WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN2305-2066

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

pharmtech & ingredients

АНАЛИТИКА ЭКСПО

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

GMP



ОТРАБОТКА И МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ

В НОМЕРЕ:

ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ПОРОШКОВЫХ ИНГАЛЯТОРОВ

СИНТЕЗ ГИДРАЗИДОВ КАРБОКСИЭТИЛАЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

АНАЛИЗ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗАЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

МЕТОДИКА ЭМБОЛИЗАЦИИ ПОРТАЛЬНОЙ ВЕНЫ КРОЛИКА

ТАБЛЕТКИ. НОРМАТИВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ XIII ИЗДАНИЯ

№ 3 (20) АВГУСТ 2017

18+

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., д.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

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.

При поддержке ФБУ «ГИЛС и НП»

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	6	Introduction
События. Мероприятия	8	Events
Раздел «Фармацевтическая технология и нанотехнологии»		«Pharmaceutical Technology and Nanotechnology» part
Секция «Современные технологии создания лекарственных форм»		«Modern Technology of Creating Dosage Forms» section
Загорулько Е.Ю., Теслев А.А.	42	Zagorulko E.Y., Teslev A.A.
ГЕЛИ ДЛЯ ПРИЕМА ВНУТРЬ. ЧАСТЬ 1. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ К ПИЩЕ (ОБЗОР)		GELS FOR ORAL ADMINISTRATION. PART 1. MEDICAL PRODUCTS AND DIETARY SUPPLEMENTS (REVIEW)
Воробьев А.Н., Абрамович Р.А., Емшанова С.В.	50	Vorobyev A.N., Abramovich R.A., Emshanova S.V.
ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ПОРОШКОВЫХ ИНГАЛЯТОРОВ		INNOVATION APPROACHES TO THE DEVELOPMENT OF DRY POWDER INHALERS
Секция «Технология биофармацевтических препаратов»		«Technology of Biopharmaceuticals Drugs» section
Лаевская Н.И., Селютина Ю.С., Каухова И.Е., Пивоварова Н.С.	62	Laevskaia N.I., Selyutina Y.S., Kaukhova I.Ye., Pivovarova N.S.
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕЖИМОВ СУШКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА БИОМАССЫ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ЖЕНЬШЕНЯ		STUDYING OF DRYING CONDITION IMPACT ON GINSENG TISSUE CULTURE BIOMASS QUALITY INDICATOR
Полудин А.Е., Гусаров Д.А., Буровик Д.А.	66	Poludin A.E., Gusarov D.A., Burovik D.A.
КИЗЕЛЬГУР ПРИ ОСАЖДЕНИИ ПРИМЕСНЫХ БЕЛКОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДНОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА ИНСУЛИНА		DIATOMACEOUS EARTH DURING THE DEPOSITION OF THE IMPURITY PROTEINS IN THE PRODUCTION OF HYBRID PRECURSOR OF INSULIN
Секция «Технологический контроль лекарственных форм»		«Technological Control of Dosage Forms» section
Вайнштейн В.А.	70	Vainshtein V.A.
ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ		DETERMINATION OF STRUCTURAL-MECHANICAL PROPERTIES OF SOFT DRUGS
Секция «Иммунобиологические препараты»		«Immunobiological Drugs» section
Васильева Д.В., Григорьева М.С., Ворфоломеева Е.В., Панов А.В., Кедик С.А.	80	Vasilyeva D.V., Grigoryeva M.S., Vorfolomeeva E.V., Panov A.V., Kedik S.A.
ИММУНОАДЪЮВАНТЫ, КЛАССИФИКАЦИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ		IMMUNOADJUVANTS, ITS CLASSIFICATION AND APPLICATION IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY
Орлова В.С., Орлова Е.В., Стойнова А.М., Станишевский Я.М.	90	Orlova V.S., Orlova E.V., Stoinova A.M., Stanishevskiy Ya.M.
РОЛЬ НУКЛЕОТИДНЫХ ПРЕПАРТОВ И NO-СИНТАЗ В ИМУННОЙ ЗАЩИТЕ ОРГАНИЗМА		THE ROLE OF NUCLEOTIDE SUBSTANSES AND NO-SYNTHASE IN THE IMMUNE PROTECTION OF THE ORGANISM

Секция «Лекарственные средства из природного сырья»

Агбади Р.К., Каухова И.Е., Вайнштейн В.А., Минина С.А., Яковлева М.В., Власенко М.А., Кутлушина А.У.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СУХОГО ЭКСТРАКТА МОРИНДЫ ЦИТРУСОЛИСТНОЙ КОРНЕЙ

94

«Drugs from Natural Raw Materials» section

Agbadi R.K., Kaukhova I.E., Vanshtein V.A., Minina S.A., Yakovleva M.V., Vlasenko M.A., Kutlushina A.Y.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGICAL PROCESSES OF THE DRY EXTRACTS OF MORINDA CITRIFOLIA ROOTS

Раздел «Аналитические методики и методы контроля»

«Analytical and Quality Control Methods» part

Секция «Контроль качества химико-фармацевтических препаратов»

Молохова Е.И, Липин Д.Е., Кириллова Р.В.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕРПИСТЕНА В МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

98

«Quality Control of Chemical Drug Products» section

Molokhova E.I., Lipin D.E., Kirillova R.V.

VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD OF ASSAY OF SERPISTEN IN OINTMENT

Секция «Поиск и разработка новых лекарственных средств»

Лупанова И.А., Цыбулько Н.С., Савина Т.А., Ферубко Е.В.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ИЗ БИОМАССЫ ЖЕНЬШЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*PANAX GINSENG* C.A. MEY) С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *IN VITRO*

104

«New Drug Search and Development» section

Lupanova I.A., Tsibulko N.S., Savina T.A., Ferubko E.V.

STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE EXTRACT OF PANAX GINSENG (*PANAX GINSENG* C.A. MEY) BIOMASS EXTRACT USING SPECIFIC ENZYMATIC TEST SYSTEMS *IN VITRO*

Куваева Е.В., Федерова Е.В., Ксенофонтова Г.В. Семакова Т.Л., Яковлев И.П.

N-АРИЛБЕНЗАМИДИНОВ ГИДРОХЛОРИДЫ. СИНТЕЗ И СТРОЕНИЕ

108

Kuvaeva E.V., Fedorova E.V., Ksenofontova G.V., Semakova T.L., Yakovlev I.P.

N-ARYLBENZAMIDINES HYDROCHLORIDES. SYNTHESIS AND STRUCTURE

Тарадейко Т.И., Седёлкина Т. М., Галашева С.Н., Иозеп А.А.

СИНТЕЗ ГИДРАЗИДОВ КАРБОКСИЭТИЛАЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

110

Taradeyko T.I., Sedelkina T.M., Galasheva S.N., Iozep A.A.

SYNTHESIS OF HYDRAZIDE OF CARBOXYETHYLALGINIC ACID

Секция «Контроль качества биопрепаратов»

«Quality Control of Biological Products» section

Аскретков А.Д., Жученко М.А., Орлова Н.В.

МЕТОДИКА ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИАНАТА КАЛИЯ В СУБСТАНЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА КАРБАМИЛИРОВАННОГО ДАРБЭПОЭТИНА

116

Askretkov A.D., Zhuchenko M.A., Orlova N.V.

METHOD OF FLUORIMETRIC DETERMINATION OF POTASSIUM CYANATE IN CARBAMYLATED DARBEPOIETIN ALPHA DRUG SUBSTANCE

Аскретков А.Д., Исайкина П.М., Черепушкин С.А., Орлова Н.В.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСОРБАТОВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

124

Askretkov A.D., Isaykina P.M., Cherepushkin S.A., Orlova N.V.

DETERMINATION OF POLYSORBATES BY SPECTROPHOTOMETRY IN DRUGS BASED ON RECOMBINANT PROTEINS

Секция «Контроль качества лекарственного растительного сырья»

«Quality Control of Herbal Drug Products» section

Разаренова К.Н., Бабушкина Е.В., Смирнов П.Д., Костина О.В., Муравник Л.Е.

ГИСТОХИМИЯ ТРИХОМ ОФИЦИНАЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ASTERACEAE

130

Razaryonova K.N., Babushkina E.V., Smirnov P.D., Kostina O.V., Muravnik L.E.

HYSTOCHEMISTRY OF GLANDULAR TRICHOMES OF MEDICINAL PLANTS FROM ASTERACEAE

Научно-производственный рецензируемый журнал
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Самылина И.А., Баева В.М., Кузнецов Р.М. **134** *Samylina I.A., Baeva V.M., Kuznetsov R.M.*

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТРЕБОВАНИЙ К КАЧЕСТВУ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ПЛОДЫ ТМИНА, ФЕНХЕЛЯ И АНИСА ОБЫКНОВЕННОГО

IMPROVEMENT OF QUALITY REQUIREMENTS FOR CRUDE HERBAL DRUGS OF FRUCTUS CARVI, FRUCTUS FOENICULI AND FRUCTUS ANISI VULGARIS

Раздел «Эффективность и безопасность лекарственных средств»

«Drug Products Efficacy and Safety» part

Секция «Кинетика растворения»

«Dissolution Profile Test» section

Дружининская О.В., Смехова И.Е. **144** *Druzhininskaya O.V., Smekhova I.E.*

СРЕДЫ РАСТВОРЕНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В РАЗРАБОТКЕ И КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

DISSOLUTION MEDIA USED IN DEVELOPMENT AND QUALITY CONTROL OF DRUGS

Секция «Доклинические исследования»

«Preclinical Trials» section

Ванатиев Г.В., Гущин Я.А., Горячева М.А., Макаренко И.Е., Ковалева М.А., Макарова М.Н **152** *Vanatiev G.V., Gushchin Y.A., Goryacheva M.A., Makarenko I.E., Kovaleva M.A., Makarova M.N.*

МЕТОДИКА ЭМБОЛИЗАЦИИ ПОРТАЛЬНОЙ ВЕНЫ КРОЛИКА

RABBIT'S PORTAL VEIN EMBOLISATION METHODS

Ферубко Е.В., Лескова Т.Е., Колхир В.К., Дул В.Н., Сидельников Н.И. **156** *Ferubko E.V., Leskova T.E., Kolkhir V.K., Dul V.N., Sidelnikov N.I.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВИНОГРАДА ЛИСТЬЕВ КРАСНЫХ ЭКСТРАКТА СУХОГО (*VITIS VINIFERA* L.)

STUDY OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF THE DRY EXTRACT OF RED GRAPE LEAVES (*VITIS VINIFERA* L.)

Секция «Биоаналитические методики»

«Bioanalytical Methods» section

Чепурная Г.П., Карташов В.А., Чернова Л.В. **160** *Chepurnaya G.P., Kartashov V.A., Chernova L.V.*

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Z-ПРЕПАРАТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

DEVELOPMENT OF THE TECHNIQUE FOR IDENTIFYING Z-PREPARATIONS IN BIOLOGICAL OBJECTS BY THE METHOD OF UV-SPECTROPHOTOMETRY

Раздел «Регуляторные вопросы»

«Regulatory Issues» part

Рожнова С.А., Цыпкина А.В. **170** *Rozhnova S.A., Tsypkina A.V.*

АНАЛИЗ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗАЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ANALYSIS OF THE SYSTEM ORGANIZATION OF PHARMACEUTICAL DRUG DEVELOPMENT

Исаева Н.В., Тулайкин А.И., Шешегова Е.В. **178** *Isaeva N.V., Tulaykin A.I., Sheshegova E.V.*

ТАБЛЕТКИ. НОРМАТИВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ XIII ИЗДАНИЯ

TABLETS. REGULATORY REQUIREMENTS OF THE STATE PHARMACOPOEIA XIII EDITION

Раздел «История фармации»

«History of Pharmacy» part

Гузев К.С. **184** *Guzev K.S.*

ФАРМАЦИЯ ДРЕВНЕГО ЕГИПТА

THE PHARMACY OF ANCIENT EGYPT

Материалы конференций **190** **Conference Proceedings**

Публикации партнеров **202** **Partner Publications**

ПРОМЫШЛЕННОЕ ПРОИЗВОДСТВО СУБСТАНЦИИ **от А до Я**

Готовые решения для реализации процессов получения АФИ в пилотном и промышленном масштабе, в т.ч. технологическое оборудование для эксплуатации во взрывоопасных зонах, для работы с коррозионно-активными веществами



Реакторная система «BR15»

- упаривание
- дистилляция (в том числе под вакуумом)
- азеотропная отгонка
- кристаллизация
- соответствует требованиям FDA, GMP, ATEX (может быть размещена во взрывоопасных рабочих зонах)



Ротационный испаритель Rotavapor® R-220 SE

- универсальный прибор с испарительной колбой объемом 20 л
- высокая интенсивность вакуумной дистилляции, упаривания, сушки порошкообразных субстанций и синтеза различных субстанций за счет режима «обратного кипячения»



Реактор «MiniPilot 15»

- из боросиликатного стекла в специсполнении, рабочим объемом 15 л
- позволяет проводить подготовительные стадии перед синтезом активной фармацевтической субстанции: растворение, смешивание, упаривание до требуемой концентрации



Система температурного контроля «Presto PLUS LH50»

Циркуляционный термостат позволяет:

- проводить нагрев/охлаждение внешних систем с высокой интенсивностью по заданной программе
- поддерживать температуры в диапазоне -50…+250°C по показаниям внешнего температурного датчика с высокой точностью (±0,01…±0,05°C).



Термостат сверхнизкого охлаждения «FP51-SL»

- нагрев/охлаждение внешнего контура, различных объектов внутри собственной бани в диапазоне температур от -51 до +200°C
- нагревательная мощность в 3 кВт и охлаждающая – в 2 кВт позволяют работать с реакторами объемом до 15 л, поддерживая заданную температуру реакции с точностью до ±0,05°C



Мобильный диссольвер на базе Minipilot15

- приготовление рабочих растворов перед началом синтеза
- рубашка позволяет термостатировать раствор перед подачей в реакторы, что экономит время пользователя
- подача раствора из диссольвера в реактор может быть обеспечена насосом или при помощи вакуум-транспорта



Химический реактор BR30 со стеклянной дистилляционной обвязкой

- универсальный аппарат для проведения химического синтеза разнообразных продуктов, в т.ч. в среде агрессивных органических растворителей и минеральных кислот
- широкий температурный диапазон работы реактора (-60…+200°C) и регулируемая скорость перемешивания (0…350 об/мин) позволяют осуществлять широкий спектр процессов: прямая и обратная дистилляция, кристаллизация, жидкостная экстракция, осаждение



Мобильный Нутч-фильтр

- выделение твердой субстанции, получаемой в реакторе, из суспензии
- возможность использовать один фильтр для нескольких задач в ходе одного процесса
- регулируемая по высоте мешалка (скребок) для ворошения осадка, его заглаживания, что позволяет осуществлять фильтрацию с максимальной эффективностью
- циркуляционная рубашка позволяет проводить процессы горячей/холодной фильтрации в широком диапазоне температур



Мобильная система сборников

выполняет множество функций:

- приемник маточного раствора при фильтрации
- мобильная емкость для хранения и транспорта реагентов и полупродуктов
- фазовый сепаратор (флорентийский сосуд) для разделения жидкостей с разной плотностью



Система автоматического управления процессом

- FlexyPAT обеспечивает дистанционное управление всеми приборами и аппаратами, входящими в комплект установки
- позволяет оператору из соседней комнаты наблюдать за всеми параметрами процесса, информация о которых поступает на компьютер с датчиков, а также управлять работой термостатов, дозирующих насосов, пневматических клапанов на трубопроводной обвязке, регулировать давление, вакуум, значение PH во всех аппаратах, управлять скоростью вращения мешалок, снимать калориметрию процесса



+7 (499) 704–25–19
(ЦЕНТРАЛЬНЫЙ ОФИС В МОСКВЕ)

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

www.phct–synthesis.ru
info@phct–synthesis.ru

Pharmcontract® group of companies

ОТ РЕДАКЦИИ

Традиционно лето принято считать сезоном затишья в деловой и нормотворческой деятельности на фармрынке. Однако в этом году, по крайней мере в России, можно наблюдать совершенно противоположную тенденцию. Например, Росздравнадзор совместно с ФНС и компаниями-первопроходцами ведет активную просветительскую работу по вопросу маркировки лекарственных препаратов. ФБУ «ГИЛС и НП» продолжает развивать направление GxP-стандартов: в начале июля прошел I Всероссийский межвузовский GxP-саммит, о котором более подробно Вы можете прочитать на страницах нашего издания С. 30–32; а в сентябре уже во второй раз состоится II Всероссийская GMP-конференция. Не отстают от коллег и сотрудники Росаккредитации, запустившие серию семинаров для испытательных лабораторий (центров), аккредитованных или готовящихся к процедуре аккредитации Федеральной службой по аккредитации. [Об одном из таких семинаров читайте на страницах этого номера С. 26–28.] Учитывая, что с мая текущего года начал функционировать единый рынок ЕАЭС, большинство ключевых тем мероприятий, где принимают участие сотрудники Евразийской экономической комиссии, Минпромторга России и Минздрава России, касаются вопросов гармонизации законодательств стран-членов ЕАЭС и особенностей организации доклинических, клинических исследований лекарственных препаратов, фармаконадзора, а также внедрения риск-ориентированного подхода при контроле качества и безопасности фармацевтической продукции. Еще одним трендом на фармацевтическом рынке стали вопросы, касающиеся биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), в связи с готовностью и регистрацией в Минюсте России соответствующих пакетов документов по БМКП, подготовленных Минздравом России. Стоит отметить, что в последние месяцы биотехнологии в фармацевтическом производстве начинают приобретать все большую популярность: биотехнологическая отрасль начинает развиваться во многих регионах России – создаются целые биотехнологические кластеры (одним из последних создан такой кластер в Кировской области).

Обозначенные тренды, безусловно, не остаются без внимания со стороны отраслевых СМИ. И о многих из них Вы могли узнать из ленты нашего информационного ресурса «Новости GLP». Однако, что более важно, эти тренды находят отражение и в статьях наших авторов, которые поступают из самых разных уголков нашей необъятной страны. В этом номере Вы сможете познакомиться с инновационными подходами к разработке порошковых ингаляторов, узнаете о структурно-механических свойствах мягких лекарственных форм, получите ответы о правилах организации фармацевтической разработки лекарственных средств, а также разъяснения нормативных требований Государственной фармакопеи РФ XIII издания к таблетированным лекарственным формам. И конечно же, на страницах нашего летнего номера, Вам будут представлены расширенные материалы о наиболее интересных и значимых для отрасли событиях: присоединении национального органа по аккредитации к Договоренности о взаимном признании Азиатско-Тихоокеанской организации по аккредитации лабораторий (APLAC MRA), открытии нового проектного офиса в Санкт-Петербурге, ходе работ по созданию дополнительного цеха по производству фармсубстанций методом тонкого органического синтеза в Калининграде и планах по расширению продуктового портфеля ООО «Инфамед К».

Надеемся, что собранный нашим коллективом материал окажется не просто интересным, но и полезным в Вашей работе.

С уважением, Редакция научно-производственного рецензируемого журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств»



Главному редактору научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» присуждена ученая степень доктора фармацевтических наук

22 июня 2017 г. главному редактору научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» **Игорю Евгеньевичу Шохину** приказом Минобрнауки России была присуждена ученая степень доктора фармацевтических наук. Диссертационная работа по теме *«Методологические основы исследований эквивалентности in vitro и моделирования высвобождения лекарственных средств в ЖКТ»* была выполнена на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), а ее результаты (наиболее интересные выдержки из работы) неоднократно публиковались на страницах нашего журнала. В работе обобщены и подготовлены рекомендации по проведению сравнительного теста кинетики растворения (СТКР) для решения разных целей и задач (оптимизация технологии производства и состава вспомогательных веществ, выбор серии клинического кандидата, замена исследований биоэквивалентности для дополнительных дозировок лекарственного средства, пострегистрационные изменения) при разработке лекарственных средств. Автором были предложены методики СТКР для инновационных и воспроизведенных отечественных и зарубежных лекарственных средств, применяемые на разных этапах их жизненного цикла. Результаты СТКР *in vitro* были сопоставлены с результатами исследований биоэквивалентности *in vivo*, что позволило сделать в каждом случае заключение о прогностической ценности СТКР при выборе оптимального состава, технологии и серии клинического кандидата. Впервые была проведена оценка возможности замены исследования биоэквивалентности на СТКР согласно процедуре «биовейвер» для препаратов 2 класса БКС (слабые кислоты) согласно рекомендациям FIP.

«Присуждение мне степени доктора фармацевтических наук – это не только личное профессиональное достижение, но и высокая оценка и подтверждение моего статуса как главного редактора научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», который мы с командой его учредителя и при колоссальной поддержке **Сергея Быковского** издаем уже вот как 5 лет. В 2015 году журнал вошел в перечень рецензируемых научных



д.фарм.н. Игорь Шохин

изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук. Этот перечень формирует ВАК Минобрнауки России, и, как вы знаете, попасть в него непросто. Но вот уже как два года мы соответствуем высоким стандартам и будем дальше стремиться развиваться в этом направлении: привлекать новых авторов, готовых делиться практическим опытом организации производства и обеспечения контроля качества лекарственных средств в России и за рубежом; освещать самые интересные мероприятия, публиковать разъяснения и рекомендации представителей органов власти в отношении как российского фармрынка, так и единого рынка ЕАЭС. Возможно, в юбилейном выпуске, который Вы все сможете получить осенью этого года, появятся новые рубрики/секции, постоянные разделы, которые станут официальным информационным бюллетенем наших коллег и партнеров из федеральных органов власти. Но одно останется неизменным – мы всегда будем тщательно отбирать материалы, которые будут вызывать у вас интерес, иметь прикладной аспект и высокий научный статус.

С уважением, главный редактор журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» д.фарм.н. ***Игорь Шохин***

КАК СКАЖЕТСЯ ВЗАИМНОЕ ПРИЗНАНИЕ РОСАККРЕДИТАЦИИ И APLAC MRA НА ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ИСПЫТАТЕЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ?

27 июня 2017 года Росаккредитация и Минэкономразвития России провели пресс-конференцию, призванную разъяснить последствия присоединения национального органа по аккредитации к Договоренности о взаимном признании Азиатско-Тихоокеанской организации по аккредитации лабораторий (APLAC MRA). Соответствующий документ об этом был подписан на прошлой недели в рамках Генассамблеи Азиатско-Тихоокеанской организации по аккредитации лабораторий и Тихоокеанской организации по аккредитации. Как пояснили замминистра экономического развития РФ Савва Шипов и руководитель Росаккредитации Алексей Херсонцев, подписанию соглашения в Бангкоке предшествовала выездная проверка (оценка) деятельности российских испытательных и калибровочных лабораторий на соответствие требованиям международных стандартов, которые прошли аккредитацию у ФСА. Среди критериев оценки особое внимание эксперты уделяли соответствию стандарту ISO 17011, видам проводимых испытаний и методикам, которыми руководствуются в своей деятельности аккредитованные испытательные лаборатории.



В чем интерес Росаккредитации и испытательных лабораторий России?

Прежде всего, как отметили инициаторы пресс-конференции, и российская сторона, и государства-члены APLAC MRA преследуют цель увеличения экспорта, что тесно переплетено с вопросами сертификации экспортируемой/импортируемой продукции. Национальное законодательство сегодня таково, что при ввозе продукции на территорию РФ производителю требуется получить на нее сертификат соответствия (качества), который Росаккредитация выдает по итогам проведенной аккредитованными ею испытательными центрами. Аналогичная ситуация складывается и в странах АТР по отношению к российской продукции. Таким образом, национальные органы аккредитации, как и производители, заинтересованы не предоставлять свой продукт для, по сути, повторной сертификации, а ограничиться равнозначным сертификатом от национального органа. Но для этого требуется взаимное признание компетенции таких национальных структур, в основе которого лежит эквивалентность применяемых при аккредитации органов по оценке соответствия процедур. В результате должен начать действовать принцип ***«испытано один раз – признано во всем мире»***.

Вторым немаловажным фактором является то обстоятельство, что вступление Росаккредитации в APLAC MRA – это своеобразный промежуточный этап на пути вступления в ILAC в статусе полноправного члена. (Сегодня, начиная с мая 2013 года, Росаккредитация входит в международную организацию по аккредитации лабораторий лишь в статусе ассоциированного члена.) Более того, учитывая пример Казахстана (который привел **Савва Шипов**), пошедшего от обратного и вступившего сразу в ILAC, минуя региональный этап, вхождение в региональную структуру позволяет Росаккредитации не только на бумаге выстроить партнерские взаимоотношения с национальными органами, занимающимися аккредитацией лабораторий, органов инспекции и т.д., в том числе по ряду продуктов, в отношении которых не всегда достаточно иметь заключение от «домашней» испытательной лаборатории, признанной и имеющей право использовать знак APLAC MRA в результате успешного подтверждения области своей аккредитации. А такое право испытательные лаборатории могут получить только от органа по сертификации, деятельность ко-

торого признается коллегами определенного региона или мира в целом. Следовательно, национальная система аккредитации такого государства должна соответствовать международным принципам и обеспечивать на выходе такие же результаты, какие были бы получены в других государствах при сертификации того же самого продукта. Такое соответствие и обеспечивает вхождение в APLAC MRA, которое стало возможным только после оценки независимой экспертной группой деятельности испытательных лабораторий, анализа деятельности Росаккредитации по аккредитации этих лабораторий.

Стоит отметить, что отчет экспертной группы от APLAC MRA в отношении Росаккредитации содержал не только положительные оценки: был подготовлен ряд замечаний, касающихся соответствия стандарту ISO17011, в том числе реальной деятельности испытательных лабораторий и прослеживаемости, неопределенности калибровочных лабораторий в области аккредитации. Но эти замечания Росаккредитация устранила к моменту заседания Генассамблеи в Бангкоке.

И наконец, сегодня разные государства используют разные методики оценки качества продукции. Для признания и внедрения зарубежной методики в деятельность российских лабораторий требуется их перевод и адаптация, что, в свою очередь, невозможно без взаимного признания в рамках региональных объединений, хотя это не отменяет права нотификации. Но с учетом подписания соглашения о принятии Росаккредитации в APLAC MRA упрощается процедура взаимодействия национальных систем аккредитации: соответствующие органы государств-членов APLAC MRA могут договориться о признании определенных методик, процедур подтверждения соответствия продукта, а нередко и сертификатов стран-импортеров определенной категории продуктов в обмен на аналогичные уступки с другой стороны.

Какие испытательные лаборатории могут рассчитывать на получение права использования знака APLAC MRA?

Учитывая, что Росаккредитация и Минэкономразвития России только приступили к разработке политики использования знака международного признания, заинтересованные в получении этого права испытательные лаборатории смогут его реализовать, скорее всего, не раньше следующего года. Также, как пояснил **Алексей Херсонцев**, испытательным лабораториям, уже прошедшим процедуры аккредитации, не придется проходить переаккредитацию. В то же время к лабораториям-претендентам в разрабатываемом нормативно-правовом акте планируется установить дополнительные требования по повышенным обязательствам по информационному взаимодействию с национальным органом аккредитации, более оперативному реагированию на случаи выявления отклонений/нарушений, а также по соблюдению нормативных документов (*Mandatory Documents*, MD) APLAC MRA. Более того, руководитель Росаккредитации обращает внимание испытательных лабораторий на вопрос целесообразности получения права на использование знака APLAC MRA: если лаборатория работает с продукцией только национальных производителей, не стремящихся к широкому экспорту, насколько ей понадобится знак APLAC MRA на протоколе испытания? То же применимо и к компаниям-производителям: взаимное признание протоколов испытания продукции – это важный инструмент, используемый участниками международной торговли для обеспечения благоприятных условий продвижения своих товаров на зарубежные рынки, ведь в этом случае устраняются технические барьеры в торговле, сокращаются издержки российских производителей при выводе товаров на рынки АТР; для товаров, ориентированных сугубо на национальный рынок, достаточным является протокол соответствия продукта от испытательной лаборатории, аккредитованной Росаккредитацией.

Еще одно замечание, которое следует учитывать испытательным лабораториям при принятии решения о подаче заявки на право использования знака APLAC MRA, касается признания их протоколов на территории ЕАЭС. **Алексей Херсонцев** акцентировал внимание на том, что в рамках ЕАЭС признаются протоколы испытаний, проведенные только в тех лабораториях, которые аккредитованы национальным органом, т.е. получение российским производителем сертификата соответствия продукта APLAC MRA не гарантирует автоматического признания соответствия этого продукта национальным стандартам какого-либо государства-члена ЕАЭС. В то же время сейчас Росаккредитация прорабатывает варианты решения такой правовой коллизии.



В КАЛИНИНГРАДЕ ПОЛНЫМ ХОДОМ ИДЕТ СТРОИТЕЛЬСТВО ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ЦЕХА ПО ПРОИЗВОДСТВУ ФАРМСУБСТАНЦИЙ МЕТОДОМ ТОНКОГО ОРГАНИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

В г. Багратионовске Калининградской области полным ходом идут строительные работы по возведению дополнительного цеха по производству фармсубстанций. Генеральным подрядчиком по выполнению комплекса работ «под ключ» по заказу ООО «ИНФАМЕД К» выступает Группа компаний «Фармконтракт».



Летом 2016 года фармацевтический завод ООО «Инфамед К» анонсировал решение не просто о расширении производственных мощностей завода, но и о создании цеха, который сможет выпускать различные фармацевтические субстанции, получаемые методом органического синтеза. Как отметил заместитель директора по научной работе ООО «ИНФАМЕД К» **Иван Кириченко,** руководством рассматривались различные пути решения данного вопроса: «Самым простым вариантом было бы размещение производственных заказов на дополнительных внешних площадках. Однако такой путь несет существенные риски для компании, которая обладает инновационными разработками и производственными «ноу-хау». Более того, необходимо признать, что период производства дешевых субстанций где-нибудь в Китае и Индии уже завершился. В азиатских странах выросла стоимость труда рабочих, ужесточаются требования к соблюдению предприятиями экологических норм и стандартов. Мы не можем позволить себе быть полностью зависимыми от добросовестности внешнего поставщика и тем более не должны зависеть от валютных колебаний. Кроме того, не так давно ужесточились регуляторные требования и теперь для каждой новой производственной площадки необходимо получать заключение Минпромторга России, основанное на мнении и проверках российского инспектората GMP при ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик». А это дополнительная нагрузка, дополнительные риски и постоянные дополнительные издержки».

Учитывая потребность «Инфамед К» в участке синтеза субстанций большей производительности, а также стремление синтезировать не только собственные продукты, но и выступать контрактной площадкой для зарубежных коллег, дистрибьюторское подразделение ведущего химико-фармацевтического холдинга России подобрало оптимальный вариант оснащения



высокотехнологичным оборудованием, изготовленным в Швейцарии, Германии и Италии, позволяющим осуществлять синтез широкого спектра субстанций, в том числе и на контрактной основе, – порядка 10 тонн субстанций в год. Выполнение всего комплекса работ планируют завершить в 2018 году.



Что сделано на сегодняшний день?

Созданный проект цеха производства субстанций, который проектировала опытная российская организация, получил высокую оценку европейских консультантов, которых привлекал завод. Западные партнеры отметили использование самых современных решений, которые позволяют создать энергоэффективное и экологически чистое производство фармацевтических субстанций, получаемых методами тонкого органического синтеза. С весны 2017 года на территории «ИНФАМЕД К» активно ведутся строительно-монтажные работы по возведению цеха.

Как отмечает **Иван Кириченко**, сердцем предприятия, его производственными линиями, станут реакторные установки швейцарской компании BuchiGlassUster, поставляемые ГК «Фармконтракт». «Несмотря на высокую стоимость, нами было выбрано лучшее оборудование ведущего европейского производителя, которое имеет необходимые сертификаты качества и соответствия и уже отлично зарекомендовало себя в фармацевтической отрасли, – обосновывает выбор не в пользу дешевого решения заместитель директора по научной работе. – Более того, мы спланировали производственные линии и участки таким образом, чтобы в будущем иметь возможность перейти к промышленному синтезу новых молекул антисептиков, входящих в портфель инновационных разработок компании. Инвестируя в собственный цех производства субстанций, мы закладываем еще один камень в фундамент развития отечественной фармацевтической отрасли. Новый цех, спроектированный и построенный по современным требованиям, имеет высокие шансы получить европейский сертификат соответствия cGMP. А это уже, в свою очередь, открывает возможности для экспорта российской продукции на европейский и другие фармацевтические рынки. Фактически благодаря стараниям ООО «ИНФАМЕД К» и при поддержке правительства Калининградской области в самой западной части нашей страны формируется новая для региона отрасль промышленности – тонкий органический синтез. Мы надеемся, что этот импульс повлечет за собой развитие в регионе научно-образовательного комплекса, уже прорабатываются вопросы обучения и подготовки собственных кадров для производства».

Каковы планы на ближайшую перспективу?

В планах инвестора и генерального подрядчика значатся и работы по организации фармацевтического склада класса «А» на 10 тыс. тонн хранения продукции в соответствии со стандартами GDP. Обсуждается и возможность организации на территории индустриального парка «Экобалтик» собственного предприятия по производству чистой фармацевтической упаковки. В этом плане у ГК «Фармконтракт» есть интересные предложения, которые включают и сериализацию продукта с системой Track&Trace, которая позволит обеспечить полный контроль этапов поставки и передвижения лекарственных средств от их упаковки на производстве до конечного покупателя.

Таким образом, создание подобного участка синтеза отечественных фармацевтических субстанции позволит внести вклад в обеспечение лекарственной безопасности страны, снизить риски применения более дешевых продуктов, не всегда необходимых для решения конкретных задач. В то же время увеличение производственных мощностей, даже с учетом серьезной автоматизации технологического процесса, – это





еще и существенное увеличение рабочих мест (порядка 600 новых рабочих мест для городка с численностью жителей не более 7 000 человек). По сути, уже сегодня завод ООО «ИНФАМЕД К» – это градообразующее предприятие для города Багратионовска: создано более трёхсот рабочих мест, налоговые отчисления существенно пополнили бюджеты города и района.

Какие продукты производит «ИНФАМЕД К» сегодня и что значится в его планах по расширению продуктового портфеля?

Большинство фармацевтических предприятий стремится производить большую линейку различных лекарств, а калининградский «ИНФАМЕД» работает преимущественно с одной молекулой – Бензилдиметил [3-(миристоиламино)пропил]аммоний хлорид, моногидрат (торговый знак препаратов – МИРАМИСТИН®, ОКОМИСТИН®). Однако на базе этой молекулы, используя ее свойства, технологи завода создают новые препараты, самые разнообразные лекарственные формы. «На сегодня зарегистрирована новая мазь для использования в хирургии и дерматологии, – поясняет **Иван Кириченко**. – Препарат отличает широкий спектр антимикробного действия, включая госпитальные штаммы, резистентные к антибиотикам, позволяет применять мазь при смешанных инфекциях, особенно в начальный период лечения, до идентификации и определения чувствительности возбудителя заболевания. На современном фармацевтическом рынке существует большое количество медикаментозных средств для местного лечения гнойных ран. Однако желаемая степень ранозаживляющего эффекта препаратов до сих пор не достигнута, в связи с чем было принято решение о разработке нового, высокоэффективного комбинированного препарата для лечения смешанной инфекции – мази для местного и наружного применения. На завершающей стадии регистрации находится препарат для применения в ветеринарной практике – Мистин®. Препарат предполагается использовать для лечения и профилактики широкого спектра заболеваний, обусловленных бактериальной или грибковой инфекцией, повреждений кожных покровов и слизистых оболочек у сельскохозяйственных и домашних животных, а также для лечения и профилактики мастита у коров. Наш научный отдел проводит серьёзные исследования, которые позволят разработать препарат для лечения язвенной болезни желудка, а также ингаляционную форму для лечения воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей. В сотрудничестве с крымскими фтизиатрами мы изучаем возможности применения Мирамистина® в сочетании с противотуберкулёзными антибиотиками для лечения различных, в том числе антибиотикорезистентных, форм туберкулёза. Уже получены очень обнадёживающие результаты».

Немного об антисептиках в целом и о Мирамистине® в частности

(материал предоставлен ООО «ИНФАМЕД К» и публикуется без купюр – прим. ред.)

Нужно отметить, что использование антисептиков стало одним из самых замечательных достижений медицины XIX в. Однако впоследствии, с открытием антибиотиков, их значение существенно уменьшилось. Время шло, и настала пора, когда антибиотики не всегда эффективны и уникальные возможности антисептиков вновь оказались в центре внимания специалистов. На сегодняшний день антимикробные препараты являются основными в лечении инфекционных заболеваний и в развитых странах занимают ведущее место по объему производства и потребления среди других групп лекарственных препаратов. Несмотря на некоторые колебания, которые обусловлены уровнем и этиологией заболеваний, наблюдается постоянная тенденция к увеличению использования в медицинской практике отечественных и импортных антисептических средств.

Сегодня многими исследователями подчёркивается рост числа возбудителей, резистентных к антибиотикам. Ни для кого не новость, что в последние годы значительно снизилась чувствительность патогенной микрофлоры к современным антибиотикам. При этом инфекционно-воспалительные заболевания остаются первоочередной проблемой современной медицины, поэтому правильный выбор противомик-



робного препарата является залогом успешного лечения. Проблема развития резистентности в мировом масштабе имеет настолько существенные медицинские, социальные, экономические и другие аспекты, что в настоящее время приняты глобальные стратегии по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам.

Мирамистин® – препарат из группы катионных антисептиков. Многочисленными экспериментальными исследованиями подтверждено, что Мирамистин обладает выраженным антимикробным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, сложных вирусов, простейших, аэробной, анаэробной флоры, находящейся в виде монокультур и микробных ассоциаций, включая штаммы, полирезистентные к лекарственным препаратам. Выявлено его иммунноадъювантное действие. Мирамистин® относится к препаратам с низкой токсичностью, не обладает раздражающим, аллергизирующим, мутагенным и эмбриотоксическим действием.

Антивирусная активность определена в сравнении с антивирусной активностью ряда общеизвестных антисептиков: хлоргексидина, этония, диоксидина, ноноксинола, твина-20.

Полученные данные показали, что Мирамистин® превосходит по своей вирулицидной активности другие антисептические препараты и антимикробные соединения. Причем к Мирамистину® высокочувствительны сложноустроенные вирусы, имеющие суперкапсидную оболочку, то есть вирусы гриппа, герпеса, кори, короновирусы и т.д.

Сегодня наша продукция поставляется в ряд стран СНГ, Армению. Окомистин® зарегистрирован в Грузии и Узбекистане. Нас, безусловно, очень интересуют рынки стран Юго-Восточной Азии. Ну и как уже говорилось ранее, у нас есть европейские амбиции, для удовлетворения которых мы проводим достаточно серьёзную работу. В результате этой работы мы рассчитываем получить европейскую сертификацию cGMP как для наших готовых лекарственных средств, так и для фармацевтических субстанций.

Справка:

Фармацевтический завод ООО «ИНФАМЕД К», открытый в 2014 году, – первое фармацевтическое предприятие в Калининградской области, которое производит инновационный популярный антисептический препарат Мирамистин®, 0,01% раствор, и глазные капли Окомистин® общим объемом до 32 млн единиц в год. Предприятие работает по полному циклу – от синтеза субстанции до выпуска готового продукта.

