемые в онкологической практике	29,1	2,9
10	Антибиотики	60,7	43,2
13	Противогистаминные препараты	30,4	44,4
14	Сульфаниламидные препараты	52,6	23,3
15	Витамины	80,8	41,5
16	Противогрибковые, противопаразитные средства и препараты для лечения кожных и венерических заболеваний	14,7	15,8

Параллельно падению объемов производства ФС происходило уменьшение средних мощностей по их производству, что следует из данных, представленных в таблице 6. Так, за период с 1992 по 2005 гг. произошло существенное сокращение производственных мощностей по выпуску ФС в среднем на 60% в 2005 г. по сравнению с 1992 г. В наибольшей степени (более чем в 5 раз) сократились мощности по производству синтетических ФС. С учетом мощностей, оказавшихся в СНГ, были демонтированы или утратили свое значение по другим причинам мощности по выпуску 132 наименований ФС. Например, «Акрихин», являвшийся крупнейшим производителем ФС в Советском Союзе, в 1990-е годы принял решение о перепрофилировании на производство готовых лекарственных средств вследствие нерентабельности производства ФС.

Выбытие мощностей сопровождалось существенным сокращением уровня их использования. Согласно данным таблицы 7 за период с 1992 по 2005 гг. произошло существенное сокращение уровня их использования с 55,1% до 22,4%. Особенно тяжёлое положение сложилось с производством ФС антибиотиков: в 2005 г. соответствующие мощности использовались всего лишь на 5,5%. Немаловажной причиной низких показателей использования производственных мощностей явилось то, что они не соответствовали структуре спроса на ФС. Не производились (или производились в небольшом количестве) ФС лекарственных препаратов для лечения ряда серьезных заболеваний, сохранялся выпуск устаревших препаратов. Особенно велики были пробелы в ассортименте противоопухолевых препаратов, инсулинов и других препаратов для лечения эндокринных заболеваний, антибиотиков цефалоспоринового ряда, средств для анестезии, отдельных видов сердечно-сосудистых препаратов, медикаментов для лечения бронхиальной астмы и др.

Таблица 6.

Динамика средних производственных мощностей по производству ФС, % (к 1992 г.) [3]

Годы	Витамины	Антибиотики	Синтетические лекарственные средства	Среднегодовая мощность всего
1992	100	100	100	100
1993	106,2	113,9	97,0	105,6
1994	99,3	110,7	87,7	91,5
1995	87,6	108,0	78,8	82,8
1996	52,1	105,9	72,1	72,5
1997	52,1	105,3	57,2	61,1
1998	51,4	91,3	56,4	59,0
1999	44,4	105,8	52,9	56,8
2000	37,0	110,1	49,8	53,7
2001	22,5	106,9	46,5	48,9
2002	18,4	97,1	43,5	45,1
2003	44,1	104,7	28,4	47,7
2004	44,6	37,4	17,1	40,1
2005	44,8	36,3	17,0	40,1

К 2005 г. промышленный выпуск ФС осуществлялся менее чем 20 предприятиями по достаточно ограниченному перечню субстанций [5]. При этом, как следует из данных рисунка 1, объем производимых ФС, использовавшихся для собственного производства ГЛС, составлял 35%, а на рынок поступало 65% продукции.

Таблица 7.

Динамика использования производственных мощностей по производству ФС в 1992–2005 гг. (%) [3]

Год	Витамины	Антибиотики	Синтетические лекарственные средства	Среднегодовая мощность всего
1992	46,4	39,8	85,6	55,1
1993	28,9	45.6	73,8	36,4
1994	22.9	33,8	62,8	30,2
1995	19,5	36.2	39.1	24,5
1996	20,5	34,5	41,7	24,5
1997	18,8	23,8	46.6	22,9
1998	14,7	24,3	43,1	18,5
1999	13,2	26,6	42,2	18,7
2000	11,5	27,0	39,3	17.2
2001	6,8	26,8	31,9	12,6
2002	7,6	18,9	46,5	12,1
2003.	10,1	8,7	45,7	12,8
2004	23,6	4,6	25,6	22,0
2005	23,9	5,5	26,7	22.4

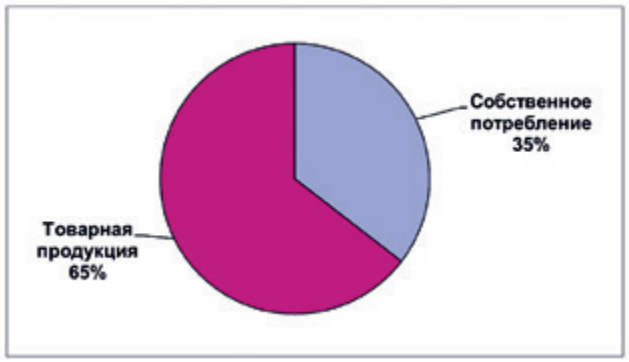


Рисунок 1. Производство ФС и его распределение по типам продукции [6]

В обеспечении производства ГЛС доля высокотехнологичных ФС (более 6 стадий синтеза) составляла 35% (в том числе 15%, произведенных в РФ) в количественном выражении и 34% (в том числе 5%, произведенных в РФ) в денежном, а доля биотехнологических – соответственно 39% в денежном выражении, из которых в РФ производится всего 2% [7].

В конце XX века все еще продолжался экспорт ФС из России. Вместе с тем его объем, так же как и производство ФС, сокращался. Так, в 1998 г. сокращение по ФС с наибольшими объемами экспорта, занимающими 75% в общем объеме экспорта, составило 49% от уровня предшествующего года, а в 1999 г. падение продолжилось и объем их экспорта сократился еще на 13%, составив 34,8 млн долл. США. Данные о ФС с наибольшими объемами экспорта приведены в таблице 8.

Таблица 8.

ФС с наибольшими объемами экспорта в 1997–1999 гг. (тыс. долл. США) [8]

Годы / Наименование ФС	1997	1998	1999
Витамин А ацетат	49127,7	17364,4	14658,8
Кислота борная	8962,3	13764,3	5158,8
Эритромицина тиоцианат	6720,9	2424,5	4245,2
Цинка оксид	0,984	15,5	2532,6
Бензилпенициллина калиевая соль	9249,2	1855,5	2234,6
Ретинола ацетат	0	0	2123,5
Эритромицин	1447,8	4361,1	1377,9
Неовир	464,8	169,6	948,8
Стрептомицина сульфат	55,4	0	786,5
Фенол	2537,7	88,5	775,5
Всего	78566,7	40043,5	34842,2

В качестве положительных явлений в разработке и производстве ФС на рубеже XX и XXI веков можно отметить то, что ещё продолжалось государственное финансирование небольшого числа проектов по разработке технологий получения ФС и ГЛС воспроизведенных препаратов, а именно:

- трописетрона для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, мощностью 8 тыс. ампул на ООО «Медтехфарм»;
- доксорубицина для лечения онкологических заболеваний во флаконах для инъекций; этот препарат предполагалось выпускать на Омутнинской опытной научно-производственной базе после выделения средств на закупку соответствующего оборудования;
- плазмозамещающего препарата декстрана-1000; препарат предполагалось выпускать на опытном производстве Государственного института кровезаменителей и медицинских препаратов;
- противотуберкулезного препарата пиразинамида, производство которого предполагалось организовать на ОАО «Синтвита».

Также финансировались инновационные проекты, например на СКТБ «Технолог» было организовано

производство ФС нового оригинального, не имеющего структурных аналогов отечественного радиосенсибилизатора – ксантобинаса, объемом 300 кг/год. Также СКТБ «Технолог» наладило производство ФС деполяризующего мышечного релаксанта дитилина в объеме 600 кг/год. Имелись и другие положительные примеры. Так, компания «Алтайвитамины» весь объем выпускаемой продукции номенклатурой более 60 наименований производила из отечественного сырья, при этом непрерывно совершенствовалась технология его переработки. Предприятие имело прибыльное производство продукции, востребованной рынком, что позволило ему интенсивно развиваться и финансировать переход на стандарты GMP. Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов производил высокотехнологичные ФС, используя новейшие биотехнологии, и лекарственные формы на их основе и реализовывал их по ценам, значительно более низким, чем у зарубежных аналогов. ОАО «Омутинская научно-промышленная база» производило ФС для лечения онкологических заболеваний и поставляло их в том числе за рубеж.

На фоне общей тенденции по выводу из строя производственных мощностей по производству субстанций имел место и ввод производственных мощностей. Данные об этом за период 2002–2004 гг. приведены в таблице 9.

Таблица 9.

Ввод производственных мощностей по производству отдельных видов ФС в 2002–2004 гг., т [3]

Группы продукции	Наименование предприятий	Виды продукции	Ввод мощностей
ФС, всего, в т.ч.			1640,2
Синтетические лекарственные средства			1579,0
	ОАО «Усолье-Сибирский ХФК» (Иркутская область)	Эуфиллин Фенобарбитал Анальгин Ксантинолани-котинат	24,0 130,0 1350,0 75,0
	ООО «Полисинтез» (г. Белгород)	Кислота акридо-нуксусная	3,2
	ОАО «Фармстан-дарт – Лексредства» (Курск)	Валидол	16,0
Витамины			1,2
	ООО «Полисинтез» (г. Белгород) ОАО «УфаВита»	Бета-каротин микробиологи-ческий Кокарбоксилаза	1,1 0,1
Антибиотики			60,0
	ОАО «Усолье-Сибирский ХФК» (Иркутская область)	Ампицилина тригидрат	60,0

Вместе с тем, несмотря на отдельные положительные примеры в производстве ФС в России на рубеже XX и XXI веков, следует сделать вывод, что их производство в тот период переживало глубокий кризис, выражавшийся в неуклонном сокращении производства отечественных ФС (по всем их видам: синтетические, антибиотики, витамины) и уменьшении производственных мощностей и степени их загрузки.

Это, в свою очередь, привело к тому, что предприятия по производству ГЛС перешли на использование импортных ФС, отдавая предпочтение продукции Китая и Индии, как более дешевой, и ФС из стран Европы, как современным и высокоэффективным. Их объем увеличивался пропорционально увеличению выпуска ГЛС. Импорт ФС превратился из средства дополнения отечественного ассортимента мировыми фармацевтическими новинками в средство заполнения пустот, образовавшихся в отечественном ассортименте в результате прекращения выпуска российскими заводами традиционных ФС. Многие из них перешли на выпуск ГЛС, преимущественно импортозамещающих. В балансе лекарственных ресурсов страны стали преобладать импортные препараты. Таким образом, фармацевтическая промышленность России стала зависимой от поставок ФС по импорту. Следует согласиться с той точкой зрения, что импортозависимость в обеспечении ФС отечественного производства ГЛС стала главной угрозой лекарственной безопасности страны [2, 9–12]. Заметим, что эта зависимость производства ГЛС в России от импорта ФС не преодолена до сих пор.

ПРИЧИНЫ КРИЗИСА В ПРОИЗВОДСТВЕ ФС

Причины кризиса в производстве ФС можно разделить на макроэкономические, связанные с переходом от административно-командной экономики к рыночной, и специфические для отрасли.

В качестве первых можно назвать следующие:

- дезорганизация работы промышленных предприятий практически во всех отраслях экономики, вызванная нарушением кооперационных связей между потребителями и поставщиками;
- поспешная, непродуманная и принудительная приватизация, породившая новых частных собственников фармацевтических предприятий, которые далеко не всегда, как это себе представляли реформаторы, были эффективными частными собственниками;
- резкий рост цен на энергоносители, транспортные услуги, сырье;
- гиперинфляция, практически лишившая предприятия оборотных средств;

- либерализация режима импорта: ослабление таможенных барьеров в сочетании с льготами для иностранных поставщиков.

Кроме макроэкономических причин кризиса в производстве ФС, о которых было сказано выше, имелись и специфические для отрасли:

- уменьшение объемов или прекращение выпуска различных видов сырья, необходимых для синтеза многих видов химических ФС;
- высокие цены на сырье, использующееся в технологических процессах синтеза ФС;
- недостаточный спрос на отечественные ФС в связи с их неконкурентоспособностью по цене по сравнению с ФС, предлагаемыми иностранными производителями, при этом попытки сократить издержки, используя такие средства, как замораживание заработной платы, резкое сокращение расходов на научные исследования и опытные разработки, на внедрение системы обеспечения качества, не только не повысили конкурентоспособность, но и создали системные проблемы для самого существования производства ФС;
- обновление реестров лекарственных средств, связанное с моральным устареванием или запрещением к использованию традиционных препаратов советской номенклатуры, и, соответственно, невостребованность ФС для их производства;
- государственный контроль за ценами на лекарственные средства, предусматривавший искусственное ограничение рентабельности производства в условиях гиперинфляции, что, в свою очередь, лишало предприятия фармацевтической промышленности как собственных ресурсов для развития, так и возможности получения банковского кредита вследствие нежелания банков кредитовать нерентабельные предприятия;
- устаревание материально-технической базы производства ФС и недостаточность средств на её модернизацию и реновацию;
- несовершенство технологических процессов, обусловливающее высокую энергоемкость производства ФС;
- экологические проблемы, связанные с несовершенством очистки технологических выбросов с учетом крайне неблагоприятной экологической ситуации на территориях локации заводов по производству ФС.

В начале 1990-х годов в значительной степени было утрачено производство многих компонентов и видов сырья, необходимых для производства ФС. Сложность проблемы заключается в том, что необходимо множество компонентов, обеспечивающих производство конкретной ФС. Так, в производстве папаверина, например, применяется 38 наименований сырья. В силу разных причин были остановлены крупнотоннажные производства ФС (паранитрохлорбензол, техническая салициловая кислота, фенилметилпиразолон, метиловый эфир бензосульфокислоты, метилмочевина, мета-нитроацетофенон, диметилмочевина, тионилхлорид и т.д.). Также было остановлено производство таких важных для производства ФС видов химического сырья, как пиперазин, антраниловая кислота, 2,5-дихлорнитробензол, бензонат натрия, ацетоуксусный эфир и многие другие. Что касается импорта химических интермедиатов, то «производство ФС тесно связано с химическим производством и доступностью химических интермедиатов, которые в большинстве также производятся за рубежом и, как правило, теми же производителями, которые и импортируют в Россию ФС. Поэтому цена интермедиатов зачастую контролируется зарубежными производителями с таким расчетом, чтобы производство ФС из них в России было невыгодно» [13].

В период с 1987 по 1999 гг. в России практически прекратились научно-исследовательские работы по созданию и внедрению новых отечественных оригинальных препаратов вследствие отсутствия бюджетного финансирования. Ранее созданные и всемирно известные отраслевые научные центры вынуждены были свернуть незавершенные исследовательские работы, многие из них вообще прекратили свое существование. Приведем вопиющий пример, когда из-за недостатка финансовых средств для оплаты отопления здания федерального государственного унитарного предприятия «Государственный научный центр по антибиотикам» погибла уникальная коллекция штаммов-продуцентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая вышеизложенное, можно сделать главный вывод о том, что рыночные механизмы оказались не способны не только обеспечить устойчивое развитие подотрасли фармацевтической промышленности по производству ФС, но, более того, их действие привело к глубокому и затяжному кризису в этой сфере. Именно поэтому решение проблем, оставшихся в наследство от кризиса в разработке и производстве ФС на рубеже XX и XXI веков, в настоящее время связывается с инновационным сценарием, предусмотренным Стратегией развития фармацевтической промышленности на период до 2020 года. Одной из целей Стратегии развития фармацевтической промышленности на период до 2020 года [7] и принятой на ее основе федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» [14] является обеспечение производства готовых лекарственных препаратов син-

тетическими и биотехнологическими ФС на основе технологической модернизации производства.

Для достижения этой цели предусмотрен комплекс мер, включающий в себя широкомасштабную государственную поддержку:

- разработки новых инновационных ФС;
- проведения доклинических и клинических испытаний;
- развития кадрового потенциала и информационной инфраструктуры фармацевтической промышленности;
- технологического перевооружения и модернизации фармацевтических предприятий по производству ФС.

В рамках общих мероприятий, предусмотренных федеральной целевой программой «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», к настоящему времени разработаны конкретные предложения по:

- внедрению прорывных технологий ФС, включающих в себя интенсивный микрореакторный синтез ФС и ключевых интермедиатов, промышленный биокатализ и инжиниринг ферментов для асимметричного синтеза и локального производства ключевых интермедиатов и ФС, технологию «single-use» производства ФС [15];
- заключению в соответствии с законом № 488-ФЗ «О промышленной политике в Российской Федерации» от 31 декабря 2014 г. специальных инвестиционных контрактов на разработку технологий ФС и производство лекарственных препаратов полного цикла;
- изменению нормативно-правового пространства государственных закупок лекарственных средств, предусматривающему установление дополнительных преференций для лекарственных препаратов полного цикла, так называемой трехступенчатой системы преференций [16, 17];
- разработке образовательных программ различного уровня подготовки кадров, обеспечивающих получение специальных компетенций по разработке и технологиям ФС.

Реализация комплекса вышеуказанных мероприятий позволяет гарантировать национальную безопасность России в сфере лекарственного обеспечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. В.И. Дорофеев. Фармацевтическая промышленность России в условиях переходного периода. – М.: Медицина. 1995. С. 11–20, 144 с.
2. А.А. Лин, Д.М. Слепнев. Импортозависимость обеспечения отечественного производства лекарств фармацевтическими субстанциями как проблема лекарственной безопасности России // Вестник Сибирского института бизнеса и информационных технологий. Научно-практический журнал. 2012. № 4. С. 28–32.
3. С. Романова, В. Захарова, Д. Журов. Надежда умирает последней // Ремедиум. 2006. № 3. С. 56–63.
4. Субстанции антибиотиков: будущее рынка в России. URL: http://newchemistry.ru/letter.php?nid=3430 (дата обращения 29.01.2016).
5. Современное состояние и перспективы развитии российской фармацевтической промышленности. URL: http://www.veb.ru/common/upload/files/veb/analytics/fld/20120816pharma.pdf (дата обращения 28.05.2016).
6. А.М. Потапов. Методические подходы к обоснованию мер государственного регулирования рынка фармацевтических субстанций в Российской Федерации.: дис. … канд. фарм. наук. – Санкт-Петербург. 154 с.
7. Приказ Минпромторга России от 23.10.2009 г. № 956. «Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года».
8. В. Захарова, С. Романова. Состояние производства субстанций лекарственных средств // Ремедиум. 2001. № 9. С. 28–32.
9. А.А. Лин, Д.М. Слепнев, М.С. Румянцева. Тотальная импортозависимость фармацевтического рынка – угроза национальной безопасности России // Экономическое возрождение России. 2014. № 1. С. 141–149.
10. А.А. Лин, С.В. Соколова, Т.Ю. Дельвиг-Каменская. Фармацевтический рынок: причины и количественная мера импортозависимости // Проблемы современной экономики. 2015. № 4 (55). С. 273–277.
11. А.А. Лин, Б.И. Соколов, Д.М. Слепнев. Фармацевтический рынок: производство лекарственных средств в России // Проблемы современной экономики. 2013. № 1(45). С. 191–195.
12. Н.Б. Леонидов, Т.А. Воронина, С.Я. Скачилова, Н.Б. Демина, А.И. Губанок, А.А. Кузьмин. Развитие фармацевтической промышленности и национальная безопасность России // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 4(8). С. 15–20.
13. И.А. Василенко, С.А. Толмачев. Перспективы создания производства фармацевтических субстанций в России // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 1(10). С. 190–195.
14. Постановление Правительства Российской Федерации от 17 февраля 2011 г. № 91 «О федеральной целевой программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».
15. L.M. Ogorodova, Z.M. Golant, I.N. Tarasov, I.A. Narkevich, A.A. Lin, N.S. Kartashova. Model breakthrough technologies as a tool to support import substitution in the pharmaceutical industry // International review of management and marketing. 2016. V. 6. S1. P. 59–66.
16. И.А. Наркевич, З.М. Голант, Н.С. Карташова. Установление особенностей описания объекта государственной закупки «лекарственный препарат» как необходимое условие предоставления преференций локальным производителям // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1(14). С. 232–236.
17. Н.С. Карташова. Государственные закупки как инструмент локализации производства лекарственных средств: автореф. дис. … канд. фарм. наук. – Санкт-Петербург, 2016. 19 с.

УДК 615.11

ФАРМАКОПЕИ XIX – НАЧАЛА XX ВЕКОВ. РЕГЛАМЕНТАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Ю.И. Зеликсон[1]*

Резюме. В статье дан обзор российским фармакопеям (РФ) XIX – начала XX века. Приведен анализ общих статей в РФ I-VI изданий, дана их систематизация в соответствии с современной классификацией лекарственных форм. Рассмотрены вопросы регламентации изготовления и хранения сильнодействующих лекарственных средств, а в связи с возникновением фармацевтического производства – подходы к регламентации промышленного производства лекарственных препаратов.

Ключевые слова: фармакопея, лекарственные формы, регламентация, сильнодействующие лекарственные средства.

PHARMACOPEIAS OF XIX – EARLY XX CENTURIES. REGULATION OF THE PHARMACEUTICAL MANUFACTURING

Yu.I. Zelikson[1]*

Abstract. This article provides the overview of the Russian Pharmacopoeia (RPh) XIX – early XX century. There are the review of the RPh I-VI general pharmacopoeia articles and their systematization in accordance with the modern classification of dosage forms. The study of the highly potent drugs regulation of the manufacture and storage are shown. Additionally, these paper describers the approaches to the industrial production regulation after its appearance.

Keywords: pharmacopoeia, dosage forms, regulation, highly potent drugs.

1 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8

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

* адресат для переписки:
E-mail: zelixon1930@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

В первой половине XIX в. регламентация изготовления лекарств характеризуется использованием ведомственных, а также иностранных фармакопей. Во второй половине XIX – начале XX века производство лекарств регламентировали российские фармакопеи I–VI изданий, и в частности общие статьи на лекарственные формы и галеновые препараты, правила изготовления и хранения сильнодействующих лекарственных средств.

Значительный вклад в изучение истории русских фармакопей внесли А.М. Филькин, А.Г. Натрадзе и другие ученые.

ВЕДОМСТВЕННЫЕ ФАРМАКОПЕИ

В первой половине XIX века общегосударственные фармакопеи по ряду причин не издавались. Их отсутствие лишь отчасти компенсировали ведомственные фармакопеи, которые подразделяли на военные и больничные.

В военных фармакопеях 1808 г. и 1812 г. способы изготовления лекарственных форм и галеновых препаратов были одинаковы с Российской фармакопеей 1798 г. Только для некоторых химических препаратов проводились новые методы изготовления. В военной фармакопее 1818 г. были приведены сведения по определению доброкачественности препаратов, указывались подмеси и способы их обнаружения.

Для военной фармакопеи «Pharmacopoea castrensis Ruthena» четвертого издания (1840 г.) характерно значительное увеличение количества статей на химические лекарственные средства, в том числе на алкалоиды (хинин, морфин, стрихнин и их соли). Впервые в фармакопейных статьях описывались химические свойства веществ и указывалась химическая формула. В статьях на многие препараты приводились реакции идентичности и доброкачественности. Для ядовитых веществ были даны высшие дозы. Сокращение числа статей на лекарственные формы и галеновые препараты объясняли выходом в это время трудов А.П. Нелюбина, А.А. Иовского [1] и других ученых. Согласно аптекарскому уставу военная фармакопея являлась руководством и для гражданских аптек.

Издание больничных фармакопей имело целью ознакомить фармацевтов и врачей с новыми препаратами, облегчить и упростить составление рецептов, удешевить лекарства. Больничные фармакопеи XIX века, по существу, являлись обязательными мануалами.

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Статья приведена в авторской редакции

По характеру издания к группе больничных фармакопей причисляют и придворные фармакопеи. В одной из них, которая была издана в 1825 г., требовалось, чтобы лекарственные препараты были свежеприготовленными:

«Поелику материалы в естественном своем виде лучше сохраняют свою силу, нежели превращенные в другой вид, то количество приготовленных из них порошков и других препаратов должно быть соразмерно надобности на некоторое время; сие разумеется и на счет сложных лекарств, как то: пластырей, мазей, сиропов, перегонных вод, разных тинктур и т.п.»

Таким образом, изданные в первой половине XIX века фармакопеи, хотя и носили ведомственный характер, имели большое значение для аптек того времени. Они способствовали внедрению в фармацию достижений науки, расширяли ассортимент применяемых лекарственных средств, подготовили издание первой общегосударственной фармакопеи во второй половине XIX столетия [2, 3–5].

ОБЩИЕ СТАТЬИ В РОССИЙСКИХ ФАРМАКОПЕЯХ I–VI ИЗДАНИЙ

Фармакопеи становятся сборниками обязательных стандартов для лекарственных средств, применяемых в России начиная с 1866 г.

Российская фармакопея 1866 г. была третьей государственной фармакопеей, но установилась традиция считать ее первой. От этой фармакопеи ведется счет изданиям и в настоящее время. Она была создана на основе достижений науки и химической промышленности. Составителем первых четырех изданий фармакопеи считается Ю. К. Трапп.

Фармакопея 1866 г. впервые содержала общие статьи, в которых обобщены методы изготовления лекарственных форм и галеновых препаратов. Данные об общих статьях в РФ I–VI изданий мы систематизировали в таблице в соответствии с современной классификацией лекарственных форм.

Во второй половине XIX – начале XX века пилюли, суппозитории, пластыри и капсулы медицинские относили к твердым лекарственным формам, а линименты – к галеновым препаратам [10].

В РФ I [6] входили общие статьи на маслосахары, эмульсии, настои, отвары, пластыри, настойки, экстракты, сиропы, воды и вино. Эти же статьи входили в РФ II [7].

В РФ III [8] содержалось 7 новых статей на сборы, порошки простые и сложные, лепешки и пастилки, пилюли, сатурации и мази.

В РФ [9] IV были включены впервые статьи на линименты, кашки и капсулы врачебные. Кроме того, из статьи «Экстракты» была выделена самостоятельная статья – «Жидкие экстракты». Таким образом, за 25 лет, с 1866 г. (РФ I) по 1891 г. (РФ IV), количество общих статей на лекарственные формы и галеновые препараты удвоилось.

Таблица 1.

Общие статьи на лекарственные формы и галеновые препараты в российских фармакопеях (РФ) I–VI изданий [6–9]

Наименование статьи	Номер издания РФ		
	I–II	III	IV–VI
Твердые лекарственные формы			
Сборы. Species	–	+	+
Простые порошки. Pulveres simplices	–	+	+
Сложные порошки. Pulveres compositi	–	+	+
Сахар с эфирными маслами. Elaeosacchara	+	+	+
Лепешки. Пастилки. Trochisci. Pastilli. Rotulae	–	+	+
Жидкие лекарственные формы			
Сатурации. Saturationes	–	+	+
Эмульсии. Emulsiones	+	+	+
Водные настои. Infusa	+	+	+
Отвары. Decocta	+	+	+
Линимент. Linimenta	–	+	+
Мягкие лекарственные формы			
Кашки. Electuaria	–	–	+
Мази. Unguenta	–	+	+
Пластыр. Emplastra	+	+	+
Мыльца. Suppositoria	–	+	+
Пилюли. Pilulae	–	+	+
Врачебные капсулы. Capsule medicamentosae	–	+	+
Галеновые препараты			
Воды. Aquae	+	+	+
Сиропы. Sirupi	+	+	+
Настойки. Tincturae	+	+	+
Экстракты. Extracta	+	+	+
Вино. Vinum	+	+	+

Примечание: «+» – означает наличие статьи в данных изданиях фармакопеи; «–» – отсутствие статьи.

В последующие 20 лет – с 1891 г. по 1910 г. (РФ VI) – количество общих статей практически не изменилось, лишь жидкие экстракты были включены в общую статью «Экстракты». К сожалению, российские фармакопеи конца XIX века – начала XX века не регламентировали правила изготовления и контроля качества таблеток, растворов для инъекций, некоторых жидких лекарственных форм, хотя материалы для составления общих статей уже имелись. Статьи на ампулы и таблетки впервые были включены в 3-е издание военной фармакопеи 1913 г.

Изменения в содержании большинства общих статей РФ I – РФ VI мы охарактеризовали в статьях по истории технологии соответствующих лекарственных форм, которые будут опубликованы в дальнейшем.

Развитие науки позволило значительно улучшить ассортимент лекарств. По сравнению с фармакопеями XVIII века в фармакопеях XIX века число химических веществ постоянно увеличивалось, а количество средств растительного происхождения снижалось.

На характере фармакопей отразились и изменения в производстве лекарственных средств.

Фармакопея постепенно обращала большее внимание на контроль качества, на подробное описание реакций, характеризующих идентичность и доброкачественность препарата. Увеличивалось число препаратов, для которых фармакопея требовала проведения количественных определений, описание способов изготовления сохранялось лишь в статьях на галеновые препараты и лекарственные формы, так как в XIX веке методы контроля таких лекарств еще были несовершенными.

РЕГЛАМЕНТАЦИЯ ХРАНЕНИЯ И ИЗГОТОВЛЕНИЯ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ СРЕДСТВ

В РФ I имелись «Правила для хранения в аптеках сильнодействующих врачебных средств». В них указывалось, что в рецептурной комнате, материальной комнате, подвале, чердаке и других помещениях сильнодействующие лекарственные средства (позже выделенные в список А) должны храниться отдельно от других лекарственных средств, в особых шкафах и ящиках с хорошими замками.

В особый список выделяли препараты мышьяка, ртути, атропина, морфина, стрихнина, аконитин и некоторые другие. Эти средства должны были храниться в рецептурной комнате отдельно, в особом шкафу под замком, ключ от которого находился у управляющего аптекой или его помощника. *«Хранитель ключа, удостоверившись в том, что действительно прописано в рецепте такое-то сильнодействующее средство и в таком-то количестве, обязан сам отвесить прописанное его количество и передать его тому, кому поручено приготовление лекарства по рецепту. За безошибочность приготовления лекарства отвечает хранитель ключа».*

На шкафах и ящиках, в которых хранятся сильнодействующие средства, должна быть надпись: «Сильнодействующие врачебные средства» или «Medicamenta heroica». В этих шкафах и ящиках должны находиться в достаточном количестве верные весы, роговые ложечки и фарфоровые или стеклянные ступки, предназначенные единственно для приготовления лекарств, в состав которых входит какое-либо из означенных сильнодействующих средств [11].

Одним из постановлений, утвержденных министром внутренних дел при введении в действие Российской фармакопеи 1866 г., регламентировалось положение об оформлении рецептов, содержавших сильнодействующие средства в завышенных дозах. Врач был обязан написать количество этого средства прописью *«и присоединить к тому восклицательный знак: !; в противном случае, прописанное лекарство не должно быть отпускаемо из аптеки, без предварительного объяснения».*

Если невозможно выяснить это у врача, то прописанное средство отпускали в высшей дозе, указанной в фармакопее, и сообщали затем врачу [7].

Для детей и «невзрослых» дозы ядовитых веществ уменьшали:

- для детей от 2 до 4 лет – 1/10 ч.,
- от 5 до 7 – 1/6 ч.,
- от 8 до 10 – 1/4 ч.,
- от 11 до 13 - 1/2 ч.,
- для молодых людей от 14 до 17 лет – 3/4 ч. [7].