ГК «Фармконтракт» – ведущий химико-фармацевтический холдинг России – крупнейшая компания, предоставляющая весь комплекс услуг по созданию и оснащению фармацевтических, химических, пищевых, биотехнологических производств, объектов химического синтеза, электронной промышленности и нефтехимических предприятий, различных лабораторных комплексов от идеи до выпуска первой таблетки, ампулы или продукции животного происхождения. В активе компании большой опыт организации «под ключ» аналитических и исследовательских лабораторий, полного цикла производства готовых лекарственных форм и фармацевтических субстанций, биологически активных веществ и биопродуктов, а также создание виварииев и радиофармпроизводств.

Консолидация проектировочных, строительных и инженерных решений с интеграцией конкретных единиц оборудования различных производителей в единую технологическую линию в структуре одного исполнителя обеспечивает заказчику успешный ввод объектов в эксплуатацию в установленный срок.

Минимальные подавляющие концентрации некоторых поверхностно-активных антисептиков для вирусов

Антисептики	Значения МПК (мкг/мл) в отношении различных вирусов						
	Грипп А	Герпес 1 и 2 типа	Корона-вирусы	Адено-вирусы	Полио-вирусы	Коксаки	ECHO
Мирамистин®	10–100	10–100	10–100	100–200	100–2000*	100–2000*	100–2000*
Декаметоксин	500–1000	–	–	R	R	R	R
Хлоргексидин	60–500	200–500	200–500	–	>5000	>5000	>5000
Этоний	2000–5000	R	–	R	R	R	–
Диоксидин	R	–	–	–	R	R	–
Роккал	90–2000	–	–	–	R	R	–
Ноноксинол-9	90–2000	90–2000	–	–	R	R	–
Твин-20	20000 –25000	–	–	–	R	R	R

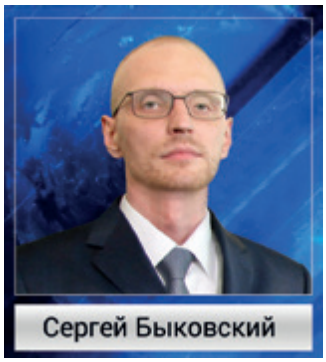
Примечание: R – резистентны к антисептикам в концентрации выше 1%; «–» – не исследовали; * – спиртовые растворы.

Источники:

1. Ю.Л. Криворутченко, Ю.С. Кривошеин, С.С. Маренникова и др. Изучение анти-ВИЧ активности мирамистина // Вопросы вирусологии. 1994. № 6. С. 267–269.
2. А.М. Дунаевский, И.М. Кириченко. Клиническое обоснование использования препарата Мирамистин® в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний респираторной системы // Поликлиника. 2013. № 6. С. 1–7.

ГК «ФАРМКОНТРАКТ» ОТКРЫЛА ПРОЕКТНЫЙ ОФИС В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

С августа 2017 года в Санкт-Петербурге начал работать проектный офис ведущего химико-фармацевтического холдинга России ГК «Фармконтракт». Создание собственного проектного офиса в структуре холдинга, специализирующегося на создании предприятий «под ключ», от идеи до выпуска первой серии продукта, было делом времени. «С 2014 года «Фармконтракт» стала единственной компанией на российском рынке, которая предоставляет весь комплекс услуг по организации фармпроизводства: помимо традиционной дистрибьюции высокотехнологичного оборудования с сопутствующим комплексом услуг по пусконаладочным и сервисным работам, мы стали предоставлять нашим партнерам клиентский сервис по преобразованию их идей в полноценное функционирующее производство любой сложности как в области готовых лекарственных форм, так и в сфере синтеза активных фармацевтических ингредиентов и биотехнологического синтеза. То есть в портфеле наших продуктов появились такие услуги, как проектирование и сопровождение проектных работ, строительно-монтажные работы, инжиниринг и комплекс чистых помещений, работы по генеральному подряду, – напомнил президент ГК «Фармконтракт» Сергей Быковский. – Сразу мы работали в партнерстве с профессиональными инжиниринговыми компаниями, которые на разных этапах присоединялись к структуре холдинга. Но опыт показал, что гораздо эффективнее иметь собственный проектный отдел, который мы и создали. Более того, с каждым годом мы расширяем отрасли присутствия: это не только фармацевтика, но агрохимия, нефтехимия, пищевая промышленность, биотехнологии и другие».



Сергей Быковский



Обособленное подразделение займется разработкой технологических разделов проектной документации, будет проводить анализ технического задания на проектирование или полностью готовить его по информации заказчика. «Я ни для кого не открою Америку, если скажу, что у большинства инвесторов (или их представителей) отсутствует понимание реальной стоимости проекта вследствие отсутствия элементарного перевода имеющейся информации на язык инженерных возможностей. Например, заказчик из фармсектора знает, какие лекарственные формы он хочет выпускать, к какой фармакологической группе относится активный компонент этой формы, токсично ли вещество. Однако крайне редко у него есть понимание, на каком оборудовании и в какой обвязке должны выполняться все технологические этапы, понятие о классах защиты оборудования и помещений, санитарно-защитных зонах и т.д. Аналогичную ситуацию мы наблюдали и на одном проекте для крупного и всем хорошо известного предприятия в пищевой индустрии. Именно поэтому наши проектировщики и инженеры-технологи перед началом работ всегда максимально совместно прорабатывают техническое задание с заказчиком», – пояснил **Сергей Быковский**.

Поскольку каждый этап проектирования сопровождается получением квалификационных документов для подтверждения соответствия принятых проектных решений требованиям GMP, GLP, ГОСТ и иных нормативных документов, в проектный офис на берегах Невы набирали высококвалифицированных специалистов, за плечами которых не только знание всех особенностей выполнения работ по указанным стандартам, но и опыт защиты проектных решений перед заказчиком и в экспертизе на соответствие требованиям надлежащей производственной практики и иных стандартов. Как отметили в ГК «Фармконтракт», в компетенции проектного офиса будут и вопросы подбора и расчета технологического оборудования для различных производственных задач, подготовка заданий по смежным разделам и многие другие, традиционные для инжиниринговых компаний обязанности: концептуальное проектирование и проектирование на стадиях П (проект) и Р (рабочая документация), DQ-квалификация проектной документации, весь комплекс работ по инженерным системам и комплексам чистых помещений, а также по созданию современных складских комплексов.

Почему Санкт-Петербург и в чем отличие проектного офиса от существующих инжиниринговых компаний?

Во-первых, как мы знаем, в Санкт-Петербурге и Ленинградской области активно развивается фармкластер, компаниями которого услуги проектного офиса будут крайне востребованы.

Во-вторых, исторически сложилось, что большинство инжиниринговых компаний являются выходцами из этого региона. Если посмотреть на кадровый состав проектного офиса ГК «Фармконтракт», то тут можно увидеть специалистов, перешедших из некогда успешных компаний, сфера интересов которых базировалась в монобизнесе. А как показала практика, сегодня многие инжиниринговые структуры испытывают серьезные затруднения, не имея возможности перераспределить финансовые риски на другие направления. Например, как отметило руководство ГК «Фармконтракт», нынешнее положение компании, которая обеспечивает фактически 90% покрытия всех поставок технологического и аналитического оборудования для фармзаводов, предприятий химической отрасли и пищевой промышленности, позволяет предложить заказчикам и давним партнерам холдинга услуги проектирования на безвозмездной основе. «Это своего рода программа лояльности для наших партнеров, с которыми мы сотрудничаем более 5 лет и которые, как и мы, стремятся к развитию – расширению своих производственных площадок, созданию площадей для предоставления контрактных услуг. Последнее становится все более актуальным явлением для фармрынка в связи с усиливающимися тенденциями локализации и постановлении о «третьем лишнем», – пояснил решение **Сергей Быковский**. Пожалуй, такая программа лояльности, о которой заявил холдинг, может рассматриваться еще и как антикризисная мера, позволяющая компаниям, планирующим создание новых производственных участков или реконструкцию морально устаревших объектов, активно эксплуатирующихся еще с советских времен, уложиться в бюджет, сократив затраты на проектные работы.

Новые лица, обеспечивающие выполнение инжиниринговых работ

Напомним, что весной этого года команда проектировщиков ГК «Фармконтракт» поплнил рядом известных на рынке специалистов с обширным опытом работы на реальном производстве:



Галина Лемперт, главный технолог-проектировщик, возглавляющий проектный офис в Санкт-Петербурге;



Константин Фроленков, возглавляющий направление технологического проектирования;



Михаил Пергаев, возглавляющий направления проектирования и строительства;





Алексей Бобрускин и Наталья Бобрускина (Кононова), отвечающие за развитие направления биотехнологии;



Яна Обручникова, курирующая вопросы безопасного производства радиофармацевтических препаратов.

КРУГЛЫЙ СТОЛ «ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И ИММУНОГЕННОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕПАРАТОВ-БИОАНАЛОГОВ»

8 июня 2017 года Центр фармацевтической аналитики и ГК «Фармконтракт» при поддержке научно-производственного рецензируемого журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» провели тематический круглый стол для специалистов фармацевтического рынка в области биотехнологий. В рамках мероприятия обсуждались такие ключевые вопросы этого направления, как исследования иммуногенности биопрепаратов в соответствии с руководством EMA, особенности государственной регистрации препаратов-биоаналогов в России и аппаратное оснащение для их исследований. Также участникам круглого стола были представлены практические кейсы исследования фармакокинетики и иммуногенности препаратов-биоаналогов и приведен обзор решений Beckman Coulter для исследований данного вида продуктов.

Вопросам биоаналогов в последнее время уделяется особое внимание. Во многом это связано с разработкой общих стандартов для единого фармацевтического рынка ЕАЭС, который начал функционировать с мая этого года. Именно этим и был обусловлен выбор темы круглого стола, прошедшего в начале июня в технопарке «Слава».

Открывая мероприятие, директор ООО «ЦФА», д.фарм.н. **Игорь Шохин** обратил внимание участников круглого стола на границы биоаналогичности при фармакокинетических исследованиях, которые устанавливает Руководство по экспертизе лекарственных средств. «Традиционно для фармакодинамических и клинических показателей выбирают 95%-й доверительный интервал, а для фармакокинетических показателей – 90%-й, – пояснил спикер. – Вторым, более строгим способом является использование интервала 80–125%, граница которого может быть сужена или расширена. В остальном процедура проводится по тем же правилам, то есть используют метод построения доверительных интервалов или проведения двух односторонних тестов».

Помимо этого, **Игорь Шохин** рассказал о требованиях к клиническим исследованиям биоаналогов, которые также устанавливает Руководство по экспертизе лекарственных средств. Например, в рамках II фазы в ходе изучения безопасности требуется проведение оценки иммуногенности.

Что касается исследований биоэквивалентности в рамках единого фармацевтического рынка ЕАЭС, то здесь спикер обратил внимание участников круглого стола на понятие «валидация методики»: «При изучении фармакокинетики лекарственных препаратов на основе макромолекул наиболее часто используются методы, основанные на связывании лиганда (МСЛ), или иммунохимические методы. Принципы валидации и рекомендации по анализу испытуемых образцов следует в целом применять и к МСЛ». Имеются и рекомендации к стандартным образцам, которые должны иметь сертификат анализа и документы, подтверждающие их происхождение. Биоаналитические методы, основанные на связывании лиганда, следует валидировать по таким параметрам, как специфичность, селективность, эффект переноса, выбор разновидности биологического образца, проводить минимально необходимое разведение, строить гра¬дуировочную прямую, проверять прецизионность и правильность, линейность разведения образцов, параллелизм и стабильность. Среди методов количественного определения **Игорь Шохин** в качестве основного указал на ИФА и его модификации, при котором используются коммерчески доступные готовые наборы. Этот метод имеет как свои преимущест-



ва, так и недостатки. Среди первых – высочайшая чувствительность (иногда менее 1 пг/мл), экспрессность (иногда – пробоподготовка от 2 ч, анализ 10 мин для 96 проб), недорогое оборудование (от 250 тыс. руб. за простейший планшетный СФМ), низкая кросс-реактивность (с эндогенными веществами) и валидированные, коммерчески доступные наборы. Среди недостатков эксперт отметил:

- Дорогостоящие расходные материалы (от 600 долларов США за набор 96 проб, включая стандарты, бланки и др.).
- Цена ошибки (ошибка аналитика – набор потерян).
- Почти все наборы импортные (длительность доставки).
- Точность и прецизионность ниже, чем для хроматографических и масс-спектральных методов.
- Иногда длительная пробоподготовка (в том числе с инкубированием ночью).
- Узкий аналитический диапазон (например, 0,3–20 нг/мл).
- Часто нелинейная зависимость (например, 4-параметровая логистическая регрессия).
- Часто необходимость разбавления проб, в том числе в тысячи раз, и подбирать разбавления экспериментально (проблема – выход концентраций за границу вПКО при максимально допустимом разведении).

Учитывая это, в качестве альтернативы ИФА в некоторых случаях целесообразнее применять LC-MS/MS, но со сложной пробоподготовкой, анализом и интерпретацией.

Поскольку ни одно мероприятие сегодня не представляет интереса без обзора нормативных изменений, зав. лабораторией фармакокинетики ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, к.фарм.н. **В.В. Смирнов** представил на круглом столе доклад по вопросам государственной регистрации препаратов-биоаналогов. Свое выступление спикер начал с определения категориального аппарата. Так, под биоинженерными препаратами сегодня понимаются препараты, полученные из субстанций, которые были созданы живыми клетками с помощью биотехнологии (генной инженерии, технологии рекомбинантной ДНК/РНК, при контроле экспрессии гена или технологии получения рекомбинантных антител), чья эффективность и безопасность доказана соответствующими методами. А биосимиляры представляют аналоги биофармацевтических лекарственных средств с близкой, но не идентичной исходной молекулой; это современные лекарственные препараты на основе белков, полученных путем биологического синтеза в клетках дрожжей и бактерий. «Под термином биосимиляр в России понимают полученное с помощью биотехнологий воспроизведенное лекарственное средство, которое может быть разрешено к медицинскому применению после истечения срока действия патента на оригинальное активное вещество», – особо выделил эксперт. Среди ключевых особенностей биоинженерных продуктов прежде всего обращает на себя внимание размер молекулы: это высокомолекулярные препараты, для которых очень важен не только одинаковый качественный/количественный состав, а также чрезвычайно важна конформация. «Биосимиляры же, – согласно визуальному представлению **В.В. Смирнова**, – подобны снежинкам, так как в результате отличий в производстве получаются продукты, отличные от своего биологического аналога и друг от друга».

Очевидно, что при сопоставлении по показателям «производство» и «клинические исследования» инновационные биотехнологические препараты и биосимиляры имеют много общего. Они синтезируются в специализированных клеточных линиях; чувствительны к изменениям производственного процесса – используется дорогое и специализированное оборудование; трудно установить их воспроизводимость; они подвергаются обширным клиническим исследованиям (фазы I–III); для них требуется постоянный фармаконадзор и периодические обновления данных по безопасности. В то же время эти продукты имеют серьезное отличие по регуляторным аспектам: первые не предназначены для «автоматической» замены, а для вторых она вообще запрещена. В отличие от них дженерики получают путем химического синтеза, они менее чувствительны к изменениям производственного процесса, а их воспроизводимость легко установить; как правило, для них является достаточным всего лишь фазы I клинических исследований; они проходят процедуру регистрации на проведении клинических исследований по упрощенной схеме. Что касается регуляторных аспектов для дженериков, то в их отношении требуется доказательство биоэквивалентности, а «автоматическая» замена разрешена.

Так как первым крупным регулирующим органом для контроля оборота биоподобных препаратов на сегодня является EMA/EC, спикер уделил пристальное внимание его руководству для разработки биосимиляров, являющемуся «золотым стандартом в таких странах, как Австралия, Канада, Япония, Корея и Южная Африка». «В этом руководстве описывается подход к сравнению биосимиляра с оригинатором с точки зрения качества, безопасности и эффективности, а для конкретных продуктов имеются свои отдельные руководства», – пояснил **В.В. Смирнов**. Еще одним (но уже после EMA) в категории «золотых стандартов» может считаться закон США о

регулировании обращения биосимиляров, легший в основу трех проектов руководств по разработке биосимиляров FDA. «FDA рекомендует поэтапный подход к доказательству биоподобности, – подчеркнул спикер. – Цель состоит в том, чтобы не выявить клинически значимую разницу с точки зрения безопасности, эффективности и качества. Руководство предоставляет консультации по видам исследований, которые должны быть предприняты производителем для решения. В соответствии с этим подходом спонсор должен провести:

- Структурный анализ: с помощью современный физико-химических методов.
- Функциональный анализ: соответствующие исследования, включая биологические анализы, анализы на связывание и взаимодействие с ферментами, исследования кинетики. FDA рекомендует, чтобы любые функциональные тесты были сравнительными.
- Доклинические исследования, в том числе исследования токсичности, фармакокинетики и фармакодинамики, иммуногенности.
- Клинические исследования, в том числе фармакокинетические и фармакодинамические исследования, результаты иммуногенности и безопасности и данные об эффективности».

Вторая часть круглого стола продолжилась в форме мастер-класса, где сотрудники ООО «ЦФА» поделились опытом проведения исследований биопрепаратов на примере эпоэтина альфа и эноксапарина натрия. Докладчики отметили, что наиболее актуальным аналитическим методом исследований биопрепаратов (фармакокинетика и иммуногенность) является иммуноферментный анализ, а также биохимические методы и хромато-масс-спектрометрические. Руководитель отдела биотехнологического оборудования ведущего хмико-фармацевтического холдинга России ГК «Фармконтракт», к.б.н. **Алексей Бобрускин** познакомил участников круглого стола с практическими аспектами исследования биоаналогов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии на примере производства препарата «РАСТАН» (рисунок 1).

«При идентификации пептидов в описываемом случае использовали ВЭЖХ **Agilent 1260 Infinity**, который позволяет повышать значения рабочего давления с 400 до 600 бар и частоту сбора данных до 80 Гц, использовать колонки с размером зерна сорбента менее 2 мкм и дает возможность работать как в традиционной ВЭЖХ, так и в области ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ), – пояснил **Алексей Бобрускин**. – Для обнаружения малых молекул, пептидов или неповрежденных белков в широком диапазоне масс (25–20000 а.е.м.) мы использовали тан-

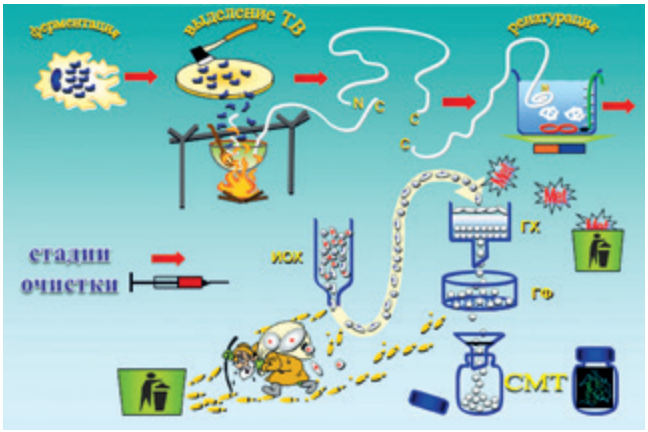


Рисунок 1. Технологическая схема производства препарата «РАСТАН»

демный квадруполь-времяпролетный (Q-TOF) масс-спектрометр **Agilent 6500**, в котором реализована технология True Hi-Def, что обеспечивает непревзойденную точность масс в режимах MC и MC/MC для однозначной идентификации соединения. При этом точность определения масс (1–2 ppm для MC и 2–4 ppm для MC/MC) повышает точность идентификации малых молекул и снижает ложноположительный отклик при поиске по белковым базам. А скорость сбора данных до 20 (MC) или до 10 (MC/MC) спектров в секунду позволяет использовать возможности жидкостной хроматографии быстрого разрешения: Agilent RRLC и системы ВЭЖХ-Chip».



ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity



Тандемный квадруполь-времяпролетный (Q-TOF) масс-спектрометр Agilent 6500

Завершился круглый стол презентацией компании ООО «Бекмен Культер» возможностей анализаторов размеров и счетчиков частиц Beckman для производства биофармацевтических препаратов от входного контроля воды до контроля качества готовой продукции на довидимые включения.

КОНФЕРЕНЦИЯ «ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ»

15 июня 2017 года в Москве прошло ежегодное мероприятие, организуемое The Moscow Times для ключевых представителей фармацевтического сообщества и органов государственной власти. В этом году конференция прошла под новым брендом: «Ведомости. Практика». Несмотря на новый бренд, ключевые темы сохранили свою актуальность и остроту дискуссии. Лейтмотивом конференции стали вопросы, связанные с локализацией производства лекарственных средств на территории Российской Федерации.



Деловая программа хорошо себя зарекомендовавшей в среде фармацевтического сообщества конференции традиционно состояла из двух ключевых сессий. Первая касалась локализации как стимула процессов импортозамещения в фармацевтической отрасли и собрала представителей профильных органов власти, курирующих это направление, а также глав отраслевых ассоциаций и топ-менеджмент крупнейших компаний-производителей лекарственных средств, вносящих существенный вклад в лекарственную безопасность страны.

Открывая сессию *«Локализация производства лекарственных средств как стимул процессов»*, исполнительный директор СПФО **Лилия Титова** отметила положительную динамику роста отрасли: «По оценкам Минпромторга России, производство лекарственных средств в России ежегодно увеличивается на 20–25%. За первый квартал 2017 года отрасль также продемонстрировала положительный рост: фармацевтическое производство увеличилось примерно на 19% по сравнению с тем же периодом прошлого года». Директор департамента развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга России **Алексей Алехин** дополнил эти данные, отметив, что по итогам 2016 года доля отечественных лекарственных препаратов в сегменте противотуберкулезных средств составила 76% в натуральном выражении и 84% в стоимостном, а в терапии ВИЧ-инфекции этот показатель достиг 64% и 30%. Учитывая, что развитие локальных производственных мощностей рассматривается как важная составляющая в решении задач повышения импортной независимости в отрасли, министерство активно работает над нормативно-правовыми актами, которые

бы стимулировали производителей активнее переходить к большей степени локализации производства своих продуктов на территории Российской Федерации. Среди таких актов **Алексей Алехин** отметил доработку постановления о «третьем лишнем» в части, касающейся преференций для фармацевтических компаний, использующих в своем производстве отечественную фармацевтическую субстанцию: «Полагаем, что должен быть преференциальный механизм. Существуют отдельные направления, где точно необходимо создавать локальные компетенции». Помимо этого, спикер рассказал о ходе работы над постановлением Правительства Российской Федерации «О критериях отнесения промышленной продукции к промышленной продукции, не имеющей аналогов, произведенных в Российской Федерации». Здесь планируется конкретизировать технологические направления, имеющие приоритетное значение: «На создание компетенций именно в этих областях прежде всего будут ориентироваться специальные инвестиционные контракты (СПИК)». Среди причин задержки подписания СПИКов в фармацевтической отрасли представитель Минпромторга России назвал отсутствие локального законодательства в отдельных субъектах под действие этого механизма.

О положительных тенденциях развития сегмента локализации производства лекарственных средств говорили не только представители государственных структур, но и сами производители. Например, генеральный директор компании «Сотекс» **Вадим Яцук** среди положительных изменений отметил тот факт, что локальные компании адаптируются под изменения в законодательстве и имеют возможность расширять производство внутри страны. Заместитель генерального директора STADA CIS **Иван Глушков**, убежденный в отсутствии в России экспорта в классическом его понимании, все же положительно оценивает организованный государством диалог с бизнес-сообществом, который помогает понять проблемы, существующие в фармотрасли.



О возможностях, которые могут быть предоставлены компаниям для развития производства на территории страны, рассказал исполнительный директор биофармкластера «Северный» **Олег Корзинов**. Среди преимуществ он выделил налоговые, административные, инфраструктурные условия, которые получают компании-резиденты кластера для инвестиций в производство, науку и инновации. Огромный потенциал для локализации фармацевтических производств, безусловно, имеет Московская область и сама Москва, площадь промышленных территорий которой составляет 15,7 тыс. га, где располагается 91% прибыльных фармпредприятий *(данные из презентации и.о. директора Агентства промышленного развития города Москвы* ***Кристины Волконицкой****)*. Более того, здесь в 2015 году суммарная выручка 27 фармацевтических предприятий превысила 69 млрд руб., что составляет 24% в совокупном обороте фармацевтической продукции на территории всей страны. Говоря об инвестиционных проектах столицы России, **Кристина Волконицкая** обратила внимание участников конференции на реализованные за последние 5 лет проекты в сегменте фармпрома: упаковка готовых лекарственных средств (ООО «Добролек»), производство лекарственных препаратов для профилактики и лечения инсультов (ЗАО «ИНПЦ «Пептоген»), для лечения ВИЧ-инфекции (ООО «Макиз-Фарма») и сердечно-сосудистых, гастроэнтерологических заболеваний (ООО «Нова Медика»). Из преимуществ для развития производства в Москве спикер выделила три вида субсидий (до 300 млн руб. в год на уплату процентов по займам на развитие технопарков, до 200 млн руб. в год – по займам на приобретение отдельных видов оборудования и до 100 млн руб. в год на уплату лизинговых платежей), налоговые льготы, поручительства по кредиту на сумму, не превышающую 100 млн руб.

Однако не все так просто для иностранных компаний, которые собираются завоевать российский рынок. По мнению руководителя юридического отдела SCHNEIDER GROUP **Ирины Саадуевой**, тренд локализации иностранными компаниями воспринимается как ряд ограничений, направленных только на поддержку отечественного бизнеса и запрещающих (ограничивающих) продвижение их продукции на российский рынок: «Любой иностранный производитель хорошо осведомлен о формуле «третий лишний» и из-

за недостатка информации однобоко трактует локализацию. То есть непредсказуемость законодательства не делает Россию привлекательной для инвестиций, а иностранным компаниям, желающим локализироваться в России, непонятны практические шаги, которые им необходимо осуществить».

Завершилась пленарная сессия докладом советника адвокатского бюро «Егоров, Пугинский, Афанасьев и партнеры» **Марии Кобаненко**, который, казалось бы на первый взгляд, мало связан с вопросом локализации, но играет немаловажную роль в бюджете любой фармацевтической компании: ценообразование на лекарственные препараты по номенклатуре перечня ЖНВЛП. Среди ключевых нововведений в сфере регулирования ценообразования на лекарственные препараты ЖНВЛП спикер отметила индикативное ценообразование (рисунок 1), уход от затратного метода к индикативам и референсам.

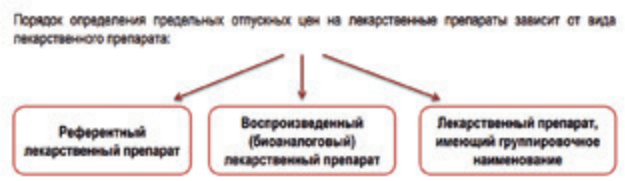


Рисунок 1. Индикативное ценообразование

Для выработки сбалансированных решений, по мнению **Марии Анатольевны**, необходимо дополнительно обсудить вопросы привязки предельных цен к ценам госзакупок за календарный год, предшествующий регистрации, уравнивание цен в рамках одного регистрационного удостоверения независимо от формы выпуска, сокращение оснований для повышения цены и введение случаев принудительного снижения цен.

Подводя итоги пленарной сессии, эксперты отметили большое количество новаций, которые происходят сегодня в фармацевтическом секторе и к которым каждому участнику процесса необходимо адаптироваться и подстраиваться. Важен диалог бизнеса и власти, который будет стимулировать дальнейшее развитие рынка.

Деловую часть конференции продолжила экспертная панель *«Модернизация фармацевтической промышленности. Развитие инновационного фармацевтического производства в России»*. Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности **Григорий Ивлиев** отметил, что фармацевтическая промышленность является одним из приоритетных направлений работы ведомства, и прежде всего эта деятельность ориентирована на защиту интересов потребителей. Глава Роспатента высказал позицию по вопросам принудительного лицензирования и возможного выпуска лекарств без патентов, отметив, что действующее российское законодательство предусматривает все механизмы для обеспечения граждан качественными лекарственными препаратами. В качестве предложения, способного помочь развитию фармацевтической отрасли, **Григорий Петрович** представил создание национального фармацевтического реестра, который станет главной базой данных всех лекарственных препаратов, сведений об их патентной защите, производстве и производителях, стоимости лицензии. Спикер также подчеркнул важность введения в отрасли широкой практики проведения глубоких патентных исследований, необходимых для защиты вложенных в производство средств.

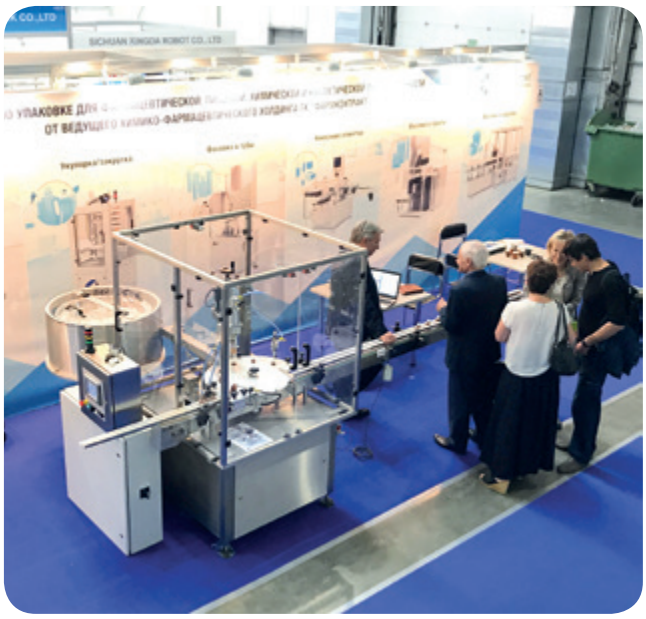
Об особенностях патентования в фармацевтической сфере рассказал управляющий партнер патентно-адвокатского бюро «Гардиум» **Алексей Абрамов**. По его данным, статистика по патентным делам в России очень мала, что связано с практически невозможным доказательством своего права в этой сфере. Небольшие коррекции, на которые идут производители, трудно использовать в защиту оригинального препарата, что делает право на изобретение практически недоказуемым в отличие, например, от права на товарный знак. **Алексей Адамович** отметил, что Роспатент ведет большую работу в направлении совершенствования законодательства. В то же время сами производители считают, что существующего законодательства по защите интеллектуальной собственности вполне достаточно – производителям просто надо научиться с ней работать: «Быть российской компанией с оригинальными разработками в России интересно, но непросто. Защищать себя компании приходится со всех сторон. Компаний, желающих нарушить право на изобретение, больше, чем компаний, желающих создать что-то свое». Такую точку зрения озвучила президент компании «Петровакс Фарм» **Елена Архангельская**, отмечая интерес к инновационному производству и понимание иностранными компаниями необязательности строительства нового производства на территории России.

Подводя итоги экспертной сессии и конференции, спикеры и участники пришли к единому мнению, что отрасль в целом демонстрирует позитивные тенденции, есть хорошие перспективы для развития и привлечения новых инвестиций.

ГЛАВНАЯ ВЫСТАВКА УПАКОВОЧНОЙ ИНДУСТРИИ В РОССИИ – ROSUPACK

20–23 июня 2017 года в «Крокус Экспо» прошла международная выставка RosUpack, на площадке которой предприятия практически любого сектора промышленности могли найти самые разнообразные решения для упаковки и сохранения качества, продления срока годности своего продукта. И это не просто слова. На выставочной площади порядка 23 тыс. м^2 было представлено оборудование для розлива и укупорки жидких продуктов и продуктов кремовой консистенции в бутылки и банки, фасовочные машины для пастообразных продуктов, оборудование для упаковки жидких, вязких, порошкообразных и твердых продуктов в саше, картонажные машины и системы нанесения этикеток, а также различные варианты упаковочного материала и тары. По данным организаторов, 600 компаний из 30 стран представили решения и для фармпредприятий, пищевого сектора, косметологической индустрии и химической промышленности.





«В 2017 году интерес компаний к выставке RosUpack значительно возрос по сравнению с двумя предыдущими годами, – констатирует директор выставки **Надежда Таланова**. – В выставочных залах, традиционно занимаемых производителями и поставщиками оборудования, достаточно давно нет свободных площадей. Наряду с компаниями, возвратившимися к участию после перерыва на год-два, более 100 компаний, включая иностранные, – абсолютные новички, никогда ранее не представлявшие свою продукцию на RosUpack». Среди таких новичков особенно выделялся крупнейший национальный дистрибьютор технологического оборудования ГК «Фармконтракт».

Действительно, для холдинга это первая выставка упаковочной индустрии, но как это обычно происходит, старт был взят вполне амбициозно: уже от входа гостей выставки встречали приятные подарки, а запущенная автоматическая укупорочная машина Imaco Hermes 1M приковывала взгляды, заставляя надолго задержаться, чтобы понаблюдать вживую за процессом укупорки стеклянных флаконов навинчивающимися крышками. Демонстрацию оборудования проводил непосредственно сам руководитель Imaco Group **Aleš Hurdes**, который обратил внимание посетителей, что данная машина роторного типа может использоваться для укупорки не только демонстрируемых флаконов, но и различных видов небольших контейнеров навинчивающимися или нахлопывающимися крышками. Среди преимуществ машины, подходящей для продуктов пищевой, косметической, химической и фармацевтической промышленности, стоит отметить тот факт, что она может быть максимально оперативно перенастроена под другой формат емкости или крышки. «Для укупорки контейнеры транспортируют-



ся подающим конвейером в звездчатое колесо (ротационный стол). Когда датчик определит положение бутылки, звездчатое колесо переместит в позицию для надевания крышки на бутылку, где ее зафиксирует. Подающий механизм захватывает крышку и вставляет ее в укупорочную головку, последняя съезжает вниз, закручивает и затягивает крышку. Необходимую силу затяжки можно выставить на укупорочной головке с помощью магнитной муфты. Закупоренная бутылка транспортируется звездчатым колесом к выводящему конвейеру», – пояснил принцип работы Hermes 1M **Aleš Hurdes**.

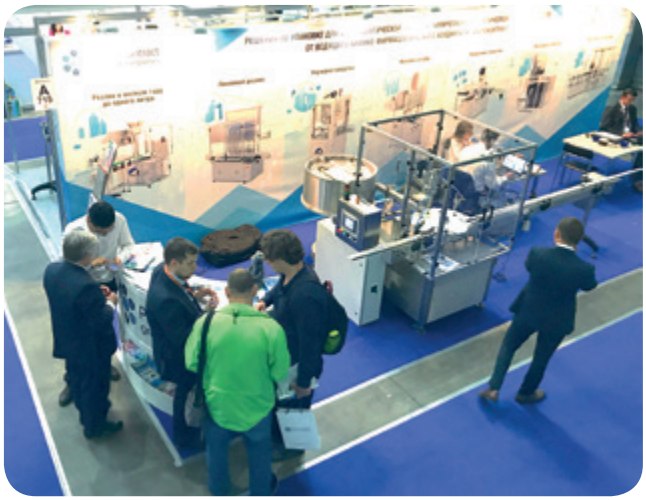
Помимо высокопоставленного гостя из Чехии, на стенде ГК «Фармконтракт» присутствовал и представитель итальянской компании Boatopack S.R.L., специализирующейся на производстве модульных систем для наполнения пакетов жидкими, вязкими, порошкообразными и твердыми продуктами с последующей запайкой этих саше с четырех сторон. Среди особенностей данной системы **Pawel Czystaw** отметил работу процессора в режиме многозадачности, что позволяет управлять одновременно 32 каналами, а также наличие в охлаждаемом ящике контроллера с функциями PLC и простоту установки базовых параметров: длины саше, количества сгруппированных саше, температуры запайки.

Кроме демонстрации оборудования, сотрудники из отдела ГЛФ и упаковочного оборудования ГК «Фармконтракт» с зарубежными коллегами проводили профессиональную консультацию по выбору соответствующего типа оборудования для решения таких производственных задач на этапе упаковки продукта, как розлив жидких, пастообразных продуктов кремовой консистенции в металлические, пластмассовые и ламинированные тубы с укупоркой загибом или сваркой с помощью горячего воздуха, горячий розлив и розлив продуктов с включениями (кусочки фруктов, орехов и т.д.), наиболее часто встречающихся при производстве продуктов питания и кондитерских изделий, а также рассказывали о возможностях автоматизации процесса розлива густых жидкостей в бутылки и банки, розливе кислот, сильных растворителей, горючих жидкостей, едких смесей и ядовитых веществ. Не остался без внимания процесс дозирования в баллоны жидкой составляющей аэрозолей, упаковки готового продукта в короба и нанесения на него этикетки. Столь разнообразные решения завершающей стадии производственного процесса любого предприятия были представлены широкой линейкой производителей признанного во всем мире оборудования **Imaco, Boatopack S.R.L., Cariba, O.M.A.R., Technomaco, TEG, MPA** и других. Как известно, в референс-листе этих компаний значатся хорошо нам знакомые производители косметики (Johnson & Johnson, Estel, Wella, P&G), пивоварня Henkel, такие гиганты FMCG, как Uniliver, и множество других компаний, продукция которых находится в ежедневном употреблении практически каждого из нас.

Московская выставка RosUpack может конкурировать с немецкой Interpack?

Подводя итоги второго дня работы, многие участники сравнивали российскую выставку для упаковочной индустрии с недавно проходившей в Дюссельдорфе выставкой Interpack. Можно смело говорить, что опасения организаторов по поводу снижения интереса к российскому мероприятию в связи с проведением Interpack не оправдались: за два дня выставку посетило более 5 000 человек. А самым востребованным продуктом, который не все компании могли предложить упаковать, оказался мед.

«Конечно, приняв решение об участии в RosUpack, мы предполагали, что большинство запросов на розлив и укупорку жидких продуктов и продуктов кремовой консистенции в бутылки и банки, фасовку пастообразных продуктов в металлические, пластмассовые и ламинированные тубы будут поступать от предприятий пищевой промышленности, но никак не ожидали, что каждый десятый посетитель будет интересоваться возможностями различной фасовки меда и его упаковкой, начиная от «заманушек» в виде шайбочек с ложками и заканчивая хорошо знакомыми нам по магазинным витринам баночками с медом, спасающими сторонников народной медицины в сезон простуд, – отметила вице-президент ГК «Фармконтракт»



Евгения Дорина интересную тенденцию для их холдинга. – Более того, мы опасались, что наш бренд будет у большинства посетителей выставки ассоциироваться с фармпродукцией, но второй день полностью опроверг эти опасения. А для предприятий, специализирующихся на парафармацевтике, космицевтике и ветеринарных препаратах, он стал дополнительным стимулом обратиться именно к нам, а не к кому-то другому. Мы нередко слышали такие фразы: «Если вы работаете с фармой, то знаете, как нам организовать не только упаковку, но и производство, например, спрея от комаров по всем стандартам». И конечно, во многом интерес предприятий пищевой промышленности обусловлен работой референсов от наших крупных заказчиков».

Стоит отметить, что, несмотря на обширную экспозицию упаковочного оборудования и машин для нанесения этикетки, очень мало на выставке было работающих демо-образцов такого оборудования. Поэтому компании, которые запустили в действие и показывали товар вживую, оказались самыми востребованными. «Нам повезло, что рядом с нами коллеги показывают процесс производства ПЭТ-тары, который своим немаленьким шумом обращает на себя внимание. А ПЭТ-тара всегда используется на предприятиях, специализирующихся на выпуске жидких продуктов. Значит, им 100% потребуются линии розлива и укупорки/закрутки», – пояснила причины популярности и ажиотажа в секторе А700 **Евгения Дорина**. И действительно, можно было заметить «живую миграцию» в зале 1 между двумя компаниями: от ПЭТ-тары посетители плавно переходили к автоматической машине укупорки разнообразнейших видов контейнеров – Imaco Hermes 1M, которая ориентирована на небольшие объемы. А вот для укупорки больших контейнеров (свыше 1 л) предлагалось рассмотреть автоматическую линейную одноголовочную машину укупорки Hermes BCWS. Для розлива жидких продуктов в различные емкости небольших размеров с последующей укупоркой винтовыми или насадными крышками рекомендовали обратить внимание на возможности разливочного и укупорочного моноблока Spectrum, который может быть дооснащен укупорочной системой с применением подкрышек или этикетировочной системой.

Помимо этого, на стенде крупнейшего национального дистрибьютора технологического оборудования можно было познакомиться с возможностями пневматической линейной машиной розлива Polaris P, которая обеспечит автоматизацию процесса розлива таких продуктов, как масло, спирт, сироп, шампунь и прочие жидкие негазированные продукты пищевой промышленности, в емкости до 20 л. Кстати, как отметил руководитель отдела ГЛФ и упаковочного оборудования ГК «Фармконтракт» **Александр Гринченко**, данная машина может оснащаться дозаторами разного объема, т.е. легко подстроится под разливаемые дозы. Для автоматического розлива жидкостей в бутылки, контейнеры или банки может применяться и линейная машина розлива Polaris FM. Также для пищевых и косметических производств были представлены возможности розлива густых продуктов в бутылки и банки на базе Polaris PD, в которой дозируемая 4-, 6-, 9-, 12- и даже 16-разливочными дозаторами для заполнения пастообразных продуктов жидкость измеряется объемным способом.

Конечно же, кроме обширной линейки универсального для ряда отраслей промышленности оборудования чешского производства, можно было увидеть оборудование и других не менее именитых представителей из Европы и Кореи и даже пообщаться с представителями этих компаний, прорабатывая свою, не всегда стандартную задачу.

Учитывая высокий интерес к выставке со стороны российских компаний и предприятий из стран СНГ в год проведения крупнейшей в мире выставки Interpack, в следующем году можно ожидать еще больший ажиотаж вокруг представляемых поставщиками упаковочного оборудования новых и хорошо себя зарекомендовавших линий.





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

СЕМИНАР «ОСНОВЫ ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВА НАЦИОНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ АККРЕДИТАЦИИ. ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОРГАНИЗАЦИИ ИСПЫТАТЕЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ И ПОДГОТОВКА К ПРОЦЕДУРЕ АККРЕДИТАЦИИ И ПОДТВЕРЖДЕНИЯ КОМПЕТЕНТНОСТИ»

21–22 июня 2017 года Национальный институт аккредитации при Федеральной службе по аккредитации провел тематический семинар для сотрудников аккредитованных Росаккредитацией и внесенных в соответствующий государственный реестр испытательных лабораторий (центров), а также для специалистов, принимающих участие в подготовке лабораторий к процедурам аккредитации и подтверждения компетентности, направленный на совершенствование компетенции аккредитованных лиц. Ключевыми темами семинара стали вопросы подготовки персонала испытательных лабораторий к требованиям и практике внедрения системы менеджмента качества в соответствии с приказом Минэкономразвития России от 30.05.2014 № 326 «Критерии аккредитации и перечень документов, подтверждающих соответствие заявителя и аккредитованного лица критериям аккредитации», а также современные подходы обеспечения соответствия требованиям национальной системы аккредитации.

Одним из таких ключевых аспектов в данной теме является планирование, проведение и анализ результатов внутрилабораторного контроля качества измерений. Данные процедуры регламентированы ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009. О практике этих процедур подробно рассказал технический эксперт Федеральной службы по аккредитации, к.ф.-м.н. **Евгений Николаевич Тупицын**.

Свой доклад спикер начал с определения понятий «качественные измерения», «погрешность» и «неопределенность». Четкое понимание данных терминов должно лежать в основе внутрилабораторного контроля качества измерений.

Качественные измерения *– это точные измерения.* ***Погрешность результата измерения*** *– это разность между измеренным значением величины и опорным значением величины.* ***Характеристика погрешности*** *– параметр функции распределения случайной величины – погрешности измерений. Среднее квадратичное отклонение, характеризующее погрешность измерения и границы, в которых погрешность измерения находится с заданной вероятностью. И, наконец, неопределенность – неотрицательный параметр, характеризующий рассеяние значений величины, приписываемых измеряемой величине на основании измерительной информации.*

Так, по словам **Евгения Николаевича**, в отечественной метрологической практике до настоящего времени более широко использовалось понятие «характеристика погрешности», близкое по смыслу к понятию «неопределенность», но необходимо учитывать, что в ГОСТ ИСО/ МЭК 17025-2009 неоднократно встречается термин «неопределенность», а термин «характеристика погрешности» отсутствует.

В положениях «ГОСТа Р ИСО 10576-1-2006 «Руководство по оценке соответствия установленным требованиям. Часть 1. Общие принципы», указано, что решение о соответствии требованиям может быть принято только тогда, когда интервал неопределенности результатов измерений находится внутри области допустимых значений. Докладчик отметил, что, «поэтому корректная оценка интервала неопределенности – одно из главных требований к испытательным и калибровочным лабораториям».

«Целью разработки ГОСТ Р ИСО 5725-2000 в Российской Федерации стало прямое применение шести частей основополагающего Международного стандарта ИСО 5725 под общим заголовком «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» в практической деятельности по метрологии (разработке, аттестации и применению методик выполнения измерений), стандартизации методов контроля (испытаний, измерений, анализа), испытаниям продукции, в том числе для целей подтверждения соответствия, оценке компетентности испытательных лабораторий согласно требованиям ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2000», – пояснил **Евгений Тупицын**. ГОСТ Р ИСО 5725-2000 дает формулировки понятий «точность», «правильность» и «прецизионность».

Точность *– степень близости конкретного результата измерений к принятому опорному значению.*

Правильность *– степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений (или результатов испытаний), к принятому опорному значению.*

Прецизионность *– характеризует степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях.*

На основе ГОСТ Р ИСО 5725-2002 разработаны нормативные документы, в которых развиты положения и более детально регламентированы эти процедуры:

- **РМГ 61-2010** «Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки».
- **РМГ 76-2014** «Внутренний контроль качества результатов количественного химического анализа».
- **МИ 2881-2004** «Методики количественного химического анализа. Процедуры проверки приемлемости результатов анализа».

Согласно этим документам, показатель точности результатов анализа представляет собой значение неопределенности или характеристики погрешности, установленное для любого результата анализа, полученного при соблюдении требований и правил данной методики при ее реализации в конкретной лаборатории. А показатель повторяемости результатов анализа – значение неопределенности или приписанной характеристики случайной погрешности результатов единичного анализа, полученных в условиях повторяемости при реализации методики анализа в конкретной лаборатории. Показатель внутрилабораторной прецизионности – это значение неопределенности или приписанной характеристики случайной погрешности результатов анализа, полученных по методике в конкретной лаборатории в условиях внутрилабораторной прецизионности.

В связи с внедрением новой редакции приказа Минэкономразвития России от 30.05.2014 № 326 «Критерии аккредитации и перечень документов, подтверждающих соответствие заявителя и аккредитованного лица критериям аккредитации» (приказ Минэкономразвития России от 07.09.2016 № 570) основными целями внутреннего контроля качества результатов анализа являются:

- обеспечение необходимой точности результатов текущего анализа;
- экспериментальное подтверждение лабораторией своей технической компетентности, достоверности получаемой ею аналитической информации;
- обеспечение доверия к результатам анализа как внутри лаборатории, организации, в составе которой работает лаборатория, так и со стороны других организаций.

Для достижения этих целей рекомендуется использовать такие виды контроля, как подтверждение правильности использования (верификация) методик выполнения измерений, контроль наличия условий для проведения аналитических работ, оперативный контроль процедуры анализа и контроль стабильности результатов анализа.

Применение способов верификации спикер проиллюстрировал схемой экспериментальной проверки правильности использования методик количественного химического анализа в лаборатории (рисунок 1).



Рисунок 1. Экспериментальная проверка правильности использования МКХА по Р. 50.2.060-2008

С учетом того, что оперативный контроль процедуры анализа осуществляет его исполнитель с целью проверки готовности лаборатории к проведению анализа рабочих проб или оперативной оценки качества результатов анализа каждой серии рабочих проб, полученных совместно с результатами контрольных измерений, схема оперативного контроля может быть представлена следующими процедурами:

- выбор контрольной процедуры;
- реализация контрольной процедуры;
- расчет результата контрольной процедуры;
- расчет (установление) норматива контроля;
- реализация решающего правила контроля.

Реализация указанных процедур происходит с применением образца для контроля, методов добавок, разбавления пробы, добавок совместно с методом разбавления пробы, варьирования навески и контрольной методики анализа.

Докладчик пояснил, что сравнительно недавно вошедшие в обиход аналитиков понятия верификации и валидации имеют определения, соответствующие терминологии ГОСТ Р ИСО 9000-2015, и являются аналогом процедур проверки правильности и пригодности методик выполнения измерения.

Верификация *– представление объективных свидетельств того, что данный объект полностью удовлетворяет установленным требованиям.*

Валидация *– подтверждение путем исследования и предоставления объективных доказательств того, что конкретные требования к специфическому целевому использованию выполняются.*

В ходе валидационного исследования методик выполняется несколько этапов работ:

- селективность;
- предел количественного определения;
- рабочий диапазон;
- определение показателей качества методики.

При верификации контролируется наличие условий для проведения аналитических работ, осуществляется проверка условий хранения и сроков годности экземпляров СО, реактивов, материалов, растворов, образцов проб, условий и правил их отбора и доставки. Помимо этого, подтверждаются технические и метрологические характеристики применяемого оборудования, сроки поверки (калибровки) СИ, сроки аттестации испытательного оборудования и стабильность градуировочных характеристик.

Планирование процедур внутреннего контроля качества рекомендуется проводить для каждой методики с учетом количества анализов и их периодичности, числа лаборантов, выполняющих эти анализы, и наличия контрольных образцов.

Евгений Николаевич также напомнил участникам семинара, что для проверки внутрилабораторной прецизионности и точности результатов анализа может быть обосновано применен выборочный статистический контроль, и представил его возможную схему (рисунок 2).

Докладчик также привел схему общего вида выборочного статистического контроля качества измерений в лабораториях, которая представлена на рисунке 3.

Свое выступление технический эксперт Федеральной службы по аккредитации **Евгений Тупицын** завершил напутствием участникам семинара, процитировав известного ученого и консультанта по менеджменту **Эдварда Деминга**: «Покончите с зависимостью от массового контроля для достижения качества. Замените его встраиванием качества в процесс».



Рисунок 2. Схема применения выборочного статистического контроля

Примечание: Ac – приемочное число, Re – браковочное число, зависящие от объема выборки (числа результатов анализа) и приемлемого уровня качества

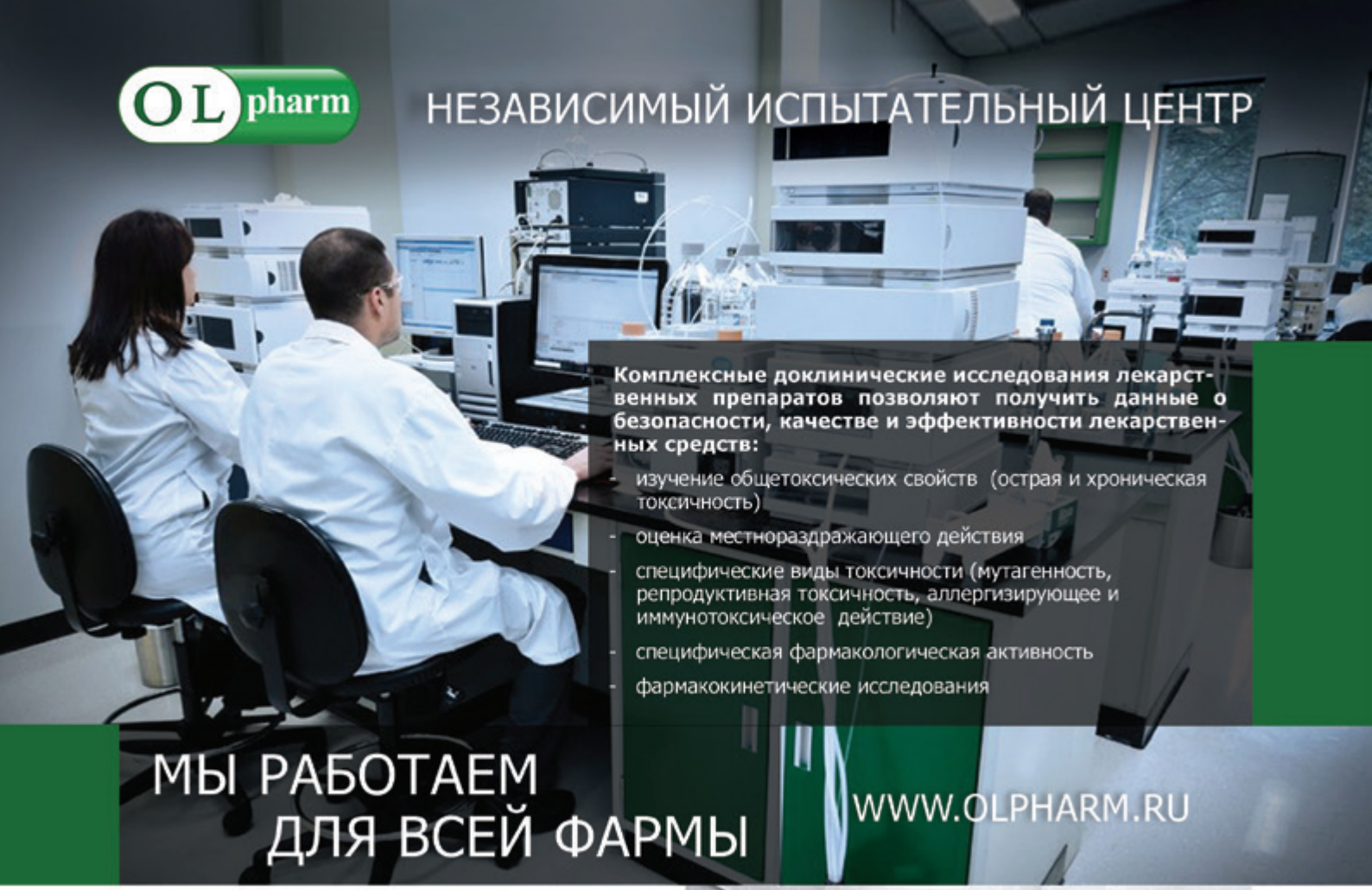


Рисунок 3. Схема общего вида выборочного статистичего контроля качества измерения в лабораториях

С Планом тематических семинаров на 2017 год, согласованных Федеральной службой по аккредитации для проведения Национальным институтом аккредитации, можно ознакомиться на сайте Службы в объявлении от 25.03.2017 в рубрике «Важная информация» http://fsa.gov.ru/news/important/page/5/show_id/1730/

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

I ВСЕРОССИЙСКИЙ МЕЖВУЗОВСКИЙ GXP-САММИТ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ВЫБОР ЛУЧШИХ. ВРЕМЯ ВПЕРЁД»

5–7 июля 2017 года образовательный центр ФБУ «ГИЛС и НП» провел в Туле саммит для студентов и аспирантов крупнейших медицинских вузов России и стран ЕАЭС. Мероприятие, посвященное GxP-практикам, в подобном формате прошло в России впервые: до саммита абитуриенты предоставили независимой экспертной комиссии свои исследовательские проекты, по результатам оценки которых и был сформирован список из 61 претендента на звание самого лучшего и перспективного молодого таланта фармотрасли. Приглашенные по итогам отборочного тура молодые ученые выполняли тестовые задания и отвечали на вопросы практического блока.



Всероссийский межвузовский GxP-саммит – это крупное мероприятие международного масштаба, посвященное таким надлежащим практикам, как клиническая, производственная, инженерная, дистрибьюторская, регуляторная и аптечная (GCP, GMP, GEP, GDP, GRP, GPhP). Несмотря на то, что саммит проходил в первый раз, он получил высокую оценку. Так, в приветственном письме заместителя министра промышленности и торговли Российской Федерации **Сергея Цыба** отмечено, что на мероприятии нет случайных людей: «Последнее десятилетие было отмечено заметным ускорением темпов развития российской фармакологии. Активно внедряются стандарты GMP, принятые в большинстве стран мира. Эти стандарты предполагают совершенно иной уровень качества производства и реализации лекарств. Для того чтобы они работали, нужны специалисты в самых различных областях – те, кто будут проводить исследования, разрабатывать новые препараты, производить их, доставлять конечным потребителям. Все эти люди – вы в самом ближайшем будущем. Каждый из вас принимал участие в конкурсе, проводил собственные научные изыскания, работал со специализированной литературой, фиксировал свои наблюдения и открытия. Итоги вашей работы были внимательно изучены и выделены среди работ ваших сокурсников, что говорит о качестве проведенных вами исследований и о высокой их оценке со стороны руководства ваших учебных заведений. Можно уверенно сказать: на саммите «Выбор лучших. Время вперёд» действительно собрались лучшие из лучших».



Сергей Цыб

Директор ФБУ «ГИЛС и НП», заместитель руководителя государственного GMP-инспектората **Владислав Шестаков**, приветствуя гостей саммита, отметил, что мероприятие подобного рода в России проходит впервые: «Все мы знаем, какими непростыми могут быть первые шаги молодых специалистов: отсутствие опыта, высокая конкуренция на рынке. Поэтому особенно важно поддерживать таланты, помогать им интегрироваться, находить эффективное применение знаниям и инициативам, – пояснил **Владислав Николаевич** интерес института к данному проекту. – Совместно с Первым Московским государственным медицинским университетом им. И.М. Сеченова и при поддержке правительства Тульской области мы создали площадку, на которой собираем самых одаренных студентов лучших профильных вузов в странах Евразийского экономического союза. Все вы, участники данного саммита, – будущие ученые, инженеры, технологи, провизоры, фармацевты. Вам предстоит развивать фармакологию, внедрять технологии, предлагать новые решения вопросов, которые помогут сделать лекарства для людей доступнее и эффективнее. Вы будете создавать правила функционирования единого рынка лекарственных средств, который объединит опыт и достижения промышленности разных стран; и вы же будете регулировать его работу, контролировать качество продукции. Вы станете лицом отечественной фармакологии и сделаете неоценимый вклад в развитие российской промышленности».

Учитывая основной костяк целевой аудитории мероприятия, директор ФБУ «ГИЛС и НП» рассказал возможным будущим коллегам об особенностях работы GMP-инспектора и деятельности самого института, миссией которого является внедрение надлежащих практик и формирование профессиональной системы ценностей у специалистов фармацевтической и медицинской отраслей. Поскольку сегодня ГИЛС и НП – это фактически экспертный центр по GxP-практикам, а не просто главный аудитор фармпредприятий, его сотрудники в своей ежедневной работе стремятся оказать содействие в обеспечении соответствия производства лекарственных средств требованиям надлежащей производственной практики (GMP); в формировании отраслевой системы повышения квалификации и переподготовки персонала фармацевтических и медицинских производств и самое главное – в повышении конкурентоспособности отечественной фармацевтической и медицинской промышленности.

Владислав Николаевич также отметил, что организация и проведение инспектирования зарубежных производителей лекарственных средств на соответствие требованиям GMP – это не только выездные мероприятия, в которых принимает участие инспектор. Это сложный и многогранный процесс, который включает в себя разработку предложений по совершенствованию системы государственного регулирования качества, совместную работу с инспекторами стран ЕАЭС и международными организациями и, конечно же, непрерывный процесс обучения и повышения квалификации. Предвосхищая вопрос, кто может стать инспектором, спикер представил требования, которым должен удовлетворять потенциальный кандидат:

- иметь высшее образование по одной из специальностей: биология, биотехнология, клиническая медицина, радиационная, химическая и биологическая защита, фармация, фундаментальная медицина, химическая технология и химия;



Владислав Шестаков

- за его плечами должен быть опыт работы от 5 лет в должности заместителя начальника ООК, ОКК, специалиста по контролю соблюдения качества, ведущего инженера по квалификации или в области производства и/или контроля качества;
- знать правила надлежащей производственной практики; системы обращения лекарственных средств; правил GMP (GxP) (EC, FDA, WHO);
- иметь практический опыт валидации и квалификации технологического и лабораторного оборудования, инженерных систем, чистых сред и помещений, валидации стерильного производства, в том числе асептических процессов, компьютеризированных систем;
- обладать знаниями компьютеризированных систем;
- свободно владеть английским языком.

Однако требования предъявляются не только к кандидатам, но и к успешно работающим инспекторам: они должны соблюдать кодекс инспектора, который предусматривает добросовестное и высокопрофессиональное исполнение должностных обязанностей в пределах полномочий, соответствующих должностной инструкции, а также:

- исключать действия, связанные с влиянием каких-либо личных, имущественных (финансовых) и иных интересов, препятствующих добросовестному исполнению должностных обязанностей;
- уведомлять своего непосредственного руководителя обо всех случаях обращения к инспектору каких-либо лиц в целях склонения к совершению коррупционных правонарушений;
- соблюдать нормы служебной, профессиональной этики и правила делового поведения;
- проявлять терпимость и уважение к обычаям и традициям, учитывать культурные и иные особенности различных этнических и социальных групп;
- воздерживаться от поведения, которое могло бы вызвать сомнение в объективном исполнении инспектором должностных обязанностей, а также избегать конфликтных ситуаций, способных нанести ущерб репутации или авторитету инспектора;
- принимать предусмотренные законодательством Российской Федерации меры по недопущению возникновения конфликтов интересов и урегулированию возникших конфликтов интересов;
- не использовать служебное положение для оказания влияния на деятельность государственных органов, организаций, должностных лиц, государственных служащих и граждан при решении вопросов личного характера;
- воздерживаться от публичных высказываний, суждений и оценок в отношении деятельности государственных органов, их руководителей;
- не оказывать предпочтения каким-либо профессиональным или социальным группам и организациям, быть независимыми от влияния отдельных граждан, профессиональных или социальных групп и организаций.

Поскольку Всероссийский межвузовский GxP-саммит – это еще и своеобразная ярмарка вакансий, российские фармпроизводители, успешно прошедшие аудит и подтвердившие соответствие своих производственных площадок стандартам GMP, представили студентам и аспирантам свои образовательные программы и возможности интеграции в их команду.



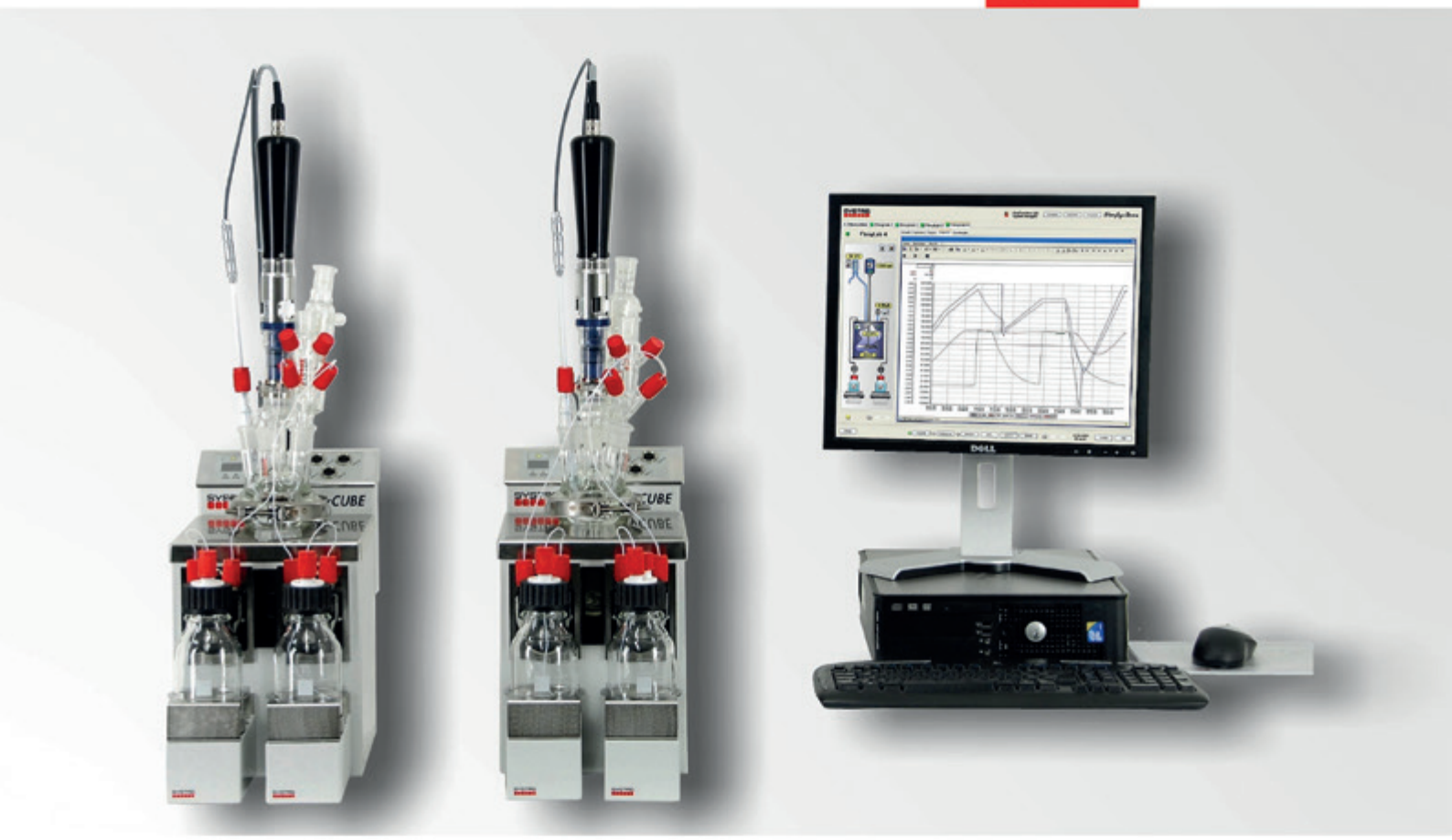




FlexyCUBE

Интегрированные системы автоматизации от systag

стр. 254



Возможность управления несколькими реакторами (до 6 объемом от 70 до 400 л) с одного персонального компьютера!

Предельные значения рабочих температур от -80 до +280.

Предельные рабочие давления от 0.01 до 100 Бар.

SYSTAG automatically better

- отработка процессов на начальной стадии исследований,
- наработка необходимого для анализа продукта,
- отработка методики синтеза с последующим масштабированием

ПАРАЛЛЕЛЬНЫЙ СИНТЕЗ И МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА С СОХРАНЕНИЕМ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

www.phct.ru

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

info@phct.ru

IV ВСЕРОССИЙСКИЙ КОНГРЕСС «НОРМАТИВНО-ПРАВОВОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ В РОССИИ И В ЕАЭС-2017»

7 июля 2017 г. компания «АСЭРГРУПП» провела в Москве традиционный для специалистов фармрынка конгресс, посвященный особенностям нормативно-правового регулирования их деятельности в условиях единого рынка ЕАЭС. Переход с 6 мая 2017 года на наднациональные стандарты разработки, доклинических и клинических исследований, контроль качества, регистрацию, производство и дистрибуцию лекарственных препаратов обусловил специфику обсуждаемых на конгрессе тем. Так, представители Евразийской экономической комиссии, Минпромторга России, Росздравнадзора и ГИЛС и НП рассказали о произошедших изменениях в государственной регистрации лекарственных средств и фармацевтических субстанций в Российской Федерации и на территории ЕАЭС, а также о дальнейших планах по гармонизации законодательства в сфере оборота лекарственных средств между странами-членами ЕАЭС в 2017–2018 гг.





Учитывая тему IV Всероссийского конгресса по нормативно-правовому регулированию фармрынка не только на территории России, но и ЕАЭС, открыть мероприятие пригласили начальника отдела координации работ в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий департамента технического регулирования и аккредитации Евразийской экономической комиссии **Дмитрия Рождественского**. Представитель ЕЭК рассказал о разработанных и уже вступивших в силу с 6 мая нормативно-правовых документах прямого действия, регламентирующих регистрацию лекарственных средств и обращение ранее зарегистрированных лекарственных препаратов на едином рынке ЕАЭС. По словам **Дмитрия Рождественского**, эти документы не требуют принятия каких-либо национальных нормативных актов, регулирующих их применение в каждом из государств-членов ЕАЭС, а значит, «с 6 мая этого года все этапы разработки, производства, изучения лекарственных препаратов в доклинических и клинических исследованиях должны проводиться в соответствии с требованиями соответствующих решений ЕЭК». В то же время спикер напомнил гостям конгресса, что до конца 2020 года в отношении регистрации лекарственных средств действует переходный период, в течение которого каждый производитель имеет право выбора способа регистрации своего лекарственного препарата: согласно национальному законодательству или по правилам ЕАЭС. «При этом уполномоченные органы государств-членов ЕАЭС не вправе отказывать производителям лекарственных средств в приеме досье на регистрацию по правилам ЕАЭС… На заседании рабочей группы, не испытывая большого энтузиазма, все пять представителей государств-членов Союза сказали, что готовы принимать документы по процедуре взаимного признания и приведения в соответствие при неполной готовности к работе информационной системы во всех государствах-членах ЕАЭС», – подчеркнул сотрудник департамента технического регулирования и аккредитации ЕЭК. По сути это означает, что формально госу-

дарства-члены ЕАЭС могут начать прием документов от компаний-производителей лекарственных средств, но пока не смогут подключить к процедурам другие государства.

Уделил **Дмитрий Рождественский** внимание и особенностям регистрации синтетических лекарственных препаратов для приема внутрь без выполнения клинических или биоэквивалентных исследований, исключительно на основании представления литературных обзоров (так называемых хорошо изученных лекарств). В правилах ЕАЭС для данной категории лекарственных препаратов предусмотрено выполнение теста кинетики растворения и специальной процедуры рассмотрения, если препарат относится к I или III классам биофармацевтической системы, или исследований биоэквивалентности, если препарат относится ко II или IV классам этой системы. Чтобы все производители данной группы лекарственных препаратов, зарегистрированных в государствах-членах ЕАЭС по национальным процедурам, успели в срок до 31 декабря 2025 года привести досье на эти препараты в соответствие с правилами ЕАЭС, ЕЭК планирует создать экспертный комитет, который будет заниматься вопросами регистрации лекарственных средств в ЕАЭС, в том числе вопросами урегулирования разногласий в сфере обращения лекарственных средств, подготовкой рекомендаций в срок до 60 дней, а также выработкой предложений по вопросам гармонизации и унификации законодательства государств-членов ЕАЭС. Еще одной компетенцией создаваемой структуры станет рассмотрение в срок, не превышающий 60 календарных дней, вопросов, связанных с разработкой, доклиническими и клиническими исследованиями, обеспечением качества лекарственных средств, деятельностью фармацевтических инспекторатов и неурегулированных нормативно-правовыми актами ЕЭК, ЕАЭС или экспертного комитета. В этот комитет должны будут войти по три представителя от каждого государства-члена ЕАЭС, а его председателем станет министр ЕЭК.

Спеша развеять упорно циркулирующие на рынке слухи о том, кому же будут принадлежать полномочия по регистрации и контролю за обращением лекарственных средств (наднациональному органу или же национальным структурам государств-членов ЕАЭС), коллега **Дмитрия Рождественского**, советник отдела координации работ в сфере обращения лекарственных средств и медицинских изделий департамента технического регулирования и аккредитации Евразийской экономической комиссии **Анна Кравчук** заявила: «В рамках ЕАЭС не будет создан единый орган по регистрации лекарств, как, например, Европейское медицинское агентство в Европейском союзе (EMA) или Управление по пищевым продуктам и лекарственным средствам в США (FDA). Полномочия по регистрации и контролю за обращением лекарств остаются на уровне государств-членов Союза».

Одной из актуальных тем конгресса стал вопрос совершенствования системы лекарственного обеспечения и взаимозаменяемости лекарственных средств в текущем и будущем годах. Об этом подробно рассказал руководитель практики юридической фирмы «Пепеляев Групп», эксперт-практик коммерческого права и правового регулирования деятельности компаний медицинской и фармацевтической промышленности **Сергей Клименко**. «В текущих условиях дефицита бюджетных средств при растущей потребности в лекарственных препаратах именно обеспечение рационального использования имеющихся ресурсов является одним из основных направлений развития системы лекарственного обеспечения», – считает спикер. Более того, по его мнению, такой подход позволит максимально эффективно решить задачи, поставленные еще в Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года (утверждена приказом Минздрава России от 13.02.2013 № 66): обеспечение рационального использования лекарственных препаратов, их безопасности, эффективности и качества, а также совершенствование порядков формирования перечней лекарственных препаратов и государственного регулирования цен на них. Среди мер по рациональному использованию имеющихся ресурсов юрист отметил введение системы референтных цен, пилотных проектов лекарственного обеспечения, взаимозаменяемость, совершенствование системы регулирования цен, импортозамещение и централизацию закупок.

«В январе 2017 года Минздрав России разместил на regulations.gov.ru правила функционирования информационно-аналитической системы мониторинга и контроля в сфере закупок лекарственных препаратов и методику расчета референтных цен на лекарственные препараты, согласно которым общий механизм расчета НМЦК выглядит следующим образом:

1) если предшествующая цена ниже референтной, то – предшествующая цена;
2) в случае несостоявшихся аукционов по вышеописанной методике расчета – референтная цена;
3) если предшествующая цена выше референтной, то – референтная цена;
4) в случае несостоявшихся аукционов – минимальная зарегистрированная предельная отпускная цена».

Эти проекты нормативно-правовых актов получили негативную оценку со стороны ФАС России и отраслевых ассоциаций. Так, ФАС считает необходимым внедрение механизма определения взаимозаменяемости, а ассоциации указывают на риски для обычных моделей поставок (цена упадет до минимальной). Однако все же стоит отметить, что Минздрав России отразил в указанных проектах необходимость особого подхода к расчету референтной цены для случаев:

- поставок гарантированных объемов по согласованным ценам, где предусмотрены модели price/volume и risk-sharing (по моделям «платеж за результат» или «софинансирование»), а также переговоры производителя (поставщика) с уполномоченными органами государственной власти (рисунки 1–3);
- отсутствия конкурирующих предложений.

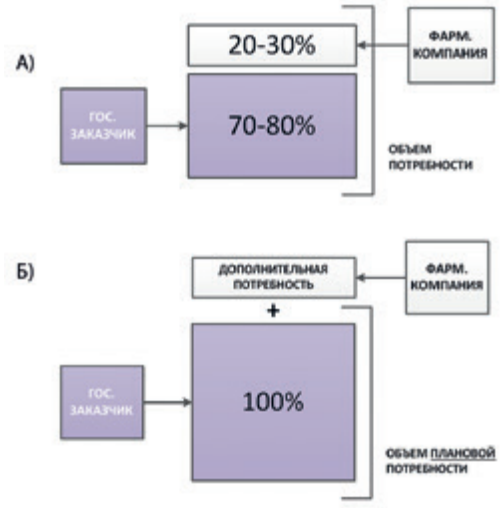


Рисунок 1. Инновационные модели лекарственного обеспечения: софинансирование

А – компания предлагает недостающий объем сверх лимита бюджетных расходов для удовлетворения плановой потребности; Б – компания предлагает объем сверх плановой потребности, если потребность в препарате для успешной терапии выросла

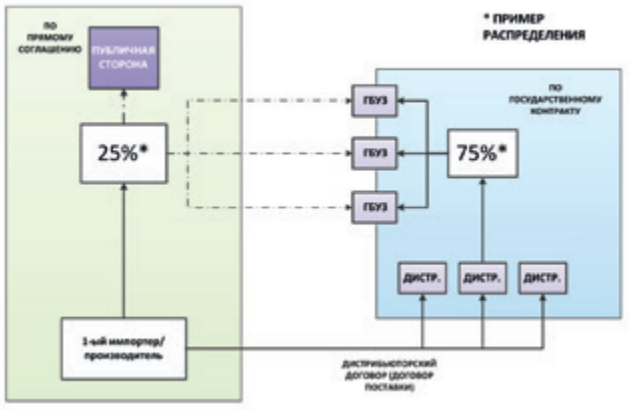


Рисунок 2. Инновационные модели лекарственного обеспечения: софинансирование

Что касается взаимозаменяемости, то, как обратил внимание участников конгресса **Сергей Клименко**, утвержденные постановлением Правительства РФ от 28.10.2015 № 1154 правила определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения не распространяются на референтные лекарственные препараты, лекарственные растительные препараты, гомеопатические лекарственные препараты и лекарственные препараты, которые разрешены для медицинского применения в Российской Федерации более 20 лет и в отношении которых невозможно проведение исследования их биоэквивалентности. Но, как мы знаем, Минздрав России дал задание подведомственным учреждениям по определению взаимозаменяемости препаратов, согласно которому до конца текущего года учреждения определяют взаимозаменяемость препаратов при проведении экспертизы качества этих лекарственных средств и (или) экспертизы отношения ожидаемой пользы к возможному риску их применения. Включение же сведений о взаимозаменяемости в ГРЛС с 1 января 2018 года позволит улучшить конкурентную среду и оперативно принимать решение о замене одного препарата другим.

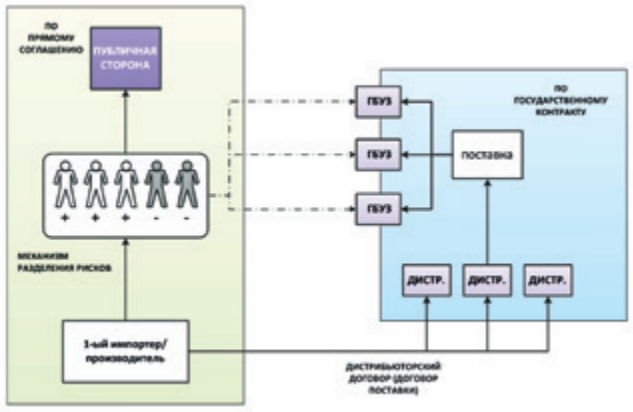


Рисунок 3. Инновационные модели лекарственного обеспечения: платеж за результат

Рассмотрение сугубо национальных особенностей нормативно-правовой базы в области взаимозаменяемости объясняется тем, что решением Совета ЕЭК № 92 от 03.11.2016 г. взаимозаменяемость определяется по национальным правилам, а национальные органы ведут свой реестр взаимозаменяемых препаратов. «Национальные решения о взаимозаменяемости не влияют на обращение на территории ЕАЭС, регистрация по новым правилам осуществляется без учета национального решения о взаимозаменяемости», – пояснил **Сергей Клименко**.

Говоря о государственных и корпоративных закупках лекарственных средств, заместитель руководителя экспертно-консультационного центра Института госзакупок **Александр Евсташенков** также затронул тему взаимозаменяемости. Согласно статье 3 Федерального закона «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» от 22.12.2014 № 429-ФЗ, информация о взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения подлежит включению в государственный реестр лекарственных средств с 1 января 2018 года. С этой же даты допускается использование результатов определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения. А письмом ФАС России от 19.05.2014 № ИА/19950/14 определяются

критерии взаимозаменяемости лекарственных препаратов для парентерального питания следующих групп АТХ: B05BA01, B05BA02, B05BA10, B05BB01, B05XB02, A11BA, B05XC, в том числе объем наполнения флаконов по отдельным позициям. «Указано, что взаимозаменяемые лекарственные препараты сравнимы по их назначению, применению, составу и другим параметрам таким образом, что приобретатель действительно готов заменить один лекарственный препарат другим», – отметил спикер. Также он обратил внимание гостей конгресса, что этим же письмом заказчику при составлении ТЗ не рекомендуется использовать иные параметры, не указанные в письме ФАС России.