В РФ VI [9] было включено *«Удостоившееся Высочайшей ратификации 11 июня 1907 года Международное соглашение о принятии единообразных способов приготовления сильнодействующих лекарств».*

В статье I этого соглашения указывалось: *«Лекарственные вещества, внесенные в нижеследующую таблицу, будут обозначены в фармакопее, изданной каждым из договаривающихся правительств, латинскими названиями, употребляемыми в этой таблице, и будут соответствовать требованиям, указанным против этих названий».* В таблице приводилось описание особенностей изготовления около 50 лекарственных средств. Например, *«Aconiti tinctura seu Tinctura Aconiti». Приготовлять посредством перколяции алкоголем в 70% по объему; эта тинктура будет содержать 0,05% всех алкалоидов».*

Статья II: *«Что касается других веществ, не обозначенных в таблице (статья I) и могущих быть внесенными в фармакопеи, то договаривающиеся правительства обязуются принять к руководству следующие правила:*

a) Сильнодействующее средство не будет изготовляться в форме лекарственного вина;

b) тинктуры сильнодействующих веществ будут изготовляться 10%-ные и при помощи перколяции;

c) жидкие экстракты сильнодействующих веществ будут изготовляться 100%-ные».

Статья III: *«Договаривающиеся правительства введут нормальный каплемер, у которого наружный диаметр трубки, выпускающей каплю, будет ровно в 3 мм, т.е. который при 15 °С даст 20 капель дистиллированной воды на грамм»* [9].

Таким образом поднимались вопросы гармонизации в изготовлении лекарственных средств.

Русские фармакопеи второй половины XIX века – начала XX века до известной степени послужили основой для создания государственных фармакопей СССР.

РЕГЛАМЕНТАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В НАЧАЛЕ XX ВЕКА [12]

До конца XIX века лекарственные средства в России изготавливали главным образом в аптеках. В аптечных лабораториях изготавливали галеновые препараты и некоторые патентованные средства. Многие препараты и патентованные лекарства ввозились из-за рубежа.

Увеличение потребности населения в лекарственном обеспечении пришло в противоречие с аптечной монополией на изготовление лекарств. Поэтому в 1898 г. были изданы правила, разрешающие производить лекарственные средства не только аптечным лабораториям, но и предприятиям фабрично-заводского типа. Открытие фармацевтических предприятий разрешалось только магистрам фармации и химикам, но не провизорам.



Рисунок 1. Фармацевтический завод начала 20 века [13]

В 1899 г. был издан первый список 65 галеновых препаратов, которые разрешалось производить на фармацевтических предприятиях. Затем такие списки издавались в 1902 и 1908 годах. В новых списках попрежнему содержались преимущественно галеновые препараты, небольшое количество химических веществ и только четыре препарата в форме таблеток.

Фармацевтическим промышленным предприятиям запрещалось производить многие необходимые лекарственные препараты, в том числе синтетические, в форме ампулированных растворов, таблеток и др. За аптеками сохранялось монопольное право на изготовление большого числа лекарственных средств. В то же время в аптеках не было условий для расширения производства лекарственных препаратов. В большинстве аптечных лабораторий не было оборудования для изготовления таблеток, растворов в ампулах и других современных лекарственных средств. Эти обстоятельства задерживали развитие фармацевтического производства и способствовали увеличению импорта лекарственных препаратов.

Отсутствие фармацевтической промышленности в России особенно остро проявилось в годы первой мировой войны, когда Германия и некоторые другие страны прекратили ввоз в Россию лекарственных средств. Население нашей страны не было в должной мере обеспечено лекарствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в первой половине XIX века в России общегосударственная фармакопея не издавалась. Изготовление лекарств и оценка их качества нормировались иностранными и ведомственными фармакопеями. Во второй половине XIX – начале XX века Российские фармакопеи I–VI изданий отразили достижения медицины, фармации, химии. Основные положения по изготовлению лекарственных форм и галеновых препаратов были изложены в общих статьях. В отдельных разделах регламентировались изготовление, хранение и отпуск сильнодействующих лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.М. Филькин. Роль А.А. Иовского и А.П. Нелюбина в становлении технологии лекарственных форм и галеновых препаратов // Аптечное дело. 1965. № 3. С. 77–82.
2. А.Г. Натрадзе. Русские и советские фармакопеи. – М.: Медицина, 1978. С. 37–72.
3. А.М. Филькин. Латинские фармакопеи России XIX столетия // Аптечное дело. 1958. № 5. С. 49–52.
4. А.М. Филькин. Русские фармакопеи капиталистического периода // Аптечное дело. 1966. № 4. С. 51–53.
5. А.М. Филькин История создания русских фармакопей. Автореферат дисс. канд. фармац. наук. – М. 1963.
6. Российская Фармакопея, изданная по Высочайшему повелению Медицинским Советом Министерства Внутренних Дел. I издание. – СПб.: Тип. Императорской АН, 1866. 604 с.
7. Российская Фармакопея, изданная по Высочайшему повелению Медицинским Советом Министерства Внутренних Дел. II издание. – СПб.: Тип. Императорской АН, 1871. 552 с.
8. Российская Фармакопея, изданная по Высочайшему повелению Медицинским Советом Министерства Внутренних Дел. III издание. – СПб.: Тип. Императорской АН, 1880. 640 с.
9. Российская Фармакопея, изданная по Высочайшему повелению Медицинским Советом Министерства Внутренних Дел. IV издание. – СПб.: Изд. Риккера К. Л., 1891. 727 с.
10. В.А. Тихомиров Курс фармации. 5-е изд. – М.: Изд-во А.А. Карцева, 1909. 528 с.
11. Российская фармакопея. VI изд. – СПБ.: Изд. Риккера К.Л., 1910. 591 с.
12. Т.Д. Семенова Состояние производства фармацевтических препаратов в России в начале XX века // Сборник научных работ Московского фармацевтического института. – М. 1957. Т. 1. С. 473–478.
13. Max Penson. URL: http://www.maxpenson.com/show?id=2182&lbid=&page=1 (дата обращения 30.03.2017).

ТАБЛЕТИРОВАНИЕ. ЧЕМ ОТЛИЧАЮТСЯ ТАБЛЕТИРУЕМОСТЬ, ФОРМУЕМОСТЬ И ПРЕССУЕМОСТЬ?

АВТОР

Р. Седлок,

Директор отдела
по проведению
технических тренингов
Natoli Engineering

АННОТАЦИЯ

Для пациентов и потребителей таблетки – это простые и удобные формы дозирования. Но наука, которая занимается описанием и изучением того, как прессование блока частиц или гранул помогает образовывать таблетку, может быть очень сложной для понимания. Именно в этой ситуации могут помочь исследования в области прессования продукта. В данной статье мы постараемся объяснить, каким образом разрабатываются профили таблетируемости, формуемости и прессуемости таблетки.



ВВЕДЕНИЕ

Достижения в области прессования связаны с использованием определенного инструментария, который позволяет улучшить процесс разработки таблеток, увеличить масштабы производства, а также усовершенствовать само производство. Сегодня большой выбор оснасток может помочь производителям лекарственных форм, разработчикам продуктов и другим профессионалам в данной отрасли лучше понять все аспекты производства и проектирования, которые связаны с твердыми лекарственными формами. Данные инструменты (оснастка) позволяют нам изучить все аспекты поведения таблетки на стадии разработки и производства небольших партий.

В этой статье мы приводим общие принципы проведения исследований прессуемости продукта, включая разработку профилей таблетируемости, формуемости и прессуемости. У этих терминов, зачастую используемых не по своему прямому назначению, есть свои конкретные значения, которые различным образом характеризуют материал для прессования.

Существует множество факторов, которые могут повлиять на успешность производства, включая правильно обученный персонал, правильно подобранный таблеточный пресс для производства продукта, высококачественную и точно обработанную оснастку, а также предпочтительные характеристики порошка. В действительности различия в поведении порошка – это одна из широко распространенных проблем в фармацевтической промышленности и производстве БАД. К счастью, существует определенный набор техник, который помогает понять и решить проблемы, связанные с порошками. Во-первых, убедитесь в том, что низкокачественные таблеточные прессы и нестандартная оснастка не являются частью Вашего уравнения. Для этого понадобится хорошее и надежное оборудование, которое поможет избавиться от проблем, связанных с производством.

Понимание значимости показателя прессуемости является очень важным. Все процессы, которые предшествуют процессам таблетирования, также являются очень актуальными. Необходимо понимать, каким образом характеристики частиц и порошка могут повлиять на свойства таблетки.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Характеристики частицы, включая форму, размер, а также распределение по размерам могут повлиять на возникновение проблем с массой, однородностью, разделением, прессованием и растворением. Присутствие нескольких частиц, которые превышают стандартные размеры, например, может привести к снижению массы таблетки ввиду того, что матрицы наполняются по объему. Большие частицы также могут повлиять на продление процесса растворения, так как они снижают общую площадь поверхности таблетки. Наличие чрезмерно маленьких частиц будет оказывать противоположное воздействие.

Характеристики порошка, включая текучесть, насыпную плотность, истинную плотность, также оказывают влияние на процесс таблетирования. Истинная, или абсолютная, плотность (плотность после удаления всех пор) измеряется при помощи гелиевого пикнометра. Этот очень полезный показатель отображает плотность таблетки, а также позволяет понять, был ли вытеснен весь воздух между частицами во время прессования, включая межчастичные и внутридисперсные поры.

После того как характеристики частиц и порошка определены, необходимо решить, является ли прямое прессование (самый простой подход) приемлемым подходом в конкретной ситуации. Если данный подход не приемлем, то необходимо разработать порошок при помощи сухой или влажной грануляции.

Также необходимо понимать, как ведет себя порошок при различных нагрузках. Это только один из шагов, необходимых для успешного производства надежной таблетки, который можно изучить для ускорения самого процесса производства. В идеале необходимо будет изучить принципы деформации материала, что, в свою очередь, поможет разработать лекарственный препарат.

ПРОЦЕСС ПРЕССОВАНИЯ ТАБЛЕТКИ

Исследования, которые приведены в данной статье, были проведены на таблеточном прессе с одной станцией (рисунок 1). Но независимо от того, используете ли Вы однопуансонный таблеточный пресс с ручным наполнением матрицы или же роторный таблеточный пресс с гравиметрической системой подачи продукта, процесс будет аналогичным: материал подвергается воздействию усилий прессования в ограниченном пространстве, что приводит к уменьшению объема. В самом начале используется воздействие низким давлением, что способствует более компактному перестроению частиц и далее снижению количества пор. При постепенном увеличении давления габаритные размеры частиц изменяются. Частицы или разламываются на более мелкие дискретные формы (фрагментация), или подвергаются временной (эластичной) или постоянной (пластичной) деформации в новые формы. При воздействии самым высоким давлением фракции частицы могут быть перераспределены или могут подвергаться дальнейшей деформации.



Рисунок 1. Таблеточный пресс с одной станцией для проведения исследования в области прессования [1]

Таблетки, которые произведены из материала, подвергающегося деформации, как правило, менее чувствительны к ослаблению при добавлении порошкообразных смазок (например, стеарата магния). Смазочные материалы зачастую препятствуют соединению частиц, но при фрагментации частиц появляются новые и чистые поверхности. Частицы, которые подверглись фрагментации, также менее чувствительны к скорости прессования. Материалы, которые подвергаются пластичной деформации, отличаются высокой прочностью соединений при относительно небольшом давлении. Это связано с наличием большого количества межчастичных контактных точек, которые образуются в процессе деформации. Тем не менее эта прочность может быть снижена при добавлении смазочных материалов и при увеличении усилия прессования. Эластичная деформация приводит к частичному или полному восстановлению оригинальной формы частиц после прекращения воздействия усилия прессования. Эластичное восстановление, которое зависит от времени, называется вязкоупругость. Факторами, влияющими на время прессования, являются скорость прессования, скорость турели, размер ролика прессования, а также габаритные размеры головки пуансона.

ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ ПРЕССОВАНИЯ ТАБЛЕТКИ

Для проведения данного вида исследования необходимо выбрать целевую массу таблетки и ни в коем случае не изменять ее. Следующим шагом будет сбор образцов таблеток, которые были произведены с использованием различных усилий прессования (от низкого к высокому), проведение измерений их толщины, массы, прочности (иногда называется твердостью), истираемости, а также характеристик распадаемости и растворимости. Далее строится график для каждого атрибута или характеристики в качестве функции усилия прессования. На рисунке 2 изображен профиль

таблетируемости, который визуализирует разрывную прочность в качестве функции, применяемой к давлению прессования.

Давление прессования, которое может подсчитываться исходя из применяемого усилия и значения поперечного сечения лицевой части пуансона (уравнение 1), позволяет сравнивать значения нагрузки при различных размерах таблеток.

$$\text{Уровень 1: Давление} = \frac{\text{Усилие}}{\text{Площадь}}.$$

Разрывная прочность, которая рассчитывается, исходя из значений разрывного усилия и габаритных размеров таблетки, позволяет сравнивать механическую прочность различных размеров таблеток. Таблетки для проведения исследований, использованные в данной ситуации, были произведены при помощи круглых плоских пуансонов, и их значения были рассчитаны при помощи уравнения Fell – Newton [2] (уравнение 2).

$$\text{Уровень 2: } \sigma_t = \frac{2F}{\pi DT},$$

где F – разрывное усилие, D – диаметр таблетки и T – толщина таблетки.

Давление прессования от 100 до 200 МПа является стандартным для производства фармацевтических таблеток, в то время как давление более 200 МПа применятся при производстве пищевых добавок. Данная разница обусловлена очень высоким процентом содержания активных ингредиентов, которые входят в состав таблеток диетических добавок. Фармацевтические таблетки могут содержать в своем составе менее 10% активных веществ и более высокий процент связующих веществ. Существует много факторов, которые определяют целевую прочность таблетки, несмотря на то, что обычно требуется разрывное усилие величиной от 1 до 2 МПа для того, чтобы таблетка оставалась неповрежденной после процессов прессования (например, во время нанесения покрытия, транспортировки/хранения и упаковки). На рисунке 2 четко отображено то, что при оценке механической прочности наличие микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) [3] с 0,5% стеарата магния [4] обеспечивает более высокий уровень уплотнения материала. Это в основном достигается благодаря характеристикам пластической деформации МКЦ. Моногидрат лактозы [5] 0,5% стеарата магния также гарантирует надежность таблетки при умеренных значениях давления прессования. Но при смешивании этих двух вспомогательных веществ нужно учесть несколько функций изменения поведения готовой формы, включая характеристики пластичной и хрупкой деформации. Пропорция лактозы к МКЦ 3:1 обеспечивает более прочную структуру таблетки по сравнению с использованием только чистой лактозы.

Благодаря оценке механической прочности таблеток при использовании различных усилий прессования мы можем перейти к оценке твердых фракций. Данная оценка позволяет получить численное выражение того, какой объем твердого материала содержится в полном объеме таблетки. Твердая фракция таблетки соответствует соотношению условной и абсолютной плотности (измеряется при помощи гелиевого пикнометра [6]). Плотность таблетки может быть рассчитана исходя из массы и объема. Обратным показателем плотности является пористость – общий объем, который заполнен порами или воздухом. Данный показатель рассчитывается путем вычитания твердой фракции из уравнения 1 (уравнения 3 и 4).

$$\text{Уровень 3: Твердая фракция} = \frac{\text{Плотность таблетки}}{\text{Истинная плотность}}.$$

$$\text{Уровень 4: Пористость} = 1 - \frac{\text{Плотность таблетки}}{\text{Истинная плотность}}.$$

Рисунок 3 отображает профиль формуемости, который представляет собой разрывную прочность таблетки в качестве функции твердой фракции. Поведение МКЦ согласовывается с профилем таблетируемости, который был вычислен ранее, и приводит к более сильному формированию связей в данном случае при самой низкой твердой фракции. Соотношение лактозы к МКЦ 3:1 обеспечивает более прочную связь, чем сама по себе лактоза в данной твердой фракции.

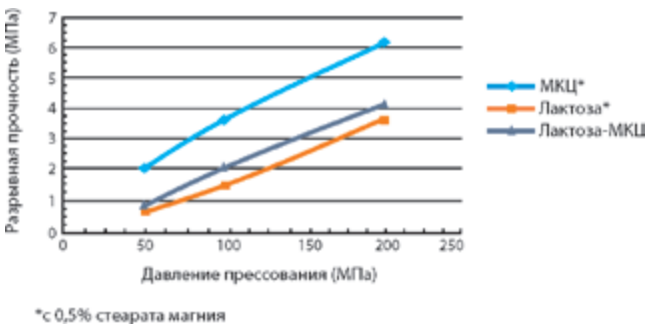


Рисунок 2. Профиль таблетируемости

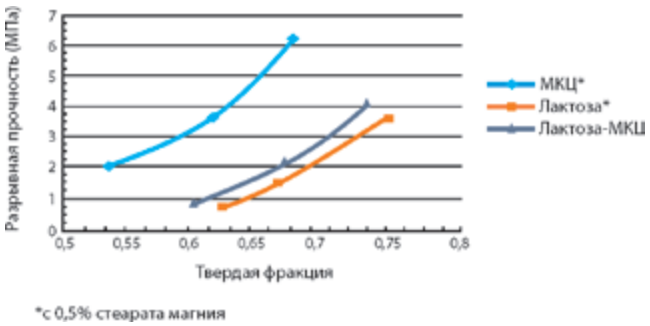
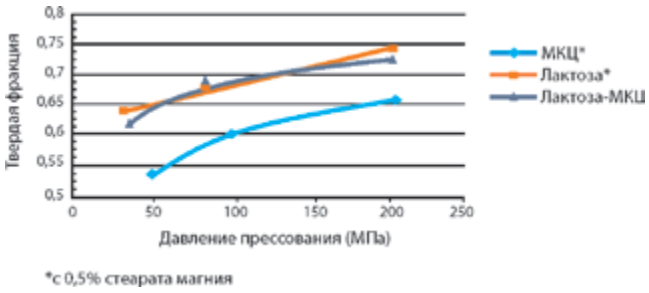


Рисунок 3. Профиль формуемости



*с 0,5% стеарата магния

Рисунок 4. Профиль прессуемости

Рисунок 4 отображает профиль формуемости, который помогает оценить, насколько готов материал к воздействию изменений в объеме непосредственно во время прессования. Ввиду того что используемое давление постоянно растет, также увеличивается объем твердой фракции материала. При конкретном давлении прессования МКЦ ведет к образованию самой низкой твердой фракции, в то время как лактоза и смесь лактозы с МКЦ (3:1) обеспечивают наличие очень похожих результатов формирования твердой фракции.

Теперь, когда мы знаем характеристики формуемости вспомогательных веществ, добавим АФИ в смесь. Рисунок 5 отображает профиль таблетируемости: 1) 3:1 лактозы к МКЦ, 2) 3:1 смесь с добавлением 10% ацетаминофена (APAP) и 3) 3:1 смесь с добавлением 20% ацетаминофена (APAP).

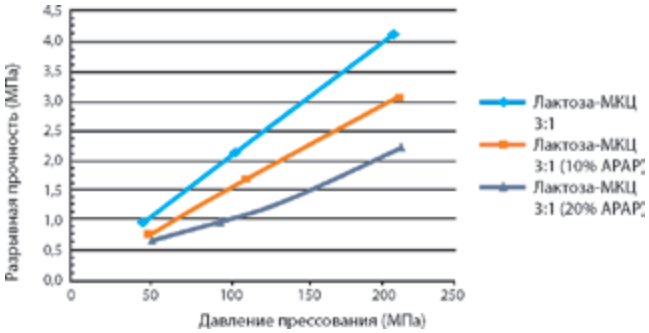


Рисунок 5. Профиль таблетируемости

Если разрывное усилие 2 МПа является целевым значением, то смесь 3:1 без добавления ацетаминофена (APAP) требует воздействия давления всего лишь 90 МПа, в то время как при добавлении 10% ацетаминофена (APAP) требуется использовать давление 120 МПа, а при добавлении 20% ацетаминофена (APAP) требуется использовать давление 180 МПа. Очевидным является тот факт, что добавление ацетаминофена (APAP) приводит к снижению прочности таблетки и для получения ее целевой прочности требуется воздействие более высокого давления.

На рисунке 6 отображен профиль формуемости смеси лактозы и МКЦ (3:1) и его изменение при добавлении ацетаминофена (APAP). При использовании

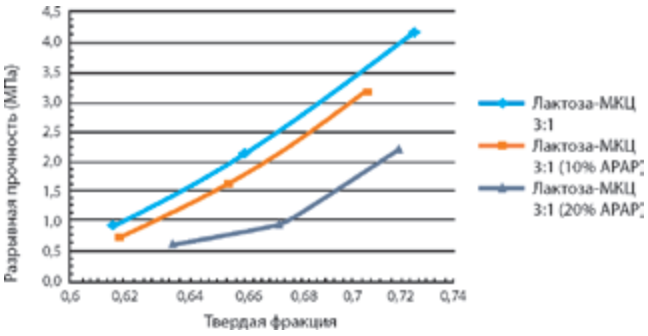


Рисунок 6. Профиль формуемости

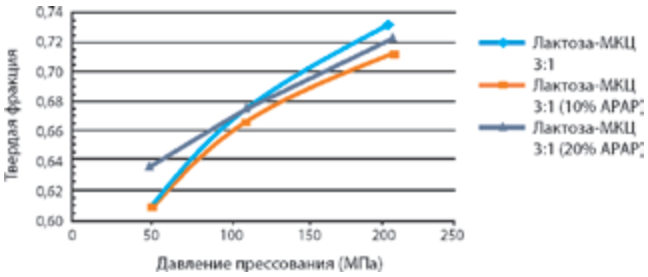


Рисунок 7. Профиль прессуемости

данной твердой фракции добавление ацетаминофена (APAP) приводит к снижению прочности таблетки. В итоге профиль прессуемости, который изображен на рисунке 7, показывает аналогичные результаты для всех трех комбинаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи в области исследования прессования таблеток продолжают помогать производителям готовых форм в производстве брендовых или воспроизводимых лекарственных препаратов. Оценка характеристик таблетируемости, формуемости и прессуемости помогает продемонстрировать фундаментальное механическое поведение продукта в нормализованном формате. Данный подход может сформировать базу для разработки прочных продуктов при использовании лишь небольшого количества материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. NP RD10a single-station tablet press from Natoli Engineering. – St. Charles, MO. URL: https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/np-rd-a-tablet-press-brochure-0001 (дата обращения 01.02.2017).
2. J.T. Fell, and J.M. Newton. Determination of tablet strength by the diametral-compression test // J. Pharm. Sci. 1970. № 59(5). P. 688–691.
3. L. Shi, S. Chattoraj and C. Sun. Reproducibility of flow properties of microcrystalline cellulose – Avicel PH102 // Powder Technology. 2011. V. 212. P. 253–257.
4. Magnesium stearate from Crompton, Middlebury, CT.
5. Lactose monohydrate from Foremost, Baraboo, WI.
6. Ultrapyc 1200e from Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL.

GE Healthcare

ОДНОСТАДИЙНОЕ НАРАЩИВАНИЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК: ОТ ОДНОГО ФЛАКОНА С КЛЕТОЧНЫМ БАНКОМ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ ДО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО БИОРЕАКТОРА ОБЪЕМОМ 2000 Л

Материал предоставлен компанией GE Healthcare

ВВЕДЕНИЕ

В комментариях по применению описано, каким образом можно использовать перфузионное культивирование, чтобы сократить время наращивания культуры, упростить рабочие операции и в максимальной степени использовать оборудование при наращивании культур клеток. Для получения клеточных банков высокой плотности клетки CHO растили с использованием биореакторной системы ReadyToProcess WAVE™ 25, работающей в режиме перфузии. При плотности жизнеспособных клеток, равной 50×10^6 на 1 мл, рост культур останавливали, добавляя в соотношении 1:1 среду для криоконсервации. Поскольку культуру клеток выращивали в перфузионном биореакторе Cellbag™, клетки можно было вновь сконцентрировать до плотности 50×10^6 жизнеспособных клеток на 1 мл, используя встроенный фильтр для удержания клеток, без необходимости вводить отдельный этап центрифугирования. Клеточную суспензию делили на аликвоты по 4,5 мл, замораживали и хранили в жидком азоте. Из клеточного банка высокой плотности брали одну криопробирку, оттаивали и использовали для инокуляции 1 л культуры в биореакторной системе ReadyToProcess WAVE 25. Объем культуры постепенно увеличивали до 10 л, после чего продолжали культивирование в перфузионном режиме до плотности клеток, равной 50×10^6 жизнеспособных клеток на 1 мл. Описанный метод позволял получить количество клеток, достаточное для засева производственного биореактора объемом 2000 л, всего за 10 суток. Использование перфузии при наращивании культуры клеток позволило делать это в один этап, от криопробирки до биореактора, предшествующего производственному (стадия N-1), исключив необходимость в промежуточных этапах выращивания и связанный с этим труд.



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Наращивание посевной культуры клеток обычно проводится посредством нескольких последовательных циклов культивирования. Начиная с замороженной исходной культуры клеток, наращивание обычно проводится сначала в культуральных колбах, а на последних стадиях – в биореакторах. Каждая стадия наращивания клеток обычно занимает от трех до четырех суток, и, если не используется емкость с большим отношением максимальной и минимальной производительности, то при каждом увеличении объема требуется новая емкость для культивирования. Подобная процедура отнимает много времени и требует больших затрат труда, а любые действия вручную сопряжены с риском контаминации культуры.

При перфузионном же культивировании клетки можно в течение долгого времени поддерживать в экспоненциальной фазе роста, добиваясь их более высокой плотности при сохранении жизнеспособности по сравнению с последовательным культивированием и культивированием с подпиткой. Используя перфузию при наращивании культур клеток для посева, можно получить культуры с индексом разведения при пересеве, равным 1:50, 1:100 или даже выше, что делает ненужными многие из последующих промежуточных этапов, необходимых при традиционном наращивании клеток для посева. Кроме того, сведение к минимуму числа этапов, требующих действий вручную, снижает риск контаминации и позволяет повысить уровень автоматизации процесса. Необходимой предпосылкой для того, чтобы получить суспензию с высокой плотностью клеток при перфузионном культивировании, является надежная биореакторная система с точным регулированием, которая способна поддерживать заданные параметры культивирования даже при высокой плотности клеток.

Здесь мы описываем использование перфузии для упрощения рабочих операций при получении клеточного банка и сокращения общего времени процесса наращивания клеток от криопробирки до биореактора этапа № 1. Клеточные банки высокой плотности были получены при выращивании клеток линии CHO в биореакторной системе ReadyToProcess WAVE 25. К культуре клеток добавляли криопротектор; клетки хранили в замороженном состоянии в виде аликвот по 4,5 мл. Одного флакона из клеточного банка высокой плотности было достаточно для инокуляции биореакторной культуры напрямую, что делало ненужным предварительное выращивание в колбах в несколько этапов (рисунок 1). Наращивание посевной культуры клеток производилось в режиме перфузии, что делало ненужным последующие промежуточные этапы культивирования в биореакторе. На рисунке 2 приведены общая схема эксперимента и общий вид системы. Использование описанного метода снижает капитальные и эксплуатационные издержки (CAPEX и OPEX соответственно), уменьшает влияние оборудования на процесс и упрощает этап выращивания культуры.

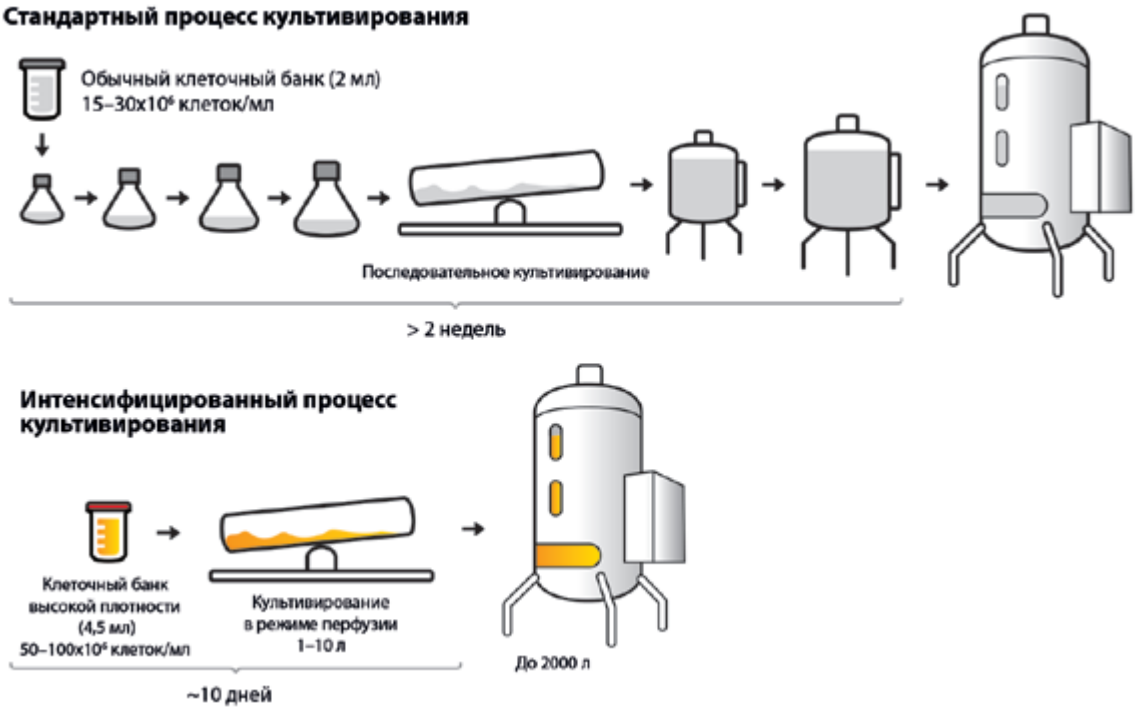


Рисунок 1. Пробирки из клеточного банка высокой плотности можно использовать для инокуляции биореакторных культур небольшого объема напрямую, что делает ненужным выращивание в колбах на этапе наращивания клеток сразу после разморозки. Использование перфузии на этапе биореактора позволяет клеткам оставаться в экспоненциальной фазе роста на протяжении всего периода культивирования, что обеспечивает высокую плотность конечной клеточной суспензии с жизнеспособными клетками. Посредством такой процедуры культура на этапе № 1 объемом 10 л может быть использована для засева производственной культуры конечным объемом 2000 л



Рисунок 2. **(A) Общая схема эксперимента. (B) Общий вид системы**

ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО БАНКА

Клетки линий CHO DG44 (разрешение на использование получено от Cellca GmbH) и CHO-S (разрешение на использование получено от Cobra Biologics Ltd.) были засеяны из находящихся в фазе экспоненциального роста культур в колбах в 2 л среды ActiCHO™ P в перфузионных биореакторах Cellbag на 10 л до плотности, равной $0,4\times10^6$ клеток/мл. Клетки культивировались с использованием системы ReadyToProcess WAVE 25 при целевой удельной скорости перфузии, составлявшей ~137,5 пкл/клеток/сут. Коррекцию скорости перфузии проводили каждые два часа в зависимости от предполагаемой скорости экспоненциального роста по запрограммированной схеме с использованием функции Method Editor (редактор метода). В культурах поддерживались pH 7,1, 40% содержание растворенного кислорода (DO) и температура 36,8 °C. Целевыми конечными критериями были плотность культуры, равная $50–100\times10^6$ жизнеспособных клеток на 1 мл при жизнеспособности клеток >95%. Для питательных веществ и перфузата использовались мешки ReadyToProcess™ объемом 20 л. Для перфузии использовались трубки внутренним диаметром 0,8 мм, а для заполнения и опорожнения биореактора – трубки внутренним диаметром 3,2 мм.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ

Для подготовки клеток к криоконсервации после достижения целевой концентрации в биореактор в соотношении 1:1 была введена свежая охлажденная среда с добавлением 15% ДМСО, а скорость перемешивания снижена с 20 до 15 об/мин. Объем культуры был вновь доведен до исходной концентрации клеток и исходного объема (2 л) путем откачивания культуральной среды через фильтр для удержания клеток. Суспензию клеток отбирали из биореактора, разливали по криофлаконам аликвотами по 4,5 мл и замораживали стандартными методами. После хранения в течение недели в жидком азоте плотность жизнеспособных клеток определяли в пробном восстановительном культивировании в колбах, прежде чем использовать для наращивания посевной культуры. Целевым критерием была жизнеспособность клеток >90% на всех этапах.

НАРАЩИВАНИЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

Содержимое одного флакона из замороженного банка клеток линии CHO DG44 разморозили и суспендировали в 100 мл заранее подогретой свежей среды для культивирования (среда ActiCHO P с добавлением 6 мМ L-глутамина и 2,8 г/л бикарбоната) в стерильном флаконе для переноса. Суспензию клеток перенесли в перфузионный биореактор Cellbag объемом 20 л, содержавший 900 мл среды для культивирования; плотность культуры составила $0,225\times10^6$ жизнеспособных клеток на 1 мл. Объем последовательно увеличивали до конечного рабочего объема 10 л, используя функцию Medium Addition (Добавление среды) системы ReadyToProcess WAVE 25. Культуру растили при скорости перфузии ~140 пкл/клеток/сут, которую устанавливали с помощью функции системы Method Editor (Редактор метода). В культуре поддерживались pH 7,1, 40% содержание DO и температура 36,8 °C. Целевыми критериями были плотность культуры, равная $50–100\times10^6$ жизнеспособных клеток на 1 мл при жизнеспособности клеток >95%. Для питательных веществ и перфузата использовались мешки ReadyToProcess объемом 100 л. Для подачи питательных веществ и сбора клеток использовались трубки внутренним диаметром 3,2 мм.

КЛЕТОЧНЫЙ БАНК ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ

Суспензии клеток линии CHO для клеточных банков высокой плотности получали с использованием биореакторной системы ReadyToProcess WAVE 25, работающей в режиме перфузии. Общий объем среды перфузии за период культивирования составлял 20 л.

Для клеток линии CHO DG44 средняя удельная скорость роста составляла 0,838 сут$^{-1}$ (время удвоения ~19,9 ч). Клетки собирали после 6 суток культивирования при плотности культуры 55,8×10^6 жизнеспособных клеток на 1 мл и жизнеспособности клеток >95%.

Для клеток линии CHO-S средняя удельная скорость роста составляла 0,797 сут$^{-1}$ (время удвоения ~20,9 ч). Клетки линии CHO-S также собирали после 6 суток культивирования при плотности культуры 48,8×10^6 жизнеспособных клеток на 1 мл и жизнеспособности клеток >95%.

Результаты представлены на рисунке 3.

Для клеток линии CHO DG44 концентрация глюкозы постепенно снижалась от 6 г/л в начале культивирования до приблизительно 1 г/л на шестые сутки, когда культивирование прекращали. Концентрация лактата возрастала приблизительно до 1,5 г/л на третьи сутки, а затем оставалась относительно постоянной до конца периода культивирования. Для клеток линии CHO-S концентрации глюкозы и лактата в последние несколько суток культивирования оставались практически постоянными (2,5 г/л и 1,5 г/л соответственно). Результаты говорят о том, что скорость перфузии была достаточно высока, чтобы поддерживать концентрации питательных веществ и метаболитов на уровне, позволявшем клеткам оставаться в экспоненциальной

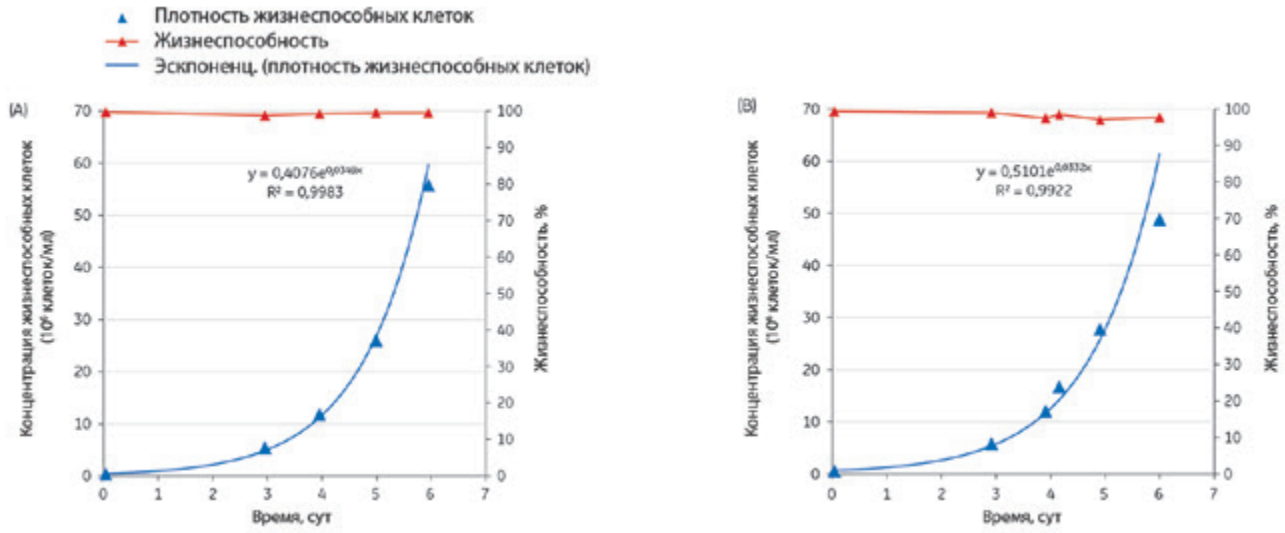


Рисунок 3. Банк клеток из клетки CHO DG44 (A) и клетки CHO-S (B) высокой плотности поколения

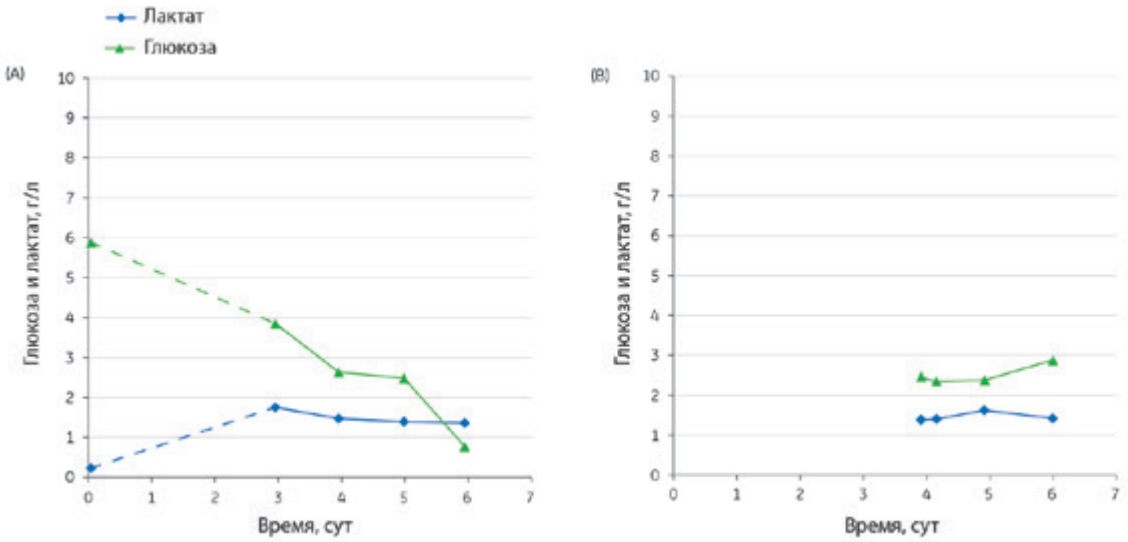


Рисунок 4. Концентрации глюкозы и лактата (A) в культуре клеток CHO DG44 и (B) для культуры клеток CHO-S

фазе роста на протяжении всего периода культивирования (рисунок 4).

Выращенной в биореакторе культуры объемом 2 л было достаточно для получения клеточных банков высокой плотности, состоящих из 400 флаконов по 4,5 мл, с концентрацией клеток, равной 50×10^6 клеток/мл. Все процедуры вплоть до розлива по аликвотам можно было проводить в биореакторе (рисунок 5). Отдельный этап центрифугирования не требовался. Клетки из полученных банков успешно восстанавливались после заморозки и при культивировании в колбах демонстрировали выживаемость >90% (рисунок 6), что близко к показателям для клеточных банков, полученных обычным методом.

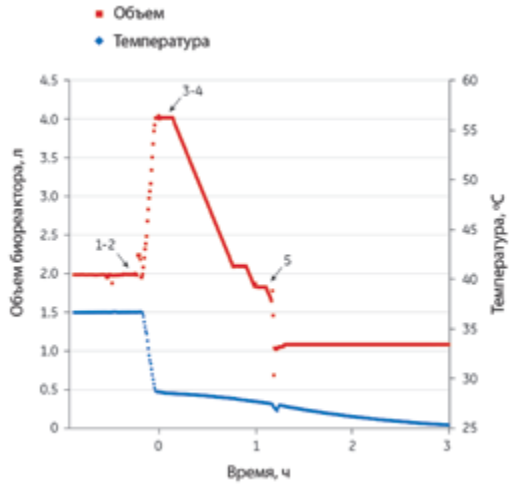


Рисунок 5. Получение клеточного банка. Перфузию и поддержание температуры прекращали при достижении ~ 50 × 10^6 клеток/мл, после чего культуру охлаждали (от 4 °C до 8 °C) и добавляли в соотношении 1:1 свежую среду, содержавшую 15% ДМСО (1, 2). Скорость перемешивания снижали с 20 до 15 об/мин и объем культуры вновь сокращали до первоначального объема (2 л), используя фильтр для удержания клеток (3, 4). Суспензию клеток отбирали из биореактора, разливали по криофлаконам аликвотами по 4,5 мл и замораживали (5)

ПРОЦЕСС ОДНОСТАДИЙНОГО НАРАЩИВАНИЯ ПОСЕВНОЙ КУЛЬТУРЫ

Один флакон клеточного банка высокой плотности (клетки линии CHO DG44) использовался для засева перфузионного биореактора Cellbag объемом 20 л при начальном объеме среды культивирования, равном 1 л. Затем объем культуры увеличивали до 10 л и начинали перфузию. Клетки оставались в фазе быстрого экспоненциального роста на протяжении всех 10 суток культивирования (рисунок 7).

Средняя удельная скорость роста составляла 0,853 $сут^{-1}$ (время удвоения ~ 19,5 ч). Общий объем среды перфузии за период культивирования составлял 90 л (рисунок 8). Клетки линии CHO DG44 собирали при плотности культуры $51,2\times10^6$ жизнеспособных клеток на 1 мл и жизнеспособности клеток >95%.

Биореакторная система ReadyToProcess WAVE 25 позволяла в реальном времени следить за параметрами культивирования и корректировать их (рисунок 9).

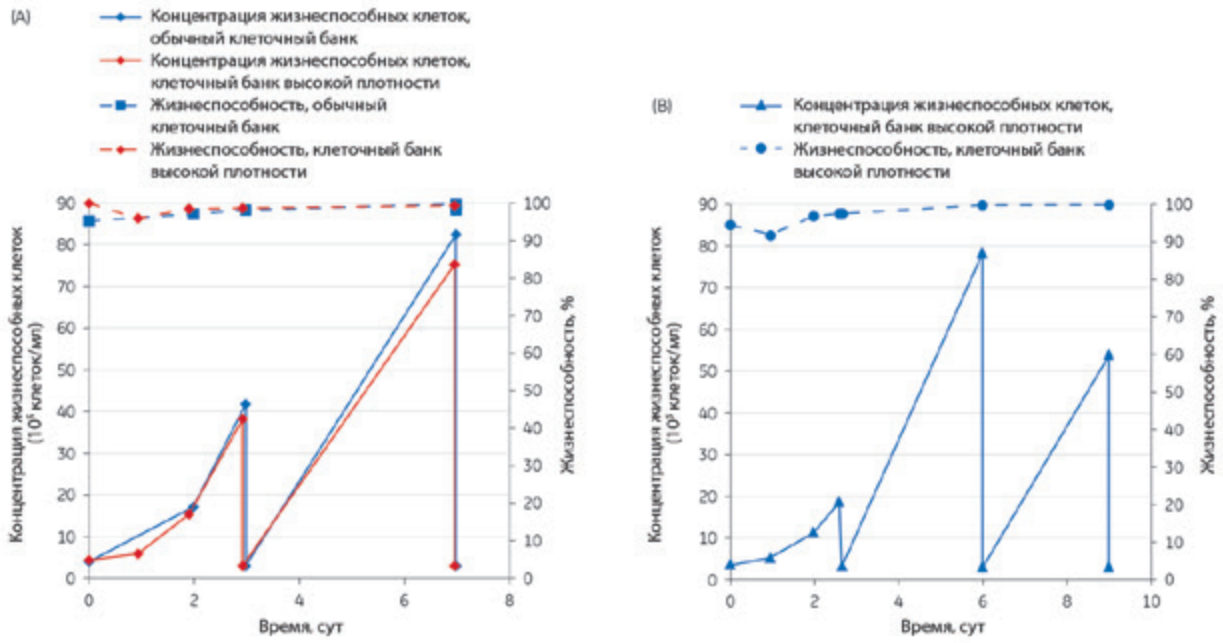


Рисунок 6. Клетки из клеточного банка высокой плотности восстанавливались после заморозки с жизнеспособностью (A) >95% для клеток линии CHO DG44 (пересевы на третьи и седьмые сутки) и (B) >90% для клеток линии CHO (пересевы на третьи, шестые и девятые сутки). Рост в колбах после восстановления был таким же, как и для клеточных банков, полученных стандартными методами

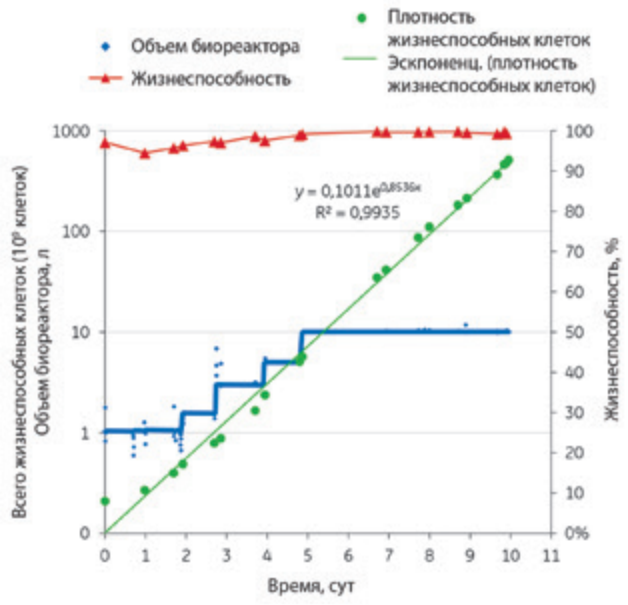


Рисунок 7. **Один шаг расширения посевной культуры из одного флакона клетки линии CHO DG44**

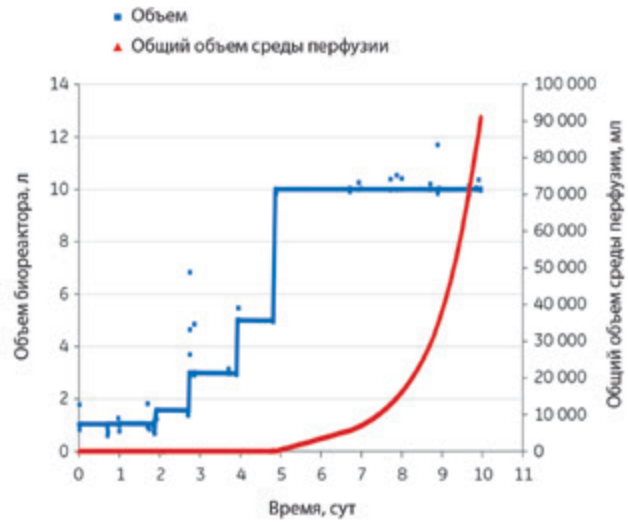


Рисунок 8. **Объем биореактора и орошаемая среда в течение периода культивирования**

Например, содержание растворенного кислорода в культуре держалось на постоянном уровне даже при высокой плотности клеток и большом рабочем объеме культуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье мы демонстрируем преимущества перфузионного культивирования при наращивании посевной культуры клеток от получения клеточных банков высокой плотности до самого процесса наращивания клеточной массы. Культивирование в перфузионном биореакторе со встроенным фильтром для удержания клеток дало возможность выращивать

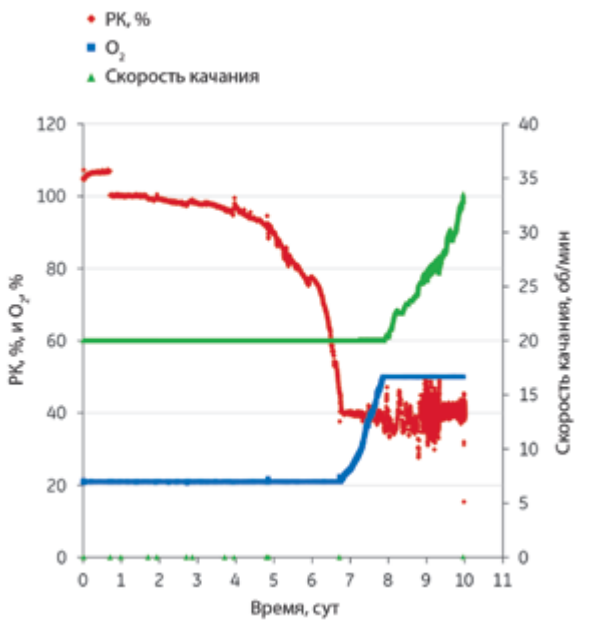


Рисунок 9. **Наблюдение за параметрами культивирования и их корректировка в реальном времени**

клетки для клеточного банка в единой замкнутой системе. Отдельного этапа центрифугирования для концентрирования клеток не требовалось. Полученный клеточный банк после разморозки демонстрировал высокую жизнеспособность клеток. Одного флакона клеток после криоконсервации было достаточно для засева напрямую 1 л культуры в биореакторе без необходимости предшествующего размножения клеток в колбах для культивирования. Использование перфузии на этапе культивирования в биореакторе позволило внедрить рентабельный одностадийный процесс наращивания посевной культуры клеток от криопробирки объемом 4,5 мл до культуры объемом 10 л плотностью 50×10^6 жизнеспособных клеток на 1 мл, занимающий всего 10 суток. Полученной плотности клеток достаточно, например, для засева производственного биореактора объемом 2000 л при начальном объеме 1700 л и плотности клеток $0{,}3\times10^6$ клеток/мл.

Описанный метод позволял культивировать клетки линии CHO до высокой плотности, тем самым упрощая получение клеточных банков и повышая рентабельность наращивания посевной культуры.

GE Healthcare

КАК ИЗБЕЖАТЬ ОШИБОК ВО ВРЕМЯ АВТОМАТИЧЕСКОГО ПОДСЧЕТА ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК ПРИ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТА

АВТОР

Т. Харрисон,

старший специалист
по маркетингу,
отдел по подсчету
и характеризации частиц
Beckman Coultet Life Sciences

АННОТАЦИЯ

Когда клетки используются для производства лекарств или проверки эффективности компонентов, входящих в состав фармакологической композиции, критически важными являются методики определения жизнеспособности и точной концентрации клеток, которые обладают хорошей воспроизводимостью. Автоматические счетчики выполняют указанные задачи по заложенной в них технологии и имеющемуся набору опций. От этих факторов зависит, насколько результаты подсчета будут отличаться от данных, полученных с помощью альтернативных автоматизированных систем и стандартной методики подсчета клеток вручную, когда применяется микроскоп и гемоцитометр. Человеческий фактор тоже имеет значение. Например, некоторые специалисты при подсчете концентрации клеток будут относить отдельные клетки к «жизнеспособным» только потому, что они больше определенного диаметра. Клетки с меньшим диаметром не будут приниматься в расчет, даже если другие характеристики будут указывать на их жизнеспособность. В этой статье будет приведен пример, как идентификация жизнеспособных клеток только по минимальному диаметру может изменить результат анализа концентрации клеток примерно на 33%. Также будет описано, как избежать распространенных ошибок на том этапе работы, когда новый автоматический метод подсчета клеток только вводится в практику.

ВВЕДЕНИЕ

Для получения терапевтического белка важно, чтобы концентрация клеток в биореакторе была правильной. Это необходимо как для обеспечения максимального выхода продукта, так и для предотвращения избыточной скученности, приводящей к программируемой гибели клеток (апоптозу). Для исследования эффективности лекарственных средств крайне важно обеспечить постоянство концентрации клеток в каждом тестируемом образце, чтобы результаты исследования не были подвержены влиянию потенциальной изменчивости жизнеспособности и концентрации клеток в образцах. В обоих случаях не существует «правильного» способа идентификации клеток. Специалистам нужно оптимизировать процесс подсчета клеток, полагаясь на свой опыт и выбранные методы подсчета. Некоторые считают клетки «жизнеспособными» только в том случае, если их диаметр превышает определенную величину. Клетки с меньшими диаметрами игнорируются, хотя их жизнеспособность подтверждается другими признаками. Далее в статье будет показано, как идентификация клеток только по минимальному диаметру может изменить результат анализа концентрации клеток примерно на 33%. Есть и другой пример, когда некоторые специалисты считают скопление клеток за одну клетку, в то время как в данной ситуации другие люди стараются подсчитать каждую отдельную клетку, входящую в скопление.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

При переходе на автоматический метод подсчета клеток важно учитывать, как автоматическая система отличает жизнеспособные экземпляры от нежизнеспособных и от клеточных дебрисов и как это отразится на ваших текущих процессах.

КАКОЙ ОТВЕТ ЯВЛЯЕТСЯ «ПРАВИЛЬНЫМ»?

Никакого «правильного» ответа не существует! Большинство людей следуют указаниям EP2.7.291 и USP<1046>2, где описывается процесс подсчета жизнеспособных клеток методом исключения красителей. Трипановый синий считается самым подходящим красителем. Наиболее распространенным является ручной способ подсчета клеток с использованием гемоцитометра и микроскопа. Но расхождение результатов, полученных разными людьми при ручном способе, заставляет отдавать предпочтение автоматическому методу подсчета. При этом важно, как счетчик идентифицирует и считает клетки, чтобы понять, каким образом использование автоматического метода подсчета может повлиять на процесс в целом в том случае, если существует разница в результатах ручного и автоматического подсчета.

ПРИЧИНЫ НЕПОСТОЯНСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИ РУЧНОМ СПОСОБЕ ПОДСЧЕТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕМОЦИТОМЕТРА

Ручной способ подсчета с использованием гемоцитометра подразумевает выполнение нескольких шагов. Расхождение полученных результатов может появится на каждом из этих этапов, что необходимо учитывать при переходе к автоматическому методу подсчета:

1. Точное пипетирование.
2. Циклы аспирации.
3. Количество красителя.
4. Циклы смешивания красителя.
5. Размер клеток.
6. Скопления.

Точное пипетирование имеет решающее значение. Объем счетных слайдов гемоцитометра обычно составляет 1 нл. Чтобы определить концентрацию жизнеспособных клеток на миллилитр и перевести нанолитры в миллилитры, количество клеток, подсчитанных через микроскоп, умножают на коэффициент 100 000. Поэтому при расчете концентрации клеток на миллилитр любые мелкие ошибки, допущенные в объеме пипетки, как и количество клеток, распределенных на предметном стекле, также многократно возрастают.



Рисунок 1. Метод исключения красителя по EP2.7.29 и USP<1046>

Для повторного суспендирования клеток и «разбивания» скоплений обычно используется аспирация. Однако методы могут меняться в зависимости от предпочтений специалистов. Кроме того, некоторые жизнеспособные клетки бывают особенно хрупкими, и чрезмерная аспирация может фактически разрушить их мембраны. Тогда краситель попадает внутрь, и жизнеспособная клетка будет определена как погибшая.

Неправильный объем добавляемого красителя влияет на точность вычисления итоговой концентрации клеток точно так же, как и изменение объема суспензии в результате неточного пипетирования тестируемого образца, поскольку краситель одновременно является для него и разбавителем. В то же время изменение концентрации красителя может повлиять на степень пенетрации красителя в мертвые и умирающие клетки.

На глубину проникновения красителя в умирающие и уже погибшие клетки может также влиять количество циклов смешивания. Для того чтобы краситель проник в мертвые клетки, требуется время. Вариативность в циклах смешивания означает, что клетки подвергаются воздействию красителя в течение различных отрезков времени.

В тех случаях, когда общее состояние жизнеспособных клеток оказывает большое влияние либо на процесс фармакологических исследований, либо на выход терапевтических белков, многие специалисты будут считать клетки жизнеспособными только тогда, когда они будут превышать некоторый заданный размер. Таким образом, при определении жизнеспособности клеток исключение красителей, как правило, не является единственным критерием.

Наконец, некоторые специалисты пытаются идентифицировать и подсчитать каждую отдельную клетку в скоплении, тогда как другие могут принять скопление клеток за одну клетку и провести подсчет соответственным образом. Разный подход к подсчету клеток при ручном способе может в итоге оказать большое влияние на результат, когда при определении концентрации клеток потребуется переводить одни единицы измерения в другие – нанолитры в миллилитры. Эффект от этого становится особенно заметным по мере увеличения концентрации клеток/мл в биореакторе. При этом клетки, как правило, чаще образуют скопления.

КАК ИЗБЕЖАТЬ ТИПИЧНЫХ ОШИБОК

Как было сказано, небольшие изменения в ручном способе подсчета клеток, при котором используется гемоцитометр, могут приводить к большому разбросу результатов при расчете концентрации жизнеспособных клеток на миллилитр. Только по этой причине многие специалисты, занимающиеся подсчетом клеток, переходят на автоматизированный подсчет клеток. С помощью этого метода можно добиться более воспроизводимых результатов, что, в свою очередь, дает возможность лучше контролировать выход продукта или следить за ходом фармакологических экспериментов.

Однако и при автоматизированном подсчете могут наблюдаться некоторые распространенные ошибки. На автоматическом счетчике должна быть возможность корректировки настроек, чтобы можно было идентифицировать количество жизнеспособных клеток точно так же, как и при использовании гемоцитометра и микроскопа. Также счетчик-автомат должен иметь целый набор опций для настройки, если он используется для замены какой-либо другой автоматизированной системы подсчета. То есть счетчик должен оперировать такими же параметрами для идентификации числа жизнеспособных клеток, как и другая автоматизированная система подсчета, для замены которой он предназначен. Если в новом автоматическом счетчике недостаточно настроек для эффективного подсчета клеток, он будет выдавать результаты, отличающиеся от результатов предыдущих подсчетов, проводившихся с этим же образцом клеток, но с использованием другого метода. Данный фактор может повлиять на результаты фармакологических исследований или на выход продукта.

На рисунке 2, представленном ниже, автоматический счетчик клеток использует визуализацию и ряд настраиваемых пользователем параметров, чтобы определить, какие клетки являются жизнеспособными, а какие нет. Устройство позволяет пользователю просматривать каждое сделанное изображение (в данном случае анализатор настроен на получение 50 изображений и усреднение результатов). Счетчик проводит анализ, делает изображение, на котором обводит клетки, которые он идентифицировал как жизнеспособные, зеленым цветом. Нежизнеспособные клетки он обводит красным.

В правой части скриншота можно заметить, что счетчик также подсчитывает общее количество клеток/мл и общее количество жизнеспособных клеток/мл как для просматриваемого в данный момент изображения, так и в среднем по всем сделанным изображениям. В идеале автоматический счетчик должен иметь широкий диапазон настроек для работы со следующими параметрами:

a) минимальный диаметр клетки;

b) максимальный диаметр клетки;

c) яркость клетки;

d) четкость контура клетки;

e) площадь пятна жизнеспособной клетки / размер;

f) округлость клетки;

g) степень декластеризации клетки.

Параметры a и b позволяют пользователю задавать тот размер клеток, который, как правило, имеют жизнеспособные экземпляры.

Ниже на рисунке 3 даны изображения клеток, в процессе анализа которых главным критерием отбора жизнеспособных экземпляров был минимальный диаметр, равный 6 микронам.

На рисунке 3 показано, что при настройке минимального диаметра на величину 6 микрон счетчик производит подсчет мелких клеток точно так же, как и в предыдущем случае, когда клетки обводились цветными кружками. Диаметр одной из них равен всего

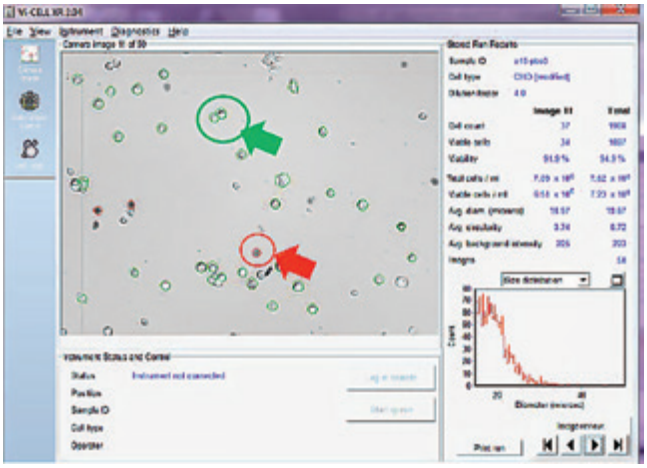


Рисунок 2. Жизнеспособные клетки обведены зеленым кружком, нежизнеспособные – красным

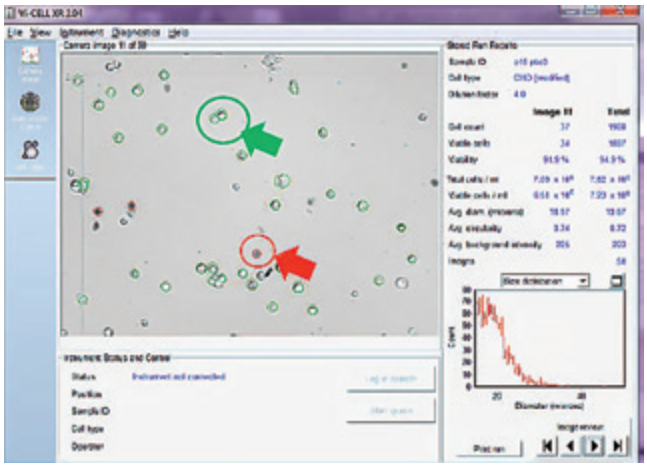


Рисунок 3. Минимальный диаметр жизнеспособной клетки, размер настроен на 6 микрон

8,10 микрона. С помощью данной настройки счетчик определил среднее значение по 50 изображениям, оно составило 10,73x10^6 жизнеспособных клеток/мл.

Если минимальный диаметр будет установлен на значение 15 микрон, счетчик будет индентифицировать в качестве жизнеспособных и подсчитывать общее количество более крупных клеток. Если провести повторный автоматический анализ и подсчет с новыми настройками, используя все те же полученные в ходе предыдущего раза изображения, счетчик выдаст в качестве результата новую величину концентрации клеток на миллилитр. И эти данные будут сильно отличаться от уже имеющегося результата (рисунок 4).

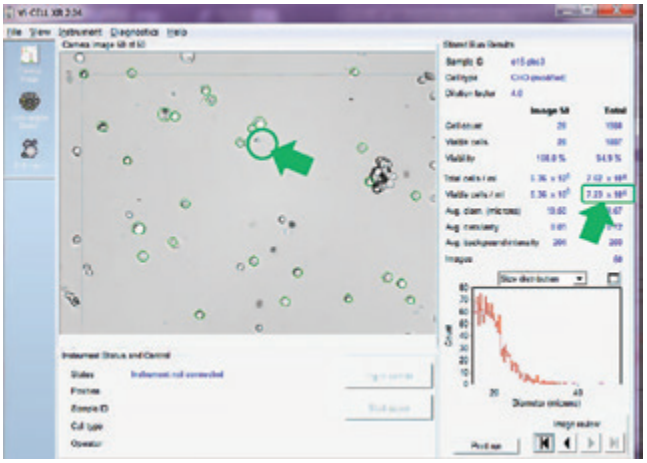


Рисунок 4. Повторный анализ тех же самых изображений с новой настройкой минимального диаметра жизнеспособной клетки

При сравнении рисунка 4 с рисунком 3 можно заметить, что на изображении № 50 счетчик больше не идентифицировал более мелкую клетку как жизнеспособную (она не обведена зеленым цветом). Общее количество клеток, зафиксированных в одном и том же наборе изображений и считающихся жизнеспособными, сократилось. Следовательно, уменьшилась среднерасчетная концентрация жизнеспособных клеток, выведенная для всех 50 изображений. Со значения 10,73×10^6 жизнеспособных клеток/мл, указанного на рисунке 3, она упала до 7,23x10^6 жизнеспособных клеток/мл, указанных на рисунке 4. Разница между этими значениями составила 3,5×10^6 жизнеспособных клеток/мл, или почти 33%.

Параметры c, d и e используются для настройки характеристик, по которым счетчик-автомат будет определять жизнеспособность клетки, т.е. следует ли считать более темную клетку жизнеспособной или нет и т. д.

Округлость клетки, опция f, помогает счетчику отличать клетки с присутствующими в них дебрисами от нормальных жизнеспособных клеток. Однако эту настройку следует использовать с осторожностью, так как не все существующие типы клеток имеют от природы сферическую форму.

И наконец, параметр g позволяет настроить счетчик так, чтобы он подсчитывал отдельные клетки в скоплении или кластере при расчете общего количества клеток в миллилитре или же считал все скопления в целом за одну клетку.

Ниже, на рисунке 5, счетчик настроен так, чтобы подсчитывать каждую клетку, находящуюся в скоплении, как отдельную клетку. Можно заметить, что при этой настройке концентрация жизнеспособных клеток равна 10,53x10^6 клеток/мл.

Можно увидеть, что в скоплении клеток, расположенном в верхнем левом углу изображения, каждая отдельная клетка обведена зеленым цветом и добавлена к общему количеству жизнеспособных клеток.

Если настроить счетчик так, что скопление жизнеспособных клеток будет принято за одну единственную клетку, а затем запустить на устройстве повторный анализ того же самого набора изображений, ответ будет другим (рисунок 6).

Очевидно, данный факт зависит от количества клеточных скоплений, присутствующих в образце, но в примере, приведенном выше, такой способ подсчета клеток, находящихся в составе скоплений, уменьшает суммарную концентрацию жизнеспособных клеток с 10,53x10^6 клеток/мл на рисунке 5 всего лишь до 8,85x10^6 клеток/мл на рисунке 6. Количество клеток уменьшилось примерно на 16%. Эта настройка приобретает еще большее значение по мере увеличения концентрации жизнеспособных клеток. Клетки естественным образом становятся более «скученными» и образуют больше скоплений.

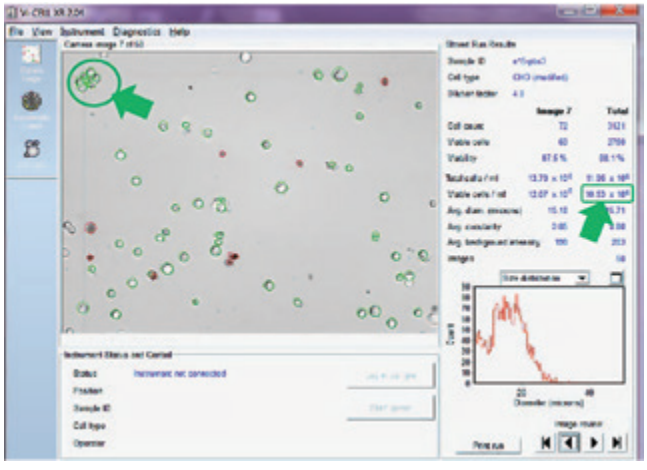


Рисунок 5. Счетчик, настроенный для подсчета отдельных клеток в скоплениях размером до 15 микрон

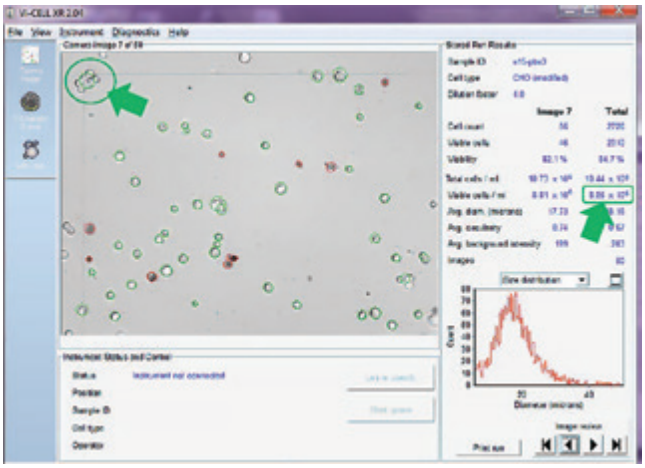


Рисунок 6. Счетчик, настроенный для подсчета клеток в скоплениях, рассматриваемых как одна единственная клетка

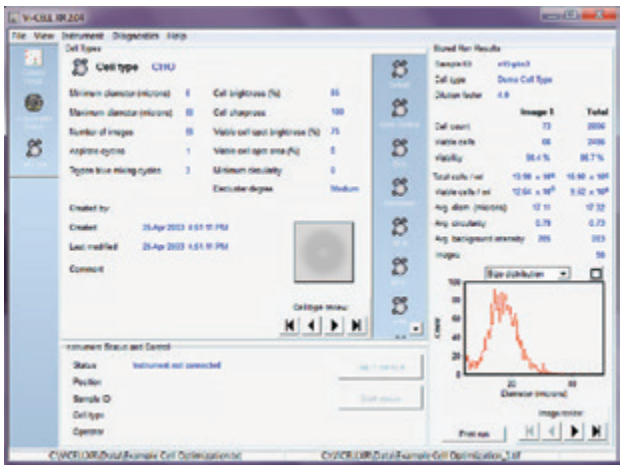


Рисунок 7. Стандартные конфигурации доступны в широко используемом счетчике жизнеспособности клеток

Комбинация настроек автоматического счетчика от a до g позволяет пользователю настроить способ подсчета клеток, который будет использоваться автоматическим устройством. Таким образом, устройство будет более точно имитировать ручной способ подсчета клеток, при котором используется микроскоп, или получить результаты подсчета, максимально похожие на те, что показывал использовавшийся ранее счетчик, на замену которому было выбрано новое автоматическое устройство.

СТАНДАРТНЫЕ КОНФИГУРАЦИИ ДЛЯ РАБОТЫ С НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫМИ ТИПАМИ КЛЕТОК

Для неопытного пользователя настройка конфигурации автоматического счетчика с целью корректной идентификации жизнеспособных клеток может оказаться сложной задачей. По этой причине счетчик обычно поставляется с заводскими настройками, то есть он уже имеет набор стандартных конфигураций, предназначенных для работы с наиболее часто использующимися типами клеток, например клетками яичника китайского хомячка (CHO). На рисунке 7 показаны имеющиеся в автоматическом счетчике стандартные конфигурации с заранее заданными значениями.

Как правило, пользователи выбирают в меню счетчика готовую конфигурацию для наиболее подходящего типа клеток, а затем корректируют настройки, чтобы результаты более точно соответствовали привычному способу подсчета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При выборе автоматического счетчика клеток необходимо обращать внимание на то, каким набором опций он располагает. Если у устройства много опций для настроек различных параметров, значит, можно будет настраивать его так, чтобы получать результаты подсчета и концентрации клеток наиболее приближенными к ручному способу подсчета, при котором используется микроскоп и гемоцитометр, или к результатам, которые давал альтернативный счетчик-автомат. Также важно иметь возможность поочередно просматривать результаты подсчета для каждого из изображений, выводимых на экран, и видеть, какие клетки счетчик идентифицирует как жизнеспособные. Это помогает пользователю определить, какие параметры следует откорректировать. После корректировки параметров проводят повторный анализ и подсчет жизнеспособных клеток по сделанным ранее изображениям, но с применением новых настроек. Это огромное преимущество в работе счетчика, так как оно позволяет получать результаты, максимально приближенные к старой методике подсчета.

ЛИТЕРАТУРА

1. EP 2.7.29. Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare / European Pharmacopoeia. – Strasbourg.
2. USP<1046>. US Pharmacopeia Convention / United States Pharmacopoeia. – Rockville.
3. S. Louis, Andre C. Siegel, Gary A. Levy. Comparison of Manual versus Automated Trypan Blue Dye Exclusion Method for Cell Counting // Industrial BioDevelopment Laboratory. – Toronto. 2016. № 3. P. 48–57.
4. International Society for Pharmaceutical Engineering, T*he ISPE Good Practice Guide: Ozone Sanitization of Pharmaceutical Water Systems*, First edition July 2012. URL: http://www.ispe.org/ispe-good-practice-guides/ozone-sanitization-pharmaceutical-water-systems [14th August 2014]. (дата обращения 10.0.4.2016).
5. Pharmaceutical and Healthcare Sciences Society, *Best Practice for Particle Monitoring in Pharmaceutical Facilities* // PHSS Technical Monograph. 2008. № 16. P. 44–73.

АНАЛИЗ ЧАСТИЦ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ СОСТАВОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ IMAGESTREAMX® С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ

АВТОРЫ

К. Пробст,
Б. Холл,
Д. Басиджи,

Amnis part of EMD Millipore,
645 Elliott Ave W, Suite 100, Seattle,
WA 98119, USA – США



АННОТАЦИЯ

Формирование белковых агрегатов (РА) и других субвидимых частиц в составе препаратов является одной из основных проблем фармацевтики, поскольку они могут влиять на активность препарата или вызывать нежелательную иммуногенность у пациентов [1]. Важно контролировать присутствие агрегатов в лекарствах, это вопрос их безопасности и эффективности, особенно потому, что на их формирование могут оказывать влияние условия производства и хранения. В настоящее время фармацевтический регламент США и Европы требует тестирования субвидимых (>10 мкм) и видимых (>25 мкм) частиц. В новых документах также подчеркивается важность измерения частиц размером от 1 до 10 мкм [2]. Другим требованием является классификация типов частиц, поскольку множественные контаминанты, включая капельки силиконового масла и бактерии, могут присутствовать в этом диапазоне. Ни один из методов не способен обеспечить одновременное определение размеров, подсчет и классификацию частиц в пределах 1–100 мкм, что подтверждает необходимость разработки новых подходов для этого применения [3].

В этом исследовании была выполнена оценка проточного цитометра Amnis ImageStreamX MKII® (ISX) на предмет удовлетворения выше перечисленным критериям, а также пригодность для характеризации частиц, входящих в состав терапевтических белков. Основным преимуществом ISX является связь проточной цитометрии с микроскопией, которая позволяет классифицировать типы частиц с использованием специфических флуоресцентных пятен и проводить количественные измерения морфологических свойств, таких как размер, получаемый с изображений. Хотя традици-

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

онная проточная цитометрия применялась для этой цели [4] и ранее, в сравнении с проточной цитометрией, имеющей опцию визуализации, она ограничена в возможностях, поскольку не позволяет напрямую определять размер частиц, имеет меньшую чувствительность при обнаружении малых и полупрозрачных частиц и не позволяет измерять такие морфологические параметры, как форма и контрастность. В этом исследовании в качестве модели системы PA были использованы белковые стандарты Enzo Life Sciences ProteoStat® Protein Aggregation. Стандарты ProteoStat® доступны на коммерческой основе и являются полезным инструментом для измерения линейности и чувствительности с помощью ISX при анализе PA. Также метод количественной оценки ProteoStat® Protein Aggregation был использован при исследовании меченого флуоресценстно красителя PA высокой специфичности. Образец ProteoStat® Protein Aggregation также использовался для FL-маркировки PA. Этот анализ, проводимый по протоколу «смешивание и считывание», обеспечивает высокую избирательность для PA, используя FL-зонд, дающий 20-90X увеличение яркости при связывании с четвертичной структурой «кросс-бета» агрегированных белков. Так как микрокапли силиконового масла – это загрязнитель для аппликаций PA, была оценена способность ISX дифференцировать этот загрязнитель, используя FL-краситель Bodipy. Исследование выявило преимущества ISX при выполнении анализа PA по сравнению с базовыми системами, включая (i) прямое измерение размера частиц и других морфологических характеристик посредством количественного анализа изображений, (ii) классификация множественных типов частиц путем включения дополнительных FL-пятен, (iii) сбор статистически робастных данных, полученных путем быстрого сбора изображений, (iv) измерение абсолютных концентраций частиц с использованием объемного поршневого насоса, (v) объем самого минимального по размеру образца должен составлять 20 мкл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:

Пробоподготовка

Образцы, содержащие только IgG

Белковые стандарты ProteoStat® Protein Aggregation Standards (Enzo-51039) были восстановлены в фильтрованной деионизированной воде до конечных концентраций 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,20% и 0% агрегированного IgG (общая концентрация белка зафиксирована на уровне 1 мг/мл). На образцах была сделана FL-маркировка с использованием ProteoStat Aggregation Assay® (Enzo-51023) в соответствии с протоколом производителя.

Смешанные пробы IgG и силиконового масла

Раствор, содержащий микрокапельки силиконового масла (SiOil), получали смешиванием 100 мкл силиконового масла с 50 мл воды. Компоненты энергично перемешивали в течение 1 мин. Образцы PA/SiOil готовили смешиванием равных объемов SiOil и 0,39% растворов PA. Образцы инкубировали с реагентом ProteoStat® Detection Reagent и красителем Bodipy (конечная концентрация 1 мкм) в течение 15 мин, чтобы сделать флуоресцентные метки на PA и SiOil.

Сбор и анализ данных

ImageStreamX-MKII® использовался для сбора цитометрических данных посредством визуализации потока для каждого образца. Было задано увеличение 60x (разрешение 0,33 мкм пикселей). Для возбуждения флуоресценции Bodipy и ProteoStat использовался возбуждающий лазер 488 нм (200 мВт). Изображения в светлом поле собирались с помощью светодиодного BF-осветителя. Измерение бокового рассеяния (SSC) проводилось с выделенным 785 нм лазером (20 мВт). Число событий на образец – 50 000 для эксперимента только IgG и 2000 для смешанного эксперимента IgG и SiOil. Анализ изображений был завершен путем использования алгоритмов количественного анализа изображений, имеющихся в комплексе ПО IDEAS 6.0. События калибровки SpeedBead® Calibration были удалены из анализа, распознавание проводилось с помощью прямого светорассеяния, а вырезанные объекты были удалены функцией Raw Centroid X. Процент объемного дозирования рассчитывался путем умножения концентрации частиц по среднему диаметру частиц BF с использованием корректного конвертирования единиц. Для измерения абсолютной флуоресценции проб использовали флуоресцентный планшетридер (Infinite 200 Pro-Tecan).

ImageStreamX-MKII® (рисунок 1) – это поточный цитометр с визуализацией, который анализирует изображения в светлом и темном поле (SSC), а также считывает FL-изображения со скоростью до 5000 событий в секунду. По 12 изображений на одно событие в образце выполняются с увеличением 20x, 40x или 60x и могут быть проанализированы с помощью ПО для анализа изображений IDEAS. Программа отличается интуитивно понятным интерфейсом, проста в использовании и позволяет создавать точечные диаграммы и гистограммы не только интенсивности флуоресценции, но и морфологии. Затем можно кликнуть по точке и увидеть изображение каждой клетки, чтобы визуально проверить регионы и отличить истинные события от дебрисов, отдельных клеток или других морфологий. ImageStreamX MKII также позволяет собирать файлы FCS, которые можно анализировать используя сторонние программы.

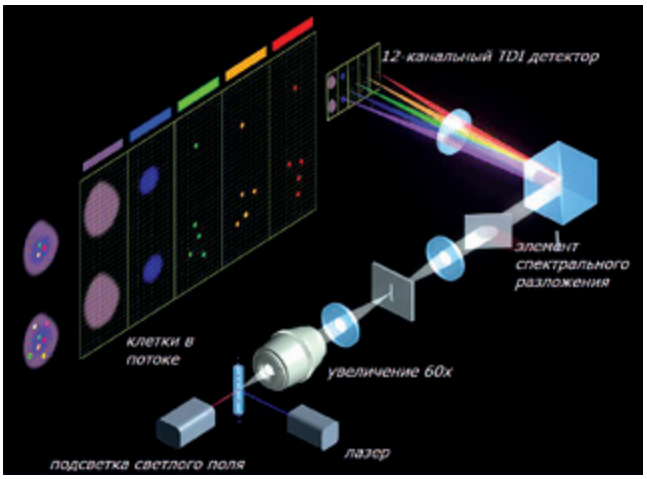


Рисунок 1. Конфигурация прибора ImageStreamX MKII®

На рисунках 2–5 представлены сравнительные характеристики, полученные при количественном определении белкового агрегата с использованием реагента обнаружения ProteoStat® путем детектирования светлого поля.

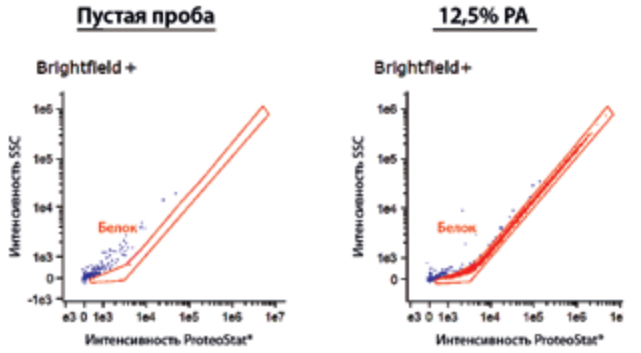


Рисунок 2. Двухмерные гистограммы интенсивности для ProteoStat® и каналов SSC, использующих родительскую популяцию BF +, показаны для холостой пробы и для 12,5% стандарта PA; белковая область использовалась для идентификации событий PA, которые относятся к ProteoStat®+

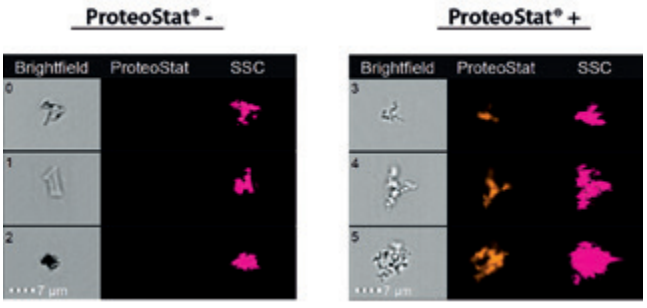


Рисунок 3. Репрезентативные изображения положительных и отрицательных событий ProteoStat®, собранных на ISX

На рисунках 6–9 приведены данные распределения размера белковог агрегата.



Рисунок 4. Количественные концентрации PA для каждого стандарта показаны для методов обнаружения BF и FL (ProteoStat® +). Концентрации PA, измеренные на ISX, первоначально коррелируют с процентом агрегированного белка и затем снижаются. Заметьте, что более высокие количества измеряются для холостого образца с использованием BF по сравнению с FL

Сигнал: Коэффициент шума

	Холостая проба	0,0%	0,2%	0,4%	0,8%	1,6%	3,1%	6,3%	12,5%
BF	1	1,4	1,9	3,7	3,0	4,4	5,3	3,8	4,1
FL	1	362	880	4165	3675	7249	9386	6200	7092

Рисунок. 5. Соотношение сигнал-шум (S/N) для каждого стандарта построены и для BF-обнаружения и для FL-обнаружения. Коэффициент сигнал/шум рассчитывается путем деления концентрации частиц пробы с образцом на концентрацию частиц холостой пробы. Более слабый фон для FL-обнаружения по сравнению с результатами BF, приводит к значительно более высокому значению S/N

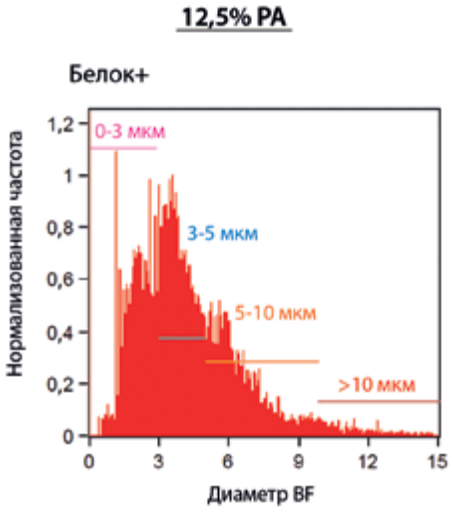


Рисунок 6. Гистограмма, выделяющая диаметр BF из популяции PA; регионы используются для идентификации PA в диапазоне размеров 0–3, 3–5, 5–10 и 10–100

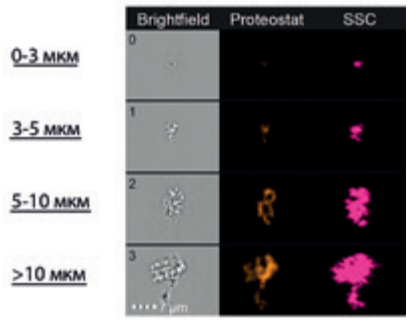


Рисунок 7. Репрезентативные изображения событий PA в каждом диапазоне размеров, собранные на ISX

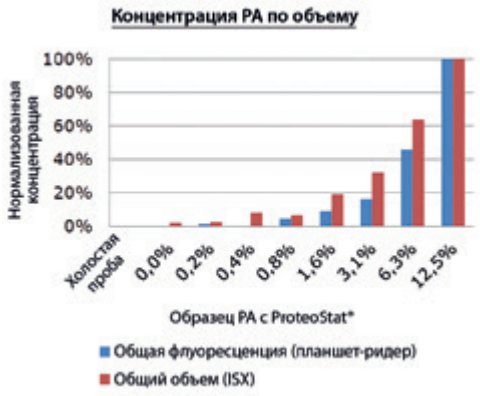


Рисунок 9. Сравнение измерений абсолютной концентрации PA с использованием ISX и флуоресцентного планшетного ридера. Значения нормализуются к одному. Процентный объем, измеренный на ISX, хорошо коррелирует со значениями общей флуоресценции, измеренной на планшете-ридере

Результаты многократного определения капелек силиконового масла (SiOil) с флуоресцентным красителем BODIPY приведены на рисунках 10–12.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из-за отсутствия подходящих аналитических методов характеризация частиц остается серьезной проблемой фармацевтической отрасли. Данное исследование оценивало способность ImageStreamX® преодолевать ограничения существующих технологий. Было установлено, что белковые стандарты ProteoStat® Protein Aggregation Standards являются

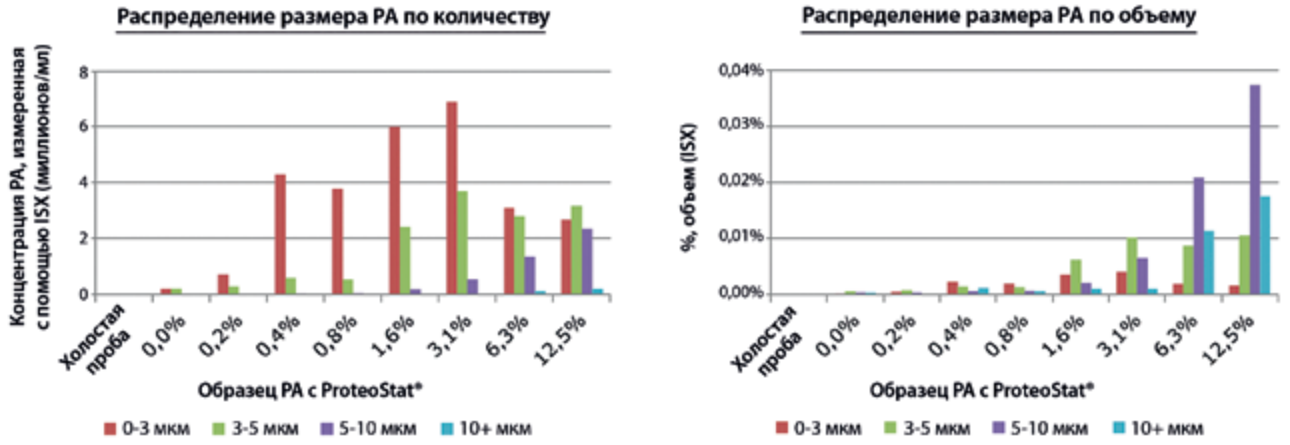


Рисунок 8. Распределения количества и объема 0–3, 3–5, 5–10, и 10–100 PA. Следует иметь в виду тот факт, что у образцов с более высокой концентрацией PA наблюдается более высокое содержание более крупных агрегатов (>5 мкм), что существенно влияет на объем в каждом диапазоне распределения частиц

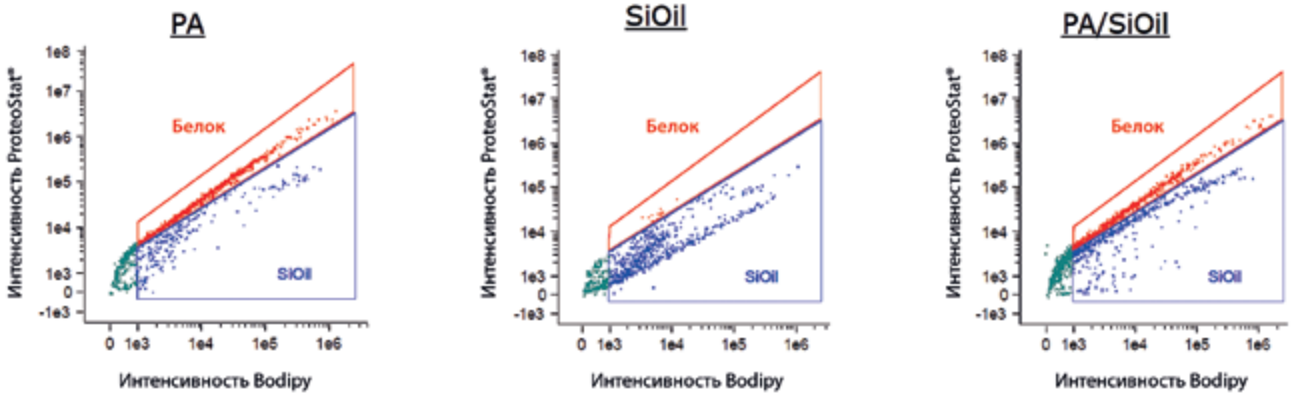


Рисунок 10. Двухмерные графики интенсивности каналов Bodipy против каналов ProteoStat® для образцов, содержащих SiOil, PA и SiOil /PA. Регионы отображены с целью идентификации популяций PA (белка) и SiOil

Анализ изображений по методу светлого поля

	Белковые агрегаты (PA)			Silicone Oil		
Параметры						
Диаметр	2,379	4,546	9,138	2,865	3,982	5,186
Округлость	7,112	3,172	4,29	8,827	12,7	14,56
Контрастность	5,073	5,874	10,12	6,799	36,25	34,91

Рисунок 11. Сравнение параметров светлого поля (BF), имеющих отношение к дискриминации белка (PA) и силиконового масла (SiOil), сделанное на основе изображений. Округлость – это показатель того, насколько изменяется радиус объекта; круглые объекты будут иметь высокие значения округлости, а объекты неправильной формы будут иметь более низкие значения округлости. Контрастность отображает изменчивость интенсивности в пикселях внутри объекта. Полупрозрачные объекты будут иметь низкие значения контрастности, а непрозрачные объекты будут отличаться высокой контрастностью. Обратите внимание, что параметры (BF) контрастности и округлости увеличиваются с размером частицы. Малые частицы белкового агрегата (PA) и SiOil (0–3 мкм) практически не отличаются, но все еще при BF различимы с помощью флуоресценции (FL)

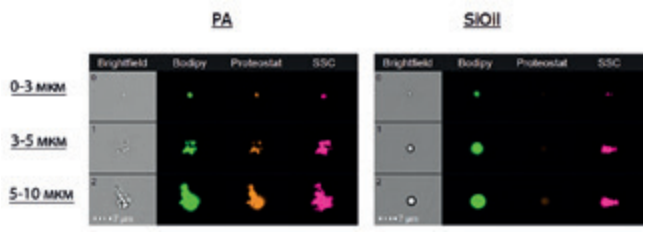


Рисунок 12. Репрезентативные изображения частиц SiOil и PA, отображающие каналы флуоресценции для Bodipy и Proteostat®, сделанные с помощью ISX

полезным инструментом для оценки чувствительности и линейности ISX, необходимых для измерения PA. Образец ProteoStat® Protein Aggregation создает условия для высокоспецифичного FL-окрашивания PA. В ходе эксперимента было установлено, что чувствительность прибора ISX при обнаружении PA составляет менее 0,2%, также были получены номинальные значения для холостой пробы. Размерный анализ для PA с различной концентрацией дает четкое представление о взаимосвязи между подсчетом частиц, распределением по количеству и объему. Способность мультиплексировать классификацию частиц была продемонстрирована при использовании микрокапель силиконового масла и пятна флуоресценции Bodipy. Проточный цитометр ImageStreamX MKII имеет ряд преимуществ по сравнению с принятыми в настоящее время отраслевыми стандартами характеризации частиц: (i) непосредственное измерение размера частиц от субмикронов до 100 микронов, (ii) классификация частиц с использованием флуоресценции или фильтрации изображений, (iii) количественное измерение потенциально релевантных морфологических свойств, таких как форма или текстура, (iv) измерения абсолютной концентрации и (v) небольшой объем пробы – 20 мкл.

ЛИТЕРАТУРА

1. AS. Rosenberg. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective // The AAPS journal. 2006. № 8(3). E501–E507.
2. J.F. Carpenter et al. Overlooking subvisible particles in therapeutic protein products: gaps that may compromise product quality // Journal of pharmaceutical sciences. 2009. № 98(4). P. 1201–1205.
3. B. Demeule et al. Characterization of particles in protein solutions: reaching the limits of current technologies // The AAPS journal. 2010. № 12(4). P. 708–715.
4. K. Tian et al. Rapid Detection and Characterization of Protein Aggregates by Flow Cytometry // Enzo life sciences. 2010. № 27(4). P. 325–330.
5. D.K. Sharma et al. Micro-flow imaging: flow microscopy applied to sub-visible particulate analysis in protein formulations // The AAPS journal. 2010. № 12(3). P. 455–464.
6. B. Demeule, R. Gurny, and T, Arvinte. Detection and characterization of protein aggregates by fluorescence microscopy // International journal of pharmaceutics. 2007. № 329(1). P. 37–45.
7. Ph. Greenspan and S.D. Fowler. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, NR // Journal of lipid research. 1985. № 26(7). P. 781–789.