Что касается вопроса государственных закупок, здесь **Александр Евсташенков** рекомендует участникам взаимоотношений руководствоваться в своей деятельности рядом правил. Так, правилом номер один при составлении лотов является следующее: «В случае, если объектом закупки являются лекарственные средства, предметом одного контракта (одного лота) не могут быть лекарственные средства с различными международными непатентованными наименованиями или при отсутствии таких наименований с химическими, группировочными наименованиями при условии, что начальная (максимальная) цена контракта (цена лота) превышает предельное значение, установленное Правительством Российской Федерации» (постановление Правительства РФ от 17.10.2013 № 929). Правило номер два гласит, что, если предметом торгов, запроса котировок является поставка лекарственных средств, не могут быть предметом одного контракта (одного лота) лекарственные средства с МНН (при отсутствии таких наименований с химическими, группировочными наименованиями) и торговыми наименованиями. А правило номер три запрещает ограничение конкуренции путем включения в состав лотов продукции (товаров, работ, услуг), технологически и функционально не связанной с товарами, работами, услугами, поставки, выполнение, оказание которых являются предметом торгов запроса котировок, запроса предложений.

Генеральный директор R&DGroup **Н.И. Маткаш** познакомил участников конгресса с обзором произошедших изменений в государственной регистрации лекарственных средств и фармацевтических субстанций в России за последние полгода: государственная регистрация лекарственных препаратов для медицинского применения; ускоренная экспертиза орфанных препаратов первых трех лекарственных препаратов, регистрируемых в России в качестве воспроизведенных; внесение изменений в регистрационные досье в соответствии с действующим законодательством, ожидаемые изменения в этом направлении в следующем году; регистрация биомедицинских клеточных продуктов (БМКП). [Более подробную информацию о произошедших изменениях, генезис и трансформацию нормативно-правовых актов в этой сфере вы можете получить, посетив информационный портал «Новости GLP» (pharmjournal.ru).] Не обошел вниманием спикер и самый обсуждаемый в этом году среди фармсообщества вопрос о маркировке лекарственных препаратов для автоматизированного контроля за их оборотом. По его мнению, данный пилотный проект преследует две цели: противодействие незаконному производству лекарственных препаратов на территории России и их ввозу, а также стандартизацию процедур учета поставок и распределения лекарственных препаратов. Поскольку процесс маркировки сопряжен с сериализацией и агрегацией, спикер привел определение данных процессов: «Процесс сериализации подразумевает присвоение уникального идентификационного кода потребительской упаковке (присвоение GTIN, Data Matrix Code), а агрегация исходит из того, что короб, паллета имеют серийный номер (упаковки агрегированы в короба, короба агрегированы в паллеты), который и попадает в систему при считывании короба или паллеты». Как мы знаем, уже с января будущего года к проекту планируется активно подключать всех участников фармацевтического рынка (к 1 января 2019 года маркировкой должны быть охвачены 100% выпущенных в оборот лекарственных препаратов, а значит, все фармпроизводители), а в систему мониторинга планируется включение лекарственных препаратов для медицинского применения из перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов.

Руководитель департамента образовательных программ в области GCP/GLP ФБУ «ГИЛС и НП» Минпромторга России, к.м.н., внештатный эксперт Росздравнадзора, внештатный отраслевой GLP-инспектор Росаккредитации **Евгений Рогов** представил обзор нормативно-правовых актов, требования которых затронули вопросы организации и проведения доклинических и клинических исследований. Как мы знаем, Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», статья 11, определяет:

1. «Доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения проводится путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства.
2. Доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения проводится в соответствии **с правилами надлежащей лабораторной практики**, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти.
3. Для организации и проведения доклинического исследования лекарственного средства для медицинского применения разработчики лекарственных средств могут привлекать научно-исследовательские организации, образовательные организации высшего образования, имеющие необходимую материально-техническую базу и квалифицированных специалистов в соответствующей области исследования.

4. Доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения проводится по утвержденному разработчиком лекарственного средства плану с ведением протокола этого исследования и составлением отчета, в котором содержатся результаты этого исследования и заключение о возможности проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения».

Сами же правила надлежащей лабораторной практики определяют даты начала и окончания доклинических исследований и содержат детально прописанные требования к лаборатории, в том числе:

- к сиситеме обеспечения качества,
- к помещениям,
- к персоналу,
- к документированию,
- к оборудованию,
- к содержанию тест-систем.

Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств» (приложение № 13 «Лекарственные препараты для клинических исследований») содержит требования к производителю: лицензия на производство (кроме подготовки: должна быть описана в протоколе клинического исследования), система качества, обучение персонала; требования к документации: заказ, досье на серию, регламенты и технические инструкции; требования к производству, в том числе требования к маркировке; контроль качества, выдача разрешения на выпуск серии, транспортировка, претензии, отзывы и возвраты, уничтожение. Что касается маркировки, то среди требований, которые к ней предъявляются в том же приказе, спикер отметил:

- адрес и номер телефона спонсора (CRO) или исследователя;
- лекарственная форма, способ введения, количество дозированных единиц;
- номер серии и (или) код для идентификации содержимого и операции по упаковке;
- номер (код) исследования;
- идентификационный код пациента и номер визита (при наличии);
- фамилия и инициалы исследователя;
- указания по использованию (может быть приведена ссылка на листок-вкладыш либо другой пояснительный документ);
- надпись «Для клинических исследований»;
- условия хранения;
- срок использования с указанием месяца и года;
- надпись «Хранить в недоступном для детей месте».

В отношении клинических исследований отмечено, что аккредитацией клинических баз занимается Минздрав России в целях установления безопасности лекарственных препаратов для здоровых добровольцев и переносимости их здоровыми добровольцами; подбора оптимальных дозировок лекарственного препарата и курса лечения для пациентов с определенным заболеванием, оптимальных доз и схем вакцинации иммунобиологическими лекарственными препаратами здоровых добровольцев; установления безопасности лекарственного препарата и его эффективности для пациентов с определенным заболеванием, профилактической эффективности иммунобиологических лекарственных препаратов для здоровых добровольцев; изучения возможности расширения показаний для медицинского применения и выявления ранее неизвестных побочных действий зарегистрированных лекарственных препаратов.

В контексте надлежащей лабораторной практики **Евгений Сергеевич** представил информацию об аудите и инспекции: «Аудит (audit) – комплексная и независимая проверка относящихся к исследованию деятельности и документации, проводимая для подтверждения соответствия этой деятельности, а также процедур сбора, анализа и представления данных

- протоколу;
- стандартным операционным процедурам спонсора;
- надлежащей клинической практике (GCP);
- нормативным требованиям.

Он (аудит) помогает принимать решения относительно эффективности и безопасности лекарственного препарата, обеспечивает целостность клинического исследования за счет проверки качества данных, защиты здоровья и благополучия пациентов, проверки соответствия законодательству.

Согласно определению ICH, инспекция (inspection) – действие уполномоченных органов, заключающееся в официальной проверке документации, оборудования, иных материалов, имеющих, по мнению уполномоченных органов, отношение к клиническому исследованию и находящихся в исследовательском центре, в помещениях спонсора и/или контрактной исследовательской организации, а также иных организациях, имеющих, по мнению уполномоченных органов, отношение к исследованию».

Напомним, что в прошлом году Минздрав России выпустил приказ от 01.04.2016 № 200-н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики», согласно которому клинические исследования проводятся в соответствии с протоколом клинического исследования, который содержит в том числе описание действий по контролю качества; отчет о результатах клинического исследования, составленный в письменной форме организацией, осуществляющей организацию проведения клинического исследова-



Рисунок 4. Система государственного контроля за проведением клинического исследования

ния лекарственного препарата на основании заключений медицинских организаций (виза ЛПУ не требуется), проводящих это исследование, и включающий в себя план проведения клинического исследования, в том числе способы обеспечения качества и достоверность полученных результатов, включая данные аудита, результаты инспекций, если проводились. Помимо этого, в виде приложений к отчету предоставляются перечень этических комитетов и кодов пациентов, получавших препарат разных серий, данные аудита (если проводились), документация по лабораторной стандартизации методов и обеспечения качества процедур, если применялись. Согласно этому же приказу независимый этический комитет проводит оценку размера и порядка осуществления выплат участникам клинических исследований с целью выявления необоснованной заинтересованности участников клинических исследований или принуждения их к участию в нем. А организатор клинического исследования устанавливает и распределяет права, обязанности и ответственность всех лиц, участвующих в клиническом исследовании, утверждает СОП, осуществляет внедрение и поддержку систем обеспечения и контроля качества в соответствии с СОП, принимает решение об образовании независимого комитета по мониторингу данных; сообщает всем участвующим в клинических исследованиях исследователям, медицинским организациям и Росздравнадзору обо всех серьезных и непредвиденных нежелательных реакциях, а также предоставляет в Росздравнадзор периодические отчеты по безопасности; осуществляет независимую от мониторинга оценку соответствия проводимого клинического исследования протоколу, СОП организатора, правилам и требованиям законодательства Российской Федерации. По сути, организатор клинического исследования проводит его аудит.

Еще одной немаловажной процедурой в области мониторинга безопасности лекарственных средств, о которой также рассказал **Евгений Рогов**, является фармаконадзор. Среди основных изменений, произошедших в области фармаконадзора, спикер отметил гармонизацию российской системы фармаконадзора с правилами надлежащей практики фармаконадзора (GVP) и надлежащей клинической практики (GCP) ЕАЭС, а также форм документов (извещение о нежелательной реакции на зарегистрированный лекарственный препарат, извещение о нежелательной реакции на препарат в клиническом исследовании, ПОБ, РОБ, ПУР) с руководствами ICH и GVP ЕАЭС. Помимо этого, произошли следующие изменения:

- Требования к предоставлению периодических отчетов по безопасности зарегистрированных лекарственных препаратов (ПОБ, PSUR) и отчетов по безопасности лекарственных препаратов, изучаемых в клинических исследованиях (РОБ, DSUR).



Рисунок 5. Порядок действий Росздравнадзора при выявлении нарушений правил клинической практики при контроле за проведением протоколов конкретных исследований

- Формат и требования к предоставлению сообщений о нежелательных реакциях для держателей регистрационных удостоверений, организаций, проводящих КИ, медицинских организаций.
- Возможность делегирования функций ведения системы фармаконадзора.
- Требования к предоставлению в Росздравнадзор планов управления рисками (ПУР) при выявлении новых проблем безопасности лекарственных препаратов.

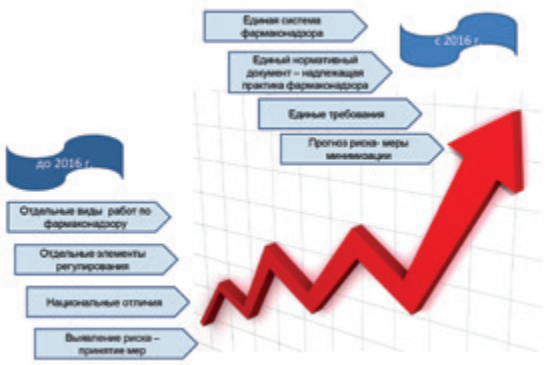


Рисунок 6. **Эволюция GVP ЕАЭС**

Фармаконадзор *– наука и практическая деятельность, связанная с обнаружением, оценкой, изучением и предотвращением побочных реакций и других проблем, связанных с лекарственными средствами.*

В соответствии с правилами надлежащей практики фармаконадзора в ЕАЭС устанавливаются дополнительные регуляторные требования:

1. Обязанность предоставлять мастер-файл по запросу региональных органов.
2. Информирование держателями регистрационных удостоверений регуляторных органов о значимых изменениях системы фармаконадзора.
3. Плановые и внеплановые инспекции системы фармаконадзора.
4. Возможность назначения пострегистрационных исследований безопасности лекарственных препаратов.
5. Требования к информированию врачей и потребителей о новых данных по безопасности лекарственных препаратов.
6. Схема (черный символ и пояснительная записка).

Завершился конгресс докладом д.т.н., члена РДА, ICCCS, президента АСИНКОМ **А.Е. Федотова** по проблемам совершенствования инспектирования и взаимного признания инспекций различных стран, в котором спикер представил свою точку зрения на различия, проблемы и решения в области гармонизации требований GMP-стандартов.

Мероприятие проходило при поддержке Комитета по предпринимательству в здравоохранении и медицинской промышленности ТПП РФ, Ассоциации фармацевтических компаний «Фармацевтические инновации» («Инфарма») и научно-производственного журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств». Следующий конгресс в серии мероприятий по данной тематике состоится уже **14–15 декабря 2017 г.**

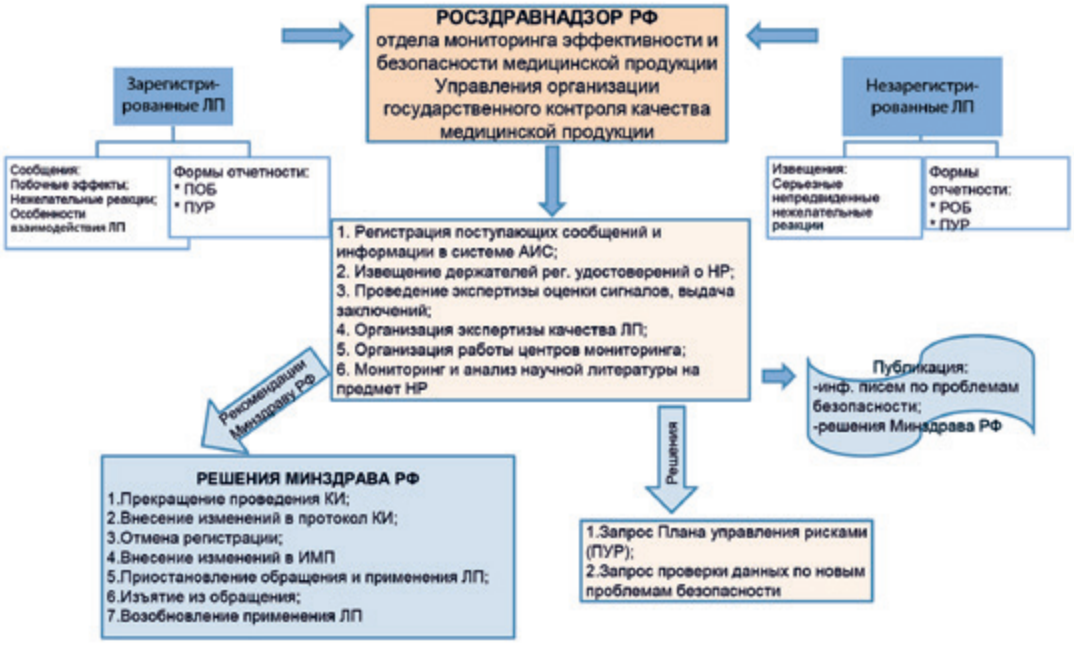


Рисунок 7. **Система фармаконадзора в Российской Федерации**



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 615.454.1

ГЕЛИ ДЛЯ ПРИЕМА ВНУТРЬ. ЧАСТЬ 1. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ДОБАВКИ К ПИЩЕ (ОБЗОР)

Е.Ю. Загорулько[1]*, А.А. Теслев[1]

Резюме. В статье представлена характеристика гелей для приема внутрь как лекарственной формы. Приведен обзор лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище в форме гелей для приема внутрь, представленных на российском рынке.

Ключевые слова: гель для приема внутрь, лекарственный препарат, биологически активная добавка к пище, состав.

GELS FOR ORAL ADMINISTRATION. PART 1. MEDICAL PRODUCTS AND DIETARY SUPPLEMENTS (REVIEW)

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

Abstract. The characteristics of gels for oral administration as a dosage form have been considered in the article. A review of medical products and dietary supplements in the form of gels for oral administration available on the Russian market has been presented.

Keywords: gel for oral administration, medical product, dietary supplement, composition.

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

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

* адресат для переписки:
E-mail: elena.zagorulko@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

В общем случае гели характеризуют как структурированные системы с жидкой дисперсионной средой, в которых частицы дисперсной фазы образуют пространственную сетку. Они представляют собой твердообразные тела, способные сохранять форму, обладающие упругостью (эластичностью) и пластичностью [1–3].

В перечне наименований лекарственных форм лекарственных препаратов для медицинского применения, утвержденном приказом Минздрава России от 27.07.2016 № 538н, гель определяется как мягкая лекарственная форма в виде коллоидной дисперсии, полученная путем гелеобразования с использованием специальных веществ [4].

В настоящее время в России зарегистрировано большое количество лекарственных препаратов (ЛП) в форме гелей для наружного применения и нанесения на слизистые оболочки, подобные формы существуют и для парентеральных ЛП. [5]. На рынке также представлен широкий ассортимент косметических средств в форме гелей.

Физико-химические свойства гелей позволяют рассматривать их как перспективную форму для перорального применения. Гели для приема внутрь сочетают преимущества твердых и жидких пероральных лекарственных форм (ЛФ). Одним из их достоинств является большая биологическая доступность по сравнению с твёрдыми ЛФ [6].

Удобство приема и возможность коррекции вкуса позволяют использовать ЛП в форме гелей для приема внутрь в детской и гериатрической практике, а также для пациентов, страдающих хроническими заболеваниями, в том числе связанными с нарушениями глотания [7].

Известны ЛП, биологически активные добавки (БАД) к пище, специализированные пищевые продукты и продукты функционального питания в форме гелей для приема внутрь [5, 8, 9].

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ В ФОРМЕ ГЕЛЕЙ ДЛЯ ПРИЕМА ВНУТРЬ

В последние годы интерес к данной ЛФ возрастает, проводятся разработки составов и технологий гелей для приема внутрь, содержащих лекарственные средства из разных фармакологических групп. Известны исследования ЛП в форме гелей для приема внутрь, содержащих нестероидные противовоспалительные средства (пара-

цетамол, ибупрофен, нимесулид), гипогликемические (метформин), противорвотные средства (домперидон), тиазидные диуретики (трихлорметиазид), антигистаминные препараты (терфенадин), витамины и витаминоподобные средства (бенфотиамин; комплекс, содержащий витамины A, C, D, E и группы B), противоподагрические средства (аллопуринол), противопаркинсонические средства (леводопа) и др. [6, 7, 10–15]. Гелевая форма позволяет разрабатывать составы с модифицированным высвобождением ЛП [6, 10, 11].

Согласно перечню среди гелей выделяют две формы для перорального приема: гель для приема внутрь (как правило, гидрофильный) и гель для приготовления суспензии для приема внутрь (путем диспергирования в соответствующем растворителе) [4].

В Государственной фармакопее XIII издания в настоящее время отсутствует статья, посвященная гелям для приёма внутрь. Нормативные требования для мягких ЛФ, предназначенных для нанесения на кожу, раны и слизистые оболочки, представлены в ОФС «Мази» [16]. К показателям качества, являющимся обязательными независимо от ЛФ, относятся «Описание», «Подлинность», «Количественное определение», «Микробиологическая чистота» [17].

В Европейской и Британской фармакопеях требования к «полутвердым» лекарственным формам для наружного применения описаны в статье «Semi-solid preparations for cutaneous application» [18, 19].

В томе Британской Фармакопеи, посвященном ветеринарным ЛП, существует статья «Semi-solid Preparations for Oral Use, Veterinary» [20].

В 2017 году статья «Semi-solid preparations for oral use, veterinary» появилась также и в 9 издании Европейской Фармакопеи [21].

В Фармакопее США в статье 1151 «Pharmaceutical dosage forms» формы Gels (гели) и Jellies (желе) упоминаются как синонимичные [22].

В Японской Фармакопее 16 издания приведена характеристика пероральной формы «Jellies for Oral Administration» – «желе для приема внутрь», которая описана как нетекучий гелеобразный препарат с формой, определяемой упаковкой, и предназначенный для приема внутрь. Для данной ЛФ определяют однородность, а также проводят контроль по тестам растворения или распадаемости [23]. До 16 издания (2011 год) описание данной ЛФ в Японской Фармакопее не встречалось [24].

Таким образом, требования к гелям для приема внутрь должны включать общие показатели качества для пероральных ЛФ и специфические, обусловленные гелевой структурой: описание (органолептические показатели); подлинность; pH; объем содержимого упаковки; однородность; однородность дозирования (в случае использования одно- или многодозовых упаковок); количественное определение; микробиологическая чистота.

Известны исследования, в которых контролируют также реологические характеристики пероральных гелей, их стабильность, проводят оценку качества по тесту растворения [7, 10].

На российском рынке представлены ЛП и БАД к пище в форме гелей для приема внутрь. В настоящее время в Государственном реестре лекарственных средств представлены 4 ЛП с действующим сроком регистрации: три – в форме геля для приема внутрь и один – в форме геля для приготовления суспензии для приема внутрь [5]. Их характеристика представлена в таблице 1.

Анализ данных, представленных в таблице 1, свидетельствует о том, что ЛП в форме геля для приема внутрь, зарегистрированные на российском рынке, используются при нарушениях функций желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Помимо основного фармакологического эффекта, такие ЛП оказывают благоприятное действие на слизистую ЖКТ за счет гелевой структуры, что особенного актуально для антацидов и энтеросорбентов.

БАД К ПИЩЕ В ФОРМЕ ГЕЛЕЙ ДЛЯ ПРИЕМА ВНУТРЬ

Среди БАД к пище в форме геля для приема внутрь, представленных на российском рынке, можно выделить нутрицевтики и парафармацевтики. Известны также исследования по разработке пробиотиков в виде гелей [25, 26]

Состав некоторых БАД к пище в форме геля для приема внутрь представлен в таблице 2.

На основании анализа сведений, содержащихся в реестре продукции, прошедшей государственную регистрацию, установлено, что большинство представленных на российском рынке БАД к пище в форме геля для приема внутрь содержат действующие вещества растительного происхождения. При этом часто в их составы включены витамины, макро- и микроэлементы. Активные компоненты БАД к пище в форме геля для приема внутрь представлены на рисунке 1.

Фитокомпоненты в составе БАД к пище представлены различными экстрактами, высушенным растительным сырьем, а также продуктами, полученными из свежего растительного сырья – соками и пюре. Такие БАД к пище имеют, как правило, многокомпонентный состав. При этом используются как официнальные виды растительного сырья (трава тысячелистника обыкновенного, корни девясила высокого, цветки ромашки аптечной, листья мяты перечной, корни солодки голой и др.), так и неофициальные (листья персика, кора осины, корни куркумы и др.) [29]. БАД к пище, содержащие экстракты из лекарственного растительного сырья, можно отнести к парафармацевтикам.

Таблица 1.

Характеристика зарегистрированных в России лекарственных препаратов в форме гелей для приема внутрь [5]

№	Торговое наименование ЛП	Фармако-терапевтическая группа	Классификация по АТХ	Состав				Упаковка	Производитель, страна
				Действующие вещества	Вспомогательные вещества				
					основной гелеобразователь	корригенты вкуса	прочие		
Гели для приема внутрь									
1.	«Пепсан-Р»	ветрогонное средство	препараты для лечения нарушений функций кишечника, другие	диметикон, гвайазулен	каррагинаны	сорбитол 70% кристаллизуемый, натрия цикламат, масло мяты перечной	метилпарагидроксибензоат, вода очищенная	по 10 г в саше	«Лаборатории Роза-Фитофарма», Франция
2.	«Трансулоза»	слабительное средство	лактулоза, в комбинации с другими препаратами	лактулоза, парафин жидкий, парафин мягкий белый	(лактулоза)	аспартам, масло биксина, мандариновое масло, масло лимона, масло апельсина	холестерол, кислота молочная	по 150 г в банках полипропиленовых (в комплекте с мерной ложкой); 5 г – саше	«Майоли Спиндлер Лабораториз», Франция
3.	«Фосфалюгель»	антацидное средство	алюминия фосфат	алюминия фосфат	агар-агар, пектин	сорбитол 70%, ароматизатор апельсиновый	кальция сульфат, калия сорбат, вода очищенная	по 16 г в саше или стики; по 20 г в саше	«Астеллас Фарма Юроп Б.В.», Нидерданды
Гель для приготовления суспензии для приема внутрь									
4.	«Энтеросгель»	энтеросорбирующее средство	адсорбирующие кишечные препараты	полиметилсилоксана полигидрат	(полиметилсилоксана полигидрат)	–	вода очищенная 30 г	по 225 г в пакетах полиэтиленовых двойных	ООО «ТНК СИЛМА», Россия

Таблица 2.

Характеристика некоторых биологически активных добавок к пище в форме гелей для приема внутрь [8, 27–31]

№	Торговое наименование	Состав				Упаковка	Производитель
		Действующие вещества	Гелеобразователи	Корригенты вкуса	Прочие вспомогательные вещества		
1.	«Черникоежка»	лецитин соевый, экстракт плодов черники сухой, витамины B_1, B_2, E, A, D_3, B_3, B_5, B_6, B_{12}, калия йодид	натрийкарбоксиметилцеллюлоза, гриндстед FF M612 (гуаровая камедь, ксантановая камедь)	сукралоза, ароматизатор, идентичный натуральному, «Черника» (пропиленгликоль, глицерилтриацетат), сорбит	лимонная кислота, сорбат калия, вода питьевая	тубы по 10, 50, 100, 175 г, саше по 5 г	изготовлено ООО «Сибфармконтракт», для ООО «Биофармрус», Россия
2.	«МАГНИЙ B_6 ГЕЛЬ»	лактат магния 2-х водный с содерж. магния 9%, дицитрат магния трехзамещенный безводный с содержанием магния 15%, витамин B_6 (гидрохлорид)	карбоксиметилцеллюлоза	фруктоза, апельсиновый сок (порошок)	лимонная кислота, калия сорбат, бензоат натрия, вода питьевая	тубы по 75 и 150 г	изготовлено ООО «КоролёвФарм» для ООО «Фармацевтические технологии», Россия
3.	«Лецитин-гель с витаминами»	фосфолипиды (лецитин), витамины B_3, E, B_5, B_6, B_2, B_1, A, B_9, D, B_{12}	натрийкарбоксиметилцеллюлоза	сахар, ароматизатор идентичный натуральному, «Абрикос»	вода, лимонная кислота, сорбат калия	тубы и банки стеклянные с мерной ложкой по 50, 100, 165, 200 г	ООО «Артлайф», Россия
4.	«Кардиогель»	купажный экстракт (крапивы, боярышника, пустырника, валерианы, мяты, мелиссы, душицы, ивы), клетчатка яблочная, аскорбат натрия, магния сульфат, калия хлорид, биофлавоноиды цитрусовых, рутин, кверцетин, токоферола ацетат, ретинола ацетат	гуммиарабик, пектин яблочный	концентрированный яблочный сок, фруктоза, ароматизатор, идентичный натуральному	вода очищенная, лимонная кислота, бензоат натрия, сорбат калия	тубы по 50, 100 г	ООО «Артлайф», Россия
5.	«Эдванс-Ювента» (Advance-Juventa)	фукуидан, яблочная кислота, яблочный уксус, натрия хлорофиллин	гуаровая камедь, ксантановая камедь	натуральный ароматизатор («Клубника» или «Вишня»), фруктоза	бензоат натрия, лимонная кислота	саше по 10 г	C.P.M.Contract Pharma, Германия
6.	«Эджел АОХ» (A-gel AOX)	пюре плодов тёмного винограда культурного, пюре плодов клюквы четырёхлепестной, пюре плодов черники обыкновенной, пюре плодов черноплодной рябины, пюре плодов голубики, сок плодов граната, пюре плодов барбадосской вишни, чайный экстракт ройбуш, пюре плодов мангостана (*Garcinia mangostana*), пюре плодов чернослива, пюре плодов облепихи крушиновидной	ксантановая камедь, гуаровая камедь	фруктоза, натуральный ароматизатор	очищенная вода, бензоат натрия	саше по 21 г	изготовлено Innovative FlexPak, США, для Agel Enterprises, LLC, США
7.	«СУПРАДИН® Киндер гель»	витамины A, D_3, E, B_1, B_2, ниацин, пантотеновая кислота, B_6, C, соевый лецитин, D, L-альфа-токоферол	натрийкарбоксиметилцеллюлоза	сахароза, ароматизатор натуральный «Апельсин», ванилин	сорбат калия, кальция лактата пентагидрат, вода, моногидрат лимонной кислоты, этанол	тубы по 175 г	изготовлено Lichtenheldt GmbH Pharmazeutische Fabrik Германия, для Bayer Consumer Care AG, Швейцария



Рисунок 1. Активные компоненты БАД к пище в форме гелей для приема внутрь [8]

В состав некоторых пероральных гелей входят компоненты, полученные из пищевого растительного сырья (плоды вишни, винограда, граната, голубики и др.) [31], предназначенные также и для коррекции вкуса. БАД к пище на их основе относят к нутрицевтикам. Подобные композиции могут входить также и в составы продуктов функционального питания.

Характеристика фитокомпонентов в составах БАД к пище в форме гелей для приема внутрь представлена на рисунке 2.



Экстракты в составах БАД к пище

Сухие	Масляные	Полиэкстракты	Вид экстракта производителем не указан
экстракт плодов черники («Черникоежка», «Биофармрус», Россия)	масло семян винограда («Эджел GLO», Agel Enterprises, LLC, США)	купажный экстракт валерианы, пустырника, душицы, мелиссы, хмеля, мяты, солодки («Седагель», «Артлайф», Россия)	экстракт коры ивы, экстракт травы тысячелистника («Алконейтрал», «Артлайф», Россия)
экстракт листьев березы, экстракт травы ортосифона («Эйм Би 1 Хэлс энд Боди контроль», «Артлайф», Россия)	масло зеленого чая («Эджел GLO», Agel Enterprises, LLC, США)	купажный экстракт горца, толокнянки, календулы, брусники, солодки, березы, можжевельника, хвоща («Урогель», «Артлайф», Россия)	экстракт плодов гуараны («Априкот монинг», «Глорион», Россия)

Рисунок 2. Фитокомпоненты в составах БАД к пище в форме гелей для приема внутрь [8, 27, 29–32]

Состав многих БАД к пище, содержащих растительные экстракты, дополнен индивидуальными соединениями, витаминами, макро- и микроэлементами. Такие БАД к пище рекомендованы к применению в качестве дополнительного источника соответствующих групп БАВ (рисунок 3) [8].

Наиболее часто в состав БАД к пище в форме гелей для приема внутрь входят такие макро- и микроэлементы, как йод («Черникоежка», «Биофармрус», Россия), калий («Гель калий-альгалана», «Альгатех», Россия), магний («Магний B_6 Гель», «Фармацевтические технологии», Россия) и цинк («Гастригель», «Артлайф», Россия) [8, 29, 30].



Рисунок 3. Число групп БАВ, упомянутых в области применения БАД к пище в качестве дополнительных источников (согласно данным реестра) [8]

В некоторых случаях в состав БАД к пище в форме гелей для приема внутрь входят индивидуальные соединения: L-тирозин, L-метионин («Априкот монинг», «Глорион», Россия), глицин, гамма-аминомасляная кислота («Седагель», «Артлайф», Россия), хондроитина сульфат («Джойнтгель», «Артлайф», Россия), лецитин («Черникоежка», «Биофармрус», Россия; «Эджел GLO», Agel Enterprises, LLC, США) и др. [8, 29–32].

Можно выделить группу БАД к пище, содержащую в составе витамины, витаминоподобные вещества и микроэлементы, в том числе включающие поливитаминные комплексы для детей («СУПРАДИН® Киндер гель», Bayer Consumer Care AG, Швейцария; «Черникоежка», «Биофармрус», Россия и др.) [8, 27, 30]. Состав витаминных комплексов некоторых БАД к пище в форме гелей для приема внутрь представлен на рисунке 4.

В качестве гелеобразователей в составе гелей для приема внутрь используют пектины, агар-агар, каррагинаны, альгинаты, ксантановую и гуаровую камеди, карбоксиметилцеллюлозу, натрийкарбоксиметилцеллюлозу [8, 27–32]. Характеристики вспомогательных веществ в составе гелей для приема внутрь будут представлены во второй части статьи.

Можно выделить гели, полученные без дополнительного введения гелеобразователя. Это экстракт мицелия вешенки «ОВО-Д®» (гель) («НПК Пульмомед», Россия), «Гель калий-альгалана», «Гель магний-альгалана» («Альгатех», Россия).

Гели серии «Альгалана» получены на основе слоевищ ламинарии беломорской, в качестве гелеобразователя в этом случае выступают альгинаты [8, 27].

Экстракт мицелия вёшенки разработан на основе нового штамма гриба *Pleurotus ostreatus* 1137, спиртоводный экстракт которого подвергают упариванию под вакуумом до состояния геля [8, 33].

Витамины	«СУПРА-ДИН® Киндер гель»	«Киндер Биовиталь» гель для детей с лецитином	«Эджел VIT»	«Черника-коежка»	«Лецитин-гель с витаминами»
A	•	•	•	•	•
C	•	•	•		
D (D_3)	•	•	•	•	•
E	•	•	•	•	•
B_1	•	•	•	•	•
B_2	•	•	•	•	•
B_6	•	•	•	•	•
B_9 (Bc)			•		•
B_{12}		•	•	•	•
Ниацин (никотинамид)	•	•	•	•	•
Пантотеновая кислота	•	•	•	•	•
Биотин			•		

Рисунок 4. Витамины в составе БАД к пище в форме гелей для приема внутрь [8, 27, 30, 31]

УПАКОВКА

В качестве первичной упаковки ЛП и БАД к пище в форме гелей для приема внутрь используют тубы, саше, банки стеклянные и полимерные, флаконы, в том числе флаконы с дозатором. В некоторых случаях многодозовая упаковка дополнена мерной ложкой («Лецитин-гель с витаминами», «Артлайф», Россия) [8, 29].

Распространенность различных упаковок гелей для приема внутрь представлена на рисунке 5 [5, 8].

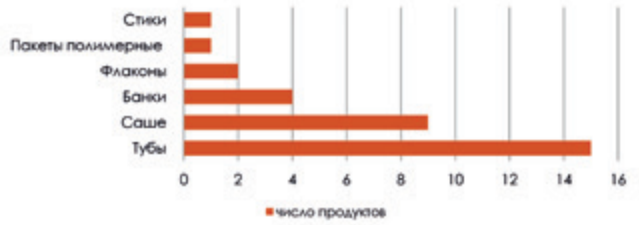


Рисунок 5. Виды упаковки гелей для приема внутрь (ЛП и БАД к пище) [5, 8]

Наиболее распространенной упаковкой БАД к пище в форме гелей для приема внутрь являются тубы полимерные и алюминиевые. Они могут вмещать от 5,0 г геля (однодозовая туба, «Априкот монинг», «Глорион», Россия) до 200 г («Лецитин-гель с витаминами», «Артлайф», Россия) [8, 31, 32].

В качестве упаковки для ЛП в форме гелей для приема внутрь чаще всего используют однодозовые саше (обычно содержат от 5,0 до 30,0 г геля). Саше представляет собой плоский трех- или четырехшовный пакет (в трехшовном саше на одной стороне периметра вместо шва находится место сгиба упаковочного материала) [34, 35]. Саше изготовлены из многослойных полимерных пленок или композитных материалов. Например, первичная упаковка препарата «Пепсан-Р» («Лаборатории Роза-Фитофарма», Франция) в саше по 10,0 г включает следующие слои: отбелённая крафт-бумага, полиэтилен низкой плотности, алюминиевая фольга, полиэтилен низкой плотности [5].

Помимо классического саше, существуют саше в ленте с перфорацией («Фосфалюгель», «Астеллас Фарма Юроп Б.В.», Нидерданды), саше в стрип-ленте с перфорацией, саше с капельной системой дозирования (линейка БАД к пище «Эджел», Agel Enterprises, LLC, США) [5, 31].

Стик представляет собой трехшовный пакет в виде трубочки с одним продольным и двумя поперечными швами [35]. Стик является одним из вариантов упаковки ЛП «Фосфалюгель» («Астеллас Фарма Юроп Б.В.», Нидерданды).

ПРОИЗВОДИТЕЛИ

Основными странами-производителями ЛП в форме гелей для приема внутрь, представленными на российском рынке, являются Франция и Нидерланды. В России производится препарат «Энтеросгель» – гель для приготовления суспензии для приема внутрь [5].

Большинство БАД к пище в форме гелей для приема внутрь, представленных на российском рынке, производится в России. Среди производителей представлены США, Германия, Швейцария [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря своим свойствам гели для приема внутрь подходят для использования в детской и гериатрической практике, у пациентов с нарушениями глотания и др.

В России зарегистрировано три ЛП в форме геля для приема внутрь (с действующим сроком регистрации) и один – в форме геля для приготовления суспензии для приема внутрь. Они относятся к следующим фармако-терапевтическим группам: ветрогонные средства, антациды, слабительные средства, энтеросорбенты. Применение всех перечисленных ЛП при нарушениях функций ЖКТ обусловлено, вероятно, их благоприятным влиянием на слизистую желудка за счет гелевой структуры.

Известны исследования, посвященные разработке составов и технологий гелей для приема внутрь, содержащих лекарственные средства из различных фармакологических групп (нестероидные противовоспалительные препараты, гипогликемические, противорвотные средства, тиазидные диуретики, антигистаминные препараты, витамины и витаминоподобные средства, противоподагрические, противопаркинсонические средства и др.).

Большинство представленных на российском рынке БАД к пище в форме геля для приема внутрь содержат в составе активные компоненты растительного происхождения и рекомендованы к приему как дополнительный источник различных БАВ (флавоноидов, катехинов, дубильных веществ, органических кислот, арбутина, антрахинонов, пищевых волокон, флаволигнанов и др.). Как правило, такие БАД к пище имеют многокомпонентный состав. Среди них можно выделить как нутрицевтики, предназначенные для коррекции питания, так и парафармацевтики, предназначенные для улучшения функционального состояния различных систем организма. Отдельное место занимают поливитаминные комплексы для детей.

Наиболее распространенными упаковками гелей для приема внутрь являются тубы и саше.

На сегодняшний день следует отметить тенденцию к расширению нормативной базы в сфере контроля качества гелей для приема внутрь.

В большинстве случаев в качестве гелеобразователей используют гидроколлоиды (пектины, агар-агар, каррагинаны, альгинаты, ксантановую и гуаровую камеди, карбоксиметилцеллюлозу и натрийкарбоксиметилцеллюлозу).

Вторая часть статьи посвящена характеристике гелеобразователей и других вспомогательных веществ в составе гелей для приема внутрь, представленных на российском рынке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Химическая энциклопедия: гели. URL: http://www.chemport.ru/data/chemipedia/article_798.html#__utmzi__1__=1 (дата обращения 10.02.2017).
2. Г. Шрамм. Основы практической реологии и реометрии. – М.: Колос-С, 2003. 312 с.
3. Е. Бибик. Реология дисперсных систем. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1981. 172 с.
4. Приказ Минздрава России от 27.07.2016 № 538н «Об утверждении Перечня наименований лекарственных форм лекарственных препаратов для медицинского применения» (зарегистрировано в Минюсте России 17.08.2016 N 43291).
5. Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ (дата обращения 27.11.2016).
6. М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина. Разработка состава и технологии перорального пролонгированного геля нимесулида // Фармация. 2016. № 6. С. 30–34.
7. D.A. Satyanarayana, P.K. Kulkarni, H.G. Shivakumar. Gels and jellies as a dosage form for dysphagia patients: A Review // Current Drug Therapy. 2011. V. 6. P. 79–86.
8. Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию (выданные Федеральной службой, включая Управления). URL: http://fp.crc.ru/gosregfr/?type=list (дата обращения 04.02.2017).
9. Применение диетического и функционального питания в лечебно-профилактических и реабилитационных программах. Клинические рекомендации. – М. 2015. 79 с.
10. Е.О. Бахрушина, М.Н. Анурова. Обоснование состава перорального пролонгированного геля ибупрофена на основе отечественного матрицеобразователя композиционного полимерного носителя // Здоровье и образование в XXI веке. 2016. Т. 18. № 5. С. 117–120.
11. Е.О. Бахрушина, М.Н. Анурова. Разработка экспериментально обоснованного состава перорального пролонгированного геля нимесулида на основе сополимера метакриловой кислоты // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 2 (11). С. 80–83.
12. S. Miyazaki, A. Takahashi, I. Kunihiko et al. Preparation and evaluation of gel formulations for oral sustained delivery to dysphagic patients // Drug Development and Industrial Pharmacy. 2009. V. 35(7). P. 780–787.
13. T. Hanawa, M. Nakazawa, K. Mohri et al. Development of patient friendly preparations. Preparation and characterization of allopurinol gelatin gel containing polyethylene (oxide) // Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2000. V. 60(3). P. 175–182.
14. M.E. Freitas, M. Ruiz-Lopez, S.H. Fox. Novel levodopa formulations for parkinson's disease // CNS Drugs. 2016. Is. 30. P. 1079–1095.
15. С.Н. Запорожська. Розробка складу і технології вітамінного гелю для дітей / С.Н. Запорожська, І.І. Баранова, І.М. Грубник // Вісник фармації. Технологія лікарських препаратів. 2009. № 1(59). С. 27–29.
16. ОФС.1.4.1.0008.15. Мази // Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 2. – М., 2015. С. 67–73.
17. ОФС.1.4.1.0001.15. Лекарственные формы // Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Т. 2. – М., 2015. С. 10–19.
18. Semi-solid preparations for cutaneous application // European Pharmacopoeia 9.0, V. I. EDQM, 2017. P. 882–889.
19. Semi-solid preparations for cutaneous application // British Pharmacopoeia 2017. V. III. Health & Medicine, 2017.
20. Semi-solid Preparations for Oral Use, Veterinary // British Pharmacopoeia (Veterinary) 2015. Health & Medicine, 2015. P. 134–136.
21. Semi-solid preparations for oral use, veterinary // European Pharmacopoeia 9.0, V. I. EDQM, 2017. P. 890–892.
22. 1151 – Pharmaceutical dosage forms // United States Pharmacopeia 40 – the National Formulary 35. V. 1. United Book Press, 2017. P. 1543–1549.
23. Jellies for Oral Administration // Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition. 2011. P. 11.
24. Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition. 2007. 1654 p.
25. S. Pandey, K. Senthilguru, K. Uvanesh. Natural gum modified emulsion gel as single carrier for the oral delivery of probiotic-drug combination // International Journal of Biological Macromolecules. 2016. V. 92. P. 504–514.
26. Т.А. Кузнецова, И.Д. Макаренкова. Влияние пробиотического продукта, содержащего бифидобактерии и биогель из бурых водорослей, на кишечную микрофлору и показатели врожденного иммунитета у мышей с экспериментальным лекарственным дисбактериозом кишечника // Вопросы питания. Т. 84. № 1. 2015. С. 73–79.
27. Регистр лекарственных средств России. URL: http://www.rlsnet.ru/lec_index_id_93.htm (дата обращения 27.11.2016).
28. Единый электронный справочник «Регистр БАД». URL: http://www.registrbad.ru/ (дата обращения 27.11.2016).
29. Артлайф. Фитогели. URL: http://www.artlife.ru/catalog/b/fito.html (дата обращения 04.02.2017).
30. Черникоежка. URL: http://chernikoezhka.ru/ (дата обращения 27.11.2016).
31. Agel. URL: http://agel.ru/products/gel/ (дата обращения 04.02.2017).
32. Gloryon. URL: https://www.gloryon.com/ruCY/info (дата обращения 27.11.2016).
33. Экстракт мицелия гриба вешенка «Оводорин (Оводорин-D)». URL: http://vitaminas.ru/ovo_d_0.html (дата обращения 04.02.2017).
34. Саше. URL: https://www.aseptica.ru/ru/kontraktnoe-proizvodstvo/upakovka-sashe/ (дата обращения 04.02.2017).
35. Стики. URL: http://packtech.com.ua/servis/stati/26-portsionnaya-upakovka-stik-ili-sashet (дата обращения 04.02.2017).

COPLEY SCIENTIFIC

ТЕСТИРОВАНИЕ ОРАЛЬНО-ИНГАЛЯЦИОННЫХ И НАЗАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Лабораторное оборудование британской компании Copley Scientific в ходе тестирования орально-ингаляционных и назальных лекарственных средств (OINDRs) позволяет определять 3 критических показателя: однородность доставляемой дозы (однородность дозирования); общее количество препарата, излучаемого из устройства и, следовательно, доступного для пациента; размер частиц (аэродинамическое распределение частиц).

Определение однородности дозирования аэрозольных и порошковых ингаляторов по ОФС.1.4.1.0006.15 ГФ РФ XIII изд.



Насос HCP5, устройство DUSA MDI и контроллер потока TPK2000

Параметр «доставленная доза» измеряется путем перемещения аэрозоля из тестируемого устройства в пробоотборник дозирующего устройства (DUSA), содержащего фильтр.



Контроль качества жидких лекарственных форм для распыления по ОФС.1.4.1.0006.15 ГФ РФ XIII изд. и ст. 2.9.18 Eur.Ph.



Насос HCP5 и стеклянный жидкостный импинжер Copley Scientific GTI

Определение аэродинамического распределения частиц по ОФС.1.4.1.0006.15 ГФ РФ XIII изд.



Насос HCP5, измеритель потока DFM и каскадный импактор Андерсена (ACI)



Определение аэродинамического распределения частиц по ОФС.1.4.1.0006.15 ГФ РФ XIII изд.

Пробоотборники для аэрозольных и порошковых ингаляторов, импинжеры и им-пакторы от британской компании Copley Scientific – *максимальная производительность, 100% точность и надежность контроля качества аэрозольных и назальных лекарственных форм!*

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.ru

info@phct.ru

УДК 615.014.2

ИННОВАЦИОННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ПОРОШКОВЫХ ИНГАЛЯТОРОВ

А.Н. Воробьев[1]*, Р.А. Абрамович[1], С.В. Емшанова[1]

Резюме. В статье приведен обзор инновационных подходов и перспективных направлений в исследованиях и разработке лекарственных препаратов в форме порошковых ингаляторов. Приведены преимущества и недостатки введения лекарственного вещества через лёгкие, обозначены основные этапы фармацевтической разработки, включая выбор технологии получения микронизированной субстанции и агломератов активного компонента и вспомогательных веществ, обеспечивающих однородность дозирования ЛС и необходимое количество респирабельной фракции, подбор устройства доставки ингаляционного порошка, отмечена необходимость и важность исследования биофармацевтических и технологических характеристик ингаляционной лекарственной формы.

Ключевые слова: ингалятор сухого порошка, инертный носитель, респирабельная фракция, фармацевтическая разработка, желатиновые и ГПМЦ-капсулы, микронизация.

INNOVATION APPROACHES TO THE DEVELOPMENT OF DRY POWDER INHALERS

A.N. Vorobyev[1]*, R.A. Abramovich[1], S.V. Emshanova[1]

Abstract. The article provides an overview of the prospects for the development of dry powder inhalers. The advantages and disadvantages of introduction drugs through the lungs are presented in this article. We considered the main farmaceutical research studies finish dosage forms – dry powder inhalers and importance of biopharmaceutical and technological characteristics of this dosage form.

Keywords: DPI, development, HPMC capsules, micropowders.

1 – Центр Коллективного пользования (научно-образовательный центр) РУДН, 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8/2

1 – Shared Research and Educational Center of the Peoples' Friendship University of Russia (SREC PFUR), 8/2, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: alek_san2007@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Создание лекарственных препаратов для пульмонологии в виде ингаляционной формы явилось одним из крупнейших и значительных открытий фармацевтической науки. Использование ингаляторов является быстрым способом доставки лекарственного вещества (ЛВ) в дыхательные пути, а значит, и возможностью оказания экстренной помощи. Сегодня целью лечения бронхолегочных заболеваний является даже не облегчение симптомов болезни, а эффективный контроль над заболеванием и улучшение качества жизни пациентов. Преимущество ингаляционной терапии – создание высокой концентрации лекарственного средства в дыхательных путях при минимальных системных нежелательных эффектах [1].

В настоящее время в России в ингаляционной лекарственной форме зарегистрированы практически все современные бронхолитические препараты: симпатомиметики, блокаторы М-холинорецепторов, метилксантины, глюкокортикоиды. Дозированные аэрозольные ингаляторы (ДАИ) до сих пор остаются самыми распространенными в мире устройствами для лечения бронхиальной астмы. Это хорошо известные баллончики, использующие для распыления ЛВ газ-носитель (пропеллент).

Неудобство дозированных аэрозольных ингаляторов состоит в необходимости обеспечения синхронизации между нажатием на баллончик и вдохом пациента для доставки необходимого количества лекарства в легкие.

В основу работы первого порошкового ингалятора (ПИ) – спинхалера – был положен принцип высвобождения ЛВ под действием инспираторного усилия пациента (активация вдохом), за счет чего и решалась проблема координации между высвобождением лекарственного порошка и его поступлением в дыхательные пути [2].

Дальнейшее усовершенствовование порошковых ингаляторов привело к появлению в 1987 году ингалятора турбухалер («Пульмикорт Турбухалер», AstraZeneca AB, Швеция), в основе действия которого положено создание вихревого потока частиц, что позволило решить проблему недостаточности поступления ЛВ в бронхи, а также осаждения его во рту и верхних дыхательных путях [2].

Таким образом, сочетание грамотного инженерного решения при проектировании и произ-

водстве девайса/устройства для доставки лекарственного средства и научно обоснованной технологии подготовки массы для ингаляции являются важнейшими составляющими при разработке дизайна порошковых ингаляторов.

В настоящее время распространены два основных вида порошковых ингалятов (ДПИ): многодозовые (резервуарные и блистерные) и однодозовые (капсульные).

В России зарегистрированы препараты в форме порошковых ингаляторов различного типа: «Пульмикорт Турбухалер», «Оксис Турбухалер», AstraZeneca; «Серетид Мультидиск», «ГлаксоСмитКляйн»; «Спирива» с ингалятором ХендиХалер, «Берингер Ингельхайм Pharma»; «Форадил» с ингалятором аэролайзер, «Новартис»; «Бенакорт», «Биастен Циклохалер», «Формисонид®-натив» и «Формотерол-натив» российской компании «Натива» на основе капсульного девайса. В мировой практике применяются такие современные инновационные порошковые ингаляторы, как ClickHaler, Innovata Biomed; FlowCaps, Hovione; MAGhaler, Boeringher-Ingelheim; Pulvinal, Chiesi; Twisthaler, Schering Plough; Diskhaler, Rotahaler, «ГлаксоСмитКляйн» и другие. При этом каждое устройство доставки имеет свои индивидуальные технические решения, что позволяет решать проблемы обеспечения однородности поступающей в организм дозы лекарства и количества респирабельной фракции, а значит, величины и стабильности лёгочной депозиции препарата [2].

Среди порошковых ингаляторов для лечения бронхиальной астмы представляет интерес инновационный для России порошковый ингалятор изихайлер компании «Орион Фарма» (Финляндия). Изихайлер – дозирующий порошковый ингалятор с относительно высоким внутренним сопротивлением. Испытания *in vitro* показали, что доставка дозы ЛВ происходит единообразно и точно при минимальном потоке при вдохе через ингалятор. Использование Изихейлера обеспечивает лучшее распределение ЛВ в легких по сравнению с другими порошковыми ингаляторами [3].

В настоящее время, помимо совершенствования устройства ингаляторов (девайсов) для доставки лекарственного средства (ЛС) в легкие, увеличился арсенал препаратов и нозологические формы заболеваний, где успешно используется ингаляционный путь их введения. Новая стратегия ингаляционной доставки ЛС основана на возможности терапии внелегочных заболеваний с применением противоопухолевых ЛС, инсулина, пептидов, вакцин против кори и вируса папилломы человека, химиотерапевтических препаратов для лечения рака легких; новых форм антибиотиков; антипротеазы для лечения муковисцидоза и дефицита альфа-1-антитрипсина и других лекарственных средств [4]. В связи с этим актуальными являются исследования по научному обоснованию и формулировке методологических подходов к фармацевтической разработке порошковых ингаляционных форм.

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ ПОРОШКОВОЙ ИНГАЛЯЦИОННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

Теоретические основы ингаляционной доставки ЛВ

Принцип действия порошковых ингаляторов заключается в том, что во время вдоха пациента ЛС, находящееся в капсуле или другом резервуаре, переводится во взвешенное состояние и вместе с потоком воздуха попадает на слизистую оболочку бронхоальвеолярного тракта. Размер частиц ЛС (порядка 2–5 мкм) обеспечивает проникновение лекарственного препарата на уровень терминальных бронхиол. Частицы размером более 5 мкм будут скапливаться в ротоглотке и проглатываться. При разработке ингаляционной формы необходимо свести к минимуму осаждение частиц ЛВ в ротоглотке для уменьшения риска возникновения местных побочных эффектов, таких как охриплость голоса и кандидоз ротовой полости. Частицы размером 4–5 мкм депонируются сначала в бронхах, а более мелкие с воздушным потоком достигают периферических отделов дыхательных путей и альвеол. Чем больше время пребывания потока воздуха с ЛВ в мелких периферических дыхательных путях, тем больше оседание частиц ЛВ за счет седиментации и броуновского движения [4].

Легкие представляют собой уникальный парный орган, обеспечивающий быструю системную доставку ЛС за счет большой площади поверхности (примерно 100 м^2) всасывания препарата через тонкий эпителий.

Легкие вместе с дыхательными путями образуют селективную к размеру частиц систему абсорбции ЛВ, в которой мелкие частицы в соответствии с размерами постепенно удаляются из вдыхаемого потока воздуха по мере продвижения через рот, гортань и более широкие дыхательные пути в альвеолярное пространство.

Важнейшей характеристикой эффективности ингаляционной порошковой формы является доставка количества лекарственного вещества, соответствующего терапевтической дозе, в легкие и минимальная потеря его в результате оседания в других отделах респираторного тракта, прежде всего в полости рта, глотке и гортани. Частицы, поступающие в легкие, имеют размер в пределах 1–5 мкм и называются тонкой респирабельной фракцией (FPF), которая распределяется в трахее и бронхах, бронхиолах и альвеолах (рисунок 1) [5, 6].

Путь введения ЛВ через легкие имеет следующие преимущества: непосредственное воздействие на орган-мишень – трахеобронхиальное дерево; быстрое всасывание ЛВ за счет увеличения его активной поверхности; депонирование ЛВ в подслизистом слое,



Рисунок 1. Распределение частиц ингаляционного порошка в отделах респираторного тракта

богатом кровеносными и лимфатическими сосудами; большая площадь поверхности для возможного всасывания ЛВ; быстрое наступление терапевтического действия; альтернативный путь введения при назначении одновременно нескольких препаратов, отсутствие при местном применении побочных явлений, неизбежных при системном действии препаратов.

При ингаляционном способе введения возможно использование меньшей дозы ЛВ для достижения терапевтического эффекта из-за быстрого всасывания, однако при этом возможно накопление в организме пиковых концентраций действующего вещества и повышение токсичности препарата [7].

Наряду с положительными моментами введение ЛВ через легкие имеет определенные недостатки, важнейшими из которых являются: высокий инспираторный поток для выведения дозы препарата из резервуара и дезагрегации порошка до респирабельной фракции; невозможность применения ингаляторов у маленьких детей, людей пожилого возраста, при реанимации; возможно накопление пиковых концентраций ЛВ в верхних дыхательных путях; небольшая длительность лечебного действия из-за быстрого удаления ЛВ из легких либо его быстрого метаболизма; небольшое количество (от 10 до 40%) ЛВ, покинувшего ингаляционный девайс, доставляется в место действия в легкие; необходимость тщательного ознакомления с техникой ингаляции.

Основные этапы фармацевтической разработки порошковых ингаляторов

Разработанные на основе научного понимания каждой составляющей ингаляторы сухого порошка (ИСП) или ДПИ (дозированные порошковые ингаляторы) – это высокоэффективные и в то же время сложные системы для доставки ЛС в легкие. Эффективность данных систем зависит от многих факторов, включающих дизайн лекарственной формы, сложность девайса для ингаляции, размер и форму частиц ЛВ и вспомогательных компонентов, однородность их смешивания, оптимальное количество респирабельной фракции, скорость потока воздуха, создаваемую пациентом, и другие, которые должны быть учтены на стадии фармацевтической разработки [8].

Нами определены основные этапы разработки порошкового ингалятора, включая стадии изучения физико-химических и технологических характеристик фармацевтической субстанции, обоснования и выбора дизайна ингаляционного устройства доставки ЛВ, исследования ряда инертных носителей для лекарственной субстанции, разработки технологии получения и изучения характеристик порошковой массы для ингаляции, выбора материала и формы капсулы в соответствии с определенным дизайном ингалятора и свойствами используемой субстанции, определения респирабельной фракции полученного лекарственного порошка, исследования стабильности лекарственной формы.

При формировании алгоритма физико-химических, фармацевтических, биофармацевтических, микробиологических фармацевтических исследований на стадии фармацевтической разработки и оценки предполагаемых рисков для качества лекарственного препарата необходимо руководствоваться современными международными требованиями – документами международной конференции по гармонизации ICH Q8, ICH Q9 и ICH Q10 и требованиями российских регуляторных органов [9–13].

Основные предлагаемые нами этапы фармразработки препарата с учетом методологии QbD (качество через разработку) приведены в таблице 1 [10].

Принцип действия порошковых ингаляторов и их основные характеристики

Важнейшими показателями качества порошкового ингалятора являются: высвобожденная/доставляемая доза, респирабельная фракция, однородность доставляемой дозы, необходимая объемная скорость вдоха пациента (инспираторный поток), дизайн ингалятора и его составных частей, сопротивление дыханию, а также перепад давления на вдохе [14, 15].

Таблица 1.

Основные этапы фармразработки лекарственного препарата в форме порошкового ингалятора

	Этапы фармацевтической разработки лекарственного препарата в форме порошкового ингалятора с использованием капсул, содержащих ЛВ
1.	Обоснование экономической целесообразности разработки нового препарата. Информационно-аналитическое обоснование методических подходов к разработке лекарственного препарата в форме порошкового ингалятора. Определение целевого профиля лекарственной формы.
2.	Обоснование выбора устройства/девайса для доставки ЛВ. Техническое и нженерные решения устройства/девайса для доставки ЛВ, содержащегося в капсулах.
3	Обоснование выбора материала капсул с учетом физико-химических свойств фармацевтической субстанции, её стабильности при хранении, способа заполнения капсул и устройства для ингаляции.
4.	Разработка состава порошковой массы для ингаляции, обладающей необходимыми технологическими свойствами и биофармацевтическими показателями в соответствии с выбранным девайсом. Изучение физико-химических и технологических характеристик активного вещества: формы и размера частиц, электризуемости, влажности, сыпучести, фракционного состава и др. При необходимости – проведение исследований по модификации частиц субстанции, оптимальных для определенного типа ингалятора по форме, размерам, плотности, пористости и другим показателям, с использованием механических, технологических и химических методов: перекристаллизации, измельчения, микронизации с использованием наносушилки и других. Изучение и обоснование целесообразности использования инертных ВВ-носителей. Выбор технологии получения порошковой массы для ингаляции. Исследование совместимости выбранных ингредиентов и стабильности полученной массы.
5.	Определение аэродинамических характеристик полученной порошковой массы. Определение респирабельной фракции лекарственного порошка для ингаляции. Выбор соответствующего импактора для исследований указанных выше показателей.
6.	Выбор технологии наполнения капсул. Контроль качества лекарственной формы.
7.	При необходимости оптимизация технологии получения порошковой смеси для ингаляции с наиболее оптимальными аэродинамическими характеристиками, максимальным выходом респирабельной фракции, однородностью дозирования активного компонента, физической и химической стабильностью. Масштабирование технологий получения модифицированной субстанции, смешивания с инертным носителем, наполнения капсул. Валидация методик аналитического контроля лекарственной формы.
8.	Опытно-промышленная проверка технологии. Необходимые исследования и валидационные процедуры.

Респирабельная фракция (RF), частицы которой достигают нижних отделов дыхательных путей, представляет собой аэрозоль с масс-медианным аэродинамическим диаметром менее 5 мкм. Для ее определения используют специальную аппаратуру, имитирующую работу дыхательной системы человека и позволяющую оценить аэродинамические характеристики частиц аэрозоля, – двойной стеклянный импинджер, который улавливает препарат, проникающий в нижнюю камеру прибора; каскадный импактор Андерсена, имеющий до 8 секций распределения и откалиброванный для улавливания определенной фракции частиц на каждую из секций; многостадийный жидкостной импинджер, имеющий 5 ступеней, улавливающие элементы которого заполняют растворителем для полного поглощения частиц ЛВ. Препарат, осевший в нижней камере импинджера либо на определенных секциях импактора или жидкостного импинджера, собирают и количественно определяют, нормируя содержание в процентах.

В Государственной фармакопее РФ XIII издания (ОФС «Аэродинамическое распределение мелкодисперсных частиц») по аналогии с фармакопеями США и Европы для контроля качества препаратов для ингаляций предусмотрены 4 прибора: каскадный импактор Андерсена, импактор нового поколения с горизонтальным расположением каскадов, стеклянный импинджер, многоуровневый (мультистадийный) жидкостной импинджер (МЖИ).

Сухие порошковые ингаляторы – это дыхательные устройства, управляемые потоком воздуха, который доставляет микронизированные частицы сухого порошка ЛВ к легким. Движение частиц порошка может быть вызвано разными способами (пневматическим, вибрационным и др.), однако чаще всего используется поток вдоха пациента.

Когда пациент активирует ДПИ и вдыхает, турбулентный поток воздуха через устройство поступает в слой порошка и статическая порошковая смесь распыляется, попадая в дыхательные пути пациента. Там частицы лекарственного вещества отделяются от частиц носителя и поступают глубоко в легкие, в то время как частицы носителя оседают в ротовой части глотки и растворяются. Таким образом, осаждение в легких определяется переменным воздушным потоком, создаваемым пациентом [16].

На порошок для ингаляции действуют главным образом три типа межчастичных сил: вандерваальсовы, электростатические и капиллярные силы [17]. Шероховатость поверхности, геометрическая структура и деформация отдельных частиц может значительно изменить сыпучие характеристики массы, в связи чем выбор формы и размера частиц ЛВ является одной из важнейших стадий фармразработки порошковой массы для ингаляции.

ЛВ с микронизированным размером частиц по специальной технологии преобразуют в конгломераты, легко диспергирующиеся в процессе инспирационного вдоха больного, или наносят на специально подобранный инертный носитель, который остается в ротовой полости, обеспечивая поступление

ЛВ глубоко в легкие [18, 19]. Схема функционирования инхалера по двум типам действия приведена на рисунке 2 [20].

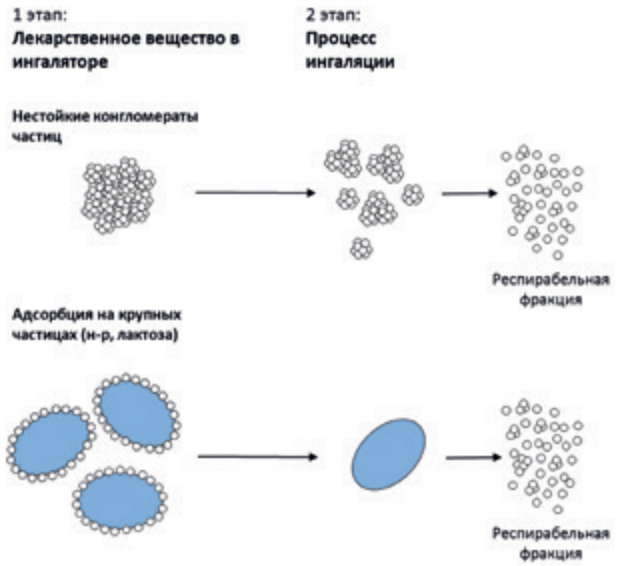


Рисунок 2. Универсальная схема функционирования ДПИ

В связи с этим качество лекарственной формы будет зависеть от выбранного состава ингредиентов и технологии получения порошка ЛВ для ингаляции, а также синхронности работы всех составных частей ингалятора.

Таким образом, научно обоснованный выбор носителя, формы и размера его частиц, дисперсности и формы частиц активного компонента, их технологических и физико-химических, а также биофармацевтических свойств является важнейшим этапом фармацевтической разработки ингаляционного препарата, обеспечивающим оптимальную эффективность доставки и осаждения ЛВ [21, 22].

Требования к фармацевтической субстанции и вспомогательным веществам для ингаляционного порошка

Для выбора оптимального состава порошка для ингаляции необходимо исследовать:

- фракционный состав лекарственного порошка;
- кристалличность / аморфность;
- содержание влаги, гигроскопичность;
- размер и форму частиц;
- морфологию поверхности частиц и при необходимости другие показатели качества субстанции.

Основной технологической проблемой ПИ является несоответствие между размером частиц субстанций, которые могут достигать дыхательных путей (менее 5 мкм), и размером частиц, необходимым для оптимального функционирования самого ингалятора (30–300 мкм).

Для решения данной проблемы используются следующие схемы приготовления порошковой массы для ингаляции [23]:

1. Порошковая масса без носителя.
2. Порошок для ингаляции с инертным носителем.
3. Порошок для ингаляции на основе субстанции с добавлением небольшого количества вспомогательных веществ.
4. Порошок для ингаляции на основе инертного носителя с добавлением небольших количеств вспомогательных веществ.

Используемые при фармацевтической разработке схемы получения порошка для ингаляции приведены на рисунке 3 [23].

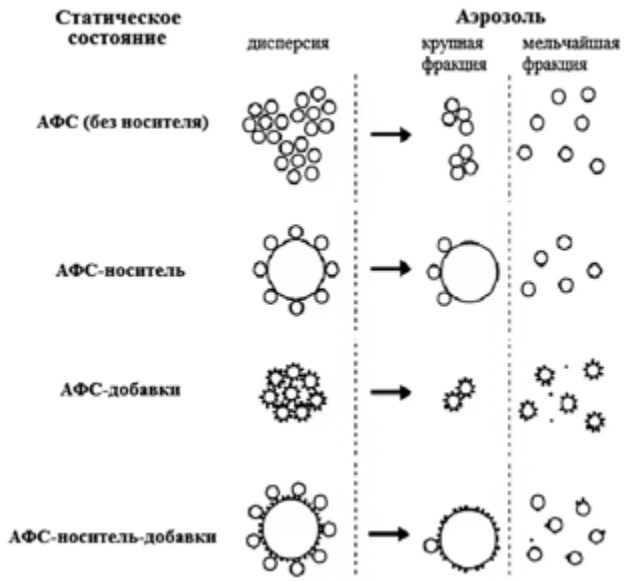


Рисунок 3. Основные схемы получения порошка для ингаляции

Оптимизация технологиии приготовления порошка для ингаляции и контроль за взаимодействием частица-частица и частица-ингалятор имеет решающее значение в разработке эффективного порошкового ингалятора. Известно, что при получении смеси АФС и наполнителя гораздо легче добиться однородности дозирования содержимого ингалятора.

Практически все активные вещества имеют неоднородный фракционный состав, низкую сыпучесть, поэтому оптимальный поток их движения чаще всего создается добавлением вспомогательных ингредиентов, которые также повышают физическую и химическую стабильность ЛС, улучшают его механические и/или фармацевтические свойства, такие как растворение и всасывание. В первую очередь в порошковых

ингаляторах вспомогательные вещества (ВВ) выполняют роль носителя. Неадекватное разделение ЛВ с носителем является одним из основных объяснений низкой эффективности осаждения, встречающейся у ИСП [24].

Как правило, к носителю ЛВ предъявляются следующие требования [25, 26]:

- отсутствие взаимодействия с ЛВ и элементами дозирующего устройства;
- совместимость с ЛВ;
- обеспечение транспортировки препарата, который доставляется в легкие;
- повышение стабильности препарата;
- увеличение специфической доставки ЛС к целевому органу.

Чаще всего в качестве инертного носителя используют разные типы лактозы моногидрата. Она имеет установленную безопасность и профиль стабильности, во время производственного процесса ее получения контролируется чистота, технологические и реологические свойства, что желательно для носителя в ИСП [27]. Лактоза менее гигроскопична, чем другие сахара. Она широко используется в производстве лекарственных форм и изготавливается специально для ингаляционной формы лекарственных препаратов. Известны марки лактозы моногидрата разных фирм, специально позиционируемые как наполнители для ингаляционных препаратов, такие как Lactohale 100, Lactohale 300, Lactohale® 200, Lactohale® 201, Respitose® ML001, Respitose® ML006, Respitose® SV 003 компании DFE Pharma, Германия, INHALAC 70, INHALAC 230, INHALAC 400 компании DFE, Германия, и другие [28].

Одним из недостатков лактозы является то, что она представляет собой восстановленный сахар, что делает её несовместимой с ЛС, которые имеют первичные аминогруппы [29].

Другие сахара, такие как маннит, глюкоза, хоть и в меньшей степени, но также находят применение в разработке ингаляционных лекарственных средств [30].

Кроме носителя, к массе для ингаляций могут быть добавлены и другие ингредиенты, улучшающие доставку ЛВ. Эти компоненты, как правило мелкодисперсные, могут закрывать поверхностные дефекты частиц носителя и таким образом способствовать целевой доставке ЛВ. Например, увеличение мелкодисперсной фракции в составе лактозного носителя приводит к улучшению отрыва частиц лекарственного вещества от частиц носителя [31].

В препаратах для ингаляции, например содержащих активные вещества беклометазон, будесонид и сальбутамол, в качестве носителя также используется лактозы моногидрат [32]. На рисунке 4 приведена микрофотография частиц препарата тимодепрессина для ингаляции. Микрофотография получена на электронном растровом микроскопе Jeol JSM-6490 LV, Япония, в Центре коллективного пользования (НОЦ) РУДН.

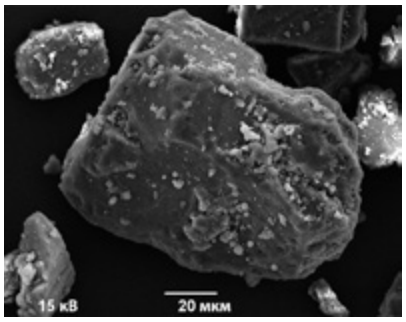


Рисунок 4. Микрофотография порошка для ингаляции на основе субстанции тимодепрессина и лактозы моногидрата

Вспомогательные вещества составляют большую часть массы порошка для ингаляции, в то время как активный компонент входит в состав лекарственного средства в незначительном количестве с частицами респирабельных размеров, которые способны проникать в дистальные отделы легких.

Кроме выполнения функции инертного носителя, ВВ могут участвовать в формировании из ЛВ специальных частиц – техносфер с улучшенными фармацевтическими свойствами за счет большой площади пористой поверхности. Одним из эффективных представителей этого класса частиц является фумарила дикетопиперазин, структурная формула которого приведена на рисунке 5 [33].

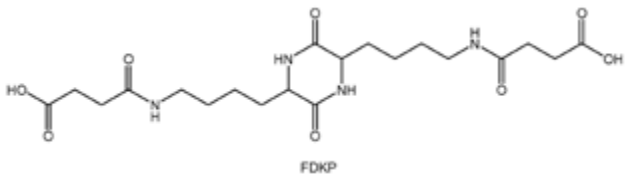


Рисунок 5. Структурная формула фумарила дикетопиперазина

Частицы данного ингредиента представляют собой агломераты округлой формы, состоящие из кристаллических или аморфных единиц, приведенных на рисунке 6.

Использование этого компонента в технологии распылительной сушки приводит к формированию шарообразных пористых структур, обладающих большой удельной поверхностью, с включением в них ЛВ, приведенных на рисунке 7, например таких, как инсулин [34].

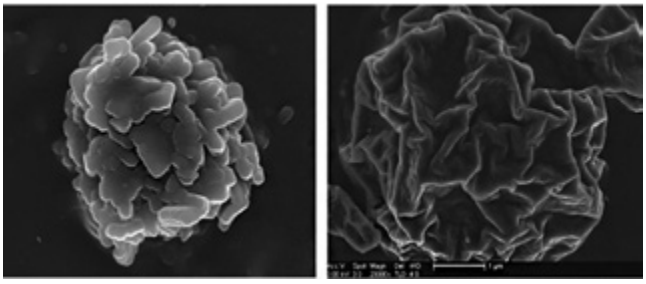


Рисунок 6. **Кристаллическая и аморфная форма частиц фумарила дикетопиперазина**

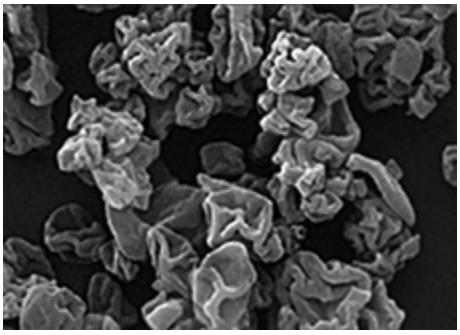


Рисунок 7. **Морфология частиц – техносфер субстанции инсулина и фумарила дикетопиперазина**

Фумарила дикетопиперазин способствует всасыванию АФС, сам при этом не метаболизируется и выполняет исключительно матричную функцию благодаря сложной морфологии поверхности частиц [35]. После ингаляции частицы – техносферы доставляют ЛВ в легкие, практически мгновенно растворяются и всасываются в системный кровоток. Ингаляционные препараты на основе техносфер из дикетопиперазина фумарила часто характеризуются фармакокинетикой, специфичной для инъекционных лекарственных средств.

Каждая фармацевтическая субстанция обладает определенной структурой, физико-химическими, технологическими, биофармацевтическими характеристиками, в связи с чем разработка и оптимизация составов ингаляционных порошков, включая и выбор комбинации вспомогательных веществ, является сугубо специфичной для каждой молекулы и должна быть научно обоснована.

В связи с этим возрастает роль технологии «инжиниринга частиц» – технологии получения и исследования частиц лекарственных веществ и вспомогательных ингредиентов для ингаляции, обладающих заданными формой и размером.

Высокая дисперсность особенно востребована в случаях, когда лекарственное вещество плохо растворимо в воде и биологических жидкостях.

Через адаптацию передовых технологий микроэлектронной промышленности компания Liquidia Technologies, США, применила систему формовки частиц, названную PRINT (Particle Replication in Non-wetting Templates), для производства на матричных пластинах ингаляционных порошков [36].

В отличие от других технологий «инжиниринга частиц» эта научная платформа позволяет достигнуть однородности частиц по форме, размеру и морфологии, определяемой свойствами формы матрицы. Дальнейшее развитие и практическое применение технологии «инжиниринга частиц» – PRINT – имеет широкое применение для науки, в том числе для разработки следующего поколения составов ингаляционных порошоков с биотехнологическими лекарственными средствами, такими как белки и олигонуклеотиды. Схематическое изображение технологии микроформования PRINT представлено на рисунке 8 [37].



Рисунок 8. **Схематическое изображение технологии микроформования PRINT**

Для получения определенных по форме и дисперсности частиц ЛВ и ВВ широко используются различные технологические методы, от кристаллизации и измельчения до распылительной сушки и сверхкритической флюидной экстракции. В настоящее время кристаллизация и измельчение не являются достаточно эффективными методами для приготовления пульмонологических препаратов, потому что с их помощью невозможно получить частицы оптимальной формы, имеющие узкое распределение по размерам, низкую поверхностную энергию, и избежать аморфного состояния вещества.

Сушка распылением суспензии веществ и сверхкритическая флюидная кристаллизация позволяют получать необходимые частицы прямо из раствора. Эти методы существенно отличаются от технологии измельчения тем, что при распылительной сушке и флюидной кристаллизации частицы вещества постепенно увеличиваются в размерах, тогда как при размоле размер частиц уменьшается. При распылительной сушке препарат растворяют в воде или растворителе и разбрызгивают в виде мелкодисперсного тумана в нагретую расширительную камеру. Растворитель испаряется, в результате остаются мельчайшие частицы лекарственного средства, которые собираются в нижней части камеры. По сравнению с измельчением при помощи распылительной сушки можно получать частицы сферической формы [38]. Однако высушенные распылением частицы в основном являются аморфными, обладают полиморфизмом, что отрицательно сказывается на стабильности ЛС [39].

В ЦКП (НОЦ) РУДН субстанция в виде пептида – тимодепрессина (произв. ООО «Фарма Био») для разработки ингаляционной лекарственной формы была микронизирована до размера частиц 5 мкм методом распылительной сушки на установке Buchi «Nano Spray Dryer B-90», Швейцария. Микрофотографии субстанции тимодепрессина до и после микронизации получены на электронном растровом микроскопе Jeol JSM-6490 LV, Япония, в Центре коллективного пользования (НОЦ) РУДН и приведены на рисунке 9.



Распылительная сушка на установке Buchi «Nano Spray Dryer B-90»

Как видно из рисунка 9, исходная субстанция с формой частиц палочки и иголки после микронизации в наносушилке приобрела шарообразную форму с размером частиц не более 5 мкм.

Использование метода распылительной сушки позволило получить субстанцию в виде частиц правильной шарообразной формы с достаточно узким интервалом их распределения. Субстанция в таком модифицированном виде обеспечила получение стабильной по технологическим характеристикам порошковой массы для ингаляции, с хорошими аэродинамическими показателями, достаточным количеством мелкой фракции, достигающей респираторного тракта.

Использование технологий распылительной сушки и сверхкритической флюидной экстракции для получения частиц фармаевтических субстанций и вспомогательных веществ является предметом интенсивных исследований и находит практическое применение в фармацевтической промышленности [40].

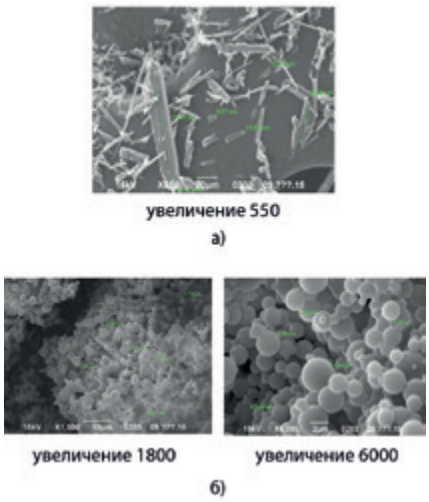


Рисунок 9. Субстанция пептида: а) исходная, б) микронизированная

Новосибирские ученые под руководством д.х.н. проф. Е.В. Болдыревой предложили новый способ получения шарообразных пористых частиц лекарственных веществ микронного размера. Для этого лекарственное вещество растворяют в смешанном водно-органическом растворителе, раствор распыляют в емкость с криогенной жидкостью (например, жидким азотом, имеющим температуру –196 °С), а затем замороженный раствор постепенно нагревают в вакууме [41].

Легкокипящий органический растворитель берется в таком количестве, чтобы при охлаждении раствора образовался клатратный гидрат, где вода образует каркас, в полостях которого размещаются «гости» – молекулы растворителя. В капельках распыляемого раствора происходит быстрая кристаллизация клатратного гидрата, при этом лекарственное вещество образует отдельную, аморфную, фазу, которая вытесняется в пространство между растущими кристаллитами. При последующем нагревании замороженных капелек в вакууме растворитель испаряется, – так и получаются микрошарики с пористой структурой.