INFORS HT

КОНТРОЛЬ КОНЦЕНТРАЦИИ АЦЕТАТА ВО ВРЕМЯ HCD-КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ СПЕКТРОСКОПИИ В СРЕДНЕЙ ИК-ОБЛАСТИ

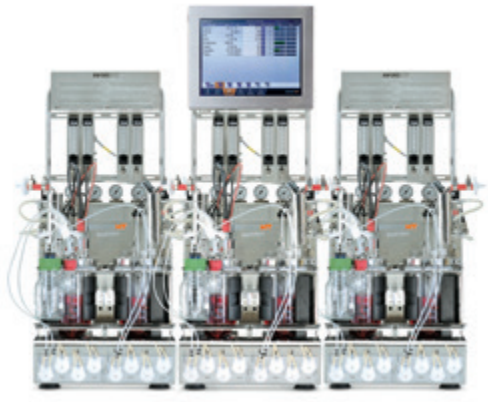
АВТОРЫ

Р. Мазух,
Дж. Хоффман,
А. Вольф,
А. Штайнкемпер,
Р. Бинер,

Факультет естественных наук,
Университет прикладных наук
Эсслингена

ВВЕДЕНИЕ

Технология культивирования при высокой плотности клеток (HCDC) – это эффективный способ получения рекомбинантных белков в *Escherichia coli*. Высокая плотность клеток может быть достигнута при условии, если образование ингибирующих рост побочных продуктов, таких как ацетат, сведено к минимуму. Причиной появления ацетата служит избыточный метаболизм, когда концентрация ограничивающего углеродсодержащего субстрата (например, глюкозы) превышает критическое значение. Описание стратегий культивирования с высокой плотностью клеток (HCDC) можно найти в литературе. В течение длительного времени не представлялось возможным напрямую измерять концентрацию ацетата ввиду отсутствия систем онлайн-анализа ацетата. Эту проблему удалось решить путем использования метода MIR-спектроскопии, позволяющего производить мониторинг параметров процесса в режиме реального времени. В данной методике рассматривается принципиально новый подход с применением ИК-спектроскопии в среднем диапазоне для мониторинга параметров процесса культивирования, таких как концентрация ацетата. Данный метод использовался для контроля концентрации ацетата при периодическом культивировании рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцирующего зеленый флуоресцентный белок (GFP), в биореакторе Multifors 2.



ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ MULTIFORS 2

- 4 сосуда общим объемом 1,4 л.
- Сенсорный дисплей.
- Аэрация – O_2 и воздух с использованием контроллеров массового расхода.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

- Охладитель отходящих газов.
- Каждый сосуд оснащен 4 перистальтическими насосами с автоклавируемыми головками.
- Контроль температуры (нагрев и охлаждение) осуществляется с помощью термоблока.
- Контроль за показателями pO_2 и pH.
- Запись онлайн-параметров осуществляется с помощью программного обеспечения eve®.
- Опционально – пеногашение / регулирование уровня пены.

ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм

Штамм *Escherichia coli* K12 TB1 *(F-ara Δ(lac-proAB) [Φ80dlacΔ(lacZ) M15] rpsL (Str^R) thi hsdR)* (New England Biolabs GmbH, Франкфурт), несущий плазмиду pGLO (Bio-Rad Laboratories GmbH, Мюнхен), использовался для культивирования. Для индукции экспрессии GFP использовалась 0,2% арабиноза.

Среда роста и подготовка биореактора

Клетки предварительно культивировали в 2000 мл качалочных колбах, наполненных 500 мл среды с определенным химическим составом. Колбы инкубировали в шейкере в течение 24 ч при температуре 37 °C. Описание состава среды и штамма было представлено в работе Бинера и соавторов (2010) (Biener et al).

Температуру в биореакторе поддерживали на уровне 37 °C. Уровень pH=7,0 регулировали с помощью аммиачной воды и фосфорной кислоты. При необходимости осуществляли пеногашение. Параметр pO_2 контролировался алгоритмом Matlab таким образом, чтобы значение pO_2 всегда было выше 25% точки насыщения воздуха (рисунок 2). Управляемыми переменными являются скорость мешалки, расход воздуха и O_2. Самонастраивающийся контроллер для концентрации ацетата также был реализован в системе Matlab. Скорость подпитки, рассчитанная алгоритмом управления, контролировалась гравиметрически. Обработка сигналов, которыми обмениваются Matlab и сенсорный контроллер Multifors 2, производится через интерфейс OPC XML DA. Для связи с анализатором MIR использовался веб-интерфейс.

Анализ и методика измерений в средней ИК-области (MIR)

Пробы для измерений в диапазоне MIR брали вручную каждые 15–30 мин с помощью системы отбора проб, в основе которой лежит тангенциальная поточная фильтрация с применением полых волокон. Образцы для контроля оптической плотности и биомассы были отобраны с помощью пробоотборника Super Safe Sampler, произведенного компанией INFORS HT. Оптическая плотность измерялась с помощью спектрофотометра Eppendorf при длине волны 600 нм после надлежащего разбавления раствора. Сухой вес клеток определяли путем помещения образцов в пробирки Eppendorf 10 мл, далее клеточную массу промывали в физиологическом растворе (0,9% раствор NaCl) и сушили до достижения постоянного веса. Анализатор MIR и параллельная биореакторная система Multifors 2 показаны на рисунке 1.

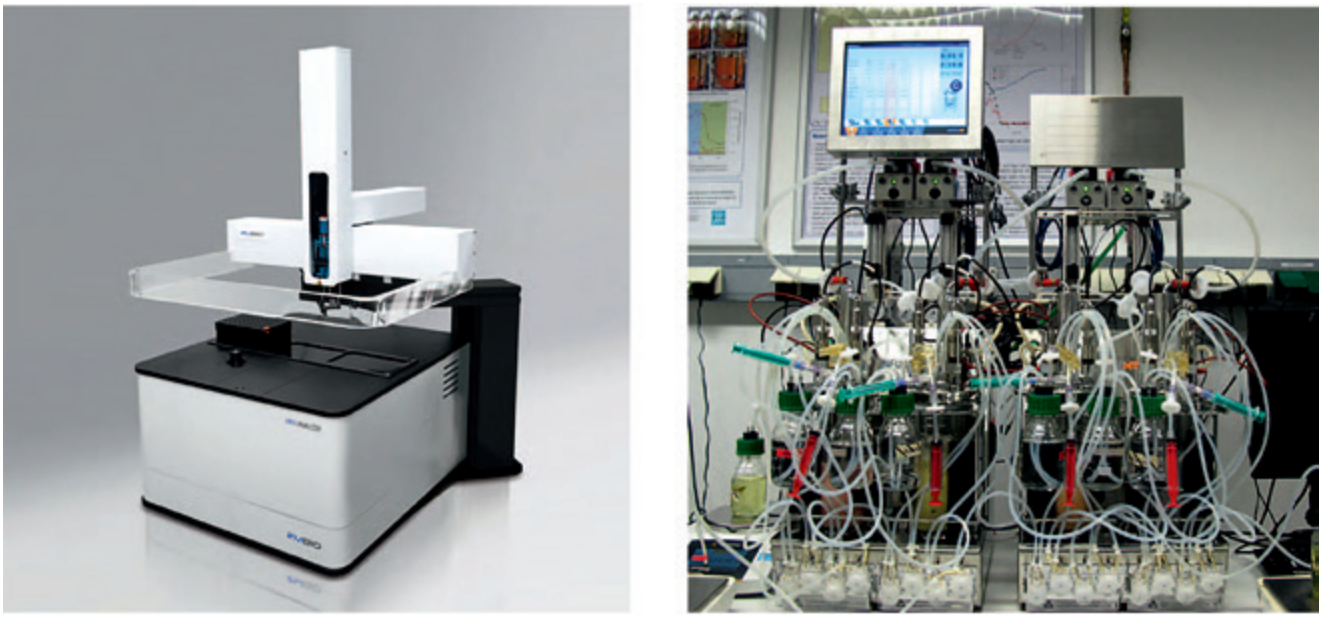


Рисунок 1. Слева: автоматический анализатор MIRA; справа: система параллельных биореакторов Multifors 2

Использование MIR-спектроскопии (спектральный диапазон от 4000 $см^{-1}$ до 400 $см^{-1}$) для мониторинга производственных процессов и скрининга биологически активных веществ в настоящее время представляет собой стандартный метод, используемый в химической фармацевтической промышленности из-за высокой информативности спектров. До сих пор данный метод не использовался для водных проб. Причиной этого является сильное поглощение воды в среднеинфракрасном диапазоне и соответствующее общее поглощение. Технологические требования к системам MIR для использования с водными пробами являются очень высокими. Они касаются световых траекторий в микрометровом диапазоне и точности пути прохождения света в нанометровом диапазоне.

Измерения с помощью ИК-спектроскопии в среднем диапазоне, рассмотренные в данной методике, были выполнены с помощью прецизионной проточной кюветы, изготовленной по технологии микросистем, и использующей определенные световые пути (менее 10 мкм и устойчивые к давлению). Измерительная ячейка очень влияет на точность светового пути, погрешность измерений составляет менее 1 нм. Эта особая конструкция проточной ячейки обеспечивает надежный анализ водных проб. В сочетании с многомерным анализом полученных данных полный набор возможностей, которыми располагает спектроскопия среднего ИК-диапазона, может быть реализован даже для водных проб. Возможно выполнение анализов в нижнем диапазоне ppm (предел обнаружения: 5–10 $мг \cdot л^{-1}$), что требуется, в частности, в ходе аналитических исследований биопроцессов. Короткая продолжительность анализов (всего лишь несколько минут) и низкие объемы проб (менее 100 мкл) позволяют проводить одновременную и непрерывную количественную оценку многих важных для процесса аналитов в форме интерактивной и перспективной онлайн-интеграции. Для проведения количественного анализа компонентов культуральной среды и метаболитов посредством технологии MIR был разработан прогнозирующий алгоритм без калибровки. Этот метод позволяет одновременно определять субстраты, такие как глюкоза, аммиак, фосфат, сульфат и пролин, а также побочные продукты, такие как ацетат, лактат, сукцинат и пируват (рисунок 2). Классически откалиброванные хемометрические модели (например, PLS-R Partial Least Squares Regression – регрессия методом дробных наименьших квадратов) требует повторной калибровки для каждого изменения состава среды. Из-за значительных усилий, необходимых для каждой калибровки, эти методы не используются для оптимизации и разработки биопроцессов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наиболее значимый побочный продукт – ацетат вырабатывается *E. coli* в аэробных условиях в присутствии избытка глюкозы и ингибирует рост клеток и образование продукта. Анализ концентрации ацета-

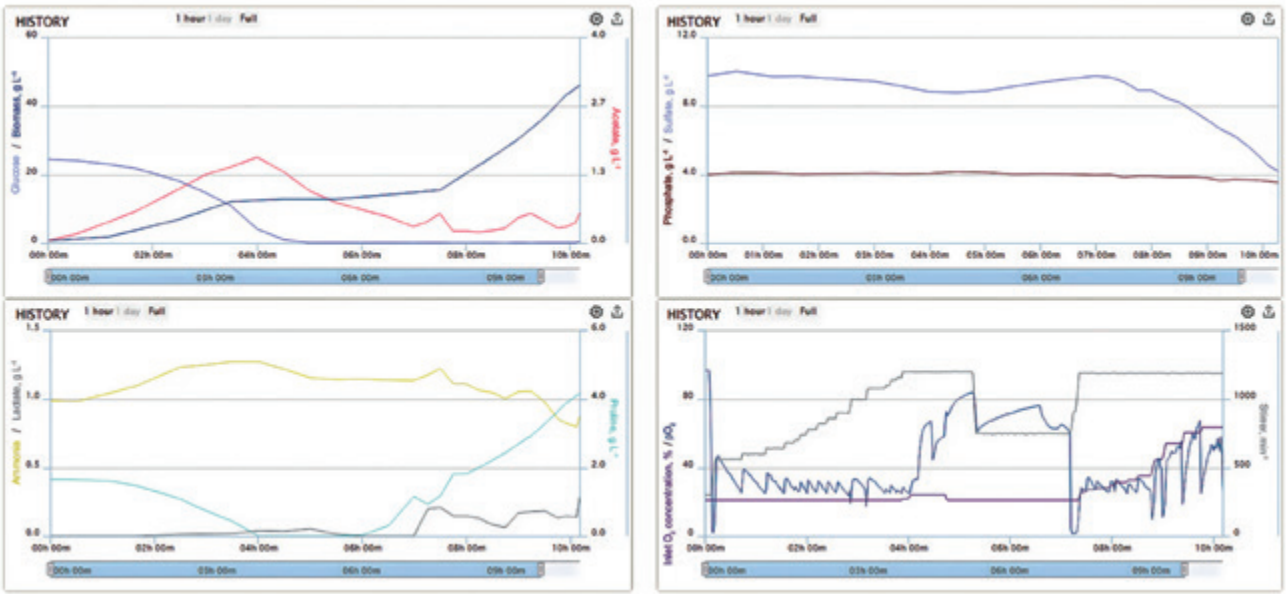


Рисунок 2. Временные профили параметров процесса культивирования с подпиткой штамма *E. coli* TB1 pGLO в биореакторе Multifors 2. Концентрация ацетата контролировалась во время культивирования *E. coli* с помощью измерений, проводимых в средней инфракрасной области спектра в режиме реального времени и без калибровки. Заданная величина концентрации ацетата находилась ниже уровня критической концентрации ингибирования роста (0,5 г $л^{-1}$; пунктирная линия), что позволяло клеткам расти с максимально возможной скоростью без ингибирования, вызываемого ацетатом. Дальнейшие субстраты и побочные продукты измеряли с использованием ИК-спектроскопии в среднем диапазоне пропускания, включая глюкозу, аммиак, пролин, лактат, сульфат и фосфат. Значение pO_2 поддерживалось на уровне выше 25%. Это достигалось путем регулировки скорости мешалки, расхода воздуха и расхода O_2 с использованием многопараметрического алгоритма

та на протяжении длительного времени вносит, таким образом, значительный вклад в эффективное управление процессом. До сих пор он не был доступен в качестве параметра, измеряемого в режиме онлайн. В этом исследовании концентрация ацетата контролировалась с использованием саморегулирующегося контроллера, измерения в средней области ИК-спектра проводились в режиме реального времени (рисунок 2). Заданное значение концентрации ацетата выбиралось ниже критической концентрации ингибирования роста (0,5 г·л$^{-1}$; пунктирная линия), что позволяло клеткам расти с максимально возможной скоростью без ингибирования, которое вызывает ацетат.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концентрацию ацетата держали под постоянным контролем во время культивирования с подпиткой рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцирующего зеленый флуоресцентный белок (GFP). Культивирование проводилось в параллельном биореакторе Multifors 2. Для измерения концентрации ацетата применялся спектроскопический анализ с использованием средней области ИК-спектра. Скорость подпитки контролировалась с помощью саморегулирующегося контроллера, за счет чего концентрация ацетата поддерживалась на желаемом уровне. Выбранное для концентрации значение было ниже критического значения, при котором наблюдалось ингибирование роста. На основании экспериментальных исследований было показано, что концентрацию ацетата можно успешно регулировать. А клетки *E. coli* растут с критической удельной скоростью роста вплоть до плотности клеток 50 г·л$^{-1}$.

Работа биореактора Multifors 2 полностью отвечает всем требованиям данного проекта. Несмотря на небольшой объем сосудов, биореакторы оснащаются достаточным количеством портов для того, чтобы можно было подключать MIR-устройство через систему фильтрации-пробоотбора в дополнение к подключению датчиков pH, pO_2 и других устройств. Кроме того, система смешивания газов позволяет смешивать воздух и кислород в любом процентном соотношении. Это обеспечивает достаточное количество кислорода, который необходим для получения высокой плотности клеток.

ИК-спектроскопия пропускания зарекомендовала себя как прекрасный инструмент для мониторинга процессов ферментации. Измерения с использованием MIR не занимают много времени, не требует длительной подготовки проб, предоставляют большой объем информации и полностью оцифрованные результаты исследований. Данная технология может с успехом использоваться для инновационных целей. Также она дает существенные преимущества с точки зрения экономии времени и материальных затрат. Было доказано, что потенциал метода MIR может быть полностью реализован при разработке биопроцессов. Быстрый и всесторонний анализ, а также возможность подсоединения нескольких биореакторов к автоматизированной измерительной системе позволяют более качественно и эффективно проводить процедуры скриннинга. Помимо количественного определения веществ, технология MIR также очень помогает в определении белковых структур и конформационных состояний. Комплексный подход в выборе параметров процесса является предпосылкой для использования более современных методов и подходов, позволяющих заранее планировать качество будущего процесса (QbD), что требует более глубокого понимания всех его тонкостей. В отличие от существующих в настоящее время методов, таких как ВЭЖХ или МС, ИК-спектроскопия в среднем диапазоне не требует от конечных пользователей сложных методов оценки. Непрерывное расширение баз данных химических веществ, которые используются для построения алгоритма прогнозирования, позволит в будущем определять гораздо большее количество веществ без необходимости разработки дополнительных аналитических методик.

Полная автоматизация аналитического процесса, получаемая с помощью анализатора MIRA, значительно повышает безопасность и производительность процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Biener, A. Steinkämper, J. Hofmann. Calorimetric control for high-cell-density cultivation of a recombinant *Escherichia coli* strain // J. Biotechnol. 2010. № 146. P. 45–53.

ПЕРИОДИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ НЕЙРОННЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В БИОРЕАКТОРЕ LABFORS 5 CELL

АВТОР

Р. Портнер,
д.т.н., профессор
Институт биопроцессов и биосистем,
Гамбургский технологический университет,
Гамбург, Германия

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторные биореакторы широко применяются для культивирования клеток животных и человека в том случае, если необходимо получить небольшое количество продукта или клеток, а также для оптимизации процессов или в качестве промежуточной ступени в линии посевных ферментеров. В данной статье описывается процесс периодического культивирования нейронных клеток человека, адаптированных для суспензионного культивирования в лабораторном биореакторе Labfors Cell 5 (INFORS HT, CH-Bottmingen). Клеточная линия AGE1.HNAAT предоставлена компанией ProBioGen AG (Берлин, Германия). Применение линий нейронных клеток человека для производства биофармацевтических препаратов позволяет получать специфические и сложные гликоструктуры, которые играют важную роль, особенно в экспрессии белков или антител человека.



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Культуральный сосуд: общий объем 3,6 л, сферическое дно.
- Магнитная мешалка (30–300 об/мин).
- Импеллер с наклонными лопастями.
- Контроль за показателями pO_2 посредством аэрации 3-компонентной газовой смесью из воздуха, O_2 и N_2.
- Уровень pH контролируется с помощью CO_2.
- Холодильник для охлаждения воздуха является стандартной опцией.
- Температурный контроль производится с помощью нагревающего мата.
- Барботер имеет круглую форму и поры микронного диаметра в нижней части.
- Асептический пробоотбор.
- Опционально: контроль уровня пены и жидкости.
- Определение онлайн-параметров посредством компьютерной программы Iris Control Software.

МЕТОДЫ

Среда

Клетки культивировали в среде 42-Max-UB (Teutocell AG, Германия), которая не содержит сыворотки и белков. Кроме того, в среду добавляли 5 ммоль/л L-глютамина (PAA Laboratories, Германия).



Рисунок 1. **Биореактор Labfors 5 Cell**



Настройка параметров

Конфигурация культуральныого сосуда Labfors 5 Cell была выбрана специально для культивирования клеточной культуры, датчики pH и pO_2 были откалиброваны. Рабочий объем сосуда – 2,5 л, температура поддерживалась на уровне 36,9 °C. Скорость перемешивания во время культивирования была установлена на уровне 156 об/мин, что соответствовало времени смешивания, равному примерно Θ_{95}=5 с (определение производилось методом изменения цвета – раствор крахмала / йодистого калия / тиосульфата натрия). Окружная скорость мешалки составляла 0,7 м/с. Эти значения находятся в пределах технологических параметров, которые были установлены Платасом (Platas) и соавторами (2012) для лабораторных биореакторов.

Насыщение воздухом pO_2=30% поддерживалось путем прямого барботирования 3-компонентной смесью из воздуха, кислорода и азота при скорости аэрации до 30 мл/мин (0,012 vvm). Уровень pH поддерживался равным 7,15 путем барботирования CO_2 или добавления 0,5 М раствора Na_2CO_3 с помощью перистальтических насосов.

Периодическое культивирование

Прекультуры получали в качалочных колбах. Исходная концентрация жизнеспособных клеток после инокуляции составляла 1×10^6 клеток/мл. Культивирование проводили в течение 5 дней, оценку процесса выполняли по росту клеток, поглощению субстрата и выработке метаболитов, отбор проб производился асептически.

Получение аналитических данных

Концентрацию клеток определяли с помощью гемоцитометра (Neubauer Improved, Blue Brand, Германия), жизнеспособность – методом исключения трипанового синего. Содержание глюкозы, лактата и

глютамина анализировали посредством YSI 7100 MBA (Yellow Springs Instruments, США), аммиака – спектрофотометром (Bio-Rad, Мюнхен, Германия) и тестовым набором Spectroquant 1.14752.0001 (Merck, Дармштадт, Германия) при длине волны 690 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Периодическое культивирование клеток AGE1.HN успешно проводилось в течение 5 дней. Динамика изменения общей концентрации клеток и концентрации жизнеспособных клеток показана на рисунке 2.

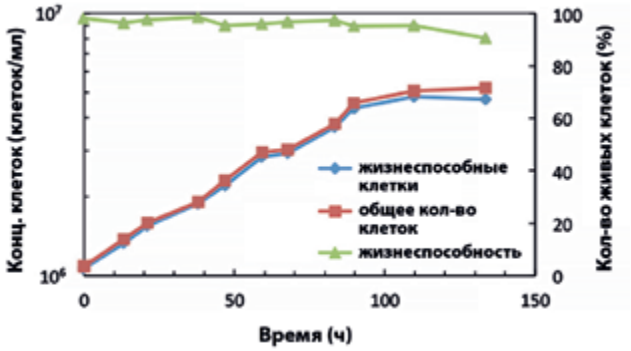


Рисунок 2. Динамика изменения общей плотности клеток и плотности жизнеспособных клеток

Максимальная концентрация жизнеспособных клеток на 4-й день составляла 4,8×10^6 клеток/мл. В фазе экспоненциального роста (до 3-го дня) средняя жизнеспособность клеток составляла 95%. На этой фазе скорость роста μ составила 0,016 в час, время удвоения – 44,1 ч (рисунок 3).

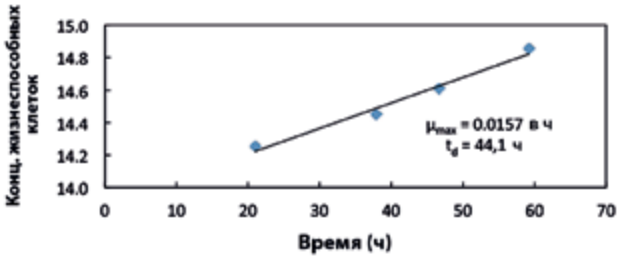


Рисунок 3. Определение максимальной скорости роста μ_{max} и времени удвоения t_d

Динамика изменения основных субстратов (глюкоза и глютамин), а также основных метаболитов (лактат и аммиак) показана на графиках (рисунки 4 и 5). Глюкоза и глютамин в конце культивирования были полностью использованы. Это соответствовало окончанию экспоненциальной фазы роста. Лактат и аммиак не достигали ингибирующей концентрации.

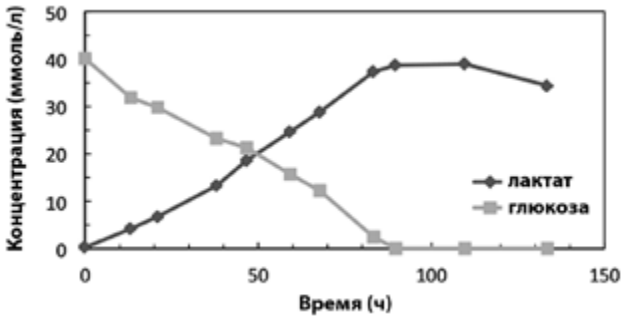


Рисунок 4. Динамика изменения концентрации глюкозы и лактата

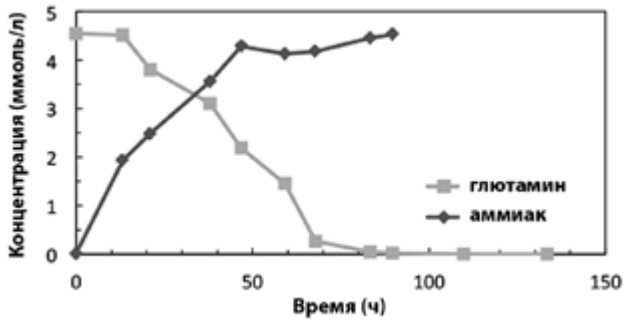


Рисунок 5. Динамика изменения концентрации глютамина и аммиака

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Периодическое суспензионное культивирование линии клеток AGE1.HN*AAT* проводилось в течение 5 дней. Полученные показатели роста сравнимы с предыдущими экспериментами, проводимыми в различных системах культивирования.
2. Максимальная концентрация клеток на 4-й день составила 4,8×10^6 клеток/мл.
3. Во время экспоненциальной фазы роста средняя жизнеспособность составляла 95%.
4. Скорость роста и время удвоения были в пределах ожидаемых значений.
5. Содержание кислорода было достаточным даже при высоких показателях плотности клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Niklas, E. Schräder, V. Sandig, N. Noll, E. Heinzle. Quantitative characterization of metabolism and metabolic shifts during growth of the new human cell line age1.hn using time- resolved metabolic flux analysis // Bioprocess and biosystems engineering. 2011. № 34(5). P. 533–545.
2. O.B. Platas, U. Jandt, LdM. Phan, M.E. Villanueva, M. Schaletzky, A. Rath, S. Freund, U. Reichl, E. Skerhutt, S. Scholz, Th. Noll, V. Sandig, R. Pörtner, A.P. Zeng. Evaluation of criteria for bioreactor comparison and operation standardisation for mammalian cell culture // Engineering in Life Sciences. 2012. № 12(5). P. 518–528.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТАХ

Использование уникального метода приготовления органического растворителя согласно общим главам USP <232> и <233> и выполнение аналитических исследований с помощью ИСП-МС Agilent 7800

АВТОРЫ

Д. Чен,
Л. Чен,
М. Чжин,

Agilent Technologies
Шанхай, Китай

С.М. Ван,
Л.М. Ли,
Ш. Чжи,

Шанхайское управление
по контролю
за пищевыми продуктами
и лекарствами
Шанхай, Китай

АННОТАЦИЯ

Данная статья освещает вопросы анализа элементарных примесей в фармацевтических ингредиентах с помощью ИСП-МС Agilent 7800 и внедрения в практику уникального метода подготовки проб с использованием органических растворителей в соответствии с общими главами <232> и <233> Фармакопеи США. ИСП-МС Agilent 7800, наряду с разработанным и оптимизированным методом органических растворителей, предлагает комплексное решение, обеспечивающее точные (правильные и прецизионные) результаты, а также отличную долгосрочную стабильность.

ВВЕДЕНИЕ

Присутствие примесей в фармацевтических препаратах вызывает озабоченность не только потому, что некоторые загрязняющие вещества по своей природе токсичны, но также потому, что они могут неблагоприятно влиять на стабильность и срок годности препарата или же вызывать нежелательные побочные эффекты. В результате органические и неорганические (элементные) примеси должны тщательно анализироваться и контролироваться как в фармацевтическом сырье, включая воду (используемую для производства лекарств), промежуточные продукты, активные фармацевтические ингредиенты (АФИ), вспомогательные вещества (стабилизаторы, наполнители, связующие вещества, красители, ароматизаторы), так и в готовой лекарственной форме. Необходимо также контролировать примеси, образующиеся в процессе производства, такие как остатки катализаторов и контаминанты.

Agilent Technologies

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ



ИСП-МС Agilent 7800

Фармакопея Соединенных Штатов (USP) совместно с ICH (Международная конференция по гармонизации) расширяет список металлических примесей, которые могут быть обнаружены в фармацевтических продуктах и ингредиентах. Главы Фармакопеи США (USP) <232> («Элементные примеси – Допустимые нормы») и <233> («Элементные примеси – Процедуры») указывают пределы и процедуры обнаружения элементных примесей в лекарственных продуктах. Анализ элементных примесей играет важную роль в любой фармацевтической разработке и в производстве. Сейчас фармацевтические организации обязаны подтверждать соответствие содержания элементных примесей в продукции указанным уровням, которые регламентируются главой <232>. В таблице 1 указаны допустимые суточные дозы (PDE) пероральных составов, компонентами которых являются 24 элемента из списка. Для этих элементов действуют особые указания, содержащиеся в главах <232> и <233>.

Для анализа элементных примесей, имеющихся в фармацевтических препаратах, фармакопейные статьи предлагают использовать четыре различных метода подготовки проб:

1. Используйте чистый неразбавленный образец (пробу), если он находится в подходящей жидкой форме.
2. Растворите образец (пробу) в водном растворе, если он растворим в воде.
3. Если он нерастворим в воде, разбавьте его в подходящем органическом растворителе.
4. Для нерастворимых образцов используется кислотный гидролиз в закрытом сосуде под действием микроволн.

Все методы подготовки проб имеют свои особенности и уникальные возможности применения, но использование органических растворителей, таких как диметилсульфоксид (ДМСО), приобретает все большую популярность благодаря простоте использования, менее жестким требованиям к ингредиенту пробы и высокой пропускной способности при подготовке образца по сравнению с микроволновой пробоподготовкой в закрытом сосуде. ИСП-МС Agilent 7800 вместе с использованием описанного выше оптимизированного метода прекрасно справляется с задачами по анализу обработанных органическими растворителями проб. Полученные результаты обладают высокой точностью и прецизионностью. Они подтверждают тот факт, что данный набор инструментальных средств является надежным способом анализа элементных примесей, содержащихся в фармацевтических препаратах.

Таблица 1.

Допустимые суточные дозы (PDE) для пероральных составов

Элемент	Класс	Концентрация при пероральном приеме (мкг/день)
Cd	1	5
Pb	1	5
As	1	15
Hg	1	30
Co	2A	50
V	2A	100
Ni	2A	200
Tl	2B	8
Au	2B	100
Pd	2B	100
Ir	2B	100
Os	2B	100
Rh	2B	100
Ru	2B	100
Se	2B	150
Ag	2B	150
Pt	2B	100
Li	3	550
Sb	3	1200
Ba	3	1400
Mo	3	3000
Cu	3	3000
Sn	3	6000
Cr	3	11000

АНАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Инструментарий

Вместе с ИСП-МС Agilent 7800 использовался распылитель Micromist, распылительная камера с элементом Пельтье, горелка (инжектор на 1,5

мм), платиновые конусы. В качестве вспомогательного газа для удаления сажи с конусов использовалась смесь аргона и кислорода. Отбор образцов осуществлялся с помощью автоматического пробоотборника Agilent SPS 4, а внутренние стандарты были добавлены в режиме онлайн с помощью перистальтического насоса, предназначенного для доставки проб.

Система ввода пробы 7800 состоит из малошумного высокоточного 10-роликового перистальтического насоса, высокопроизводительного малопоточного распылителя Micromist и охлаждаемой элементом Пельтье камеры. Температурный диапазон в камере составляет от –5 °C до +20 °C. Температуру можно регулировать. Двухходовая распылительная камера Скотта устойчива как к водным, так и к органическим растворителям. Ячейка 4-го поколения ORS4 обеспечивает быстрое переключение используемых газов и наиболее эффективное устранение интерференций во всех режимах с помощью высокочастотного гиперболического квадруполя и синхронного двухрежимного дискретного детектора новейшего поколения. Программное обеспечение Mass Hunter 4.3, поставляющееся для ИСП-МС Agilent, имеет интуитивно понятный интерфейс и набор готовых предустановленных методик, соответствующих требованиям статей USP. Используемые в приборах рабочие условия перечислены в таблице 2.

Таблица 2.

Рабочие условия для ИСП-МС 7800

Параметр	Заданное значение
Режим плазмы	Общее назначение
RF-мощность (Вт)	1550
Газ-носитель (мл/мин)	0,99
Глубина пробы (мм)	8,0
S/C Temp (0C)	17
Скорость подачи газа через ячейку (мл/мин)	4
Дискриминация энергии (V)	3
Вспомогательный газ (%)	10

Подготовка образцов (проб) и приборов

Калибровочные стандарты были подготовлены с использованием отслеживаемых стандартов NIST в ДМСО (диметилсульфоксиде). 100 мг образца активного фармацевтического ингредиента (АФИ) очень аккуратно пересыпались в 50 мл пробирку фирмы Falcon, в которой содержалось 5 мл ДМСО. Затем пробирку в течение 15 мин обрабатывали ультразвуком для полного растворения образца и доводили объем до 50 мл, добавляя ДМСО. Образцы готовили в нескольких экземплярах. Одновременно готовили пробы с добавками. Внутренний стандарт был добавлен в режиме онлайн. На рисунке 1 показана блок-схема для подготовки и анализа проб.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Калибровка

Графики калибровки для As, Hg, Cd и Pb показаны на рисунке 2.

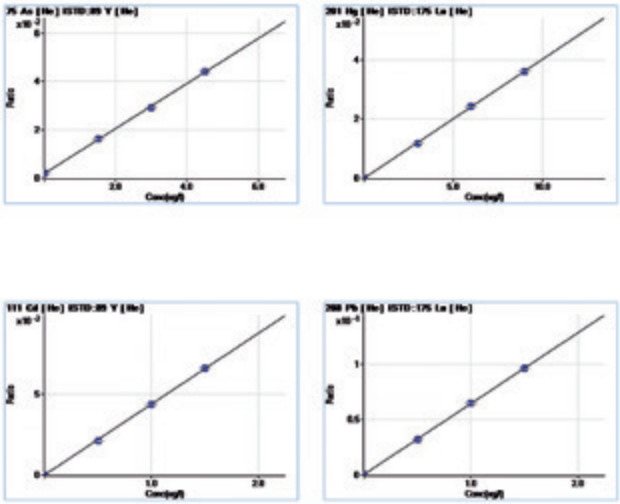


Рисунок 2. Линейные графики калибровки для As, Hg, Cd и Pb

В таблице 3 перечислены элементы вместе с их калибровочными коэффициентами расхода (значение R) и пределами обнаружения (DL). Система демонстрирует хорошую чувствительность в ДМСО с



Рисунок 1. Блок-схема для подготовки и анализа проб, проводимого с помощью ИСП-МС Agilent 7800

пределами обнаружения в уровнях мкг/л для всех элементов.

Таблица 3.

Коэффициенты корреляции и пределы обнаружения элементов в растворе

Элемент	Значение R	Предел обнаружения DL (мкг/л)
Cd	0,9998	0,002
Pb	1,0000	0,002
As	0,9997	0,072
Hg	1,0000	0,014
Co	1,0000	0,001
V	1,0000	0,001
Ni	0,9999	0,007
Tl	0,9997	0,001
Au	0,9953	0,001
Pd	1,0000	0,018
Ir	1,0000	0,002
Os	0,9998	0,007
Ru	1,0000	0,001
Rh	0,9998	0,002
Se	0,9999	0,001
Ag	0,9983	0,001
Pt	1,0000	0,002
Li	0,9999	0,119
Sb	1,0000	0,001
Ba	0,9999	0,016
Mo	1,0000	0,008
Cu	1,0000	0,033
Sn	1,0000	0,010
Cr	0,9999	0,007

Пригодность системы

Согласно общим главам <232> и <233> Фармакопеи США пригодность системы устанавливается путем сравнения результатов, полученных при анализе стандартизированного раствора 1 (1.5J) до и после анализа раствора пробы. При этом учитывается процент дрейфа, который должен составлять не более 20% для каждого целевого элемента [2]. В таблице 4 приведены результаты пригодности системы, здесь процент дрейфа находится в пределах критериев пригодности. Период времени между проведением измерений составлял приблизительно 4 ч.

Исследование точности при значении J, равном 100%

В исследуемые активные фармацевтические ингредиенты вводили добавки, так чтобы значение J в конечном итоге для каждого целевого элемента, присутствующего в пробе, достигло концентрации 100%, как это требуют главы <232> и <233>. Критерий приемлемости для добавки и извлечения составляет 70–150% для среднего количества повторов в каждой концентрации [1]. В таблице 5 приведены результаты исследования точности при значении J, равном 100%. Полученные результаты демонстрируют отличный процент RSD (относительное стандартное отклонение), все показатели находятся в пределах допустимого для извлечения диапазона.

Таблица 4.

Результаты пригодности системы при 1.5J для каждого целевого элемента

Элемент	Значение J (мкг/л)	Стандартизированный раствор 1 (1.5J) до анализа (n=6)	Стандартизированный раствор 1 (1.5J) после анализа (n=6)	% дрейфа, n=6
Li	110	161	166	2,8
V	20	30	30	0,3
Cr	2200	3320	3317	–0,1
Co	10	15	15	0,1
Ni	40	60	60	0,3
Cu	600	899	902	0,2
As	3	4,5	4,5	0,1
Se	1	1,5	1,5	0,1
Mo	600	904	899	-0,6
Ru	20	30	30	0,3
Rh	20	30	30	0,1
Pd	20	30	30	0,0
Ag	30	42	45	8,0
Cd	1	1,5	1,5	0,1
Sn	1200	1819	1802	–0,9
Sb	240	363	359	–1,2
Ba	280	413	418	1,2
Os	20	29	30	4,5
Ir	20	30	30	0,7
Pt	20	30	30	1,0
Au	20	30	31	2,3
Hg	6	9	9	0,1
Tl	1,6	2,4	2,4	0,1
Pb	1	1,5	1,5	0,1

Внутрилабораторная прецизионность

Внутрилабораторная прецизионность (воспроизводимость) определяется повторным анализом повторяемости, либо в другой день, либо с другим инструментом либо с другим аналитиком, либо комбинацией указанных выше условий. Критерии приемлемости

для относительного стандартного отклонения должны составлять не более 25% для каждого целевого элемента [2]. Каждый образец АФИ опредленной концентрации был приготовлен в 6 экземплярах, анализ проводился в два отдельных дня. В таблице 6 приведены результаты промежуточной прецизионности для всех трех АФИ-проб.

Таблица 5.

Результаты исследования точности при 100% J для каждого целевого элемента

Элемент	Значение J (мкг/л)	АФИ-1% Извлечения (n=6)	% RSD	АФИ-2% Извлечения (n=6)	% RSD	АФИ-3% Извлечения (n=6)	% RSD
Li	110	107,1	3,0	102,4	3,2	103,0	1,5
V	20	101,7	2,7	97,5	1,1	98,7	1,2
Cr	2200	106,1	2,7	102,2	0,9	103,0	1,1
Co	10	104,4	2,7	100,4	1,3	101,0	1,1
Ni	40	104,4	2,8	100,4	1,4	101,1	1,0
Cu	600	109,8	2,8	105,5	1,9	106,4	1,0
As	3	90,9	3,1	90,6	4,9	96,6	2,0
Se	1	95,0	7,1	86,5	4,6	92,9	1,4
Mo	600	105,2	2,8	101,4	1,2	102,0	0,7
Ru	20	101,8	2,6	97,9	1,4	98,2	0,5
Rh	20	102,1	2,5	98,2	1,3	98,6	0,4
Pd	20	104,1	2,2	100,0	1,2	100,5	0,6
Ag	30	91,3	2,0	97,8	2,9	94,6	2,2
Cd	1	103,2	2,6	98,7	2,1	100,0	1,5
Sn	1200	106,9	2,2	102,5	1,3	102,8	0,6
Sb	240	110,5	2,3	107,2	1,7	108,0	0,6
Ba	280	93,7	2,1	90,5	1,0	91,3	0,5
Os	20	91,8	2,9	87,4	0,6	88,1	0,4
Ir	20	103,5	2,4	98,4	0,9	99,0	0,4
Pt	20	106,7	2,3	101,4	1,0	102,2	0,2
Au	20	98,6	2,7	95,6	3,0	94,1	2,8
Hg	6	108,2	3,4	102,3	0,9	103,2	0,6
Tl	1,6	102,9	2,7	97,6	0,3	98,8	0,7
Pb	1	101,7	3,1	96,6	0,4	97,1	0,5

Оптимизированный метод пробоподготовки с использованием органических растворителей не выявил наличия каких-либо значимых элементов ни в одном из трех образцов АФИ, и во время анализа никаких матричных эффектов не наблюдалось. Таким образом, данная методика подготовки и анализа фармацевтических препаратов, описанная в главах <232> и <233> Фармакопеи США, предоставляет фармацевтическим лабораториям возможность обновить свои методики и инструментарий.

Таблица 6.

Результаты внутрилабораторной прецизионности

Элемент	Значение J (мкг/л)	Внутрилабораторная прецизионность при 100% (n=12)		
		АФИ-1	АФИ-2	АФИ-3
Li	110	4,2	2,8	2,1
V	20	3,7	2,7	1,8
Cr	2200	4,2	3,1	1,9
Co	10	4,1	2,9	1,8
Ni	40	3,5	2,6	2,1
Cu	600	8,3	9,2	1,2
As	3	4,2	7,2	9,5
Se	1	4,2	3,0	1,7
Mo	600	3,1	2,9	2,4
Ru	20	4,1	2,8	1,8
Rh	20	3,4	2,5	1,6
Pd	20	4,7	4,8	3,3
Ag	30	3,5	2,9	3,8
Cd	1	3,7	3,0	1,5
Sn	1200	2,1	1,4	1,2
Sb	240	4,1	2,9	1,9
Ba	280	3,6	2,8	1,8
Os	20	3,3	2,5	1,6
Ir	20	3,2	2,6	1,5
Pt	20	6,3	3,5	1,7
Au	20	3,5	2,5	1,4
Hg	6	3,9	2,6	1,7
Tl	1,6	3,5	2,9	1,8
Pb	1	4,2	2,8	2,1

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ИСП-МС Agilent 7800 наряду с оптимизированным методом подготовки проб с использованием органических растворителей, использующихся для определения элементных примесей в фармацевтических препатов согласно требованиям, указанным в главах <232> и <233> Фармакопеи США, представляет собой комплексное решение, которое дает отличные результаты по таким критериям, как чувствительность, стабильность, устойчивость, извлечение и предел обнаружения для всех необходимых элементов. Главным преимуществом является то, что данное комплексное решение заменяет утомительную методику пробоподготовки в кислоте и обеспечивает более высокую пропускную способность и производительность.

ЛИТЕРАТУРА

1. USP Chapter <232>. Elemental Impurities- Limits, Pharmacopeial Forum. 2011. № 42(2). P. 241–242.
2. USP Chapter <233>. Elemental Impurities-Procedure. USP 38–NF 33. Second Supplement.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСТРАГИРУЕМЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ПРЕПАРАТАХ ТРАДИЦИОННОЙ КИТАЙСКОЙ МЕДИЦИНЫ (ТКМ) С ПОМОЩЬЮ ИСП-МС-ОРС

АВТОРЫ

Д. Чен,
Л. Чен,
М. Чжин,

Agilent Technologies
Шанхай, Китай

С.М. Ван,
Л.М. Ли,
Ш. Чжи,

Шанхайское управление
по контролю
за пищевыми продуктами
и лекарствами
Шанхай, Китай

АННОТАЦИЯ

Из лекарств, используемых в традиционной китайской медицине (ТКМ) и приготовленных на основе ключевых компонентов – реальгара и киновари, с помощью ультразвука и искусственного желудочного сока или 1%-й соляной кислоты (HCl) удалось экстрагировать элементы. Затем основные составные элементы лекарств были определены благодаря масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS), где для устранения интерференций использовалась октопольная реакционная система (ОРС). Были вычислены пределы обнаружения метода и оценена стабильность метода. По итогам работы был сделан вывод о том, что для оценки токсичности и биодоступности средств ТКМ метод экстракции имеет большую ценность, чем полное кислотное разложение.

ВВЕДЕНИЕ

Традиционная китайская медицина – одна из старейших, сохранившихся до наших дней и практикуемых традиций в мире – служит для поддержания хорошего здоровья и лечения заболеваний. В ТКМ широко используются натуральные вещества, взятые из растений, животных и минералов. Все медикаменты, используемые для лечения людей, должны обладать доказанным качеством, безопасностью и эффективностью. В отношении качества у многих известных средств ТКМ возникают проблемы. Особенно это касается препаратов, ключевыми компонентами которых являются минералы реальгар (сульфид мышьяка) и киноварь (сульфид ртути). Как известно, мышьяк и ртуть обладают высокой токсичностью. В Китайской фармакопее [1] 2005 года издания киноварь является ключевым компонентом 396 рецептур, а реальгар является ключевым компонентом 203 рецептур.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ



Масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Agilent 7500

Когда эти лекарственные средства ТКМ полностью растворяются, уровни содержания мышьяка и ртути остаются чрезвычайно высокими. Это свидетельствует о том, что средства ТКМ очень опасны из-за этих высокотоксичных элементов. Но на самом деле готовые рецептуры исторически доказали свою безопасность и эффективность в отношении определенных заболеваний. Чтобы решить проблему подобного несоответствия, требуется применить новый подход к оценке токсичности средств ТКМ.

Поскольку HCl является основным компонентом желудочного сока человека, для извлечения растворимых элементов в ТКМ рекомендуется использовать искусственный аналог желудочного сока или 1% HCl. Когда качество средств ТКМ хорошо контролируется, мышьяк (As) и ртуть (Hg), находящиеся в составе ТКМ, поглощаются человеческим организмом только частично и постепенно. И только определенные виды As и Hg в ТКМ могут быть абсорбированы. ТКМ могут быть токсичными, когда уровни растворимых As и Hg относительно высоки.

В данном исследовании оценивалось действие искусственного желудочного сока или 1% HCl в экстракции растворимых элементов ТКМ, содержащих реальгар и киноварь. Эти результаты были включены в проект издания китайской фармакопеи 2010 года в качестве оценочных данных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растворение образцов

Препараты ТКМ были измельчены пестиком в ступке. Затем порошкообразные образцы ТКМ (по 0,2 г каждый) были помещены в микроволновую печь (CEM, США) для полного разложения и дальнейшего анализа As и Hg. Процесс разложения проводился в соответствии с рекомендованной методикой, разработанной для данной установки. Для смеси использовались 5 мл азотной кислоты (HNO_3, 68% мас./об., GR, Merck) и 5 мл HCl (35% мас./об., GR, Merck).

Порошкообразные образцы ТКМ (0,2 г каждый) также экстрагировали с помощью 10 мл 1% HCl или 10 мл искусственного желудочного сока в 15 мл пластиковых пробирках для центрифуги в течение 1 ч с помощью ультразвуковой ванны. (Композиция искусственного желудочного сока стандартизируется Китайской фармакопеей 2005 года издания.) После разделения центрифугированием на скорости 4000 об/мин полученные супернатанты фильтровали через мембраны с размером пор 0,22 мкм, а затем в 10 раз разбавляли смесью кислот (1% HCl и 1% HNO_3), перед тем как проводить прямой масс-спектральный анализ экстрагируемых элементов.

Инструменты

В данном исследовании использовался ИСП-МС-ОРС Agilent 7500cx. Поскольку для экстракции и разбавления использовали 1% HCl, то ИСП-МС-анализ целевых элементов, особенно мышьяка (As), ванадия (V), хрома (Cr), меди (Cu) и других, в обычных условиях мог бы быть затруднен из-за интерференции полиатомных ионов, вызываемых матрицей хлора или нерастворенными органоуглеродными и сероорганическими матрицами. Для устранения интерференции в ИСП-МС-ОРС Agilent 7500cx применялся коллизионный режим с использованием гелия (He). К преимуществам данного режима относятся: 1) отсутствие вторичных интерференций (по сравнению с реакционным режимом); 2) эффективное устранение множественных типов интерференций для всех целевых элементов; 3) простые рабочие параметры. Эксплуатационные параметры ИСП-МС-ОРС Agilent 7500cx для работы в нормальном режиме без газа и в режиме пропускания гелия (He) практически одинаковы. Только для второго режима предварительно устанавливаются три параметра дискриминации энергии и расхода гелия. Таким образом, работа с аппаратурой не вызывает сложностей.

Калибровка

Калибровки проводились с использованием метода внешней калибровочной кривой. Калибровочные стандарты были получены из многоэлементных стандартных растворов (Environmental Calibration Standard, Agilent p/n 5183-4688), которые разбавлялись смесью кислот (1% HCl и 1% HNO). Внутренние стандарты скандия (Sc), германия (Ge), индия (In), тербия (Tb) и висмута (Bi) для калибровки были добавлены в режиме онлайн.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Устранение интерференций

В таблице 1 показаны концентрации элементов в одном экстракте ТКМ (XEZZ), измеренном в режиме без газа и в режиме с He. При работе в режиме без газа с целевыми изотопами, масса которых меньше 80, возникают серьезные препятствия. Например,

результаты, полученные для As, V и Cr, завышены и некорректны из-за накладывающихся друг на друга интерференций, исходящих от $ArCl^+$, ClO^+ и ArC^+. Аналогичные результаты в отношении целевых элементов – кадмия (Cd), ртути (Hg) и свинца (Pb) – были получены как при коллизионном режиме с He, так и без него, только с меньшим количеством интерференций.

Таблица 1.

Сравнение результатов, полученных с/без режима с He для извлечения элементов XEZZ из ТКМ, а также показателей BEC и MDL в режиме с He. Единицы для всех измерений – нг/г в растворе

Элемент матрицы	Экстракт ТКМ в режиме без газа	Экстракт ТКМ в режиме с He	BEC (фоновые экв. концентрации) Режим с He и 1% HCl	MDL (предел обн. метода), режим с He и 1% HCl
51 V	0,97	0,54	0,054	0,02
52 Cr	2,6	0,75	0,10	0,02
55 Mn	96	73	0,018	0,03
56 Fe	412	352	1,0	0,2
59 Co	0,35	0,22	0,0016	0,001
60 Ni	2,2	1,6	0,081	0,03
63 Cu	21	18	0,13	0,04
66 Zn	523	417	0,030	0,007
75 As	3,3	1,2	0,026	0,01
78 Se	0,17	< 0,08	0,18	0,08
111 Cd	0,45	0,42	0,0029	0,003
202 Hg	0,67	0,62	0,022	0,005
208 Pb	1389	1401	0,012	0,007

Поскольку все целевые элементы можно было определить в режиме с He, другие режимы работы не потребовались, что значительно сократило время исследования.

Пределы обнаружения метода (MDL) и фоновые эквивалентные концентрации (BEC) определялись с помощью матрицы с высоким содержанием хлора (смеси 1% HCl и 1% HNO_3). Интерференции были эффективно уменьшены до незначительного уровня, когда аппарат работал в режиме с He. В частности, 5,2 нг/г (в режиме без газа) понизили всего до 0,026 нг/г в режиме с He. В последнем случае значение MDL было меньше, чем 0,01 нг/г в матрице с 1% HCl и 1% HNO_3. Полученные показатели BEC и MDL в режиме с He свидетельствуют о том, что технология ИСП-МС-ОРС подходит для анализа элементов, извлеченных из этих средств (ТКМ).

Долгосрочная стабильность метода

Для создания эталонного образца, предназначенного для контроля качества (КК), в один экстракт ТКМ был добавлен многоэлементный стандартный раствор в концентрации 2 нг/г. Концентрации целевых элементов в образце КК варьировались от 2 нг/г кобальта (Co) до 150 нг/г марганца (Mn). Для проверки долгосрочной стабильности метода образец КК и раствор пустой пробы кислоты использовались один раз через каждые восемь проб. Результаты контроля качества, когда анализ проб (60 проб) шел непрерывно в течение шести часов, варьировались от 1,3% относительного стандартного отклонения (RSD) для свинца (Pb) до 3,6% для селена (Se). При холостом анализе значимой памяти не наблюдалось. Результаты показали, что ИСП-МС-ОРС Agilent 7500cx в режиме с He является надежным и функциональным устройством для извлечения проб ТКМ и эффективного устранения интерференций.

Извлекаемые элементы в средствах ТКМ

Двенадцать типов ТКМ (три параллельных образца для каждого типа) были экстрагированы 1% HCl при помощи ультразвуковой ванны. Тринадцать ключевых

Таблица 2.

Среднее содержание элементов, экстрагируемых из ТКМ (мг/кг, n=3)

Элемент	TCBX[a]	SHXW[a]	ZXP[a]	XEZZ[a]	WSNH[a]	Киноварь[a]	WLP[a,b]	XEQXW[a,b]	NHXXW[b]	XEQRP[b]	QWXXW[b]	Реальгар[b]
51 V	0,38	0,17	0,34	0,26	0,21	0,049	0,32	0,12	0,030	0,18	0,12	0,034
52 Cr	0,43	0,14	0,82	0,72	0,31	2,65	1,1	0,13	0,053	0,19	0,13	0,027
55 Mn	98	39	69	33	60	8,5	42	52	3,6	21	52	0,00
56 Fe	137	79	242	187	60	44	185	201	79	80	201	2,5
59 Co	0,22	0,14	0,26	0,12	0,16	0,027	0,29	0,14	0,044	0,10	0,14	0,013
60 Ni	1,1	0,52	1,0	0,66	1,7	0,080	1,9	0,40	0,15	0,39	0,40	0,039
63 Cu	3,2	2,2	6,3	6,9	9,6	0,65	5,2	4,6	1,2	0,30	4,6	0,025
66 Zn	36	29	180	193	83	1,7	24	6,6	8,6	6,8	6,6	0,00
75 As	0,60	0,42	1,2	0,56	1,2	0,54	664	140	42	809	140	183
78 Se	0,082	0,075	0,12	0,094	0,10	0,031	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
111 Cd	0,29	0,092	0,16	0,23	0,34	0,015	0,17	0,068	0,015	0,076	0,068	0,019
202 Hg	0,37	0,68	3,3	0,092	6,7	0,37	0,28	0,27	0,048	0,28	0,47	0,85
208 Pb	112	74	2,3	642	836	16	2,4	2,3	0,61	3,1	2,3	0,57

Примечание: a – представляет ТКМ с киноварью; b – представляет ТКМ с реальгаром

элементов были проанализированы на ИСП-МС-ОРС Agilent 7500cx в режиме с He. В таблице 2 приведены средние результаты измерений. Показатели RSD трех параллельных образцов составляли менее 10%, метод экстракции оказался надежным. Степень извлечения целевых элементов в матрице экстракта ТКМ составляла от 90% до 110%; также ИСП-МС-ОРС Agilent 7500cx и режим подачи гелия (He) доказали свою надежность во время анализа образцов ТКМ.

В Китайской фармакопее 2005 года издания указано, что для токсичных элементов в составе средств ТКМ безопасная доза составляет: Cu≤20 мкг/г, Pb≤5,0 мкг/г, Cd≤0,3 мкг/г, As≤2,0 мкг/г и Hg≤0,2 мкг/г. Для средств ТКМ, содержащих реальгар, степень извлечения As является относительно высокой. Анализ молекулярных форм экстрактов ТКМ, выполненный с помощью методов ВЭЖХ-ИСП-МС, показал, что извлеченный As является главным образом As (III) и As (V).

Интересный факт: экстрагируемый As (III) составляет менее 1% от общего содержания As в ТКМ, и он всегда находится в узком диапазоне концентраций независимо от общего содержания As, присутствующего в ТКМ. Доказано, что As (III) эффективен при некоторых типах рака крови. Дальнейшие исследования As в рамках проведения анализа молекулярных форм и изучения его лечебного действия продолжаются и будут обсуждаться в другой научной публикации.

Экстрагируемая ртуть в ТКМ с киноварью составляет менее 0,01% от общего содержания Hg в ТКМ. Хотя экстрагируемой ртути в некоторых ТКМ относительно много, если принимать во внимание правила безопасности, указанные в Китайской фармакопее 2005 года издания, таблица 3 показывает, что большинство уровней содержания этого элемента ниже или приближаются к 0,0137 мг/сутки на человека – норме, установленной Объединенным комитетом ВОЗ по пищевым добавкам (JECFA). Что более важно, вещественный анализ Hg в экстрактах ТКМ показал, что Hg не является токсичной ртутью Hg^{2+} или метилртутью, а представляет собой неизвестное высокомолекулярное соединение ртути Hg. Дальнейшие исследования продолжаются.

Содержание Pb и Cd в некоторых ТКМ с киноварью превышает допустимый уровень. Это свидетельствует о необходимости проведения дальнейшего контроля качества в отношении множества других токсичных элементов в ТКМ, особенно это касается ТКМ, в которых ключевыми компонентами являются минералы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Был разработан и проверен новый метод контроля качества экстрактов ТКМ, содержащих реальгар и киноварь. Раствор 1% HCl или искусственного желудочного сока использовали для ультразвуковой экстракции растворимых элементов. Коллизионный режим с подачей гелия (He), имеющийся на ИСП-МС-ОРС Agilent 7500, оказался эффективным для удаления интерференций, поступающих со сложных матриц экстрактов ТКМ, особенно тех, что имеют высокое содержанием хлора, а также с углеродной матрицы. Для подтверждения устойчивости метода ИСП-МС были определены пределы обнаружения методов и долгосрочная стабильность, которые требовались для анализа 13 целевых элементов, входящих в состав экстрактов ТКМ.

Были проверено двенадцать типов ТКМ с реальгаром и киноварью и обнаружено, что даже при относительно высоком содержании As и Hg из-за присутствия реальгара и киновари процентное содержание As и Hg в растворе составляли менее 1% от их общего содержания. Дальнейший вещественный анализ выявил причину эффективности данных лекарственных средств (ТКМ).

Высокое содержание Pb, Cr и Cd в некоторых ТКМ вызвало необходимость контроля качества ТКМ, в состав которых входят минералы. Возможность ИСП-МС анализировать целый ряд элементов является большим преимуществом в работе по контролю качества средств ТКМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Determination of Lead (Pb), Cadmium (Cd), Arsenic (As), Mercury (Hg) and Copper (Cu) / Pharmacopoeia of the People's Republic of China. 2005.

Таблица 3.

Сравнение общей и экстрагируемой ртути в ТКМ с киноварью

Проба ТСМ	TCBX	ZXP	XEZZ	WSNH	WLP	SHXW	XEQRP	Норма
Всего Hg (мг/г)	8,8	42	32	50	24	23	10	0,0137 мг/день/человек (JECFA)
1% HCl экстраг. Hg (мкг/г)	0,37	3,3	0,094	6,7	0,28	0,68	0,28	
Содерж. раств. элемента (%)	0,0042	0,0079	0,00029	0,013	0,0012	0,0030	0,0028	
Суточная доза потребления ТКМ (г/человека)	≤9	≤17	≤0,9	≤4,5	≤12	≤6	≤4	
Общее потребл. (мг/сутки/чел.)	79	272	28,8	225	144	138	60	
Потребл. растворимой Hg (мг/день/чел.)	0,0033	0,021	0,000085	0,030	0,0017	0,0041	0,0017	

ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ АПТЕКА: ИСПЫТАННЫЕ ПРИЕМЫ И НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Материал предоставлен OHAUS, СНГ

ВВЕДЕНИЕ

В сфере приготовления лекарственных средств есть аксиома: чем проще лекарство в применении, тем вероятнее, что пациент будет принимать его правильно. Индивидуальные лекарства изготавливают по медицинским показаниям: надо поменять форму (например, с твердой на жидкую) или исключить аллергенный ингредиент. Еще учитывают личные предпочтения, например придают лекарству вкус, который нравится пациенту.

Майкл Джонс, провизор и владелец производственной аптеки Northwest Pharmaceutical Compounding, руководствуется этим в своей работе. За 30 лет в аптечном деле он узнал, как делать лекарственные средства одновременно эффективными и простыми в применении. Он следует испытанному правилу: выше точность – лучше качество. Майкл Джонс измеряет,



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

смешивает и комбинирует ингредиенты очень точно. Благодаря этому он изготавливает неизменно стабильные, эффективные и простые в применении лекарственные препараты.

ТОЧНО И БЫСТРО

За свою долгую карьеру Майкл Джонс неоднократно модернизировал лабораторию, заменяя старое оборудование более современным. Однако требования к работе провизора не менялись. В 1970-х гг. точность и своевременность выполнения заказа были важными качествами провизора – не менее важными, чем любое оборудование или технология. Свое значение эти качества сохраняют и сегодня. Провизор ежедневно решает сложную задачу приготовления из микрообъемов лекарственных ингредиентов таблеток, капсул, жидкостей или аэрозолей. Причем он следует отраслевому стандарту: отклонение от требуемой дозы – не более 10%. При этом приготовление лекарств – очень трудоемкая работа: часто за короткое время (счет идет на секунды) приходится делать по индивидуальным рецептам лекарства, которые не производят крупные фармацевтические предприятия.

У себя в лаборатории Майкл Джонс наблюдает, как новое и старое дополняют друг друга. Современное оборудование помогает Майклу и его команде готовить за то же время больше лекарств, даже несмотря на постоянное ужесточение правил.

Он особо выделяет аналитические весы OHAUS Explorer (сертифицированы NTEP) за точные и воспроизводимые результаты измерений. Среди преимуществ весов серии Explorer Майкл отметил автоматическую внутреннюю калибровку AutoCal™. Благодаря ей весы не нужно калибровать повторно. Приборы распознают изменения окружающей температуры, которые влияют на взвешивание, и автоматически калибруются – тратить время на ручную калибровку не нужно.



Кроме того, в отличие от прочих весов, разрешение которых 0,1 мг, Explorer взвешивают с точностью до одной сотой миллиграмма. Для фармацевтических производителей и производственных аптек отраслевой стандарт устанавливает допустимое отклонение от требуемой дозы – 10%. Однако у Майкла Джонса благодаря его весам отклонения не превышают 1%.

ЧИСТОТА – ЗАЛОГ ЗДОРОВЬЯ

Стерильность и чистота – условия, необходимые для приготовления лекарств. Как говорит Майкл Джонс, эти принципы неизменны независимо от того, сколько технических новшеств появляется. Он отметил, что стандарты стерильности и чистоты становятся строже. Это положительно сказывается на качестве лекарств – пациенты от этого выигрывают.

Микробное загрязнение и бактериальные эндотоксины – это лишь некоторые из возможных факторов риска. Вариабельность параметров, инородные частицы и отклонения критически важных показателей качества тоже напрямую влияют на конечный продукт: любая ошибка может привести к серьезным последствиям. Многие производственные аптеки – местные предприятия. Они часто делают лекарства для пациентов с ослабленной иммунной системой или для новорожденных, у которых иммунитет еще не сформировался. Поэтому, как указывает Майкл Джонс, важно, чтобы все в лаборатории было стерильными.

И вновь он отметил свои аналитические весы: благодаря защитному чехлу клавиатуры и съемному ветрозащитному кожуху их очень легко чистить.

МАЛЕНЬКОЕ ПРОИЗВОДСТВО – БОЛЬШАЯ ПОЛЬЗА

Производственные аптеки выполняют важнейшую функцию: в них разрабатывают лекарства для пациентов, которым нужна особая дозировка или препарат для однократного применения. Провизоры стараются подобрать лекарству такую форму, чтобы пациенту было удобно его принимать. Сочетание новых технологий и испытанных приемов – вот путь к сохранению этого очень маленького, но нужного людям производства.

OHAUS®

ИССЛЕДОВАНИЕ ГРАНУЛОМЕТРИЧЕСКОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТИЦ ПРИ РАБОТЕ КОНИЧЕСКОЙ ПРОСЕИВАЮЩЕЙ МЕЛЬНИЦЫ CONIKA 6

Материал предоставлен компанией IKA®



ВВЕДЕНИЕ

Иногда таблетки могут оказаться дефектными по разным причинам: излишне твердая или чересчур мягкая консистенция может влиять на действие АФИ на организм пациента. Несомненно, для потребителей имеют значение такие характеристики таблеток, как цвет и форма, а если есть какие-то дефекты, например деформация, изменение цвета, наличие воздушных карманов, то таблетка считается дефектной, и пациент, скорее всего, откажется ее принимать.