Данным методом получена порошковая композиция сальбутамола – лекарства, широко используемого для купирования приступов астмы и бронхоспазмов. Эта композиция представляет собой свободно сыпучий порошок с чрезвычайно низкой плотностью, с размером частиц несколько десятков нанометров, что дает возможность дозировать их с высокой точностью [40].

Предложенный метод достаточно универсален и может быть использован для создания высокоэффективных ингаляционных лекарственных форм практически всех современных низкодозных лекарственных веществ.

Технологические приемы и оборудование для получения ингаляционных порошков

После предварительной обработки фармацевтической субстанции и вспомогательных компонентов одной из важнейших стадий технологии получения ингаляционных порошков является стадия их смешивания.

Выбор смесителя, времени и скорости вращения перемешивающих устройств, уровень заполнения оборудования являются объектами для обоснованного их выбора и постоянной оптимизации, так как они оказывают непосредственное влияние на процесс гомогенизации массы, а значит, и на качество готового ЛС [42]. Для получения смеси лекарственных и вспомогательных веществ для использования в порошковых ингаляторах зарубежными компаниями, кроме традиционного оборудования для смешивания фармацевтических порошков, широко используются смесители специальной конструкции типа Cyclomix компании Hosokawa Micron B.V. (Нидерланды), совмещающие горизонтальное вращательное и вертикальное перемешивающее напряжение сдвига, что позволяет создавать в перемешиваемой массе баланс сил сцепления и диспергирования (рисунок 10) [43].

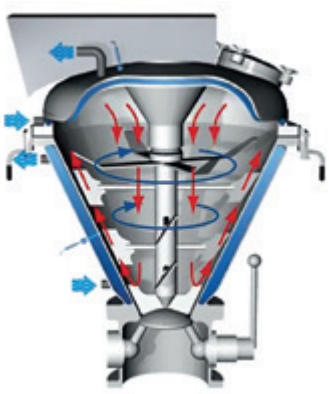


Рисунок 10. Принцип работы смесителя типа Cyclomix компании Hosokawa Micron B.V. (Нидерланды)

При фармацевтической разработке ингаляционных лекарственных форм необходимо также учитывать свойства окружающей среды, такие как температура и влажность, которые также могут быть критическими праметрами процесса и оказывать существенное влияние на стабильность ЛС и эффективность ИСП.

Дизайн ингаляционного устройства

Большое значение при разработке ингаляционной лекарственной формы имеет выбор дизайна самого девайса для доставки ЛВ.

Существуют два основных типа порошковых ингаляторов: многодозовые и однодозовые капсульные (спинхалер, ротахалер, аэролайзер, хандихалер и другие).

На рисунке 11 представлен один из самых распространенных ПИ – турбухалер (AstraZeneca, Швеция) – многодозовый ингалятор резервуарного типа [44].



Рисунок 11. Строение девайса типа «турбохалер»

Разовая доза порошка отмеряется простым поворотом диска в нижней части ингалятора, причем точность дозирования гарантируется независимо от количества препарата, оставшегося в резервуаре. При вдохе воздух проходит через дозирующий диск с отверстиями, где отмеренная доза порошка захватывается потоком и поступает в ингаляционный канал, а затем к двум спиральным каналам в мундштуке, где создается турбулентный поток воздуха. При интенсивном перемешивании порошка и воздуха порошок диспергируется с образованием мельчайших частичек ЛС диаметром <6 мкм (респирабельная фракция). Случайное превышение установленной дозы препарата исключается, так как избыток порошка автоматически возвращается в резервуар. Турбухалер снабжен счетчиком доз, и больной в контрольном окошке может узнать, сколько доз остается в ингаляторе [44].

Эффективность работы ПИ зависит от усилия пациента, его способности создать адекватный инспираторный поток, необходимый для приведения порошка ЛВ во взвешенное динамическое состояние, а также для дезагрегации порошка на более мелкие аэрозольные частицы. Чем интенсивнее инспираторный поток, тем выше содержание респирабельных частиц в порошке ЛВ [частиц со срединным массовым аэродинамическим диаметром (MMAD) <5 мкм] и тем большая доза препарата достигает легких [45].

Разработка дизайна самого устройства является предельно важным моментом фармацевтической разработки препарата, поскольку при назначении пациенту ингаляционной терапии должен быть выбран тот метод доставки и то устройство, к которому расположен больной, а для пациентов значимыми факторами являются простота в использовании ингалятора, раз-

меры, отсутствие раздражающего действия и другие свойства [2].

Для порошкового ингалятора, активируемого вдохом, существует пороговое значение объемной скорости воздуха, создаваемой при ингаляции, ниже которого величина вводимой дозы и респирабельной фракции будет недостаточной для проявления терапевтического действия лекарственного препарата.

В связи с этим снижение пороговой величины скорости воздушного потока позволяет также снизить инерционное осаждение частиц лекарственных препаратов в ротоглотке и повысить их проникновение в легкие.

При этом различия в аэродинамических и механических свойствах ингаляторов оказывают большое влияние на легочную депозицию препарата и эффект терапии, а потому каждая комбинация «ингалятор + ЛВ» разрабатывается конкретно для каждого лекарственного препарата.

Все существующие на данный момент порошковые ингаляторы могут быть охарактеризованы как «пассивные» ингаляторы (то есть для генерации лекарственного аэрозоля используется энергия вдоха пациента).

Эффективность работы этих устройств зависит от лекарственной формы и геометрии пути, по которому идет поток воздуха.

Внутренняя форма ингалятора конструируется таким образом, чтобы создать турбулентный поток, облегчающий диспергирование порошка.

Дыхательное усилие пациента, как правило, не превышает 50% от максимально возможного для того, чтобы пользование ингалятором было комфортным.

Инспираторный поток, создаваемый здоровым добровольцем, может достигать 180 л/мин.

Для тестирования ингаляторов применяют фиксированную скорость потока 30, 60 и 100 л/мин. Необходимо учитывать, что пациент с ослабленным дыханием создает гораздо меньший инспираторный поток, не более 20–30 л/мин [22].

Низкое сопротивление устройства дает возможность достичь высокого инспираторного потока при менее интенсивном вдохе больного и позволяет использовать ДПИ с низким сопротивлением даже при тяжелом бронхоспазме.

Проектирование и разработка любой системы доставки лекарственных средств в форме порошка – достаточно сложная задача, включающая исследование множества факторов, влияющих на качество готовой лекарственной формы, в том числе тщательный анализ рисков для качества препарата. Оптимальным решением в целом является соответствие свойств ЛФ и геометрии устройства системы доставки.

Достоинством капсульных моделей ПИ является точность дозирования препарата, компактный размер устройств, защита лекарственной субстанции от влажности, возможность назначения большой дозы препарата (до 20–30 мг) и низкая стоимость ингалятора. К недостаткам можно отнести неудобство, связанное с частой заправкой ингалятора, и технические проблемы: неадекватное вскрытие капсулы, застревание капсулы в камере ингалятора и возможность ингаляции частиц капсулы [46].

При разработке дизайна ИСП обычно используют два вида твердых капсул: желатиновые капсулы и капсулы, полученные на основе гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ). Твердые желатиновые капсулы успешно используются в ИСП более 30 лет, что делает их выбор стандартным при разработке составов для данных ингаляторов. ГПМЦ-капсулы, такие как Capsugel Vcaps, являются новыми для рынка фармацевтических препаратов, но уже достаточно убедительно показали свои преимущества при использовании в составах ИСП [47].

Желатиновые капсулы по сравнению с ГПМЦ-капсулами при одних и тех же условиях хранения набирают большее количество влаги (рисунок 12) [48].

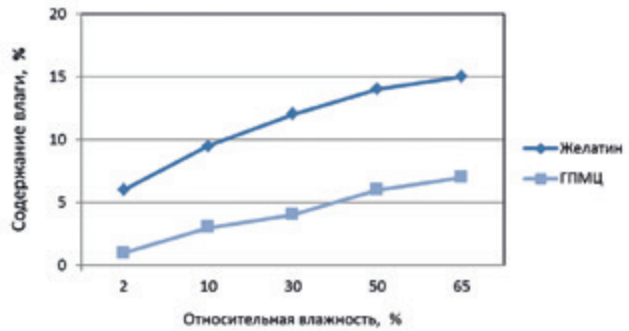


Рисунок 12. Содержание влаги в капсулах двух видов при различной относительной влажности среды

Для влагочувствительных составов порошкообразных смесей разница в содержании воды в капсулах может иметь большое значение, приводящее к нестабильности действующего вещества содержимого капсул. В таких случаях выбор ГПМЦ-капсул становится очевидным.

В то же время необходимо отметить, что твердые желатиновые капсулы имеют меньшую проницаемость для кислорода воздуха по сравнению с капсулами ГПМЦ, что является их преимуществом. Тестирование пленок из желатина и ГПМЦ толщиной 100 мкм на приборе OX-TRAN 2.61 (компании «Мокон») для определения количества кислорода в $см^3$, прошедшего через образцы пленок, показало, что изучаемый показатель для капсул из ГПМЦ значительно превышает таковой для капсул из желатина (рисунок 13) [49].

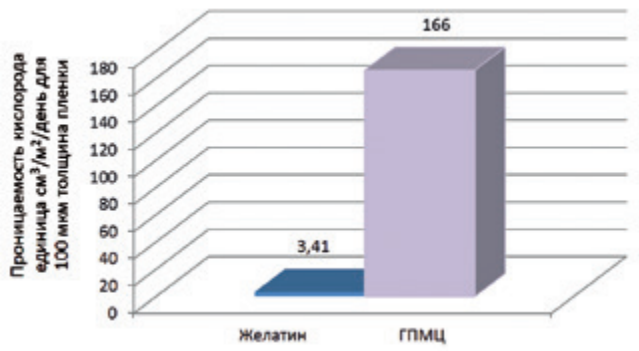


Рисунок 13. Измерение проницаемости пленок из желатина и ГПМЦ для кислорода

Большими преимуществами все же обладают капсулы из ГПМЦ, которые не требуют таких жестких условий хранения, как желатиновые капсулы, чувствительные к влажности и температуре окружающей среды.

Даже при низкой влажности воздуха или при наличии в составе порошка гигроскопичного компонента ГПМЦ-капсулы остаются устойчивыми к разрушению и практически не обладают хрупкостью, то есть способностью разрушаться с образованием частиц корпуса самой капсулы. Из рисунков 14 и 15 видно, что ГПМЦ-капсулы, выдержанные в условиях различной влажности воздуха и помещенные в ингалятор типа «аэролайзер», легко прокалываются без образования фрагментов капсулы [50].

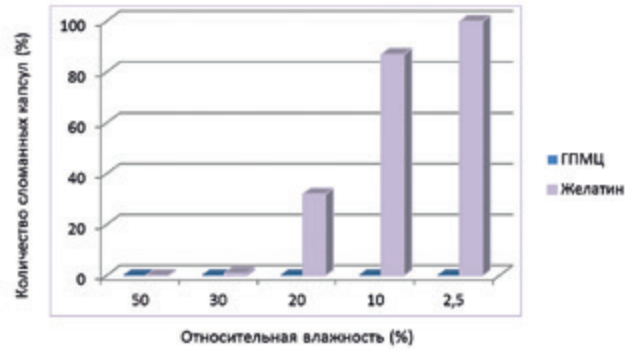


Рисунок 14. Сравнение хрупкости капсул двух видов, выдержанных при различных значениях влажности воздуха

В свою очередь, капсулы из желатина обладают повышенной хрупкостью, образуя при прокалывании мелкие фрагменты, которые в дальнейшем могут попасть в организм пациента при вдохе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ингаляторы сухого порошка являются перспективной лекарственной формой не только для лечения бронхолегочных, но и аутоиммунных заболеваний, в частности псориаза. Большие преимущества

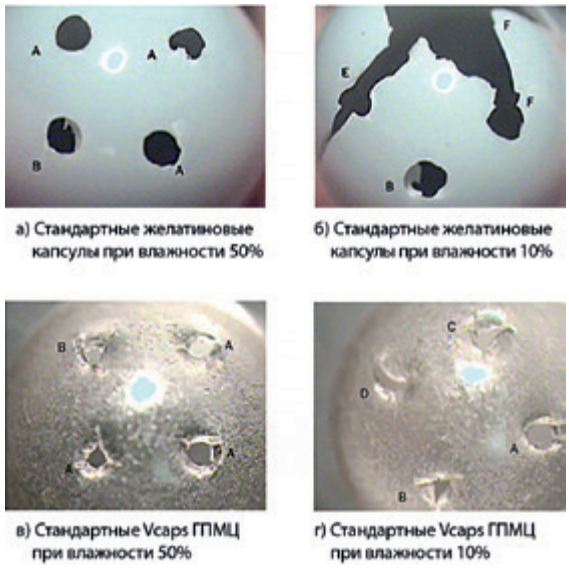


Рисунок 15. Внешний вид капсул из желатина и ГПМЦ, выдержанных в условиях различной влажности, после использования в аэролайзере, «Новартис»

данной лекарственной формы – быстрота действия, уменьшение дозировки, целевое использование ЛВ, удобство применения – делают данную форму перспективной для перевода некоторых инъекционных препаратов в ингаляционные. Рассмотрены основные подходы к фармацевтической разработке порошкового ингалятора, содержащего лекарственное средство в капсуле. Рассмотрены вопросы выбора технологии получения микронизированной субстанции, технологии модифицирования частиц субстанции и вспомогательных веществ, а также образование их пористых агломератов, обеспечивающих получение однородной массы с использованием современного эффективного специализированного оборудования для смешивания порошков для ингаляции. Рассмотрены критические параметры исходного сырья и технологических процессов, оказывающих влияние на содержание респирабельной фракции препарата и качество готовой лекарственной формы в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. С.Н. Авдеев. Порошковые ингаляторы // Пульмонология и аллергология. 2004. № 4. С. 36–42.
2. С.Н. Авдеев. Дозированный порошковый ингалятор турбухалер: особенности и место среди других ингаляционных устройств доставки // Пульмонология. 2012. № 1. С. 117–122.
3. Е.П. Терехова. Современные ингаляционные устройства, применяемые в лечении бронхиальной астмы // Эффективная фармакотерапия. Пульмонология и оториноларингология. 2013. №3 (39). С. 24–39.
4. С.Н. Авдеев. Устройства доставки ингаляционных препаратов, используемые при терапии заболеваний дыхательных путей // РМЖ. 2002. № 5. С. 255.
5. Н.Г. Колосова. Современная небулайзерная терапия респираторных инфекций у детей // Практика педиатра. 2013. С. 46–51.

6. Публикации коллектива авторов ООО «ИФК «СильверФарм»». URL: www.silver-pharm.ru (дата обращения 10.06.2017).
7. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / Под редакцией А.С. Белевского. – М.: Российское респираторное общество, 2012. 108 с.
8. H.W. Frijlink, A.H. De Boer. Dry powder inhalers for pulmonary drug delivery // Expert Opin Drug Deliv. 2004. V. 1. P. 67–86.
9. ICH Topic Q8 (R2). Part 1. Pharmaceutical Development (EMEA/CHMP/167068/2004 Note for Guidance on Pharmaceutical Development).
10. ICH Topic Q8 (R2). Part II. Annex Pharmaceutical Development (EMEA/CHMP/167068/2004 Annex to Note for Guidance on Pharmaceutical Development).
11. Н.Б. Демина. Биофармация – путь к созданию инновационных лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 8–13.
12. Федеральный закон от 12 апреля 2010 года № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
13. ICH Q9: Управление рисками по качеству / Пер. с англ. – К.: Виалек, 2008. 38 с.
14. О.А. Победин. Исследование аэродинамических свойств ингаляционных лекарственных форм: дис. ... канд. фарм. наук. – М. 2010.
15. G. Pilcer, K. Amighi. Formulation strategy and use of excipients in drug delivery // International Journal of Pharmaceutics. 2010. V. 392. P. 1–19.
16. Современные ингаляционные устройства для лечения респираторной патологии: отчет рабочей группы Европейского респираторного общества и Международного общества по использованию аэрозолей в медицине // Пульмонология. 2011. № 6. С. 17–41.
17. А.Н. Цой. Ингаляции сухих порошков – наиболее эффективный способ доставки лекарственных средств в терапии бронхообструктивных заболеваний легких // РМЖ. 2008. № 22. С. 1486.
18. N.M. Crowder, M.D. Louey, V.V. Sethuraman, H.D. Smyth, A.J. Hickey. An odyssey in inhaler formulations and design // Pharm Technol. 2001. V. 25 (7). P. 99–113.
19. C.A. Dunbar, B. Morgan, M. Van Oort, A.J. Hickey. A comparison of dry powder inhaler dose delivery characteristics using a power criterion // PDA J Pharm. Sci. Technol. 2000. V. 54(6). P. 478–484.
20. S. Newman, A. Hollingworth, A. Clark. Effect of different modes of inhalation on drug delivery from a dry powder inhaler // Int J Pharma. 1994. V. 102(1). P. 127–132.
21. X. M. Zeng, A.P. Martin, C. Marriott, J. Pritchard. The influence of carrier morphology on drug delivery by dry powder inhalers // Int J Pharm. 2000. V. 200(1). P. 93–106.
22. J. Sanchis, C. Corrigan, M.L. Levy, J.L. Viejo. Inhaler devices – from theory to practice // Respiratory Medicine. 2011. V. 107. № 4. P. 495–502.
23. D.I. Daniher, J. Zhu. Review Dry powder platform for pulmonary drug delivery // Particuology. 2008. № 6. P. 225–238.
24. Patent US № US2011 /0114092 A1, Dry Powder For Inhalation / M. Keller, R.M. Walz. – Publication Date 19.05.11.
25. M.B. Chougule, B.K. Padhi, K.A. Jinturkar, A. Misra. Development of dry powder inhalers // Recent Pat Drug Deliv Formul. 2007. V. 1(1). P. 11–21.
26. N. Yadav, A. Lohani. Dry Powder Inhalers: A Review // Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013. V. 3(2). P. 142–155.
27. Wu Linna, Xu Miao′, Ziyun Shan, Ying Huang Lu Li, Xin Pan. Stadies on the spray dried lactose as carrier for dry powder inhalation // Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, V. 9(6). 2014. P. 336–341.
28. Дж. Харри., В. Питерс. Выбор лактозы для сухого порошкового ингалятора // Фармацевтические технологии и упаковка. № 6. 2013. С. 25.
29. Handbook of pharmaceutical excipients. 4ed. – Washington DC: American Pharmaceutical Association. 2003.
30. H. Steckel, N. Bolzen. Alternative sugars as potential carriers for dry powder inhalations // Int J Pharm. 2004. V. 270(1–2). P. 297–306.
31. F. Podczeck. The relationship between physical properties of lactose monohydrate and the aerodynamic behaviour of adhered drug particles // Int J Pharm. 1998. V. 160. P. 119–130.
32. P.W.S. Heng, L.W. Chan, L.T. Lim. Quantification of the surface morphologies of lactose carriers and their effect on the in vitro deposition of salbutamol sulphate // Chem Pharm Bull, 2000. V. 48. P. 393–398.
33. N. Kaur, B. Zhou, F. Breitbeil. A delineation of diketopiperazine self-assembly processes: understanding the molecular events involved in NЄ-(fumaryl)diketopiperazine of L-Lys (FDKP) interactions // Mol. Pharm. 2008. V. 5. C. 294–315.
34. A. Pfützner, A. E. Mann, S.S. Steiner. Technosphere™/Insulin – a new approach for effective delivery of human insulin via the pulmonary route // Diabetes Technol. Ther. 2002. V. 4. C. 589–594.
35. S. Palacin, D.N. Chin, E.E. Simanek et al. Hydrogen-bonded tapes based on symmetrically substituted diketopiperazines: a robust structural motif for the engineering of molecular solids // J Am. Chem. Soc. 1997. V. 119. C. 11807–11816.
36. J.P. Rolland, B.W. Maynor, L.E. Euliss, A.E. Exner, G.M. Denison, J.M. DeSimone. Direct fabrication and harvesting of monodisperse, shape-specific nanobiomaterials // Journal of the American Chemical Society. 2005. V. 127(28). C. 96–100.
37. J.Y. Kelly and J.M. DeSimone. Shape-specific, mono-disperse nano-molding of protein particles // Journal of the American Chemical Society. 2008. V. 130(16). P. 5438–5439.
38. H. Steckel, Y.G. Brandes. A novel spray-drying technique to produce low density particles for pulmonary delivery // Int. J Pharm. 2004. V. 278(1). P. 187–195.
39. M.T. Vidgren, P.A. Vidgren, T.P. Paronen. Comparison of physical and inhalation properties of spray-dried and mechanically micronized disodium-cromoglycate // Int. J Pharm. 1987. V. 35. P. 139–144.
40. H. Schiavone, S. Palakodaty, A. Clark, P. York, S.T. Tzannis. Evaluation of SCF-engineered particle-based lactose blends in passive dry powder inhalers // Int. J Pharm. 2004. V. 281(102). P. 55–66.
41. А.Г. Огиенко, Е.Г. Зевак, А.А. Огиенко, С.А. Мызь // Наука из первых рук. 2012. № 3(45). С. 108–111.
42. O.S. Sudah, D. Coffin-Beach, F.J. Muzzio. Effects of blender rotational speed and discharge on the homogeneity of cohesive and free-flowing mixtures // Int. J Pharm. 2002. V. 247(1–2). P. 57–68.
43. Технический бюллетень компании HOSOKAWA MICRON B.V., Netherlands // Cyclomix for blending DPI formulations. 2004. С. 12.
44. А.Н. Цой. Факторы эффективности ингаляционной терапии и выбор порошкового ингалятора // Пульмонология и аллергология. 2009. № 3. С. 16–20.
45. L. Borgstrom, E. Bondesson, F. Moren et al. Lung deposition of budesonide inhaled via Turbuhaler: a comparison with terbutaline sulphate in normal subjects // Eur. Respir. J. 1994. V. 7. P. 69–73.
46. A. Leone-Bay, R. Baughman, C. Smutney, J. Kocinsky. Innovation in drug delivery by inhalation. – Frederick Furness Publishing. 2010. URL: www.ondrugdelivery. com. (дата обращения 20.07.2017).
47. Н.Б. Демина, М.С. Демин. Разработка технологии производства капсульных форм лекарственных препаратов // Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации / Под ред. Быковского С.Н., Василенко И.А., Деминой Н.Б., Шохина И.Е., Новожилова О.В., Мешковского А.П., Спицкого О.Р. – М.: Изд-во Перо, 2015. С. 196–236.
48. An examination of differences between gelatin and HPMC capsules and their respective contributions to DPI formulations. Matt Richardson Capsugel. URL: http://www.capsugel.com/ (дата обращения 13.06.17).
49. Измерение кислородопроницаемости упаковочных материалов. URL: https://www.czl.ru/blog/measuring-oxygen-permeability-packaging-materials/ (дата обращения 13.06.2017).
50. E.T. Cole. Liquid filled and sealed hard gelatin capsules. Gattefossé Bulletin. 1999. № 92.

УДК 615.322

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕЖИМОВ СУШКИ НА ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА БИОМАССЫ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ЖЕНЬШЕНЯ

Н.И. Лаевская[1]*, Ю.С. Селютина[2], И.Е. Каухова[2], Н.С. Пивоварова[2]

Резюме. На данный момент актуальной остается задача получения высокоэффективных препаратов растительного происхождения широкого спектра действия для использования в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности. В статье изучено влияние параметров процесса сушки на показатели качества биомассы женьшеня: состав биологически активных веществ (БАВ) и антиоксидантную активность (АОА). Установлено, что антиоксидантная активность спиртоводных извлечений из биомассы клеточной культуры женьшеня увеличивается при повышении температуры сушки исходного сырья. Проведенные качественный и количественный анализы показали подлинность биомассы по отношению к контролю, которым послужила настойка корня женьшеня.

Ключевые слова: биомасса женьшеня, влажность, антиоксидантная активность, спектрофотометрический метод, тонкослойная хроматография (ТСХ), гликопептидный комплекс (ГПК).

STUDYING OF DRYING CONDITION IMPACT ON GINSENG TISSUE CULTURE BIOMASS QUALITY INDICATOR

N.I. Laevskaia[1], Y.S. Selyutina[2], I.Ye. Kaukhova[2], N.S. Pivovarova[2]

Abstract. At the moment the task of obtaining high-efficient plant medicinal with wide range of action to be used for pharmaceutical, cosmetic, food industry as a biologically active additives remains valid. The ginseng tissue culture drying parameters impact on the biomass quality (chemistry of biologically active substances and antioxidant activity) is studied in this article. It was identified that increasing temperature and decrease the drying time of ginseng tissue increases antioxidant activity. Qualitative and quantitative analyses confirmed authenticity of the biomass compared to the control (ginseng root tincture).

Keywords: ginseng, moisture, antioxidant activity, spectrophotometric method, thin layer chromatography (TLC), glycopeptide complex (GPC).

1 – ООО «Химико-биологическое объединение при РАН «Фирма Вита», 192148, Россия, г. Санкт-Петербург, Старопутиловский вал, 7, к. 2, лит. А

2 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации,, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14

1 – CHEMICAL & BIOLOGICAL ASSOCIATION at RAS «FIRM VITA» Ltd., 7/2, lit. A, Staroputilovsky val, Saint Petersburg, 192148, Russia

2 – St. Petersburg state chemical-pharmaceutical Academy, 14, Professor Popov str., Saint Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: proizvodstvo4@preobrajenie.com
Тел.: +7(911) 950 07 49

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых безопасных адаптогенных средств, повышающих общую неспецифическую резистентность организма к различным неблагоприятным факторам (стресс, повышенная радиация, гипоксия и др.), является актуальной задачей современной фармакологии. Известно успешное применение с этой целью адаптогенов растительного происхождения – женьшеня, родиолы розовой и других.

На фармацевтическом рынке РФ представлены следующие препараты женьшеня: «Гинсана», «Доппельгерц женьшень», «Гербион женьшень», «Теравит антистресс», «Геримакс женьшень»; БАДы «Геримакс энерджи», «Витамакс»; настойки женьшеня производства Тверской, Ивановской, Тульской фармацевтических фабрик, ЗАО «Вифитех», ООО «Камелия НПП» и др. [1].

Препараты из биомассы культуры ткани женьшеня представляют интерес в качестве источника лекарственного сырья и обладают широким пределом безопасности [2].

В литературных данных показана достаточно выраженная антиоксидантная активность фитоадаптогенов семейства аралиевых, которую связывают с антиатерогенным [3] и антигипоксическим действием препаратов биомассы клеточной культуры женьшеня [4].

Значительное число публикаций посвящено изучению физиологических свойств препаратов биомассы клеточной культуры женьшеня [2, 3, 4].

Цель настоящей работы заключалась в изучении влияния режимов сушки на уровень антиоксидантной активности извлечений из биомассы клеточной культуры женьшеня.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явилась измельченная высушенная биомасса женьшеня. Биомассу получают методом культивирования культуры клеток на твердой агаровой питательной среде. Питательной средой являлась модифицированная среда Мурасиге – Скуга. Культивацию проводят по стандартной методике [5]. На 28–30-й день культивирования в темноте при 25–27 °С биомассу снимают с питательной среды и высушивают на бумажных поддонах до воздушно-сухого состояния в сухожаровых шкафах при определенных температурах. После чего биомассу растирают в ступке, отбирают фракцию 0,0–0,5 мм (измельчают до порошкообразного состояния). Заливают растворителем (40% этанол), настаивают (24 ч). В извлечении из биомассы определяют уровень АОА.

1. Для количественной оценки АОА извлечений из сухой биомассы использовали метод спектрофотометрии с орто-дианизидином и рибофлавином при длине волны 460 нм [6].

Для приготовления контрольной пробы готовят раствор рибофлавина R4500 3,76 мкг/мл. Навеску 0,0244 г орто-дианизидина D3252 растворяют в 5 мл воды + 5 мл спирта этилового 96%. Далее 1,4 мл 0,2 М фосфатного буфера с pH 7,8, 40 мкл раствора орто-дианизидина, 300 мкл рибофлавина переносят в пробирки объемом 8 мл.

Опытная и контрольная пробы стоят при комнатной температуре 6 минут.

В опытную пробу добавляют 10 мкл исследуемого препарата. Для приготовления пробы извлечение тщательно перемешивают и отбирают 10 мкл автоматической пипеткой.

Опытные и контрольную пробы подвергают УФ-облучению в течение 10 мин на расстоянии 100 мм от источника облучения, затем измеряют оптическую плотность образцов на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 460 нм.

По измеренной оптической плотности рассчитывают АОА в условных оптических единицах по формуле:

$$АОА=D_{460}\times1000/10,$$

где D_{460} – величина оптической плотности при 460 нм; 10 – объем пробы в мкл; 1000 – пересчет на 1 мл пробы.

2. Определение влажности сырья проводили в соответствии с ГФ XIII (ОФС.1.5.3.0007.15), т. 2, стр. 413 [7].

3. Качественный анализ биомассы проводили методом тонкослойной хроматографии (ГФ XIII, т. 1., С. 482, ОФС.1.2.1.2.0003.15). В работе использовали пластины Silufol. Контроль: настойка женьшеня (25 мл, корни женьшеня, ЗАО «ВИФИТЕХ», партия 020909, годен до 2017 г.). Система растворителей: н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:5); Детектирование: 0,1% раствор нингидрина в спирте этиловом 96% при нагревании до 105–110 °С 10 минут.

4. Количественное содержание ГПК проводили по оригинальной методике [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки влияния температурного режима сушки биомассу женьшеня сушили при температуре 60 °С, 80 °С и 90 °С в течение 60 минут, затем определяли влажность и АОА образцов (таблица 1).

Таблица 1.

Влияние режимов сушки на антиоксидантную активность извлечений из биомассы женьшеня

Температурный режим	№ образца	Масса сухой ткани, г	Влажность, %	Σ, среднее, %	АОА, у.е.	Σ, среднее, у.е.
60 °С	1	0,5	1,52	1,89	50,57	75,03
	2	0,5	1,82		86,04	
	3	0,5	2,34		88,49	
80 °С	4	0,5	0,68	0,80	92,01	80,86
	5	0,5	0,92		82,46	
	6	0,5	0,81		68,10	
90 °С	7	0,5	0,64	0,74	83,13	88,82
	8	0,5	0,77		89,78	
	9	0,5	0,80		93,55	

Результаты качественного анализа биомассы женьшеня представлены на рисунке 1 в виде схемы хроматограммы.

Установлено, что во всех извлечениях присутствуют углеводы (Rf 0,1–0,11), гликозиды тритерпеновых сапонинов (Rf 0,2–0,7), эфиры олеаноловой кислоты (Rf 0,8–0,85), β-ситостерин (Rf 0,9–0,99).

По данным хроматографического исследования можно сделать вывод, что в образцах 2, 3 и 4 содержатся такие же БАВ, что и в контроле 1.

Таким образом, при увеличении температуры сушки биомассы женьшеня уменьшается количественное содержание ГПК в извлечении почти вдвое, возможно это связано с частичным разрушением комплекса БАВ.

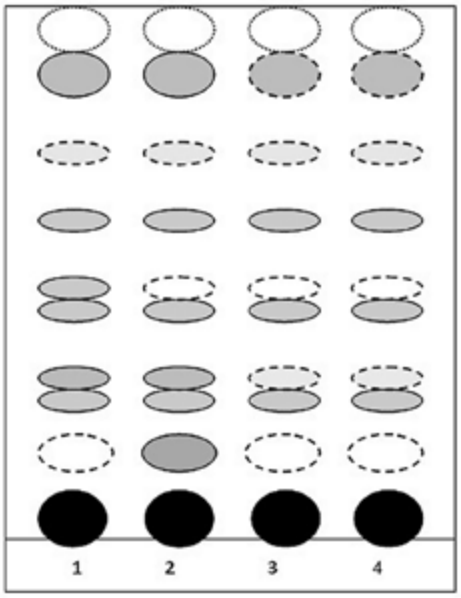


Рисунок 1. Схема хроматограммы качественного анализа БАВ 40% спиртовых извлечений

1 – контроль (настойка женьшеня корня на 40% этиловом спирте); 2 – спиртовое извлечение из биомассы женьшеня, высушенной при 60 °С; 3 – спиртовое извлечение из биомассы женьшеня, высушенной при 80 °С; 4 – спиртовое извлечение из биомассы женьшеня, высушенной при 90 °С

Таблица 2.

Результаты хроматографического анализа БАВ 40% спиртовых извлечений

Вещество	Значения R_f			
	Контроль № 1	Извлечение № 2	Извлечение № 3	Извлечение № 4
β-ситостерин	0,99	0,99	0,99	0,99
Олеаноловая кислота	0,84	0,82	0,84	0,84
Гликозид Rh_2	0,71	0,70	0,73	0,73
Гликозид Rh_1	0,61	0,60	0,62	0,62
Гликозид Rg_1	0,52	0,52	0,51	0,51
Гликозид Rf	0,47	0,46	0,47	0,47
Гликозид Rd	0,39	0,38	0,38	0,38
Гликозид Rc	0,31	0,32	0,31	0,31
Гликозид Rb	0,22	0,21	0,21	0,21
Полисахариды	0,11	0,10	0,11	0,11

Таблица 3.

Влияние режимов сушки на содержание ГПК в извлечениях из биомассы женьшеня

Экстрагент	Содержание ГПК, %		
40% этиловый спирт	60 °С	80 °С	90 °С
	0,139±0,010	0,064±0,003	0,064±0,003

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование влияния режимов сушки биомассы женьшеня показало, что при повышении температуры до 80–90 °С содержание ГПК в извлечении уменьшается, но при этом увеличивается АОА. Такой температурный режим является предпочтительным при разработке адаптогенных препаратов на основе биомассы клеточной культуры женьшеня.

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр лекарственных средств России: РЛС. Энциклопедия лекарств. Инструкция, применение, описание. URL: http://www.rlsnet.ru. (дата обращения 07.02.2017).
2. Р.Н. Аляутдин, Ф.П. Крендаль. Оценка безопасности биотехнологического женьшеня в эксперименте // Биомедицина. 2011. № 3. С. 112–115.
3. А.Н. Рябков, А.А. Слепнев. Изучение антиатерогенных свойств препаратов из биомассы клеточных культур женьшеня и полисциаса папоротниколистного // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. 2013. № 2. С. 66–70.
4. А.Н. Рябков. Влияние препарата из биомассы культуры ткани женьшеня на биохимические параметры эритроцитов при экспериментальной гипоксии // Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. 2014. № 1. С. 66–71.
5. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Под ред. Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1991. 273 с.
6. ТУ 9154-060-49011274-2006. Культуры растительных тканей для производства косметических средств.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, 2. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/ (дата обращения 15.02.2017).
8. Н.С. Кузьмина, Л.И. Слепян, А.Л. Марченко. Гликопептидный комплекс (ГПК) листьев *Polyscias filicifolia* (Moore ex Fournier) Bailey, корней и препаратов женьшеня *Panax ginseng* С.А. Меу и биомассы клеток этих растений // Растительные ресурсы. 2008. Т. 44. Вып. 4. С. 155–164.
9. Н.Л. Наумова. Современный взгляд на проблему исследования антиоксидантной активности пищевых продуктов // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». 2014. Т. 2. № 1. С. 5–8.

МИНПРОМТОРГ РОССИИ

ГИЛС и НП

ВТОРАЯ ВСЕРОССИЙСКАЯ GMP КОНФЕРЕНЦИЯ

GMP
НАДЛЕЖАЩАЯ ПРАКТИКА

18-20 сентября 2017 года

г. Геленджик,
«Кемпински Гранд Отель Геленджик»

- 800 участников
- Более 20 делегаций из разных стран мира
- Эксперты в области надлежащих практик мирового уровня
- Глобальные тренды в области GMP, GDP, GEP
- Обсуждения, дискуссии, практические сессии
- Кубок GMP-2017 по теннису

Участие бесплатное

www.gmp-conference.gosgmp.ru

Генеральный партнер

phs Фармстандарт

Официальный партнер

Гедеон Рихтер

16+

Технический оператор: Центр корпоративных коммуникаций S-GROUP
Тел.: +7 (499) 340 25 11, info@sgr.com.ru, www.sgr.com.ru

УДК 615.3

КИЗЕЛЬГУР ПРИ ОСАЖДЕНИИ ПРИМЕСНЫХ БЕЛКОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДНОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА ИНСУЛИНА

А.Е. Полудин[1]*, Д.А. Гусаров[1], Д.А. Буровик[1]

Резюме. В статье описывается возможность промышленного применения кизельгура при осаждении примесных белков. В результате проведенных опытов и проанализированных результатов показана эффективность применения кизельгура в работе. Продемонстрировано, что с помощью кизельгура удается значительно повысить скорость осаждения балластных белков в производственной технологии получения рекомбинантного гибридного белка инсулина предшественника.

Ключевые слова: кизельгур, примесные белки, осаждение, гибридный белок инсулин.

DIATOMACEOUS EARTH DURING THE DEPOSITION OF THE IMPURITY PROTEINS IN THE PRODUCTION OF HYBRID PRECURSOR OF INSULIN

A.E. Poludin[1]*, D.A. Gusarov[1], D.A.Burovik[1]

Abstract. The article describes the goal of utilization of diatomiceous earth for the impurities of protein nature sedimentation. The experiments done showed and proved the efficiency of diatomiceous earth as a flocculation agent in the insulin fusion protein production. It was shown that insulin fusion protein being in the solution might be easily separated from admixtures by means of isoelectric point sedimentation with a success help of diatomic earth facilitation the precipitation.

Keywords: diatomaceous earth, impurity proteins, precipitation, insulin fusion protein.

1 – ОАО «Герофарм-Био», 142279, Россия, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск

1 – «GEROPHARM-Bio», Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, 142279, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: poludin@list.ru

ВВЕДНИЕ

Препараты на основе генно-инженерного инсулина человека в настоящее время являются основным вариантом заместительной терапии сахарного диабета. При этом наиболее известным и зарекомендовавшим себя способом получения инсулина является технология рекомбинантных ДНК, манипулирующая генным материалом продуцентов бактериальной или дрожжевой природы с целью биосинтеза рекомбинантного предшественника (РП) инсулина. В свою очередь, инсулин может быть легко выделен из РП посредством методов ферментативного расщепления и/или процессинга [1].

В свою очередь, РП синтезируется в клетках продуцента, как правило, в виде нерастворимых в физиологических условиях агрегатов, так называемых телец включения (ТВ). И первой стадией даунстрим-процесса получения инсулина, очевидно, является выделение РП из ТВ. При этом РП должен приобрести правильную третичную структуру, быть в мономерной конформации, и, кроме того, должен быть очищен от балластных примесей (которые синтезируются продуцентом помимо целевых ТВ), мешающих последующим операциям ферментативного расщепления и процессинга с образованием нативной молекулы инсулина [2].

На производстве ОАО «Герофарм-Био» получают генно-инженерный инсулин человека путем культивирования штамма-продуцента *Escherichia coli*, выделения ТВ, содержащих РП, растворение в хаотропных условиях и восстановление дисульфидных связей (процесс денатурации). Затем с помощью процедуры ренатурации целевому продукту РП придают корректную третичную структуру с одновременным нативным замыканием дисульфидных связей.

Однако одной из проблем данного способа являются примесные балластные белки *E. coli*, которые не позволяют эффективно выделить из ренатурированного РП молекулу инсулина в ходе последующих стадий процесса.