Таблетки, которые использовались во время исследований с применением мельницы CONIKA 6, были изготовлены из прессованной микрокристаллической целлюлозы, на них был нанесен тальк, а потом покрытие из оксида железа или диоксида титана. Эти таблетки не содержали каких-либо активных ингредиентов. Целью исследования являлось определение наиболее эффективного способа переработки таблетки в форму, удобную для последующей утилизации.

Для измельчения (деагломерации) овальных таблеток использовали коническую просеивающую мельницу CONIKA 6 с круглыми ситами и перфорацией 5 мм, 2,5 мм, 1 мм и 0,6 мм. Мощность двигателя данной модели – 4 кВт. Мельница имеет функцию «Регулирование скорости вращения», но для минимизации переменных данных исследования, а также для улучшения интерпретации результатов была установлена фиксированная скорость вращения ротора 2000 об/мин. Зазор между ротором и ситом также можно регулировать исходя из задачи, и мы установили зазор в 1 мм.

Все испытания проводились по одному стандарту: в воронку конической просеивающей мельницы закладывалось 5 кг овальных таблеток, после чего включалась CONIKA 6. Измельчённые таблетки загружались в мешок, заранее прикрепленный к конической мельнице, и соответственно после каж-

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

дого этапа измельчения порции таблеток проводилось исследование гранулометрического распределения частиц.



0,6 мм	1 мм	2,5 мм	5 мм

Материалом для исследования была выбрана микрокристаллическая целлюлоза, спресованная в форму овальных таблеток длиной 15 мм, общей высотой 5 мм и шириной 5 мм. Покрытие таблеток – оксид железа и диоксид титана, поэтому таблетки имели цвет от желтоватого до бежевого.



При разламывании таблетки внутри видна белая микрокристаллическая целлюлоза, а по краю – соответствующее желтое или бежевое покрытие.

Было проведено 7 тестов для определения размеров частиц продукта и, соответственно, влияния диаметра отверстий сита на процесс измельчения (деагломерации). Каждая серия испытаний начиналась с исследования сырья, т.е. с таблеток в их первоначальном виде. На каждом следующем этапе всегда использовался продукт, полученный на предыдущей стадии.

Таблица 1.

Использованные сита с размером отверстий, указанным в мм

№ теста	Этап 1	Этап 2	Этап 3	Этап 4
1.	5	2,5	1	0,6
2.	5	1	0,6	
3.	5	0,6		
4.	2,5	1	0,6	
5.	2,5	0,6		
6.	1	0,6		
7.	0,6			

Результаты, полученные на ситах с одинаковым размером отверстий, сравнивали непосредственно друг с другом с учетом регулируемых параметров. Это касается каждого размера, за исключением сита с наибольшим диаметром отверстия (5 мм). Из-за особенностей конструкции сит конической просеивающей мельницы некоторый остаток продукта может застревать в сите при измерении гранулометрического распределения, процентные значения меньше 1 всегда округлялись до нулевого значения. При построении графиков доли процента после запятой не учитывались, поэтому общая сумма процентов не всегда составляет ровно 100%.

ТЕСТЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ



Тестовая серия 1, этап 1: при использовании сита с отверстиями диаметром 5 мм таблетки разламываются, но внутренняя часть не отделяется от покрытия полностью; «вскрытый продукт» состоит из микрокристаллической целлюлозы, которая пока еще прочно связана с покрытием таблетки. Для полного дробления 5 кг таблеток, так чтобы в сите не оставалось сырья, конической просеивающей мельнице CONIKA 6 требуется 1 мин 24 с. Как видно на приведенном рисунке 1, получаются частицы самых разных размеров. Наибольшая доля частиц при гранулометрическом распределении имеет размер 188 мкм (22%). Большой по сравнению с другими ситами диаметр отверстий напрямую указывает на то, что размер примерно 23% полученных частиц по-прежнему заметно превышает 1 мм.

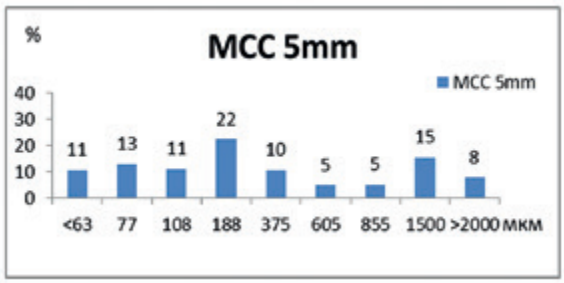


Рисунок 1. Гранулометрическое распределение частиц при использовании сита 5 мм

Тестовая серия 4, этап 1 (Т4, Э1): при использовании сита с отверстиями 2,5 мм микрокристаллическая целлюлоза отделяется от покрытия, появляются крупные хлопья материала покрытия, а прессованная микрокристаллическая целлюлоза принимает форму линзы. Кроме того, существенно возрастает доля мелких фракций микрокристаллической целлюлозы и покрытия. После 2-минутного процесса измельчения 7,2 г исходного материала остались в сите. Как видно на рисунке 2, в полученном продукте больше нет частиц с размером более 2 мм. Доля частиц размером 1,5 мм уменьшилась в 4 раза при непосредственной обработке с помощью сита с отверстиями 2,5 мм, а при предварительной подготовке с помощью сита 5 мм и последующей обработке ситом 2,5 мм – уменьшилась в 2 раза. Больше всего вырос процент фрак-

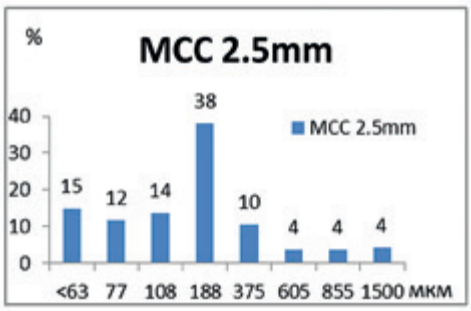


Рисунок 2. **Гранулометрическое распределение частиц при использовании сита 2,5 мм**

ции размером 188 мкм. Для этого этапа конической просеивающей мельнице CONIKA 6 потребовалось 2 мин.



При сравнении результатов исследований, полученных после 1-го этапа процесса с использованием сита с размером пор 2,5 мм с двумя этапами последовательной серии тестов с применением сита размером пор 5 мм, а затем 2,5 мм, можно увидеть, что доля крупных фракций становится меньше (пик приходится на размер частиц 188 мм). При этом время, затраченное на перемалывание с помощью сита 2,5 мм при предшествующем измельчении ситом 5 мм, составило всего 18 с (рисунок 3).

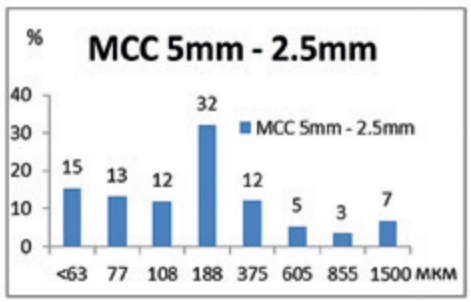


Рисунок 3. **Гранулометрическое распределение частиц при использовании сита 5 мм, а затем 2,5 мм**

Для сита с диаметром отверстий 1 мм были проведены три различных теста. В первом тесте сырьевой материал измельчался непосредственно 1 мм ситом без предварительной обработки (Т6, Э1). Во втором тесте сырьевой материал был предварительно обработан с помощью сита с диаметром отверстий 5 мм. В третьем тесте овальные таблетки были предварительно подготовлены с помощью сита 2,5 мм.

Интересно отметить, что при предварительной обработке таблеток с помощью сита 5 мм (продолжительность процесса 1 мин 24 с) и сита 2,5 мм (продолжительность процесса 2 мин 00 с) следующий этап, т.е. применение сита 1 мм, длился 40 с в обоих случаях. При непосредственном измельчении таблеток с помощью сита 1 мм процесс длился 2 мин 15 с. Доля продукта, оставшегося от 5 кг исходного сырья в сите на момент окончания процесса, составляла около 60 г во всех вариантах.

При рассмотрении гранулометрического распределения обращают на себя внимание отчетливые различия результатов при использовании сит с разными диаметрами отверстий.

На рисунке 4 представлены результаы исследования гранулометрического состава при непосредственном использовании сита 1 мм без предварительной подготовки продукта с помощью сита с отверстиями другого диаметра. Показано, что доля крупных фракций в этом случае наименьшая по сравнению с другими тестовыми сериями. Основной пик – 49%, а доля частиц, размер которых превышает 188 мкм, составляет в общей сложности всего лишь 8%. Количество частиц, размер которых меньше 188 мкм, т.е. <63 мкм, 77 мкм и 108 мкм, примерно одинаково.

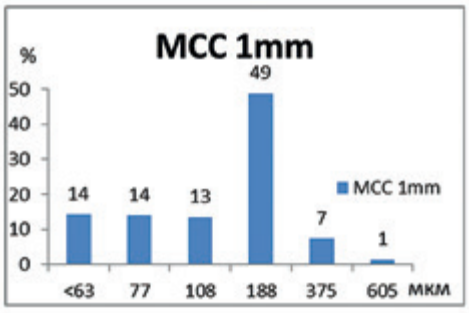
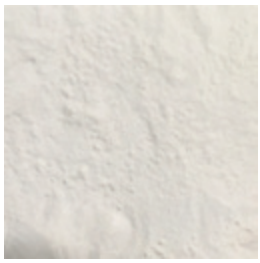


Рисунок 4. **Гранулометрическое распределение частиц при использовании сита 1 мм**

Несмотря на то, что при предварительной обработке ситом 5 мм с последующим использованием сита 1 мм (рисунок 5) отмечена более высокая доля очень мелкой фракции, составляющая 17% для размера <63 мкм (прирост плюс 3%), основной пик падает до 44% (снижение минус 5 %), а доля частиц размером более 188 мкм возрастает на 6%.



Хотя в гранулометрическом распределении продукта при предварительной подготовке сырья с помощью сита 2,5 мм основной пик имеет значение 39% (по сравнению с распределением частиц без предварительной обработки

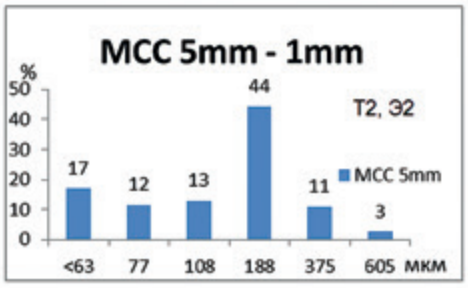


Рисунок 5. **Гранулометрическое распределение частиц при использовании сита 5 мм, а затем 1 мм**

разница составляет 10%), но зато общая доля частиц, размер которых меньше 188 мкм, в общей сложности увеличивается на 8%. Доля фракций, размер которых превышает 188 мкм, увеличивается незначительно – на 3% (рисунок 6).

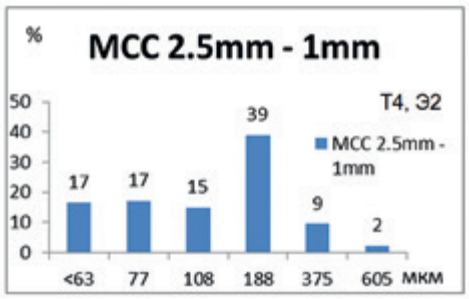


Рисунок 6. **Гранулометрическое распределение частиц при использовании сита 2,5 мм, а затем 1 мм**

Полученные результаты свидетельствуют о наличии очевидного влияния размера отверстий сита на гранулометрическое распределение.

При использовании сита 0,6 мм существенную роль играет то, были ли таблетки предварительно обработаны на конической просеивающей мельнице CONIKA 6 и какое сито при этом использовалось.

Впрочем, результаты обработки таблеток без предварительного процесса тоже превосходные.

На рисунке 7 представлены результаты, полученные при использовании сита с диаметром отверстий 0,6 мм.

Основной пик приходится, как обычно, на долю частиц размером 188 мкм, при этом доля наиболее крупных частиц размером 375 мкм составляет всего лишь незначительные 4%. Доля частиц размером менее 63 мкм достаточно велика – 20%, в то же время на долю частиц других размеров (меньше 188 мкм) приходится по 15%. Конечно, процесс занимает некоторое время, пока сырьевой материал не станет достаточно мелким. В проведенном тесте для измельчения 5 кг потребовалось 2 мин 11 с. Возможным недостатком этого процесса может быть температура, которая

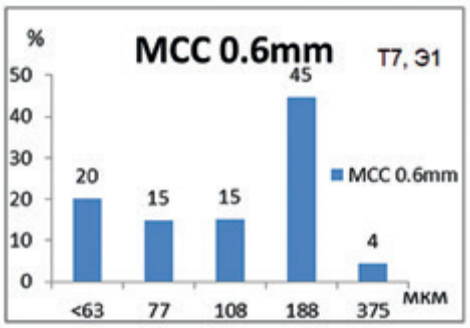


Рисунок 7. **Гранулометрическое распределение частиц при использовании сита 0,6 мм**

возрастает во время процесса. Поскольку из-за узости отверстий сита выделяется много тепла, вызванного трением, с температурой, доходящей в проведенных измерениях до 40,9 °С, это может (только при очень чувствительных материалах таблетки) оказать соответствующее влияние на продукцию. Здесь также отмечена наибольшая доля материала, оставшегося в сите (остаток в сите = 300 г).

Если продукт заранее обработан с помощью сита 1 мм (рисунок 8), результат также получается очень хороший. При предварительном измельчении сырья процесс занимает почти столько же времени, сколько при измельчении с помощью сита 0,6 мм, а затем еще 40 с для деагломерации продукта сита 1 мм с помощью сита 0,6 мм. Тем не менее в этом случае удается избежать возможного сильного нагрева продукта (Т=29 °С после измельчения ситом 0,6 мм). Кроме того, удается получить более высокую долю частиц размером <63 мкм и 77 мкм – рост на 3% и 1% соответственно. При этом основной пик снижается до 39%, и на 1% увеличивается доля частиц с наибольшим измеренным диаметром 375 мкм. В этом варианте в рабочей камере осталось всего около 60 г остаточного продукта.

При предварительной обработке продолговатых таблеток с помощью сита 5 мм или сита 2,5 (рисунки 9, 10) мм было обнаружено, что для конечного продукта, т.е. продукта после обработки ситом 5 мм и ситом 2,5 мм с последующим использованием сита

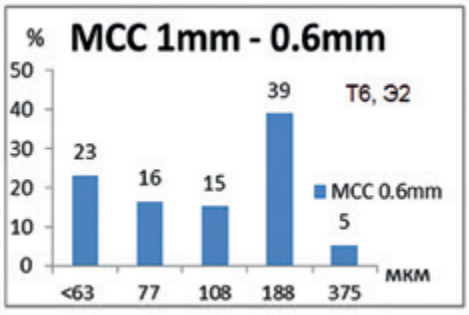


Рисунок 8. **Гранулометрическое распределение частиц при использовании сита 1 мм, а затем 0,6 мм**

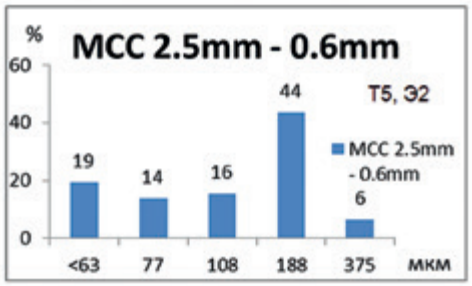


Рисунок 9. **Гранулометрическое распределение частиц при использовании сита 2,5 мм, а затем 0, 6 мм**

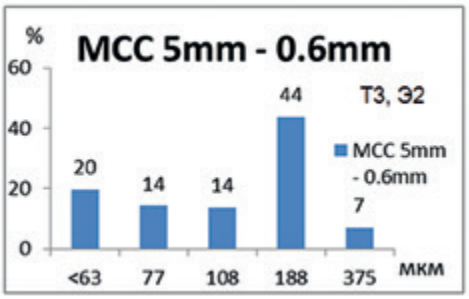


Рисунок 10. **Гранулометрическое распределение частиц при использовании сита 5 мм, а затем 0,6 мм**



0,6 мм, имеет место лишь небольшое различие в гранулометрическом распределении. Основной пик в обоих случаях имеет значение 44%. Доля крупных частиц размером 375 мкм, составляющая от 6% до 7%, довольно высока по сравнению с процессами, описанными ранее.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Не существует панацеи, позволяющей решить все задачи с помощью одного единственного процесса и одного единственного инструмента. Однако отчетливо видно, что с помощью продуманного применения сита можно повлиять на продолжительность процесса, гранулометрическое распределение, температуру и даже на форму микрокристаллической целлюлозы и покрытия таблеток.

В зависимости от поставленной задачи может быть целесообразно задуматься о правильном выборе сита, чтобы произвести наилучший продукт:

1) для получения продукта с максимальным количеством частиц размером <63 мкм необходимо сначала предварительно обработать сырье с помощью сита 1 мм, а затем окончательно измельчить с помощью сита 0,6 мм;



2) если лимитирующим фактором являеется количество стадий процесса и температура не оказывает влияния на свойства продукта, правильным решением будет в рамках одного этапа использовать сразу сито 0,6 мм;

3) если гранулометрическое распределение должно соответствовать кривой Гаусса, а максимальная доля частиц иметь размер 188 мкм, тогда первым этапом процесса может стать использование сита 5 мм, а вторым этапом – применение сита 1 мм.

В конечном счете процесс определяет, какое именно сито необходимо использовать.

Немного о конической просеивающей мельнице типа CONIKA от компании IKA Werke GmbH.

Мельница сухого помола с коническими ротором и ситом; CON – коническая, IKA – имя компании.

Модификации мельницы:

CONIKA 6 с диаметром на входе 6 дюймов (~15,2 см)

CONIKA 8 с диаметром на входе 8 дюймов (~20,3 см)

CONIKA 10 с диаметром на входе 10 дюймов (~25,4 см)

- Для производительности 500–4000 кг/ч.
- Измельчение до 150 мкм.
- Температура –10 °C ... +100 °C.
- Разные конфигурации ротора и сит для выбора оптимального процесса измельчения.
- Удобный интерфейс панели управления.
- Простое интегрирование с другим оборудованием в одну производственную линию.
- Разные виды исполнения: от строительной отрасли до фармацевтической.

ОБЗОР НОВИНКИ ЯПОНСКОГО ПРОИЗВОДИТЕЛЯ SHINKO DENSHI БРЕНДА VIBRA. ВЫСОКОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ВЕСЫ ПРЕМИУМ-КЛАССА СЕРИИ ALE

Материал предоставлен компанией ViBRA®

ВВЕДЕНИЕ

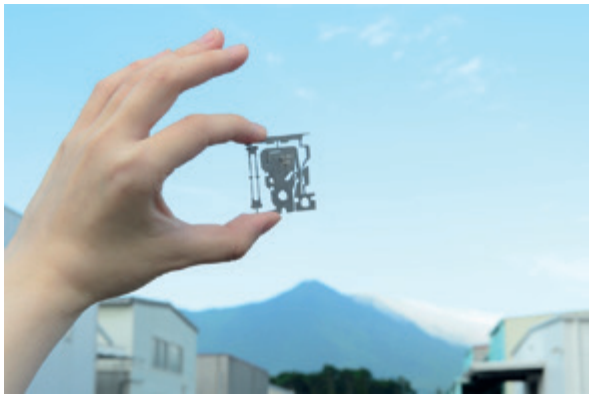
В сентябре 2017 г. на рынок точного взвешивания выходят новые высокофункциональные лабораторные весы ViBRA серии ALE, сконструированные на акустическом датчике Tuning-Fork.

В 1980-х годах в процессе разработки оригинального измерительного датчика Shinko Denshi изобрели первый в мире акустический датчик Tuning-Fork. Изобретение датчика Tuning-Fork стало прорывом в весовых технологиях, значительно улучшив процесс измерения и стабильность измерительных показаний высокоточного весового оборудования. С этого времени Tuning-Fork стал основной технологией Shinko Denshi.

Использование датчика Tuning-Fork в весах ViBRA серии ALE позволяет существенно повысить их качество и надежность. Количество отказов и поломок стало в 3 раза меньше по сравнению с ведущими производителями весов. Качество используемых материалов и сборки подтверждается предоставлением 7-летнего срока гарантии от производителя.

Новинка также обладает высокой устойчивостью к перегрузу и неприхотливостью к условиям эксплуатации. Показания весов серии ALE не зависят от температуры окружающей среды и нечувствительны к воздействию электромагнитных





ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

помех. Весы слабо подвержены повреждениям во время транспортировки или вследствие ненадлежащего обращения.

Весы ViBRA серии ALE отличаются высокой скоростью нагрева (выходят на рабочий режим в течение 1 мин), а также возможностью автономной работы. Конструкция весов позволяет производить взвешивание магнитных материалов без дополнительных приспособлений.

Весы серии ALE обладают следующими функциями.

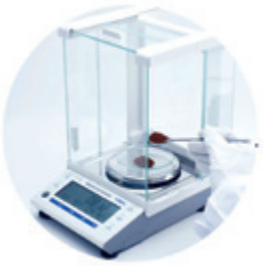
- Счетный режим.
- Процентное взвешивание.
- Функция сравнения.
- Статистическая функция.
- Суммирование.
- Функция взвешивания нестабильных грузов.
- Возможность взвешивания под весами.
- Возможность настройки уровня доступа пользователей.
- Режим умножения на коэффициент.
- Режим вычисления по формуле.



Особенности весов ViBRA серии ALE:

Самое короткое время отклика 1,6 с

Короткое время отклика незаменимо для эффективного взвешивания. В весах ViBRA серии ALE значительно уменьшено время стабилизации (отклика) с применением новой технологии.



Автоматическая встроенная калибровка

Расширенный модельный ряд для весов со встроенной калибровкой с Max до 15 кг.



Автономная работа для весов в базовой комплектации

Благодаря низкому энергопотреблению весы ViBRA серии ALE могут работать от «сухих» батарей. Это позволяет использовать весы в местах без возможности подключения к точке электропитания.



Уникальная модель ALE1203

Впервые на датчике Tuning-Fork с Max=1200 г. и d=0,001 г.



Дружественный по отношению к пользователю интерфейс (user-friendly)

Весы ViBRA серии ALE легко управляются. Дружественный дисплей помогает пользователю текстовым сообщением.



Функция свободной кнопки

В весах ViBRA серии ALE на передней панели есть 4 «свободные» кнопки, которые легко программируются на быстрый вызов часто используемых функций. Минимизируйте время при проведении стандартных процедур с весами.



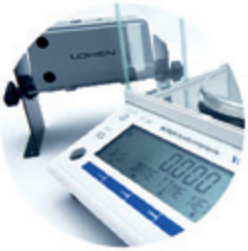
Самые компактные в сегменте лабораторных весов

Компактный корпус весов серии ALE позволяет использовать весы в самых небольших лабораториях. Кроме того, весы легко помещаются в любом ламинарном или перчаточном боксе.



Многообразие интерфейсов

В стандартной комплектации весов ViBRA серии ALE для соединения с внешними устройствами присутствует RS232C и USB. Второй RS232C, Ethernet и релейный выход доступны в виде дополнительных опций.



Четкий, яркий и большой LCD-дисплей



На четком, ярком и большом LCD-дисплее пользователь может без ошибок прочесть показания даже в тяжелых производственных условиях.

Взвешивание нестабильных грузов при минимальном времени отклика

Стабильность и скорость получения результата должны быть корректными в зависимости от характера измеряемого объекта. Весы ViBRA серии ALE позволяют взвешивать животных в лабораторных условиях.



Возможность индивидуальных настроек пользователей

Весы ViBRA серии ALE позволяют путем ввода настроек ID-пользователей решать разные производственные задачи нескольких операторов.



Измерение плотности

Все весы серии ALE в базовой комплектации оснащены поддонным крюком для взвешивания под весами и определения плотности образцов.



С весами ViBRA серии ALE измерения становятся более быстрыми, простыми, понятными и надежными.

Raypa
Laboratory equipment

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ В ГЕРМЕТИЧНЫХ КОНТЕЙНЕРАХ

Материал предоставлен компанией Raypa

ВВЕДЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Целью стерилизации пищевых продуктов в герметически запечатанных контейнерах является уничтожение находящихся там бактерий и спор. Тепловая стерилизация подобных продуктов должна быть достаточно интенсивной, чтобы уничтожить даже самые устойчивые к нагреванию микроорганизмы. Внутри продукта необходимо создать температуру, превышающую 100 °C (обычно в пределах 110–121 °C в зависимости от типа продукта). Продукты выдерживаются в течение определенного периода времени при достаточной для стерилизации температуре, которая определяется типом продукта и размером контейнера.

Если споры в пищевом продукте были уничтожены не полностью, то при восстановлении благоприятных условий из них разовьются микроорганизмы. Выжившие микроорганизмы приводят к порче заготовленных продуктов, а также выделяют токсины, вызывающие у потребителей пищевое отравление.

С точки зрения микробиологического обеззараживания идеальным решением была бы максимально интенсивная тепловая стерилизация, которая устранила бы риск выживания каких-либо микроорганизмов. Большинство продуктов, однако, невозможно подвергнуть настолько сильному нагреву без ухудшения их структурных, цветовых, вкусовых и питательных свойств, поскольку при нагревании разрушаются витамины и белковые компоненты.

Приняв во внимание выше указанные аспекты, необходимо найти компромисс: интенсивность тепловой стерилизации должна быть достаточной, чтобы обеспечить бактериальную безопасность, и как можно более щадящей, чтобы сохранить надлежащее качество продуктов.

Для достижения баланса между требованиями к безопасности и пищевыми свойствами продукции был разработан метод, заключающийся в измерении суммарного количества тепла, которое воздействует на заготовленный продукт в течение всего процесса стерилизации.

Количество тепла, воздействующего на заготовленный продукт, можно определить с помощью F-величины (см. раздел «Определение F-величины»). Эта концепция широко используется как крупными, так и мелкими производителями.

ПРОЦЕСС

Процесс стерилизации заготовок посредством пара можно разделить на три фазы:

1. Фаза нагрева – температура продукта возрастает от комнатной до той, что требуется для стерилизации.
2. Фаза выдерживания – температура поддерживается в течение определенного времени.
3. Фаза охлаждения – температура внутри контейнера понижается.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ОБОРУДОВАНИЕ

Для осуществления полного цикла стерилизации в соответствии с выше перечисленными принципами компания RAYPA выпускает линию продукции RFG.

- Модели паровых автоклавов AE-RFG с вертикальной загрузкой: заготовленные продукты загружаются в автоклав в металлических корзинах. Корзины устанавливаются в автоклав по отдельности или друг на друга.



Используется главным образом для жестяных/алюминиевых банок, герметичных стеклянных банок или контейнеров из синтетических материалов.



Жестяная банка



Стеклянная банка

- Модели паровых автоклавов AHS-RFG с горизонтальной загрузкой: заготовленные продукты загружаются в автоклав на металлических поддонах.

Главным образом используются для упаковок из алюминиевой фольги и пластиковых пакетов.







Упаковка из фольги

На последней стадии процесса стерилизации продукты необходимо охладить как можно быстрее. В автоклавах RAYPA RFG эта операция выполняется путем подачи воды в стерилизационную камеру. Контакт холодной воды и пара приводит к конденсации и быстрому падению давления.

При этом избыточное давление, образовавшееся в процессе стерилизации внутри банок или пакетов, некоторое время остается неизменным. Во время этой стадии, когда давление снаружи уже упало, а давление внутри контейнеров остается повышенным из-за все еще высокой температуры продуктов, разница в давлении может деформировать гер-

Модель	Емкость, л	Полезная емкость, л	∅ x H, см	Глубина x ширина x высота, см	Температура °C	Макс. давление, бар	Мощность, Вт	Вес, кг	Время, мин
AES-28 RFG	33	28	30x40	56x51x112	50-130	2,1	3200	90	3–180
AES-50 RFG	55	50	30x70	56x51x130	50-130	2,1	3200	110	3–180
AES-75 RFG	79	75	40 x 60	73x62x119	50-130	2,1	6000	140	3–180
AES-110 RFG	115	110	40x85	73x63x144	50-130	2,1	6000	180	3–180
AES-150 RFG	175	150	50x75	85x76x140	50-130	2,1	9000	265	3–180

Примечание: AES-28-RFG, AES-50-RFG 1P+N 230 VAC (1P+N 110VAC по запросу).

AES-75-RFG, AES-110-RFG и AES-150-RFG 3P + N 400 VAC (3P + N 230 VAC по запросу).

Модель	Полезная емкость, л	∅ x H, см	Глубина x ширина x высота, см	Температура °C	Макс. давление, бар	Мощность, Вт	Вес, кг	Время, мин
AH-21-RFG	21	25x43	42,5x59x68	50–130	2,1	2000	55	3–180
AHS-50-RFG	50	40 x 40	78x76x63	50–130	2,1	2800	125	3–180
AHS-75-RFG	75	40 x 60	98x76x63	50–130	2,1	3200	140	3–180

метичные контейнеры и даже привести к их взрыву. Таким образом, большой разницы давлений следует избегать.

В автоклавах RAYPA RFG это достигается с помощью введения сжатого воздуха в стерилизационную камеру на начальной стадии охлаждения.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ F-ВЕЛИЧИНЫ

Обеспечение безопасной, но не чрезмерной тепловой стерилизации требует практического метода для точного определения количества теплового воздействия. Такой метод должен учитывать температуру и время тепловой стерилизации.

Для удобства принято считать, что F-величина, равная 1, соответствует стерилизации при 121 °C в течение 1 мин.

Использование справочного значения 121 °C не означает, что это рекомендуемая или оптимальная температура стерилизации. Для любой другой используемой температуры можно также подсчитать F-величину тепловой стерилизации в минуту.

Во время процесса тепловой стерилизации температуру внутри контейнеров нужно измерять в самой холодной точке продукта – в том месте, куда тепло добирается в последнюю очередь. Для банок это обычно центр контейнера, а для жидкостей – одна треть высоты емкости. Кроме того, в процессе нагрева внешние части консервированного продукта всегда получают больше тепла, чем центр, то есть F-величина там будет выше. Соответственно, стерилизацию нужно проводить таким образом, чтобы внешние части продукта не потеряли своих свойств из-за чрезмерного нагрева.

Близкие к 100 °C температуры характеризуются очень низкими F-величинами, которые потребовали бы долгой тепловой стерилизации для достижения суммарных F-величин, достаточных для полной стерилизации. С другой стороны, температуры выше 121 °C могли бы применяться для кратковременной стерилизации, но в этом случае необходимо соблюдать осторожность, чтобы не повредить качество продукта.

Измеряя температуру продукта во время процесса стерилизации с помощью теплового датчика в самой холодной точке контейнера, можно определить суммарную достигнутую F-величину. Для этого температуру продукта в процессе стерилизации необходимо измерять каждую минуту.

Формула расчета F-величины:

$$F_0 = \Delta t \sum 10^{\frac{T-T_0}{z}},$$

где F_0 – эквивалентное количество времени, в течение которого производилась стерилизация продукта; Δt – временной интервал между двумя последовательными измерениями T (в минутах); T – температура стерилизуемого продукта по истечении времени t; T_0 – справочное значение температуры (стандартно, 121 °C); z – температурный коэффициент (считается равным 10 °C).

На практике повторно рассчитывать F-величину для обрабатываемых продуктов одного типа не нужно. Для каждой партии достаточно определить F-величину только один раз, учитывая размер контейнеров, а также интенсивность и продолжительность тепловой стерилизации. Если эти параметры не изменились, то и F-величина останется неизменной для следующей загрузки.