Цель данного исследования – изучить возможность применения процедуры флокуляции с помощью диатомитовой замли (кизельгура) балластных примесей и получения очищенного ренатурированного РП.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во всех опытах использовали тельца включения, полученные на производстве ОАО «Герофарм-Био» (Оболенск, Россия) в ходе промышленной ферментации штамма-продуцента *E. coli* JM109/pPins 07. В работе использовали реакторы вместимостью 1000 л (Olsa S.p.A, Италия) и кизельгур фирмы PALL SeitzSchenk SUPER (Pall GMBH, Германия). Степень флокуляции оценивали визуально, содержание целевого белка – с помощью метода контроля на основе фармакопейной ОФ-ВЭЖХ [3]. Кратко: проводили анализ на приборе Dionex 3000 (Thermo Scientific, Германия), оснащенном плунжерным насосом высокого давления, DAD-детектором, термостатом колонки и автосэмплером. Хроматографирование проводили на колонке Luna(2) C18, 5 мкм, 10 нм, размером 250x4,6 мм (Phenomenex, США). Детектирование проводили при длине волны 214 нм. Подвижные фазы готовили как описано в [3]: подвижная фаза А состояла из 10 % об. ацетонитрила, 20% об. сульфатного буфера с pH 2,0, 70% об. воды для инъекций; подвижная фаза Б состояла из 40% об. ацетонитрила, 20% об. сульфатного буфера с pH 2,0, 40% об. воды для инъекций. Скорость потока 1 мл/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Флокуляция – разновидность коагуляции [слипание частиц коллоидной системы при их столкновениях в процессе теплового (броуновского) движения, перемешивания или направленного перемешивания во внешнем силовом поле]. Образовавшиеся флокулы без электрического заряда начинают выпадать в осадок. Поэтому в белковой химии используют флокуляцию примесей в условиях, близких к их изоэлектрической точке. Нами было сделано предположение, что скорость флокуляции можно увеличить, если добавить в систему тяжелый и нейтральный флокулянт, например кизельгур.

Диатомит (кизельгур) [4] – осадочная горная порода, состоящая преимущественно из остатков диатомовых водорослей. Обычно рыхлая или слабо сцементированная, светло-серого или желтоватого цвета. Границы размеров породы находятся в пределах от 3 мкм до 1 мм, но чаще всего размер частиц достигает 10–200 мкм [5] (рисунок 1).

Наша гипотеза заключалась в следующем. Балластные белки *E. coli* имеют тенденцию к осаждению при pH 5,5-6,5. При этом целевой белок (РП) в этих условиях находится в растворенной форме. После корректировки pH балластные белки начинают оседать, но этот процесс очень длителен. Добавляемый к суспензии кизельгур, будучи сильно пористым и тяжелым материалом с высокой сорбционной активностью, может способствовать ускорению осаждения, выступая в качестве флокулянта. После добавления кизельгура в реактор с суспензией под воздействием силы тяжести кизельгур начинает быстро оседать, поры

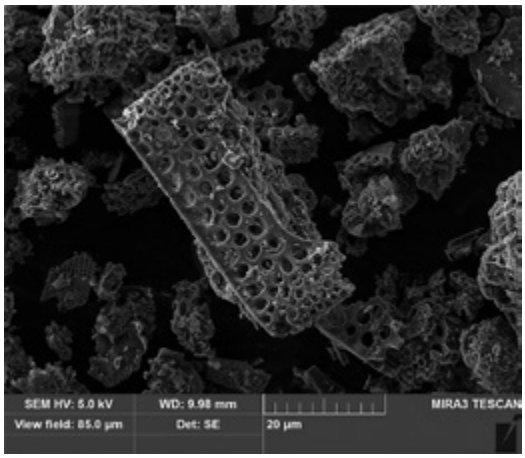


Рисунок 1. Частицы диатомита в микромасштабе (увеличение x5000)

захватывают с собой хлопья, размер которых превышает 10 мкм.

Гипотезу проверяли визуально с помощью отстаивания суспензии балластных белков в растворе РП в мерном цилиндре. Для этого использовали одинаковые мерные цилиндры, в один из которых приливали суспензию без кизельгура, во второй – с 2,5% (масс.) кизельгура, в третий – 5,0%, в четвертый – 10,0% (рисунок 2). В течение 90 мин наблюдали за скоростью и степенью осаждения примесных белков. Замеры по рискам цилиндра послужили основой для построения графического описания процесса флокуляции кизельгуром (рисунок 3). Из графика видно, что добавление кизельгура делает осадок минимальным и увеличивает скорость осаждения. При этом разница между 5 и 10% добавлением кизельгура минимальна. Таким образом, в промышленном формате в реакторах вместимостью 1000 л мы использовали 5% добавление кизельгура к суспензии.

В промышленном масштабе после нескольких производственных серий флокуляции балластных белков из раствора РП стало возможным достоверно определить влияние кизельгура на объем потерь целевого продукта, который остается в сформировавшемся осадке после флокуляции. Очевидно, что чем больше объем осадка, тем больше в нем остатков целевого растворенного РП, и наоборот, чем плотнее осадок, тем меньше потери.

Процесс изучался по результатам десяти производственных циклов: пять циклов осаждения примесных белков без кизельгура и пять циклов осаждения примесных белков с кизельгуром 5,0% (масс.).

Проанализировав данные циклов, построили график полученного объема осадка примесных белков (рисунок 4) и график потерь инсулина, который содержится в осадке (рисунок 5).

Без кизельгура за 12 ч только 80–85% раствора было избавлено от балластных белков. А для того чтобы достичь хотя бы уровня в 10% потерь целевого РП

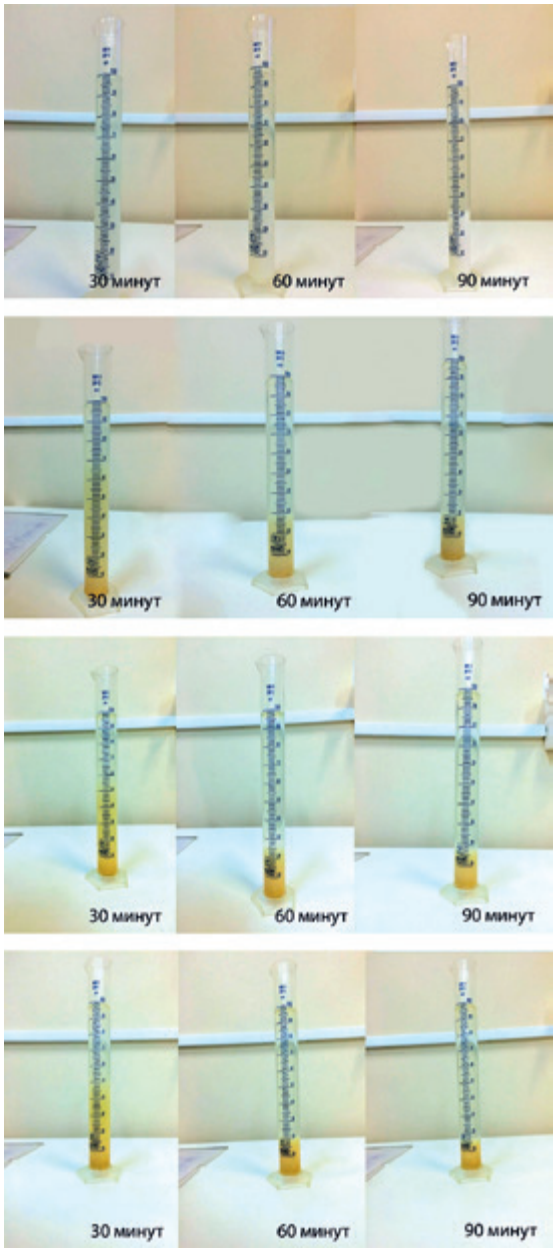


Рисунок 2. Осаждение примесных белков, фото сверху вниз: без кизельгура, с кизельгуром 2,5%, с кизельгуром 5,0%, с кизельгуром 10,0%

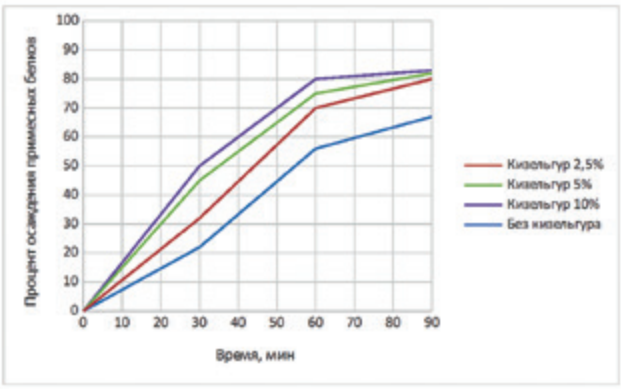


Рисунок 3. Осаждение примесных белков с добавлением и без кизельгура

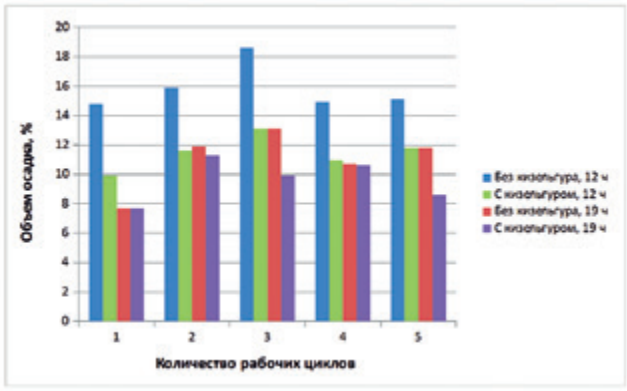


Рисунок 4. Объем осадка примесных белков

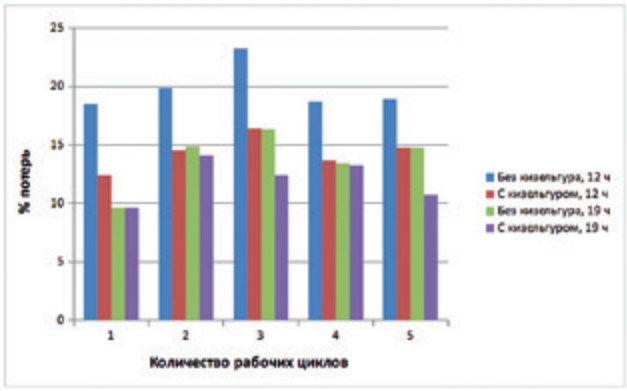


Рисунок 5. Процент потерь инсулина в осадке

в осадке, потребовалось осаждать балластные белки в течение 19 ч. В то же время при использовании 5% кизельгура в качестве флокулянта осадок поджимался до 10% объема в среднем на семь часов быстрее.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

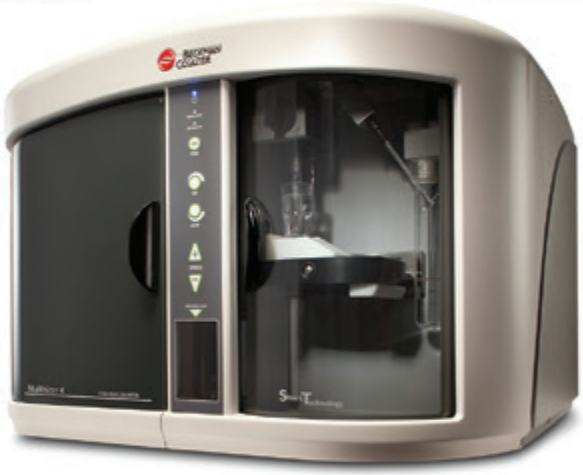
При использовании кизельгура процесс осаждения примесных соединений проходит быстрее и образуется более плотный осадок, что позволяет сократить количество потерь на стадии флокуляции балластных белков. Кизельгур может быть рекомендован для использования в качестве флокулянта в промышленном масштабе производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д.И. Баирамашвили, Е.М. Беликова, Д.А. Кудлай. Анализ отечественного рынка лекарственных препаратов инсулина человека // Биофармацевтический журнал. 2010. Т. 2 (1). С. 3–13.
2. Молекулярная биология. Структура и функции белков / Степанов В.М.: Учеб. для биол. спец. вузов / Под ред. А.С. Спирина – М.: Высшая школа, 1996. 335 с.
3. Европейская Фармакопея, 8.2, электронная версия, статья 01/2011:0838.
4. Геологический словарь: в 2-х томах / Х. А. Арсланова, М. Н. Голубчина, А. Д. Искандерова и др.; под ред. К. Н. Паффенгольца. – 2-е изд., испр. – М.: Недра, 1978.
5. Кизельгур. URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Кизельгур.html (дата обращения 16.06.2017).

BECKMAN COULTER

Анализаторы Beckman Coulter Life Sciences для контроля качества сырья и мониторинга технологических процессов



Анализатор размера и количества частиц и клеток методом Культера

Multisizer 4e

Расширенные возможности анализа:

- диапазон размеров частиц: 0,2 – 1 600 мкм
- диапазон измерения: 2 – 80% от размера апертуры
- динамический диапазон: 1 : 40 (диаметр), 1 : 64 000 (объем)

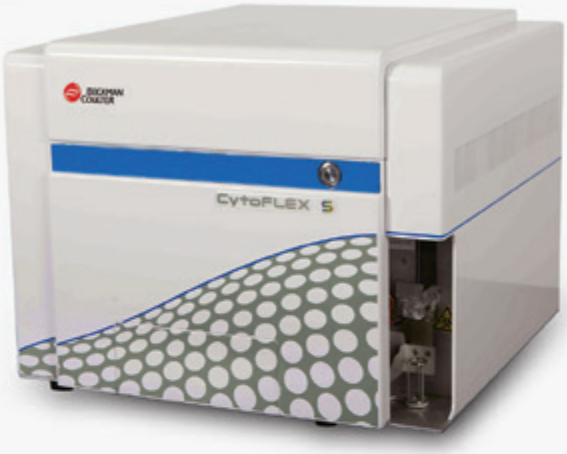


Анализатор размеров частиц методом лазерной дифракции

LS 13 320

- диапазон размера частиц 0,4 мкм – 2 мм
- 126 точек измерения для диапазона от 400 нм до 2 000 мкм
- 42 точки измерения для диапазона 17 – 400 нм





Анализатор жизнеспособности клеток Vi-CELL XR

Подсчет количества концентрации, скорости роста и времени удвоения биомассы

- Диапазон концентрации 5 x 10^4 – 1 x 10^7 клеток/мл
- Размер анализируемых клеток 2 – 70 мкм

Проточный цитометр CytoFLEX

Гидродинамическая фокусировка

Скорость сбора данных 30 000 событий в секунду:

- Регистрация частиц диаметром от 200 нм
- Чувствительность каналов регистрации флуоресценции: FITC < 30 MESF и PE < 10 MESF

АНАЛИЗАТОРЫ BECKMAN COULTER LIFE SCIENCES – ОПТИМАЛЬНОЕ РЕШЕНИЕ ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА И ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЗАДАЧ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ!

Pharmcontract® group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

www.phct-group.com

info@phct-group.com

УДК 66.08; 66-911; 665.58

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

В.А. Вайнштейн[1]*

Резюме. Исследована возможность определения структурно-механических свойств мазевых и кремовых консистентных основ – предела текучести, скорости и степени релаксации напряжений и тиксотропного восстановления структуры. Предлагаемый способ заключается в измерении напряжения, возникающего при погружении тестера в консистентную массу, и определении скорости изменения показаний тензометрического датчика. Зависимость механического напряжения, измеряемого в процессе релаксации, от логарифма времени имеет линейный характер, что позволяет просто и удобно определять структурно-механические свойства испытуемых образцов.

Ключевые слова: структурно-механические свойства, тиксотропия, релаксация напряжений, вязкость, мазевые основы.

DETERMINATION OF STRUCTURAL-MECHANICAL PROPERTIES OF SOFT DRUGS

V.A. Vainshtein[1]*

Abstract. The possibility of determining the structural and mechanical properties of ointment and creamy bases, such as the yield point, speed and degree of stress relaxation and thixotropic structure restoration, is described. The proposed method consists in measuring the mechanical stress that occurs when the tester is immersed in a consistency mass. The dependence of the mechanical stress measured in the process of relaxation on the logarithm of time is linear, which makes it simple and convenient to determine the structural and mechanical properties of the test samples.

Keywords: structural and mechanical properties, thixotropy, stress relaxation, viscosity, ointment bases.

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 and pharmaceutical academy, Ministry of Healthcare, 14/A, Prof. Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: victor.vainshtein@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее известной и обычно измеряемой характеристикой вязких (упруго-пластичных, вязко-пластичных) материалов является динамическая вязкость [1].

При движении реальной жидкости в ней возникают силы внутреннего трения, оказывающие сопротивление движению. Эти силы действуют между соседними слоями жидкости, перемещающимися друг относительно друга.

Свойство жидкости оказывать сопротивление усилиям, вызывающим относительное перемещение ее частиц, называется вязкостью [2].

Как известно, сила внутреннего трения $F_т$ прямо пропорциональна градиенту скорости dv/dh и площади поверхности слоя движущейся жидкости – закон вязкого трения Ньютона.

$$F_т = \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{S} \cdot dv/dh.$$

Коэффициент вязкости **μ** [Па·с] численно равен силе трения между слоями жидкости единичной площади при градиенте скорости, равном единице. Жидкость, для которой коэффициент вязкости не зависит от скорости течения, называется ньютоновской. Жидкости, для которых кажущаяся вязкость изменяется в зависимости от скорости сдвига, называются неньютоновскими.

Вязко-пластическими (упруго-пластическими, бингамовскими) называют среды, течение которых начинается лишь после превышения некоторого критического напряжения $\boldsymbol{\tau_0}$, называемого пределом текучести. Кривая течения таких сред при скорости сдвига, равной 0, отсекает на оси напряжений отрезок конечной длины, равной τ_0. Иными словами, τ_0 – это напряжение, которое необходимо приложить для разрушения образовавшейся из агрегатов структуры, чтобы среда начала необратимо деформироваться.

Таким образом, динамическая вязкость является механической характеристикой систем в процессе движения, то есть относительного перемещения слоев под действием внешней силы, прилагаемого извне напряжения.

Приборы, наиболее часто применяемые для определения динамической вязкости упру-

го-пластичных систем, – ротационные вискозиметры Брукфильда, «Реотест»; вискозиметр Гепплера (с падающим шариком). Эти приборы широко описаны в литературе и проспектах фирм-изготовителей.

Известен прибор, измеряющий консистенцию упруго-пластичных материалов путем измерения пенетрации, то есть расстояния (в десятых долях миллиметра), на которое тестовое тело в виде конуса проникает в образец за фиксированный момент времени при заданной температуре. Это пенетрометр PNR12 австрийской компании Anton Paar [3]. Результатом определения является глубина проникновения тестера в материал при фиксированных условиях. Прибор удобен для сравнительного изучения жесткости упруго-пластичных материалов, например вазелина. Однако этот принцип не позволяет измерить предел текучести в принятых единицах измерения, а также определить параметры релаксации напряжений в упруго-пластичных материалах – скорость и степень тиксотропного восстановления структуры после принудительной деформации.

В ряде случаев представляет интерес изучение механических свойств, обусловленных внутренней структурой упруго-пластичных материалов (УПМ) – кремов, консистентных эмульсий, гелей, мазей, упруго-пластичных материалов и т.п. – в статическом режиме, при отсутствии механического перемещения слоев. Практически и теоретически это имеет значение для:

1) определения консистенции, густоты или жесткости материала, предела текучести в состоянии покоя, например при хранении или технологической экспозиции;
2) определения остаточного сопротивления материала (консистенции, густоты, предела текучести) после некоторого разрушения структуры, например в процессе применения (намазывания мази или крема) или технологической обработки;
3) изучения параметров релаксации напряжений (скорости и степени изменения) в материале и тиксотропного восстановления структуры после приложения определенной нагрузки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы: вазелин (ГФ XIII, ФС.2.2.0003.15); ланолин безводный (Россия, CAS 8020-84-6); масла касторовое, соевое, какао (ГФ XIII, ОФС.1.5.2.0002.15 «Масла жирные растительные»); моноглицериды дистиллированные Е471 (МГД) марки 2 (INCI: GLYCERYL MONOSTEARATE, НЖМК, Россия); стеарин косметический (INCI: Stearic Acid); воск пчелиный; спирты жирные высшие C_{16}-C_{18} (INCI: FATTY ALCOHOLS); эмульгин В2 (оксиэтилированные высшие спирты, INCI: Ceteareth-20); эмульсионный воск (INCI: Emulsifying Wax., Россия); кремофор RH-40 (INCI Name: PEG-40 Hydrogenated Castor Oil; рег. № П N013635/01, «БАСФ СЕ», Германия); изопропилмиристат (INCI: ISOPROPYL MYRISTATE); диметикон 350 (INCI: DIMETHICONE); пропиленгликоль (Е 1520, CAS NR 57-55-6); эфирные масла эвкалипта, розмарина, чайного дерева («АСПЕРА», Россия); ментол (ФС.2.1.0026.15 «Рацементол», Россия).

Методы: Для исследования структурно-механических свойств нами сконструирован прибор, позволяющий определять сопротивление структуры упруго-пластичного материала путем погружения в образец тестера (рисунки 1, 2).

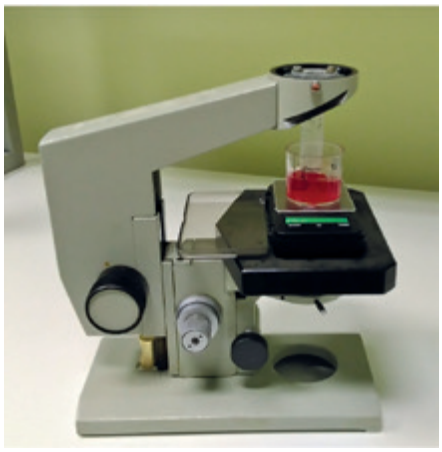


Рисунок 1. Прибор-макет для измерения сопротивления структуры упруго-пластичных материалов

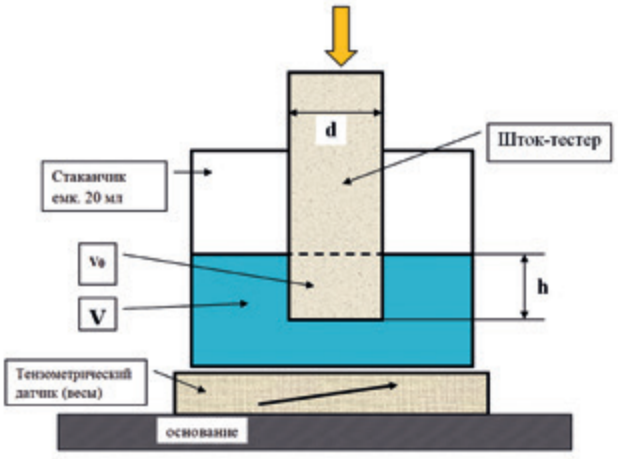


Рисунок 2. Схема прибора для измерения сопротивления структуры упруго-пластичных материалов

В описываемом приборе в качестве контейнера для испытуемого материала взят пластмассовый стаканчик емкостью 20 мл.

Шток-тестер – полиэтиленовый цилиндр с закрытым дном диаметром d=14,0 мм. Тестер укреплен на специальном подвижном штативе, с помощью которого можно поднимать или опускать тестер на заданную величину перемещения.

Стакан помещен на весы (тензометрический датчик): диапазон показаний весов – до 200 г, точность – 0,01 г.

Описание проведения процедуры измерения

Вначале необходимо определить объем жидкости, вытесняемой погружением тестера в материал. В стаканчик вносят определенный объем воды, например 10 мл. Обнуляют показания весов. Опускают тестер в нижнее фиксированное положение, которое задается ограничителем подобранной высоты. Записывают массу вытесненной воды. Поскольку плотность воды – 1,0 г/мл, то объем v_0 численно равен массе вытесненной воды, то есть показанию весов.

Затем приступают к измерению испытуемого материала (крема, вазелина, геля и т.п.). Чистый сухой стаканчик помещают на весы и обнуляют показания. Вносят в стаканчик с помощью шприца определенный объем V=10 мл испытуемого материала и записывают вес пробы m. В случае недостаточно текучего материала (например, вазелин, ланолин) вносят его в расплавленном виде с помощью шприца, а затем термостатируют стаканчик с пробой при заданной температуре измерения. Определяют плотность испытуемого материала $\rho = \frac{m}{V}$. Стаканчик с пробой термостатируют при заданной температуре, например 25 °С.

Помещают стаканчик на весы и обнуляют показания весов. Аккуратно опускают тестер, не касаясь поверхности материала.

Затем быстрым движением вводят тестер в материал до нижнего фиксированного положения и одновременно включают секундомер. Записывают показания весов каждые 5 с в течение первых 20–30 с, затем с интервалами 10 с. В общей сложности измерение длится до 70–100 с.

По мере проведения измерения показания весов изменяются (снижаются) все более медленно.

В момент погружения тестера в материал наблюдается максимальное **показание весов F** (в граммах силы), показывающее силу, необходимую для разрушения структуры $f_{структ}$ в состоянии покоя, плюс архимедову силу выталкивания – вес вытесненного материала.

$$F = f_{структ} + v_0 \cdot \rho,$$

где $v_0 \cdot \rho$ – вес вытесненного материала (сила Архимеда).

Затем наблюдается снижение показания весов F вследствие релаксации внутренней структуры материала; $f_{структ}$ снижается. При этом происходит тиксотропное восстановление структуры в новой геометрической форме с погруженным тестером. Для исключения влияния площади тестера следует принимать в расчет не силу, а напряжение **σ**, то есть $\sigma = 4\, f_{структ}/\pi d^2$. Напряжение должно быть выражено в системе СИ, то есть в Па [1 г силы/см^2 (gf/cm^2) = 98,07 Па].

Таким образом, напряжение сопротивления структуры σ в Па рассчитывается по формуле:

$$\sigma = 4(F - v_0\rho)98/\pi d^2.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Апробация способа определения структурно-механических свойств предлагаемым способом была выполнена на вазелине и ряде косметических составов – кремов и эмульгелей. В таблице 1 приведены результаты измерения структурно-механических свойств вазелина. Измерение выполнено в трех повторностях.

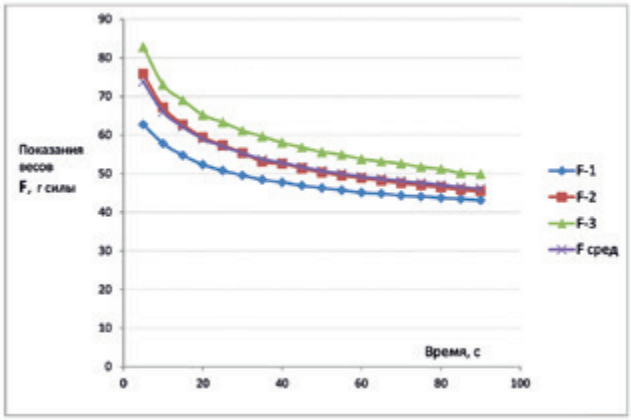


Рисунок 3. Зависимость показания весов $F=f_{структ} + v_0 \cdot \rho$ от времени при введенном тестере. Температура образцов – 25 °С

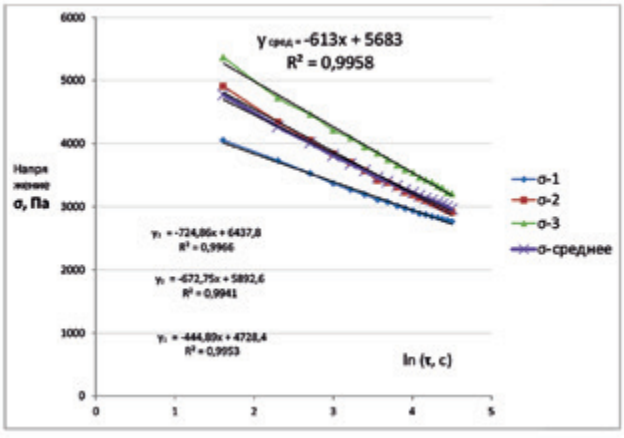


Рисунок 4. Зависимость напряжения сопротивления структуры $\sigma = 4(F - v_0\rho)98/\pi d^2$ от логарифма времени при введенном тестере

Как видно из рисунков, релаксация структуры упруго-пластичного материала после деформации, вызванной введением тестера, происходит по логарифмическому закону. Линейная зависимость напря-

Таблица 1.

Определение структурно-механических свойств вазелина при 25 °С

№ пробы вазелина	1	2	3
Масса пробы вазелина m, г	8,24	8,32	8,30
Объем пробы V, мл	10,0	10,0	10,0
Плотность ρ, г/мл	0,824	0,832	0,830
Вытесняемый объем v_0, мл;	1,12	1,12	1,12

Проведение измерения										
№ образца		1		2		3		Средние		
Время от момента введения тестера, с		F, г силы	σ,Па	F, г силы	σ, Па	F, г силы	σ, Па	$F_{ср}$, г силы	$s_{ср}$, г силы	$S_{ср}\times100/x_{ср}$, %
τ, с	lnτ									
5	1,61	62,70	4050	75,80	4908	82,81	5367	73,8	4,8	6,5
10	2,30	57,80	3730	67,18	4343	73,01	4725	66,0	3,6	5,4
15	2,71	54,71	3526	62,70	4049	69,00	4462	62,1	3,4	5,5
20	3,00	52,32	3370	59,43	3835	65,21	4214	59,0	3,0	5,1
25	3,22	50,76	3267	57,37	3700	63,30	4088	57,1	3,0	5,3
30	3,40	49,57	3190	55,38	3569	61,13	3946	55,3	2,7	4,9
35	3,56	48,40	3112	53,08	3418	59,61	3847	53,7	2,7	5,0
40	3,69	47,75	3070	52,54	3383	58,01	3742	52,8	2,4	4,5
45	3,81	46,89	3013	51,38	3307	56,77	3660	51,7	2,3	4,4
50	3,91	46,27	2972	50,28	3235	55,60	3584	50,7	2,2	4,3
55	4,01	45,70	2935	49,53	3186	54,88	3537	50,0	2,2	4,3
60	4,09	45,06	2893	48,88	3143	53,76	3463	49,2	2,0	4,1
65	4,17	44,79	2875	48,18	3097	53,13	3422	48,7	2,0	4,1
70	4,25	44,30	2843	47,52	3054	52,57	3385	48,1	2,0	4,1
75	4,32	44,05	2827	47,00	3020	51,70	3328	47,6	1,8	3,8
80	4,38	43,70	2804	46,45	2984	51,16	3293	47,1	1,8	3,8
85	4,44	43,42	2786	45,81	2942	50,16	3227	46,5	1,6	3,4
90	4,50	43,12	2766	45,42	2916	49,83	3206	46,1	1,6	3,4
										(4,5 ± 0,7)%

жения от логарифма времени позволяет определить параметры полученных уравнений – начальное напряжение в момент разрушения структуры, то есть предел текучести σ_0, и скорость релаксации напряжения, то есть тиксотропного восстановления структуры. Стандартная ошибка среднего из 3-х измерений для вазелина составляет около 5% (таблица 1).

Предлагаемый метод изучения консистентных свойств был применен для исследования структурно-механических свойств эмульсионных кремов разного состава.

На рисунке 5 приведены зависимости силы (показаний весов) от времени.

Как видно из рисунка 5, зависимости силы от времени адекватно аппроксимируются уравнением вида $y=-\alpha\times\ln(x)+b$. Коэффициент α, отражающий скорость процесса, имеет знак «–», что указывает на снижение сопротивления в массе УПМ вследствие релаксации. Кривая, отражающая показания весов для воды (ньютоновской жидкости), указывает, что после введения тестера весы показывают только вес вытесненной воды, без какого-либо сопротивления структуры.

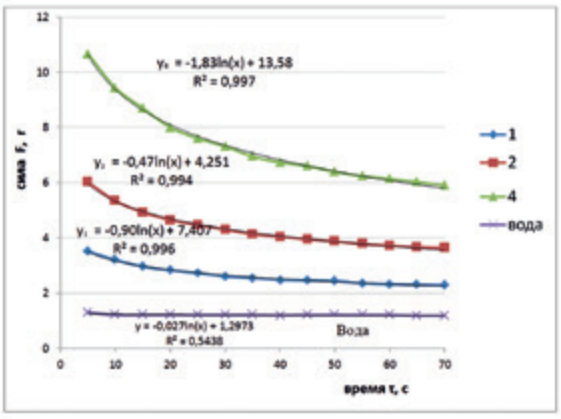


Рисунок 5. Изменение показаний весов с момента погружения тестера в опытные образцы кремов. Образцы кремов из таблицы 2 с различными масляными фазами (МФ): 1 – соевое масло; 2 – смесь соевого и касторового масел 1:1; 4 – масло какао; вода. Температура образцов – 25 °С.

По оси ординат – сила сопротивления (показания весов в г); по оси абсцисс – время в с

Для дальнейшего анализа и оценки результатов зависимости приведены к линейному виду и вместо показания весов отражены напряжения без вклада архимедовой силы (таблица 4, рисунок 6).

Таблица 2.

Составы кремов (в граммах) на основе 1-й группы эмульгаторов с различными видами масляной фазы

Ингредиенты (состав эмульгаторов 1)	1	2	3	4
Сплав липофильных компонентов и ПАВ				
Масло соевое	12	6	–	–
Масло касторовое	–	6	12	–
Масло какао				12
Ланолин	3	3	3	3
Моноглицериды дист.	3	3	3	3
Воск пчелиный	1	1	1	1
Стеарин	2	2	2	2
Эмульгин В2	2	2	2	2
Диметикон М-350	1	1	1	1
Итого сплава ПАВ	24	24	24	24
Водный р-р, в его составе:				
Триэтаноламин	0,2	0,2	0,2	0,2
Пропиленгликоль (ПГ)	5	5	5	5
Нипагин	0,3	0,3	0,3	0,3
Вода (до 100%)	71,5	71,5	71,5	71,5
Ароматические добавки:				
Ментол	0,2	0,2	0,2	0,2
Масло чайного дерева	–	–	–	0,5
Эфирное масло эвкалипта	1	0,5	–	0,5
Эфирное масло розмарина	–	0,5	1	–

Таблица 3.

Запись показаний в процессе измерения

№ образца материала из таблицы 2	1-й крем с соевым маслом	2-й крем со смесью соевого и касторового масел 1:1	4-й крем с маслом какао	Вода
Масса образца материала m, г	9,8	10,2	10,1	10
Объем образца V, мл	10,1	10,5	10,2	10
Плотность ρ, г/мл	0,97	0,97	0,99	1,0
Вытесняемый объем v_0, мл;	1,2	1,2	1,2	1,2
Проведение измерения. Образцы термостатированы при 25 °С				

Время, с	ln τ	F, г	F, г	F, г	F, г
5	1,61	3,51	6,01	10,67	1,3
10	2,30	3,20	5,34	9,43	1,2
15	2,71	2,96	4,92	8,70	1,2
20	3,00	2,82	4,65	8,00	1,2
25	3,22	2,72	4,46	7,60	1,2
30	3,40	2,60	4,30	7,31	1,2
35	3,55	2,54	4,13	6,94	1,2
40	3,69	2,48	4,04	6,73	1,2
45	3,81	2,46	3,94	6,60	1,2
50	3,91	2,44	3,87	6,39	1,2
55	4,01	2,35	3,77	6,23	1,2
60	4,10	2,32	3,72	6,14	1,2
65	4,17	2,30	3,66	6,02	1,2
70	4,25	2,29	3,63	5,90	1,2

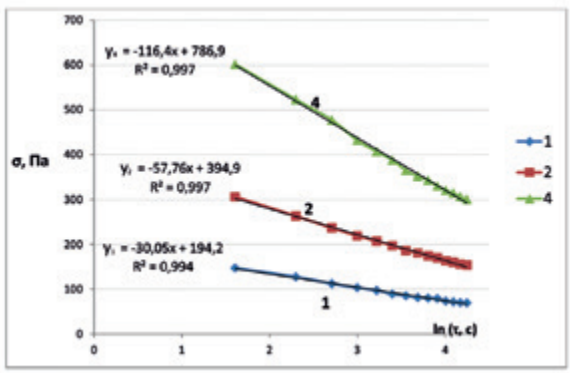


Рисунок 6. **Изменение напряжения опытных образцов кремов с момента погружения тестера. Образцы кремов из таблицы 2 с различными масляными фазами (МФ): 1 – соевое масло; 2 – смесь соевого и касторового масел 1:1; 4 – масло какао; вода. Температура образцов – 25 °С.**

По оси ординат – напряжение в Па; по оси абсцисс – ln(τ, с)

Таблица 4.

Расчетные значения напряжений для кремов с различными маслами; $\sigma=4(F-v_0\rho)98/\pi d^2$

Время, с	ln τ	1. σ, Па	2. σ, Па	4. σ, Па
5	1,61	147	306	602
10	2,30	127,2	263	523
15	2,71	112	236,5	477
20	3,00	103	219	432
25	3,22	97,0	207	407
30	3,40	89,0	197	388
35	3,55	85,0	186	365
40	3,69	81,0	181	352
45	3,81	80,1	174	343
50	3,91	79,0	170	330
55	4,01	73,1	163	320
60	4,09	71,2	160	314
65	4,17	70,0	156	306
70	4,25	69,3	154	300

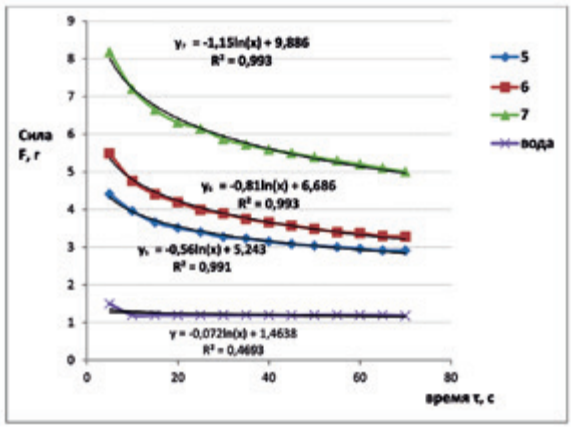


Рисунок 7. **Изменение показаний весов с момента погружения тестера в опытные образцы кремов на основе 2-й группы эмульгаторов (таблица 5.) Образцы кремов с различными маслами: 5 – соевое масло; 6 – смесь соевого и касторового масел 1:1; 7 – масло какао; вода. Температура – 25 °С.**

По оси ординат – сила сопротивления (показания весов в г); по оси абсцисс – время в с

Таблица 5.

Составы кремов (в граммах) на основе 2-й группы эмульгаторов с эфирными маслами и различными масляными фазами

Ингредиенты	Составы кремов на 2-й группе эмульгаторов (в %)			
	5	6	7	8
Сплав липофильных компонентов и ПАВ				
Масло соевое	6	–	–	6
Масло касторовое	–	6	–	–
Масло какао	–	–	6	–
Сплав, в его составе:				
Ланолин	2	2	2	2
МГД	3	3	3	2
Стеарин	2	2	2	2
Воск эмульсионный	2,5	2,5	2,5	2,5
Спирты высшие C_{16}-C_{18}	1,5	1,5	1,5	1,5
Кремафор RH-40	2,5	2,5	2,5	2
Изопропилмиристат	2,5	2,5	2,5	1,5
Диметикон М-350	1	1	1	1
Итого сплава масел и ПАВ	23	23	23	20,5
Водный р-р, в его составе:				
Триэтаноламин	0,2	0,2	0,2	0,2
Пропиленгликоль (ПГ)	5	5	5	5
Нипагин	0,3	0,3	0,3	0,3
Вода (до 100%)	71,5	71,5	71,5	73,3
Ароматические добавки				
Ментол	0,2	0,2	0,2	0,2
МЧД	0,5	–	–	–
Эфирное масло эвкалипта	–	0,5	–	0,5
Эфирное масло розмарина	–	–	0,5	–

На рисунках 6 и 8 приведены зависимости напряжения от логарифма времени, которые имеют линейный характер с высокими значениями коэффициентов корреляции – R^2>0,99. Отсекаемый отрезок на оси ординат показывает напряжение через 1 с (ln1=0), то есть практически в момент введения тестера. Измерение и

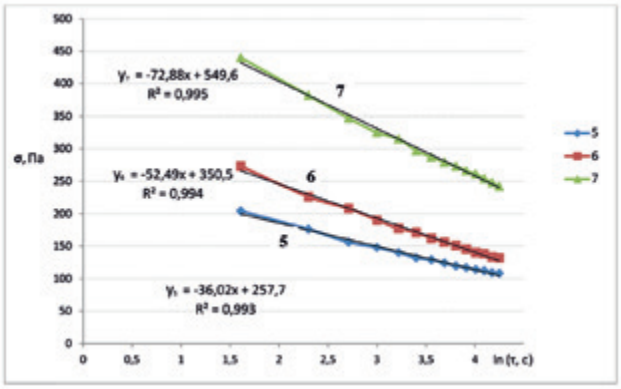


Рисунок 8. Изменение напряжения опытных образцов кремов на основе 2-й группы эмульгаторов с момента погружения тестера. Образцы кремов с различными маслами: 5 – соевое масло; 6 – смесь соевого и касторового масел 1:1; 7 – масло какао; вода. Температура – 25 °С (таблица 5).