F-величины для 1 мин теплового воздействия при температурах свыше 100 °C приведены в таблице 1:

Таблица 1.

F-величины для температур в диапазоне от 100 °C до 130 °C

Температура (°C)	z-величина 10	Температура (°C)	z-величина 10	Температура (°C)	z-величина 10
100	0,008	111	0,100	121	1,000
101	0,010	112	0,126	122	1,259
102	0,013	113	0,158	123	1,585
103	0,016	114	0,200	124	1,995
104	0,020	115	0,251	125	2,512
105	0,025	116	0,316	126	3,162
106	0,032	117	0,398	127	3,981
107	0,040	118	0,501	128	5,012
108	0,050	119	0,631	129	6,310
109	0,063	120	0,794	130	7,943
110	0,079				

BINDER
Best conditions for your success

ПРИМЕНЕНИЕ КЛИМАТИЧЕСКИХ КАМЕР BINDER ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

Материал предоставлен компанией BINDER

ВВЕДЕНИЕ

Штаб-квартира Leatherhead Food Research располагается в Бирмингеме, Великобритания. Компания была основана в 1919 году и предлагает широкий спектр услуг в области пищевой индустрии, таких как анализ рынка, исследования пищевых продуктов, выдача разрешений, подготовка коммерческой и технической информации, а также проведение тренингов. 1500 компаний, производящих продукты питания и напитки, входят в состав Leatherhead Food Research.

Текущая деятельность компании связана с исследованием срока годности натуральных пищевых красителей. В последнее время многие компании-производители пищевых продуктов отказываются от использования искусственных компонентов в пользу натуральных. Как следствие, производители столкнулись с массой проблем, связанных с необходимостью проводить исследования срока годности продуктов в максимально приближенных к естественным условиях. Однако производители продуктов питания не располагают необходимым количеством времени, поскольку вынуждены выпускать новые продукты в крайне сжатые сроки. Зачастую у производителей нет возможности проводить исследования срока хранения в условиях реального времени. Ускоренное исследование срока хранения (ASLT) является непрямым методом измерения и оценки стабильности продукта. С целью ускоренной комплексной оценки срока годности компания Leatherhead применяет климатические камеры постоянных условий объемом 240 и 720 л от BINDER вот уже несколько лет. На сегодняшний день климатические камеры используются для спецификации методов ускоренного исследования срока хранения и в качестве стандартизованной методики исследования фотостабильности продуктов, содержащих пищевые красители.



Ускоренное исследование срока хранения проводили с использованием различных видов пищевых продуктов, содержащих один и тот же краситель (твердые карамельки, сладости, имеющие желеобразную текстуру, напитки на основе фруктовых соков). Образцы помещали в климатическую камеру с постоянными условиями и выдерживали при температуре 20 °C, 30 °C и 40 °C, а также подвергали воздействию светом вы-

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ



сокой интенсивности. По окончании эксперимента замеряли потерю интенсивности окраски (ΔH) в зависимости от времени (7 месяцев при 20 °C и 8 недель при 30 °C и 40 °C).

Все изменения химических, микробиологических и физических показателей замерялись в определенные периоды времени вплоть до тех пор, пока продукт не становился непригодным для употребления в пищу. Помимо определения стабильности окраски продуктов питания и напитков, использование методов исследования сроков хранения позволяет решать многие другие задачи, например определение безопасности продукта при хранении в ненадлежащих условиях, выявление дефектов на ранних стадиях разработки продукта и для оценки стабильности его упаковки.

Благодаря возможности поддерживать заданные значения температуры и влажности в течение длительного периода времени с высокой точностью климатические камеры KBF P Binder являются оптимальным решением для применения в фармацевтической и пищевой промышленности.

ВАЖНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КЛИМАТИЧЕСКИХ КАМЕР ПОСТОЯННЫХ УСЛОВИЙ СЕРИИ KBF P

- Цветной сенсорный дисплей.
- Диапазон температур: от 0 °C до 70 °C.
- Диапазон температур с освещением: от 10 °C до 60 °C.
- Диапазон влажности: от 10 до 80 % отн. вл.
- Световые кассеты с гибким позиционированием с источником освещения по нормам ICH УФ/видимое.



- Камерная технология предварительного нагрева APT.line™.
- Регулировка влажности с емкостным датчиком влажности и паровым увлажнением.
- Внутренняя камера выполнена полностью из нержавеющей стали.
- Интуитивно понятный контроллер с жидкокристаллическим дисплеем с программированием на определенный промежуток времени и в режиме реального времени с внутренней записью данных измерений.
- Плотно закрывающаяся внутренняя дверца из безопасного стекла (ESG) со специальным покрытием TIMELESS.
- Решетчатые вставные полки из нержавеющей стали.
- Порт доступа с силиконовыми заглушками, 30 мм, слева.
- 4 устойчивых ролика, 2 – со стояночным тормозом.
- Независимое устройство защиты от перегрева и переохлаждения, класс 3.1 (DIN 12880) с визуальным и акустическим сигналами тревоги.
- Интерфейс для подключения к компьютеру: Ethernet.
- Нагрев двери.



BINDER
Best conditions for your success

СОВРЕМЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ОХЛАЖДЕНИЯ ЭЛЕМЕНТОМ ПЕЛЬТЬЕ

Вытеснят ли модули Пельтье компрессор?

Материал предоставлен компанией BINDER

ВВЕДЕНИЕ

Элементы Пельтье представляют собой термоэлектрические компоненты, способные в обратимом порядке перекачивать тепло в заданном направлении. Несмотря на то, что этот принцип известен уже достаточно давно, прорыв в технологии Пельтье наметился лишь с появлением современных полупроводниковых материалов.

Преимущества технологии Пельтье заключаются в вариативности размеров охлаждающих элементов, их продолжительной автономности и надежности, а также в предельно точной регулировке. Кроме того, элементы Пельтье не имеют подвижных частей и потому не создают никаких вибраций и шумов. Основное преимущество по сравнению с обычными компрессорными холодильными машинами заключается в использовании негорючих и экологически безопасных хладагентов.



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

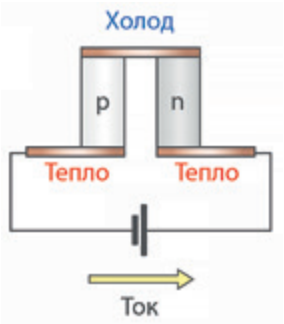
Однако максимальная производительность и КПД систем охлаждения с элементами Пельтье значительно ниже, чем у компрессорных систем. А в случае использования стандартных холодильных и морозильных аппаратов приходится мириться со значительно более высокими затратами на электроэнергию и более интенсивной теплоотдачей.

Благодаря своим особым свойствам технология термоэлектрического охлаждения подходит для многих специфических областей применения, однако из-за своей нерентабельности она не вытеснит компрессоры, например, в бытовом холодильном оборудовании.

ТЕХНИЧЕСКОЕ ВОПЛОЩЕНИЕ ТЕРМОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ОХЛАЖДЕНИЯ. УСТРОЙСТВО ЭЛЕМЕНТА ПЕЛЬТЬЕ

Термопара

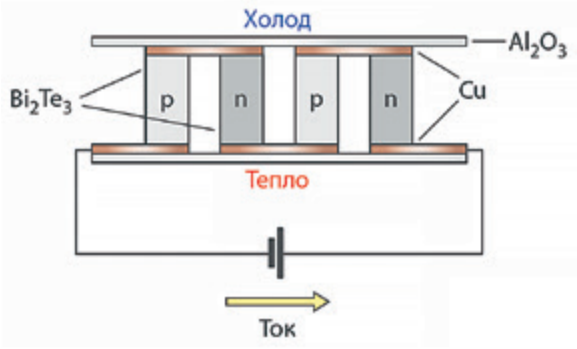
Самый мелкий компонент термоэлемента называется термопарой. Термопара состоит из двух электропроводников с сильно различающимися коэффициентами Зеебека для создания максимально возможного термоэлектрического напряжения. Для этого чаще всего используются полупроводниковые блоки, концы которых соединены медью. Наиболее подходящим материалом для применения при температуре окружающей среды является на сегодняшний день теллурид висмута, легированный донорными и акцепторными примесями.



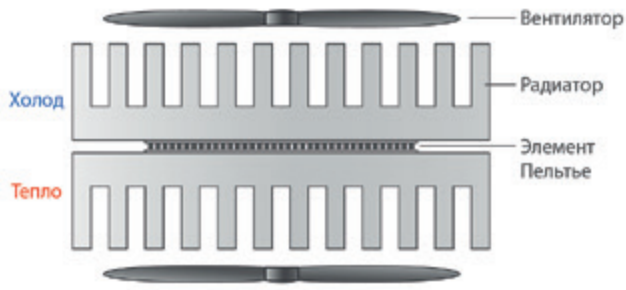
Термоэлемент

Современный элемент Пельтье состоит из множества термопар, которые последовательно соединены между собой медной перемычкой. Медные перемычки с каждой из сторон термически соединены друг с другом керамическими пластинами (чаще всего из оксида алюминия), но при этом электрически изолированы.

Использование полупроводникового материала с донорными и акцепторными примесями не позволяет называть это «полупроводниковой технологией» в строгом смысле, которая применяется, например, в полупроводниковых диодах. Обычная полупроводниковая технология подразумевает непосредственный контакт между полупроводниками, который блокирует прохождение тока в одном направлении. В элементе Пельтье, напротив, это не работает, поэтому различные полупроводники соединяются в основном металлическими перемычками. Предпочтение отдается полупроводникам, а не другим проводниковым материалам лишь потому, что в этой группе материалов удалось найти вещества с высоким термоэлектрическим напряжением, которые хорошо проводят электрический ток, но изолируют тепло. Лишь при наличии таких свойств удается эффективно изолировать холодную сторону от теплой и создать полезную разность температур.



Модуль Пельтье состоит из одного или нескольких элементов Пельтье и термически соединенных радиаторов. Используемая для перекачки электрическая мощность в элементах Пельтье необратимо преобразуется в тепло, которое нуждается в эффективном отведении. Кроме того, элементы Пельтье в обратимом порядке перекачивают тепло с одной стороны на другую (в зависимости от направления тока). Таким образом, на одной стороне происходит поглощение тепла, которое, однако, существенно менее интенсивное, чем теплоотдача на другой стороне. Поэтому теплообмен должен осуществляться посредством крупных радиаторов, которые термически плотно прилегают к элементу Пельтье с обеих сторон. Нагретый или охлажденный воздух в основном отводится мощными вентиляторами.



РЕГУЛИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ПЕЛЬТЬЕ

Зачастую элементы Пельтье регулируются ШИМ, при этом средняя сила тока зависит от длины импульсов тока высокой частоты. Распространенным методом является также регулирование напряжения. Обычное же двухпозиционное регулирование практически не применяется, так как оно ведет к перегрузке элемента Пельтье и значительному сокращению его срока службы.

Термический стресс

Несмотря на то, что модули Пельтье можно регулировать простым переключением полюсов, необходимо понимать последствия этого процесса. При изменении направления тока еще до уравнивания температур в элементе Пельтье компонент подвергается очень сильному термическому стрессу. Производители чипов Пельтье тестируют, сколько циклов переключения полюсов могут выдержать их изделия, провоцируя тем самым выход чипов из строя спустя всего несколько сот подобных циклов. Определенные модификации позволяют увеличить устойчивость к циклам переключения.

Но в научной сфере, где очень важны долговременная стабильность и надежность оборудования, такое сокращение срока службы зачастую считается неприемлемым.

СРАВНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ОХЛАЖДЕНИЯ

Преимущества систем Пельтье

За счет отсутствия подвижных и быстроизнашивающихся деталей все элементы Пельтье очень надежны, долговечны и не нуждаются в техобслуживании. Кроме того, они не создают никаких вибраций и шумов. Поэтому элементы компактны и без труда позволяют объединять даже несколько модулей в один блок. Еще одно преимущество заключается в недорогом производстве. В системах Пельтье нет хладагентов, которые легко воспламеняются, разрушают озоновый слой и вызывают парниковый эффект. Отпадает надобность в целом контуре охлаждения с компрессором, дросселем и конструктивными элементами испарителя и конденсатора, которые занимают много места. Элементы не нуждаются в техобслуживании, а в случае выхода из строя без труда заменяются.

Современные технологии регулирования позволяют более точно дозировать охлаждающий эффект, чем в стандартном компрессоре. Кроме того, в результате переключения полюсов функция может изменяться на противоположную, то есть охлаждающий элемент может становиться эффективным нагревательным элементом.

Недостатки систем Пельтье

При создании модулей Пельтье технически неизбежно очень тесное расположение теплой и холодной сторон. На практике толщина современных модулей Пельтье составляет всего 3–5 мм, что требует очень эффективного подвода и отвода тепла. Эта техническая дилемма решается установкой больших радиаторов с вентиляторами. Производительность модуля Пельтье зависит в первую очередь от необходимой разности температур. Чем больше разность температур, тем меньше мощность перекачки, а при разности около 70 К мощность падает до нуля (на сегодняшний день развития технологии Пельтье). Более высокие значения разности удается реализовать лишь за счет затратной установки многоступенчатых элементов.

Энергоэффективность

Элементы Пельтье способны поглощать тепло с одной стороны и отдавать его с другой. В качестве посредника в этом обратимом процессе перекачки выступает электрический ток или его носитель заряда. Электрический ток является своего рода хладагентом в контуре охлаждения, а мощность перекачки в идеале пропорциональна проходящему току. Процесс необратимого превращения тока в джоулево тепло неизбежен из-за омического сопротивления элемента Пельтье. Выделяющееся в результате этого тепло не только означает потерю мощности, но и требует компенсации возникающих на холодной стороне тепловых потерь из-за мощности перекачки до момента достижения полезной холодопроизводительности.

На практике приходится мириться с многократными потерями мощности перекачки тепла в системах Пельтье. Холодопроизводительность компрессорных систем, напротив, превышает рабочие затраты примерно в два раза.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПЕЛЬТЬЕ

Современная технология Пельтье применяется в тех случаях, когда компрессоры не подходят из-за своих больших размеров, энергоэффективность играет лишь второстепенную роль или требуется совсем незначительная мощность охлаждения.

В быту и на досуге

Холодильные боксы с элементами Пельтье, предназначенные для интенсивного охлаждения продуктов питания и напитков, идеально подходят для автомобилей и дач на колесах, ведь они мобильны в своем использовании и могут питаться от 12-вольтовой бортовой сети.

Главный недостаток модулей Пельтье применяется в осушителе воздуха. Осушаемый воздух пропускается через холодную сторону модуля Пельтье, а образующийся конденсат стекает в специальный поддон.

Научная сфера

Ярким примером термостатирования по технологии Пельтье является амплификатор – лабораторный прибор для амплификации последовательностей ДНК. При так называемой реакции ПЦР (полимеразной цепной реакции) требуется три различных, быстро сменяющихся температуры реакции.

Ввиду своего устройства компрессорные системы бывают лишь определенных размеров. А модули Пельтье могут быть совсем крошечными, обладая при этом удивительно высокой мощностью охлаждения. Миниатюрные элементы Пельтье используются, например, в сцинтилляторах, где требуется подавление шумов фотодиодов путем охлаждения.

Функционирование большинства компрессорных систем зависит от положения. В наклоненном или перевернутом состоянии они перестают работать, равно как и в невесомости. А модули Пельтье можно встраивать в мобильные устройства, которые питаются от широко распространенного 12-вольтового аккумулятора. Пример использования: денсиметры, вискозиметры, реометры или рефрактометры.

Специальные области применения

Элементы Пельтье отдают больше тепла, чем способы перекачивать. Поэтому в большинстве компьютерных процессоров широко используются высокотехнологичные радиаторы и теплопередающие элементы, которые служат исключительно для отвода выделяемого процессором тепла. Технология Пельтье применяется лишь в тех случаях, когда температура процессора должна быть ниже температуры окружающей среды.

Разность температур в многоступенчатых модулях Пельтье может достигать 100 К: такие модули используются, например, в ИК-датчиках или гигрометрах точки росы. Диффузионные камеры, предназначенные для доказательства различных частиц (альфа-излучения, электронов, позитронов), нуждаются как в охлаждении, так и в обогреве. И оптимальным решением этой задачи является компактная технология Пельтье.

Охлаждающие инкубаторы

В лабораторных охлаждающих инкубаторах технологию Пельтье начали применять совсем недавно. Хотя охлаждающие инкубаторы и не очень подходят для поддержания неизменно низких температур (например, ниже 10 °C), однако для инкубации в пределах температуры окружающей среды (15–30 °C) или специфического применения с теплоподачей эти устройства вполне рентабельны.

При этом низкая энергоэффективность практически не играет никакой роли ввиду малоинтенсивного охлаждения без достижения максимальной мощности. Благодаря этому средний расход электроэнергии ниже, чем у классического охлаждающего инкубатора, а техническое устройство значительно проще, чем у компрессорной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология Пельтье открывает совершенно новые возможности в специфических областях применения, особенно в тех случаях, когда не требуется максимальная мощность охлаждения или высокая энергоэффективность. Независимость от размеров и положения установки позволяет разрабатывать небольшие и портативные устройства. Эффективность термостатирования с использованием модулей Пельтье при небольшом перепаде температур достигается за счет точного дозирования мощности охлаждения.

А стандартные компрессорные системы охлаждения благодаря своим большим резервам мощности и высокому КПД будут по-прежнему широко применяться в холодильных и морозильных аппаратах, предназначенных, например, для бытового или лабораторного использования.

ЛИТЕРАТУРА

1. D.K.C. MacDonald. Thermoelectricity. An Introduction to the Principles. – New York: Wiley, 1962. 216 p.
2. J.S. Dugdale. The electrical Properties of Metals and Alloys. – London: Edward Arnold, 1977. 266 p.
3. J. Jäckle. Über die Ursache der Thermospannung. – Fakultät für Physik: Universität Konstanz, 1998. 244 p.

BINDER
Best conditions for your success

ЛАБОРАТОРНАЯ ЛИОФИЛЬНАЯ СУШКА ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Материал предоставлен компанией BÜCHI

ВВЕДЕНИЕ

Лиофильная сушка представляет собой наиболее бережную технологию, которая применяется для сушки разного рода скоропортящихся материалов. В основе принципа лиофильной сушки лежит непосредственный переход вещества из твердого состояния в газообразное, который называется сублимацией. Сначала продукт замораживают, а затем подвергают лиофильной сушке в среде пониженного давления. Низкое давление делает возможным прямой переход замороженного растворителя в пар. В большинстве случаев удаляемым из продукта при сушке растворителем является вода. Но могут использоваться и другие растворители, такие как этанол или ацетон.

Лиофильная сушка используется главным образом для консервации материалов, требующих к себе бережного отношения и подверженных порче и разложению. Устойчивость продукта значительно возрастает за счет снижения в нем содержания воды. Существует связь между присутствием воды и биологической и химической активностью, виновной в порче продукта. По сравнению с другими методами обезвоживания лиофильная сушка меньше повреждает продукт и позволяет избежать усадки или уплотнения материала (рисунок 1). При обычных способах консервации используются высокие температуры, которые влияют на форму и цвет продукта, а также на его вкус, аромат и пищевую ценность.

Лиофильная сушка проходит бережно и особенно подходит для чувствительных к нагреву, а также дорогостоящих продуктов. Лиофильная сушка применяется во многих сферах и с самыми разными целями: с целью сохранения характеристик продукта (например, фармацевтических препаратов) и первоначальной формы (в археологии, флористике) или с целью доведения продукта до кондиции, необходимой для его дальнейшего использования (например, фруктов в йогурте).

В процессе первичного замораживания продукта внутри него и на поверхности образуются кристаллы льда. Превращаясь в лед, молекулы воды создают кристаллы с четко выраженной кристаллической решеткой (рисунок 2). Поскольку молекулы воды сублимируются из продукта, они оставляют небольшие поры и промежутки внутри продукта, что способствует сохранению формы и структуры. Поэтому последующая регидрация продукта происходит быстро и легко, что

Методы консервации

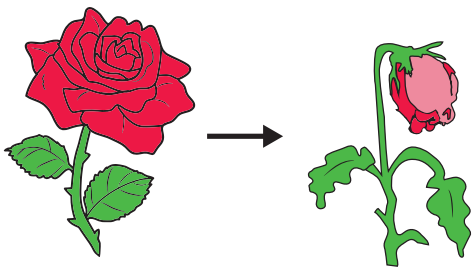


Рисунок 1. При обычных способах консервации используются высокие температуры, которые влияют на форму и цвет продукта, а также на его вкус, аромат и пищевую ценность (например, сохранность витаминов)

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

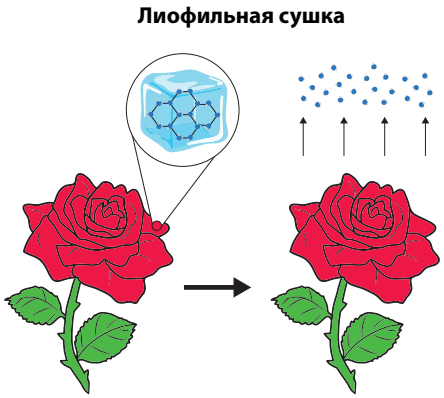


Рисунок 2. При лиофильной сушке лед непосредственно переходит в водяной пар путем лиофилизации, что позволяет сохранить структуру и характеристики продукта. Лиофильная сушка – очень бережный процесс

особенно важно в фармацевтике. Лиофилизированные продукты могут храниться много лет, часто при комнатной температуре, если они хорошо запечатаны и защищены.

ОСОБЕННОСТИ ЛИОФИЛЬНОЙ СУШИЛКИ

Основными компонентами лиофильной сушилки являются сушильная камера и специальные аксессуары для сушки, вакуумный насос, ледовый конденсор и блок управления. Подлежащий лиофильной сушке образец помещают на полки внутри сушильной камеры или в отдельные колбы, прикрепленные к манифолду. Вакуумный насос соединен с сушильной камерой через ледовый конденсор и отвечает за вакуумирование сушильной камеры. Кроме того, вакуумный насос действует как средство для удаления всех неконденсируемых газов, которые не собираются в ледовом конденсоре.

Главная задача ледового конденсора – собирать водяной пар и другие конденсируемые газы. Молекулы воды естественным образом перемещаются к ледовому конденсору, чему способствует разница значений давления пара. Температура ледового конденсора должна быть значительно ниже температуры продукта – обычно на 15 °C или более. Использование органических растворителей вместо воды требует большей разницы температур. Ледовый конденсор Lyovapor™ способен охлаждать до –105 °C. Наконец, необходима адекватная система управления для регулирования давления и подачи тепла. Системы управления варьируются от базовых до самых передовых; Infinite-Control™ от BUCHI обладает беспрецедентными возможностями, выходящими далеко за пределы регулирования давления и температуры.

Infinite-Control™

Эта система позволяет контролировать процесс в лиофильной сушилке Lyovapor™ на самом приборе, с рабочего места или с мобильного устройства. Конт-

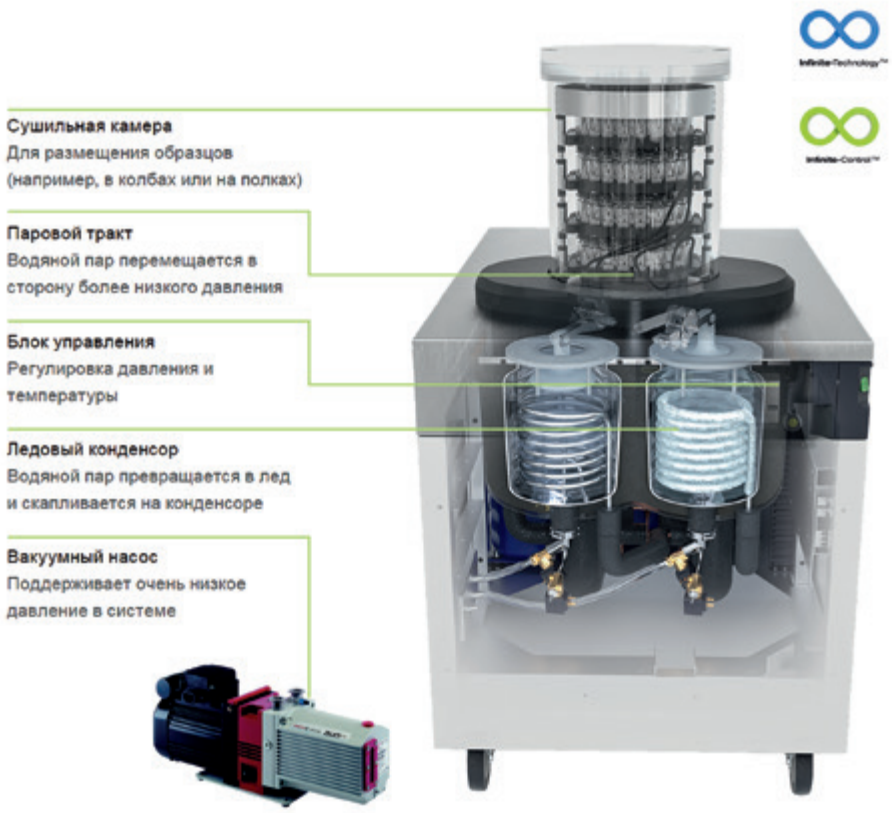


Рисунок 3. Основные компоненты лиофильной сушилки

роль параметров в режиме реального времени, запись данных и индивидуальные отчеты делают работу максимально удобной. Специальное приложение позволяет удаленно контролировать прибор и получать мгновенные уведомления на смартфон.

Infinite-Technology™

Lyovapor™ L-300 – это первая лиофильная сушилка с двумя конденсорами и неограниченной ёмкостью. Два ледовых конденсора поочередно собирают лед и автоматически очищаются. Как только один ледовый конденсор полностью наполняется, система автоматически переключается на второй. Пока второй конденсатор собирает лед, первый автоматически и гигиенически очищается паром и готовится для дальнейшего использования. Концепция чередования делает возможной непрерывную работу при любых объемах льда, без вынужденных простоев, необходимых для разморозки конденсора.

ЛИОФИЛИЗАЦИЯ МАННИТА В ВИАЛАХ

Маннит является наиболее часто используемым наполнителем для лиофилизированных лекарственных форм. Преимущества использования маннита заключаются в том, что он кристаллизуется во время замораживания и позволяет производить сушку при более высоких температурах продукта, то есть с более высокой скоростью лиофилизации в отличие от аморфных систем.

Используемое оборудование

- BUCHI Lyovapor™ L-300 Pro.
- ПО BUCHI Lyovapor™.
- Камера глубокой заморозки (–40 °C), tritec HANNOVER.
- Полка из нержавеющей стали.
- Виалы, 5 мл, WHEATON (223738), с пробками (22 мм).
- Галогенный анализатор влажности Mettler Toledo HR73.

Материалы и химические вещества

D-Mannitol, Fluka (63560).

Подготовка образцов

3 мл 5%-го водного раствора маннита (50 г/л) были перенесены в виалы с помощью пипетки (в общей сложности 70 виал). Затем образцы были поставлены на полку из нержавеющей стали и оставлены для заморозки на ночь в морозильной камере при температуре –40 °C. Также можно использовать камеру с температурой –20 °C.

Настройки Lyovapor™ L-300

Через 24 ч глубокой заморозки виалы были помещены в Lyovapor™ L-300 для лиофильной сушки. Для маннита критическая температура была установлена на 30 °C. Для неизвестных препаратов рекомендуется определять критическую температуру с помощью лиофилизационного микроскопа. Кроме того, имеется возможность запрограммировать границу безопасной температуры для защиты образца от перегрева.

- Тип сушильной камеры: Куб.
- Критическая температура образца: 30 °C.
- Безопасная температура ниже критической точки: 0,0 °C.
- Тип газа: Атмосферный воздух.

Температура полки была выбрана такой, чтобы она не превышала 20 °C к концу первичной сушки и 25 °C к концу вторичной сушки. Этапы первичной и вторичной сушки были запрограммированы с помощью программного обеспечения Lyovapor, как указано в таблице 1. Во время первичной сушки основной объем воды удаляется из образца лиофилизацией, в то время как вторичная сушка удаляет адсорбированную воду.

Таблица 1.

Параметры первичной и вторичной сушки, настроенные в программе Lyovapor™

Step		1	2	3
Phase		Primary Drying	Primary Drying	Secondary Drying
Time	hh:mm	06:00	18:00	00:30
Temperature set point	°C	0.0	20.0	25.0
Temperature gradient	°C/min	0.11	0.02	0.17
Pressure type		Regulated	Regulated	Regulated
Pressure set point	mbar	0.200	0.100	0.050
Safety pressure	mbar	1.500	1.500	1.500
Safety pressure duration	sec	10	10	10

Галогенный анализ влажности

После сушки для оценки ее эффективности был проведен анализ остаточного содержания влаги в девяти образцах. Для этого образцы были измельчены в ступке и перенесены в анализатор влажности в течение 30 секунд. Для анализа влажности применялся галогенный анализатор с использованием указанных ниже параметров. Критерий отключения относится к изменению не более 1 мг/140 с.

- Критерий отключения: 5.
- Температура сушки: 110 °C.

Визуальная оценка

На рисунке 4 показана стальная полка с 70 виалами после процесса лиофильной сушки. Для визуального сравнения виалы, занимающие весь диаметр полки, показаны на рисунке 5. Все 70 виал содержали гомогенный лиофилизированный маннит. В этом эксперименте маннит использовался в чистом виде в качестве модели для имитации фармацевтического препарата. Поскольку лиофилизированные фармацевтические препараты на основе маннита обычно содержат другие эксципиенты для удовлетворения потребностей в стабилизации и высвобождении активного фармацевтического ингредиента, степень кристаллизации может быть иной, чем для чистого маннита.



Рисунок 4. **Стальная полка с образцами лиофилизированного маннита**



Рисунок 5. **Подвергнутые анализу на остаточную влажность образцы с показанным на рисунке 3 расположением на полке**

Анализ влажности высушенного образца

Для определения эффективности сушки в Lyovapor™ L-300 девять образцов, поставленных, как показано на рисунке 4, были подвергнуты анализу остаточной влажности с помощью галогенного анализатора. Результаты измеренного содержания влаги и эффективности сушки показаны в таблице 2.

Все образцы независимо от их положения на полке содержали после сушки менее 2,0% влаги, что соответствует эффективности сушки от 98,00 до 99,18%. Образцы, расположенные в центре полки, содержали меньше остаточной влаги, чем образцы по краям. Это свидетельствует о том, что увеличение времени сушки позволяет удалить больше влаги. Кроме того, вероятно, что некоторая вода адсорбируется на образце при его подготовке для анализа остаточной влажности. Следовательно, эффективность сушки, вероятно, даже выше, чем указано в отчете.

Таблица 2.

Остаточное содержание влаги и эффективность сушки

Виала	Масса лиофилизированного образца (г)	Масса высушенного галогеном образца (г)	Остаточная влага (%)	Эффективность сушки (%)
1	0,107	0,105	1,87	98,13
2	0,100	0,098	2,00	98,00
3	0,113	0,112	0,88	99,12
4	0,122	0,121	0,82	99,!8
5	0,111	0,110	0,90	99,10
6	0,116	0,115	0,86	99,14
7	0,121	0,120	0,83	99,17
8	0,108	0,107	0,93	99,07
9	0,116	0,114	1,72	98,28

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Lyovapor™ L-300 позволяет с высокой эффективностью высушить маннитол для моделирования масштабирования. Положение виал на полке во время лиофильной сушки не влияет на внешний вид высушенного маннита. Таким образом, Lyovapor™ L-300 позволяет высушивать маннит в виалах для фармацевтических целей.

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!