По оси ординат – напряжение в Па; по оси абсцисс – ln (τ, с)

запись результата в ручном режиме возможны через 5 с и более (технически не удается достоверно записать показание весов при меньшем начальном промежутке времени. При автоматизации процедуры фиксации напряжения можно будет выполнять отсчет в любой момент времени).

В состоянии покоя до введения тестера в материал структура не нарушена и масса крема имеет максимальную густоту, то есть статическую вязкость. При введении тестера, то есть приложении напряжения, в массе происходит пластическая деформация, принудительное течение – напряжение в момент введения тестера отражает **предел текучести $\sigma_т$**. Далее при погруженном тестере происходит тиксотропное восстановление разрушенных структурных связей. В каждый момент времени на весах отражается сопротивление остаточной структуры.

Такая закономерность в динамике сопротивления структуры наблюдается для структурированных (неньютоновских) жидкостей. В случае испытания ньютоновских жидкостей – воды, масла, глицерина и т.п. – показание весов при введении тестера практически сразу падает до величины веса вытесненной жидкости и далее не изменяется (рисунки 5, 7; кривые «вода»). Таким образом, данный тест позволяет сразу отличить структурированную систему от ньютоновской жидкости.

Величина предела текучести, измеряемая на данном приборе, может рассматриваться как **статическая, или структурная, вязкость**, в отличие от **динамической вязкости**, которая проявляется как трение движущихся слоев жидкости и измеряется на вискозиметрах с движущимися измерительными элементами (ротационных, «падающий шарик», системах «конус – плита» и т.п.).

Анализ экспериментальных зависимостей вида $\sigma=k\times\ln\tau+\sigma_т$ позволяет получить важные для теории и практики характеристики упруго-пластичных материалов при заданных температурах.

Свободный член линейного уравнения регрессии показывает предел текучести упруго-пластичного материала.

Скорость релаксации напряжений в массе равна коэффициенту k, знак «–» указывает, что напряжение в процессе измерения снижается. Размерность скорости выражается в полулогарифмических единицах: Па/ln (τ, с).

Коэффициент при параметре времени τ или lnτ – скорость релаксации напряжений, то есть скорость тиксотропного восстановления нарушенной структуры системы. Если в экспериментальных уравнениях задать любое определенное время (lnτ), то можно рассчитать остаточное сопротивление или степень

тиксотропного восстановления структуры на заданный момент времени.

В экспериментах было обнаружено, что величина силы F (показания весов) зависит как от площади, так и от глубины погружения тестера, то есть от вытесняемого объема испытуемого материала.

Это объясняется тем, что при погружении тестера в массу происходит деформация структуры во всем вытесняемом объеме. Экспериментально было установлено, что измеряемая сила сопротивления структуры пропорциональна вытесняемому объему в пределах, определяемых конструкцией прибора.

Поэтому представляет интерес расчет **объемного напряжения $\sigma_{об}$**. Эта величина рассчитывается как отношение силы разрушения структуры ($f_{структ}=F-v_0\rho$) к величине вытесненного объема v_0, то есть:

$$\sigma_{об}=(F-v_0\rho)/v_0.$$

На примере состава 8 (таблица 5) рассмотрим динамику изменения объемного напряжения структуры при различной глубине погружения тестера, то есть при различных вытесненных объемах (таблица 6).

Как показали измерения и расчеты, объемное напряжение в пределах вытесняемых объемов от 10 до 20 мл (на данной конструкции) различаются в пределах среднего квадратичного отклонения среднего арифметического, то есть от 2 до 5% при трех повторностях.

Этот результат позволяет использовать для оценки консистенции кремов и других УПМ как плоскостное напряжение $\sigma_{пл}=4(F-v_0\rho)/\pi d^2$ при постоянной

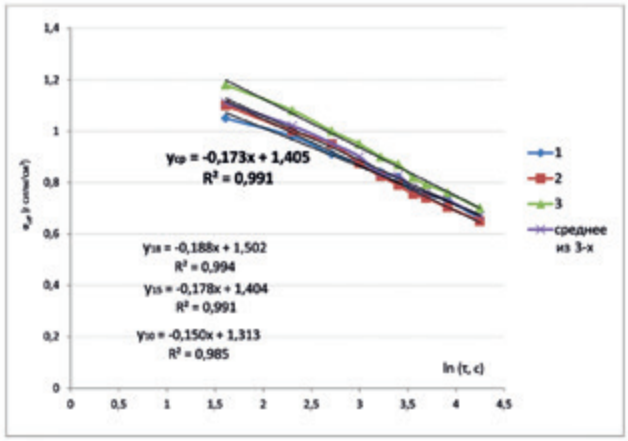


Рисунок 9. Изменение объемного напряжения крема состава 8 (таблица 5) с момента погружения тестера при различной глубине погружения и, соответственно, разном вытесняемом объеме. Кривые 1, 2, 3 соответствуют вытесняемым объемам 1,05; 2,16; 2,8 мл. Температура образцов – 22 °С.

По оси ординат – объемное напряжение в (г силы/см³); по оси абсцисс – ln (τ, с)

величине вытесняемого объема, так и объемное напряжение $\sigma_{об}=(F-v_0\rho)/v_0$ в пределах объемов проб 10–20 мл.

Как видно из полученных результатов эксперимента, динамика объемного напряжения в достаточно широком интервале величин вытесняемого объема в пределах ошибки <5% не зависит от величины вытесняемого объема. Это дает возможность проводить измерения на данной конструкции прибора при различных удобных для эксперимента величинах навесок испытуемого материала.

Таблица 6.

Числовые результаты испытания состава № 8 (таблица 5) с различными навесками. Диаметр тестера – 14 мм. Температура образцов – 25 °С

№ образца материала	Состав № 8 с соевым маслом		
Масса образца материала m, г	10,0	15,0	18,0
Объем образца V, мл	9,80	14,77	17,80
Плотность ρ, г/мл	0,98	0,98	0,99

Время от момента введения тестера, с		$\sigma_{об}=(F-v_0\rho)/v_0$ (г силы/см³)			$\sigma_{об}$ среднее	s станд. откл. средн.	$S_{отн}$, %
Вытесняемый объем v_0, мл;		1,05	2,16	2,80			
τ, с	lnτ						
5	1,609	1,05	1,10	1,30	1,150	0,062	5,4
10	2,303	1,00	1,00	1,15	1,050	0,041	3,9
15	2,708	0,91	0,95	1,07	0,977	0,039	4,0
20	2,996	0,876	0,875	1,00	0,917	0,033	3,6
25	3,219	0,84	0,824	0,96	0,875	0,035	4,0
30	3,401	0,82	0,79	0,89	0,833	0,024	2,9
35	3,556	0,76	0,754	0,818	0,777	0,017	2,2
40	3,689	0,75	0,74	0,793	0,761	0,013	1,7
50	3,912	0,73	0,70	0,76	0,731	0,013	1,8
70	4,248	0,66	0,65	0,7	0,670	0,012	1,8

Таблица 7.

Определение ошибки воспроизводимости измерения силы разрушения структуры F (г) на примере эмульсионного крема; температура образцов при измерении – 22 °С

№ образца материала		1	2	3	4	5	$x_{ср}$ – среднее из 5		
Масса образца материала m, г		9,93	9,93	9,92	9,91	9,92			
Объем образца V, мл		10,0	10,0	10,0	10,0	10,0			
Плотность ρ, г/мл		0,993	0,993	0,992	0,991	0,992			
Вытесняемый объем v_0, мл;		1,12	1,13	1,12	1,11	1,12			
Проведение измерения									
№ образца		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	$x_{ср}$		
Время, с		**Показание весов F, г**							
τ, с	**lnτ**	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	$F_{ср}$	**S – станд. ошибка воспр. (г)**	**$S \times 100/x_{ср}$ – отн. ошибка воспр., %**
5	1,609	4,52	4,54	4,64	4,55	4,59	4,568	0,043	0,94
10	2,303	4,14	4,12	4,18	4,45	4,17	4,212	0,121	2,87
15	2,708	3,92	3,87	3,92	3,91	3,89	3,902	0,019	0,487
20	2,996	3,78	3,73	3,78	3,8	3,72	3,762	0,0312	0,83
25	3,219	3,7	3,62	3,64	3,65	3,6	3,642	0,034	0,93
30	3,401	3,63	3,54	3,56	3,51	3,47	3,54	0,053	1,49
35	3,556	3,56	3,45	3,49	3,4	3,41	3,46	0,058	1,67
40	3,689	3,51	3,4	3,42	3,5	3,34	3,43	0,063	1,84
45	3,807	3,46	3,35	3,36	3,35	3,27	3,36	0,060	1,78
50	3,912	3,42	3,3	3,31	3,3	3,21	3,31	0,067	2,02
55	4,007	3,39	3,26	3,28	3,2	3,19	3,26	0,072	2,21
60	4,094	3,34	3,23	3,24	3,15	3,15	3,22	0,07	2,17
65	4,174	3,31	3,18	3,2	3,14	3,11	3,19	0,068	2,13
70	4,248	3,27	3,16	3,17	3,25	3,08	3,18	0,068	2,14
75	4,317	3,23	3,12	3,14	3,1	3,05	3,13	0,06	1,91
80	4,382	3,2	3,1	3,13	3,2	3,02	3,13	0,067	2,14
85	4,442	3,18	3,08	3,09	3,05	2,99	3,08	0,061	1,98
90	4,500	3,16	3,06	3,07	2,98	2,97	3,05	0,07	2,29
Средняя относительная ошибка единичного измерения, %									1,77

Ошибка воспроизводимости данного метода была определена на 5 сериях крема состава № 6 (таблица 5).

Источниками дисперсии измерения силы являются величина и точность измерения объема материала в стаканчике-контейнере, адекватность фиксации времени и показаний весов; плотность и характер структуры материала (наличие пузырей воздуха в массе испытуемого материала), индивидуальные особенности экспериментатора и т.д. Полученные данные включают все основные источники дисперсии. При этом на имеющемся приборе относительная ошибка воспроизводимости единичного измерения составляет около 2%. Учитывая тот факт, что процедура единичного измерения достаточно проста и занимает не более 1,5 мин, если каждый образец измерять 3 раза, то ошибка среднего из трех измерений составит около 1,2%.

Составим сводную таблицу 8 структурно-механических свойств исследуемых образцов.

Высокие значения коэффициентов корреляции подтверждают адекватность математической модели для исследуемых групп эмульсионных кремов. Для наглядности представим полученные результаты графически (рисунки 10 и 11).

Как видно из рисунка 10, предел текучести, то есть статическая вязкость кремов, зависит от состава масляной фазы, в первую очередь вида масла. Предел текучести достоверно возрастает в ряду масел: соевое – касторовое – масло какао. Из сравнения составов на двух типах эмульгаторов следует, что введение в качестве эмульгаторов эмульсионного воска, высших спиртов и кремофора RH-40 по сравнению с комбинацией воска пчелиного, МГД и ОС-20 понижает крутизну зависимости консистенции от типа масла.

Таблица 8.

Структурно-механические свойства ряда эмульсионных кремов (составы из таблиц 1 и 4) при температуре 25 °С

Образец исслед. УПМ	Уравнение регрессии	Коэфф. достоверности R^2	$\sigma_т$, Па		К, Па/lnτ		$T_{50\%}$ – время 50% релаксации напряжений, с
	$\sigma=k\times\ln\tau+\sigma_т$		$\sigma_{т\,ср}$	s_σ	К	s_k	
1 (таблица 1)	$y_1 = -30{,}05x + 194{,}2$	0,994	194	8	–30	1,5	25
2 (таблица 1)	$y_2 = -57{,}76x + 394{,}9$	0,997	394	12	–58	2,3	30
4 (таблица 1)	$y_4 = -116{,}4x + 786{,}9$	0,997	787	15	–116	3,4	30
5 (таблица 4)	$y_5 = -36{,}x + 258$	0,993	258	10	–36	1,7	37
6 (таблица 4)	$y_6 = -52{,}5x + 350$	0,994	350	11	–52	1,9	29
7 (таблица 4)	$y_7 = -72{,}9x + 550$	0,995	550	12	–73	2,0	43
Вазелин	$y_{сред} = -612{,}89x + 5683{,}2$	0,9958	5680	250	–612	40	100

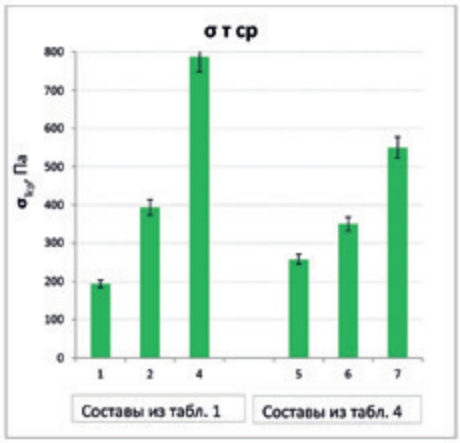


Рисунок 10. Пределы текучести эмульсионных кремов при 25 °С. Составы 1 и 5 – с соевым маслом; 2 и 6 – с касторовым маслом; 4 и 7 – с маслом какао. Составы 1, 2 и 3 – с системой эмульгаторов I; 5, 6 и 7 – с системой эмульгаторов II

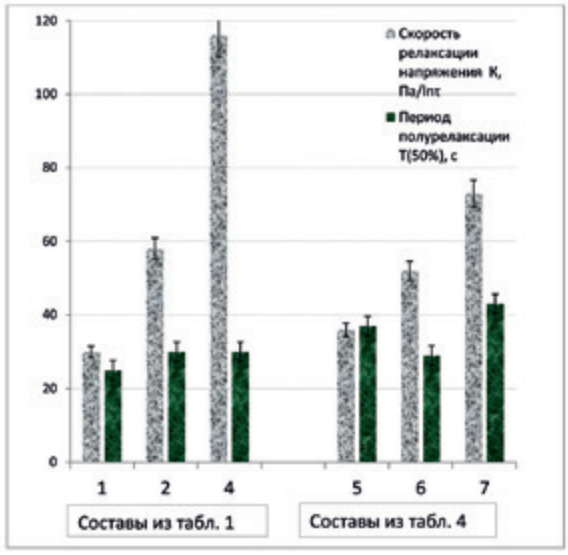


Рисунок 11. Скорость релаксации напряжений и период полурелаксации эмульсионных кремов при 25 °С. Составы 1 и 5 – с соевым маслом; 2 и 6 – с касторовым маслом; 4 и 7 – с маслом какао. Составы 1, 2 и 3 – с системой эмульгаторов I; 5, 6 и 7 – с системой эмульгаторов II

Аналогичные закономерности наблюдаются также в отношении скорости релаксации напряжений (рисунок 11). При этом характерно, что для испытуемых составов кремов периоды 50% релаксации различаются незначительно, что связано, вероятно, с эмульсионной природой упруго-пластичной системы. 50% тиксотропное восстановление структуры после введения тестера наступает в течение 30–40 с. Этот показатель свидетельствует о легком и быстром распределении эмульсии на коже при намазывании.

Вазелин, в отличие от эмульсионных кремов, имеет более высокий предел текучести и в 3–4 раза более длительный период полурелаксации (таблица 7), что свидетельствует о большей жесткости, худшей намазываемости и неудовлетворительных органолептических свойствах по сравнению с эмульсионными кремами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенное устройство и способ исследования структурно-механических свойств упруго-пластичных материалов, в частности косметических и фармацевтических мазей, кремов, гелей, позволяет численно оценить консистентные свойства мазевых и кремовых основ и композиций, включающих БАВ.

Способ имеет достаточно высокую точность и воспроизводимость; является информативным и полезным при разработке, стандартизации и контроле качества лекарственных и косметических средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. ОФС.1.2.1.0015.15. Вязкость // Государственная фармакопея, XIII изд. URL: http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-0015-15-vyazkost/ (дата обращения 10.07.2017).
2. Лекция № 6.1. Механика биологических жидкостей. URL: http://te.zavantag.com/docs/1396/index-24789.html (дата обращения 10.07.2017).
3. М.В. Дунаева. Исследование пенетрации при разработке лекарственных форм // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. №1(18). С. 285.

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 615.371

ИММУНОАДЪЮВАНТЫ, КЛАССИФИКАЦИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Д.В. Васильева[1]*, М.С. Григорьева[1], Е.В. Ворфоломеева[1], А.В. Панов[1], С.А. Кедик[1]

Резюме. Данный обзор посвящен изучению иммуноадъювантов. Рассмотрены основные свойства адъювантов, их виды и причины их использования в вакцинах. Приведена классификация адъювантов.

Ключевые слова: адъюванты, классификация адъювантов, адъювантные соединения.

IMMUNOADJUVANTS, ITS CLASSIFICATION AND APPLICATION IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY

D.V. Vasilyeva[1]*, M.S. Grigoryeva[1], E.V. Vorfolomeeva[1], A.V. Panov[1], S.A. Kedik[1]

Abstract. The present review is devoted to the investigation of immunoadjuvants. The main properties of adjuvants, their species and reasons of the use in vaccines are considered. Adjuvant classification is described.

Keywords: adjuvants; adjuvant classification; adjuvant combinations.

1 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (Институт тонких химических технологий), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, 86

1 – Moscow Technological University (MITHT), 86, Vernadsky prosp., Moscow, 119571, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Вакцины, по мнению многих учёных, являются одной из наиболее успешных медицинских мер против инфекционных заболеваний [1]. Для эффективности вакцины решающее значение имеет включение иммунных усилителей – адъювантов, которые вызывают ранние врожденные иммунные ответы, чтобы помочь в генерации надежных и долговечных адаптивных иммунных реакций [2].

Адъюванты, широко используемые в настоящее время как для человека, так и для животных, по большей части были разработаны эмпирически, без четкого понимания клеточных и молекулярных механизмов их действия. Тем не менее последние данные показывают, что большинство, если не все адъюванты повышают Т- и В-клеточные ответы путем привлечения компонентов иммунной системы, а не путем прямого воздействия на сами лимфоциты [3–5].

В борьбе с инфекционными заболеваниями наряду с созданием эффективных вакцин, способных вызвать стойкий иммунитет, актуальным остается дальнейшее усовершенствование существующих и разработка новых веществ, способных усиливать эффект иммунизации. Необходимость применять адъюванты, которые оказывают иммуностимулирующее действие, обусловлено слабой иммуногенностью некоторых препаратов (например, противомалярийная, пневмококковая и другие вакцины) [6].

ПОНЯТИЕ АДЪЮВАНТОВ

Адъюванты (от лат. adjuvare – помогать, усиливать) – это вещества, повышающие иммунный потенциал вакцин. Они являются вспомогательными компонентами различного происхождения и различной химической природы, оказывающими неспецифическое стимулирующее действие на иммунный ответ при совместном их применении со специфическими антигенами [6].

Адъюванты используют для повышения иммуногенности высокоочищенных бактериальных и вирусных антигенов, анатоксинов, рекомбинантных и синтетических антигенов. Включение адъювантов в состав вакцин обеспечивает более быстрое формирование выраженного и длительного специфического иммунитета. Целесообразность использования адъювантов в вакцинах заключается в повышении иммуногенности вакцин, изменении характера иммунного ответа, снижении количества антигена, необходимого для успешной иммунизации, уменьшении кратности введения вакцины и повышении интенсивности иммунного ответа у лиц со сниженной им-

мунологической активностью, в том числе у пожилых лиц [7].

В идеальном случае адъюванты должны быть стабильными, иметь длительный срок хранения, быть биодеградируемыми, безопасными и усиливать соответствующий иммунный ответ (клеточный или гуморальный иммунитет в зависимости от требований защиты организма) [8].

ВИДЫ АДЪЮВАНТОВ

В настоящее время известно множество веществ органической и неорганической природы, которые способны оказывать адъювантное действие. В качестве адъювантов используют минеральные соединения (гели гидроксида и фосфата алюминия); полимерные вещества; сложные химические смеси (липополисахариды, белково-липополисахаридные комплексы, мурамилдипептид и его производные); бактерии и компоненты бактерий (вытяжки вакцины БЦЖ); липиды и эмульгаторы (ланолин, арлацел); вещества, вызывающие воспалительную реакцию (сапонин, скипидар).

Как видно, адъюванты имеют различный химический состав и происхождение, сходство их состоит в том, что все они способны усиливать иммуногенность антигена, изменять степень гуморального ответа на иммуноген, являясь при этом чужеродными для организма веществами [6].

ПРИЧИНЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АДЪЮВАНТОВ

Адъюванты традиционно используются для повышения интенсивности адаптивного ответа на вакцины, основанной на титре антител или способности предотвращать инфекцию, вторая роль адъювантов – это направление адаптационной реакции для получения наиболее эффективной формы иммунитета для каждого конкретного возбудителя.

Адъюванты в настоящее время используются в клинике для:

1) увеличения отклика на вакцину в общей популяции с помощью увеличения среднего титра антител и/или доли субъектов, которые становятся иммунизированными;
2) увеличения сероконверсии в популяциях с уменьшенной ответной реакцией из-за возраста (как детей, так и пожилых людей), болезней или терапевтических вмешательств [9, 10];
3) содействия использованию небольших доз антигена [11–13], потому что способность адъюванта разрешить сопоставимые ответы с существенно меньшими количествами антигена может быть важна в условиях, в которых широкомасштабная вакцинация является срочной и ограниченной по производственной мощности, например в случае появления пандемического штамма вируса гриппа;
4) иммунизации с меньшим количеством доз вакцины: необходимость в многократных инъекциях для многих вакцин вызывает в большинстве стран мира значительные логистические проблемы – адъюванты могут уменьшить число доз, необходимых для достижения защиты [12, 13].

Вторая причина для включения адъюванта в вакцину – достижение качественного изменения иммунного ответа. Для вакцин, находящихся в разработке в настоящее время, адъюванты всё чаще используются для поддержания тех видов иммунитета, которые неэффективно вызваны неадъювантными антигенами. Например, в доклинических и клинических исследованиях адъюванты были использованы, чтобы:

1) обеспечить функционально подходящие типы иммунного ответа (например, клетки Т-хелперы-1 (Th1) по сравнению с клетками Th2, Т-клетки $CD8^+$ по сравнению с $CD4^+$, специфические изотипы антител);
2) увеличить выработку памяти, особенно Т-клеточной памяти [14–16];
3) увеличить скорость начальной реакции, которая может иметь решающее значение во вспышках пандемической инфекции [17–19];
4) изменять широту, специфичность или сродство иммунного ответа [19, 20].

КЛАССИФИКАЦИЯ АДЪЮВАНТОВ

Адъюванты могут быть классифицированы по происхождению, механизму действия и физико-химическим свойствам.

Минеральные соли

Соли алюминия, главным образом гидроксид алюминия $Al(OH)_3$ или фосфат алюминия $AlPO_4$, наиболее широко применяются в качестве адъювантов для человека [21]. Механизм, по которому действуют соли алюминия, остается неизвестным, хотя существует предположение, что они работают, образуя депо антигена на месте прививки [22]. Другие возможные механизмы действия могут включать активацию комплемента или эозинофилов или активацию макрофагов [23].

Что касается алюминиевых квасцов, то они являются относительно слабыми адъювантами, особенно для вызывания клеточного иммунного ответа. Когда квасцы вводят подкожно или внутрикожно, а не внутримышечно, появляются гранулемы. Другие побочные эффекты квасцов – увеличение уровня имму-

ноглобулина E (IgE), аллергенность и потенциальная нейротоксичность. Обычно алюминий выводится почками, хотя при определенных условиях, таких как низкое функционирование почек, алюминий накапливается в организме и может стать токсичным. Высокие уровни алюминия в организме влияют преимущественно на мозг и костные ткани, вызывая фатальный неврологический синдром и диализную деменцию. Интоксикация алюминием также потенциально связана с боковым амиотрофическим склерозом и болезнью Альцгеймера. Соли других металлов, таких как кальций, железо и цирконий, также используются для адсорбции антигенов. В частности, фосфат кальция был использован в вакцине от коклюша [24, 25].

Поверхностно-активные соединения

Квил-А (Quil A®) – это сапонин, полученный из водного экстракта коры квиллайи мыльной (*Quillaja saponaria*). Фракции, выделенные из этого экстракта с помощью обращенно-фазовой хроматографии, такие как QS-21, имеют способность индуцировать сильные клеточные ответы против ВИЧ-1 и других патогенпроизводных антигенов [26, 27].

Квил-А (Quil A®) представляет собой натуральный продукт, который состоит из более чем 23 различных сапонинов и является слишком токсичным для человека. В дополнение к тяжелым местным реакциям и гранулемам токсичность вызывает тяжелый гемолиз [28–32]. Производный сапонин QS-21 менее токсичен, чем Quil A®, но имеет ряд недостатков, что делает его непригодным для применения в составе вакцин. Его употребление возможно лишь в случаях приемлемости высокой токсичности (вакцины от рака) или использования в низких дозах [33].

Адъюванты, производные микроорганизмов

Учитывая сильный иммуностимулирующий потенциал бактериальных или грибковых веществ, можно сделать заключение, что они являются продуктивным источником потенциальных адъювантов. Пептидогликан клеточной стенки бактерии или липополисахариды (ЛПС) усиливают иммунную реакцию, в то время как сами по себе не являются высокоиммуногенными. Эта адъювантная активность опосредуется через активацию Толл-подобных рецепторов (TLRs), которые обеспечивают сигналы опасности, активирующие системы иммунной защиты [34].

Различные виды бактерий используются в качестве источников адъювантов: *Mycobacterium* spp., *Corynebacterium parvum, C. granulosum, Bordetella pertussis* и *Neisseria meningitidis*. В целом убитые микроорганизмы слишком токсичны для использования в качестве адъювантов для человека [35].

Однако, по-видимому, основная адъювантная активность этих бактерий опосредуется N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамином, также называемым мурамилдипептидом (MDP). В физиологическом растворе MDP усиливает основной гуморальный иммунитет, а будучи включенным в липосомы или в смеси с глицерином, вызывает сильный клеточный иммунитет. Соединения с адъювантной активностью, полученные из MDP, включают треонил-MDP [36].

Другой важной группой соединений, полученных из клеточной стенки грамотрицательных бактерий, являются липополисахариды (ЛПС). Основным структурным элементом ЛПС, ответственным за их адъювантный эффект, является липид А. В условиях низкой кислотности липид А можно гидролизовать с получением монофосфорилированного липида А (MPL), соединения, которое совмещает адъювантную активностью липида А с пониженной токсичностью [37].

Эмульсии

Этот класс включает эмульсии типа «масло в воде» или «вода в масле», такие как неполный адъювант Фрейнда (FIA), Монтанид (Montanide®), адъювант-65 [38–40] или Липовант (Lipovant®) [41]. Механизм действия адъювантной эмульсии включает в себя формирование депо в месте инъекции, что обеспечивает медленное высвобождение антигена и стимуляцию клеток плазмы, производящих антитела [42].

В общем, эти адъюванты слишком токсичны для повседневного использования в качестве человеческой профилактической вакцины, хотя они могут быть пригодны для использования в таких случаях, как рак, где сохраняется большая терпимость к побочным эффектам. Частые побочные эффекты эмульсий: воспалительные реакции, гранулемы и язвы в месте введения. Например, Montanide® – совокупность масляных адъювантов, которые были использованы в пробных вакцинах против ВИЧ, малярии и рака молочной железы [43].

Системы доставки крупнодисперсных антигенов

Из наиболее изученных адъювантов в категорию «системы доставки крупнодисперсных антигенов» могут быть включены липосомы, полимерные микросферы, наночастицы, вирусоподобные частицы (VLPs), как наиболее важные из систем доставки антигенов. Эти адъюванты широко используются в качестве носителей субъединиц белка и ДНК-вакцин. Существует обширное понимание их биологических взаимодействий и механизмов действия, связанное с их размерами и химической природой [44].

Липосомы

Липосомы – синтетические сферические наночастицы, состоящие из липидного бислоя, которые могут инкапсулировать антигены и действовать как в качестве механизма доставки вакцины, так и в качестве адъюванта [45].

Активность липосом зависит от количества липидных слоев, электрического заряда, состава и способа их создания. Недавние результаты показали, что соединенные с поверхностью липосомальные антигены могут быть применимы для разработки противоопухолевых вакцин для доставки опухолевых антигенов до антигенпрезентирующих клеток (APC) и индукции противоопухолевой реакции [46].

Хотя липосомы являются одной из наиболее изученных систем доставки антигенов, они по-прежнему являются источником новых результатов по активизации стратегии иммунной защиты. Синергетический эффект липосом совместно с ДНК и белком превышает известные адъювантные эффекты плазмидной ДНК и липосомы. Этот новый подход к вакцинации был назван «ко-доставка» («co-delivery»). Тем не менее стабильность, производство и обеспечение качества являются основными факторами, препятствующими использованию липосом в качестве адъювантов для человека [47, 48].

Полимерные микросферы

Среди гранулированных и полимерных систем широко изучены поли-(D,L-лактид-ко-гликолид)-микросферы. Эти биологически совместимые и биодеградируемые микросферы размером от 1 до 1000 нанометров способны включать различные антигены. Одним из их преимуществ является способность манипулировать кинетикой деградации за счет изменения относительной концентрации их компонентов, тем самым управляя временем выпуска антигена [49, 50].

Приготовление катионных и анионных микрочастиц полилактид-ко-гликолида (PLG), которые были использованы для адсорбции различных веществ, в том числе плазмидной ДНК, рекомбинантных белков и иммуностимулирующих олигонуклеотидов, приводит к индукции существенно улучшенных иммунных реакций по сравнению с квасцами. Адсорбция на поверхности микросферы позволяет использовать альтернативный и оригинальный способ доставки антигенов в вакцинных препаратах [51].

Наночастицы

Твердые инертные наночастицы с поверхностно-адсорбированным антигеном ранее использовались для стимулирования $CD8^+$-Т-клеточных ответов с оптимальным диаметром 1 мкм [52]. В последнее время использование твердых инертных частиц нанометрового размера (0,04–0,05 мкм) является очень перспективной стратегией для достижения эффективной доставки антигена к антигенпрезентирующим клеткам (APC), создавая мощный и комбинированный гуморальный и $CD8^+$-Т-клеточный иммунитет [53].

Наночастицы в отличие от квасцов индуцируют существенный клеточный ответ наряду с умеренным гуморальным ответом в ходе масштабных испытаний на животных. Таким образом, данные адъюванты потенциально полезны для внутриклеточных патогенов в организме человека и животных в лечебных и профилактических целях [54].

Вирусоподобные частицы (VLPs)

Вирусоподобные частицы – это инертные, пустые капсиды вирусов, которые не содержат ДНК/РНК самого вируса. Однако они сохраняют структуру вируса и могут быть сконструированы с прикрепленными антигенами. Частицы аналогичного размера и формы, что и вирусы, и полученные генно-инженерным способом, с включением антигенов из вирусных или невирусных источников, относятся также к VLPs. Антигены вирусоподобных частиц (VLPs) эффективно поглощаются дендритными клетками (DC) и вызывают сильные иммунные ответы после парентеральной иммунизации, иммунизации через кожу, а также после иммунизации слизистых оболочек [55–57].

Цитокины

Как правило, цитокины включают в современную классификацию адъювантов. Например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) повышает первичный иммунный ответ путем активации антигенпрезентирующих клеток (APC) [58].

Тем не менее практическое применение GM-CSF в качестве адъюванта ограничено требованием по количеству доз, токсичности и иммуногенности гетерологичных цитокинов. Цитокины могут иметь особый потенциал для ДНК-вакцин, где цитокин может быть совместно экспрессирован с антигеном с помощью одного вектора. С другой стороны, непосредственное применение интерлейкина-12 (IL-12) и других цитокинов в виде растворимых белков доказало свою эффективность в качестве мукозного адъюванта [59, 60].

Полисахариды

Инулин – углевод, получаемый из корней растений семейства Compositae, – в виде микрочастиц является мощным гуморальным и клеточным иммунным адъювантом. Микрочастица инулина (MPI) является мощным активатором альтернативного пути комплемента и тем самым активирует врожденную иммунную систему [61].

MPI особенно эффективна в повышении клеточного иммунного ответа без токсичности, которая обычно присуща другим адъювантам, таким как полный адъювант Фрейнда (FCA), Montanide или QS-21. Микрочастицу инулина (MPI) можно сочетать с другими компонентами для получения ряда адъювантов с различными степенями активности Th1 и Th2. Например, алгаммулин представляет собой сочетание MPI и гидроксида алюминия. Алгаммулин проявляет более высокую активность Th2 и Th1, чем просто MPI, причем общий эффект эквивалентен эффекту квасцов, несмотря на более низкое общее содержание солей алюминия [62, 63].

Адъюванты на основе MPI успешно тестируется на многих животных моделях, включая дифтерию, анатоксин столбняка, респираторно-синцитиальный вирус, белок E7 ВПЧ, гликопротеин D вируса герпеса 2-го типа, гемагглютинин гриппа, гемофильную инфекцию и малярийный плазмодий. Микрочастица инулина (MPI) преимущественно индуцирует иммунные ответы как Th1-, так и Th2-типа, не вызывая повышения иммуноглобулина E (IgE), и не связана с какой-либо значительной локальной или системной токсичностью. Инулин метаболизируется в простые сахара – фруктозу и глюкозу и, следовательно, безопасен [64].

Адъювантные препараты

Новые адъювантные препараты представляют собой смесь двух или более адъювантов с различными механизмами действия. Целью этого метода является усиление в дальнейшем и/или модулирование иммунного ответа на данный антиген и в некоторых случаях улучшение доставки и модуляции. Эффективный адъювантный препарат, содержащий монофосфориллипид A (MPL) и квасцы, недавно был включен в утвержденный состав вакцины Fendrix®, используемой для профилактики иммунизации против гепатита B у пациентов с заболеваниями почек, в том числе пациентов на гемодиализе. Эта вакцина развивает более быстрый, интенсивный и продолжительный иммунный ответ по сравнению с контрольной вакциной в группах высокого риска, демонстрируя безопасность и клинически приемлемые местные реакции, как и другие лицензированные вакцины против гепатита B [65].

Адъювантный препарат AS04 был протестирован также в рамках развития перспективной вакцины против ВПЧ [66, 67].

Синтетические иммуноадъюванты

Перспективным направлением в разработке новых адъювантов является получение высокомолекулярных полимеров, обладающих иммуномодулирующей активностью, которые используются в качестве адъювантов, увеличивающих эффективность применения консервативных средств профилактики заболеваний [68].

Для использования в качестве синтетических иммуноадъювантов и иммуномодуляторов большой интерес представляют сополимеры N-оксидов (например, полиоксидоний) [69] и сополимеры на основе N-винилпирролидона с различными производными пиридина (например, сополимер N-винилпирролидона с 2-метил-5-винилпиридином) [70].

Синтетический иммуноадъювант — физиологически активное высокомолекулярное соединение, обладающее выраженной иммуномодулирующей активностью. Иммуномодуляторы – это лекарственные средства, обладающие иммунотропной активностью, которые в терапевтических дозах восстанавливают функции иммунной системы [71].

Полиоксидоний

Полиоксидоний® – препарат класса синтетических полиэлектролитов, который представляет собой N-оксидированное производное полиэтиленпиперозина с высокой молекулярной массой [72] и используется для лечения и профилактики заболеваний, связанных с нарушениями иммунной системы [73].

На рисунке 1 представлена формула полиоксидония.



Рисунок 1. Полиоксидоний – производное N-окиси 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиния бромида

Полиоксидоний® был разработан в ГНЦ Институт иммунологии Министерства здравоохранения Российской Федерации [74] и включен в качестве адъюванта в состав субъединичной гриппозной вакцины (Гриппол®) [68]. Включение полиоксидония в состав вакцины Гриппол® позволило снизить количество антигена (по 5 мкг гемагглютинина серотипов A/H1N1 и A/H3N2 и 11 мкг серотипа B) [75]. Однако имеются публикации, указывающие на недостаточную иммуногенность данной вакцины, главным образом для лиц пожилого возраста [76, 77].

По классификации токсичности Полиоксидоний® относится к 5 классу, то есть к практически нетоксичным соединениям. Высокую степень безопасности полиоксидония подтверждают и результаты доклини-

ческого изучения. Полиоксидоний® в дозе, в 50 раз превышающей терапевтическую, не проявляет пирогенных, раздражающих, токсических, аллергенных, мутагенных, эмбриотоксических, тератогенных и канцерогенных свойств [78].

Сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина

Сополимеры на основе N-винилпирролидона с различными производными пиридина находят широкое применение в медицине и фармации [79–81] вследствие проявления ими выраженной физиологической активности [82]. К числу перспективных относится сополимер N-винилпирролидона с 2-метил-5-винилпиридином, обладающий иммуномодулирующими свойствами [83].

На рисунке 2 представлена его химическая формула.

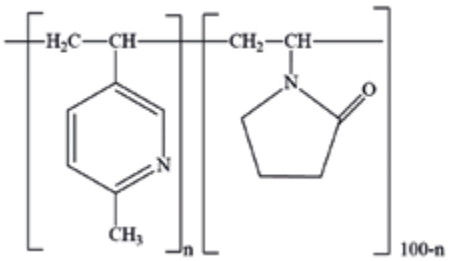


Рисунок 2. Сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона:

n – доля (мольный процент) звеньев мономера 2-метил-5-винилпиридина в сополимере; 100-n – доля (мольный процент) звеньев мономера N-винилпирролидона в сополимере

Сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона – это водорастворимый полимер, который со средневязкостной молекулярной массой M_η=30000÷55000 дальтон проявляет высокую антигенную активность и может использоваться как адъювант в вакцинах [84, 85].

Сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина был синтезирован по методике радикальной сополимеризации, разработанной профессором С.А. Кедиком и его сотрудниками [86], и включен в состав инактивированной вакцины для профилактики гриппа Совигрипп® в качестве иммуноадъюванта.

Группой ученых под руководством профессора С.А. Кедика были осуществлены широкие доклинические исследования сополимера N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина. На различных биообъектах было доказано, что данный сополимер обладает низкой токсичностью, отсутствием тератогенного и канцерогенного действия, является эффективным иммуномодулятором, проявляющим собственные антибактериальные и антивирусные свойства [87].

Перспективным оказалось введение данного полимера в вакцины для повышения их эффективности, возможного снижения дозы антигена и реактогенности вакцины (т.е. снижение каких-либо побочных эффектов при введении вакцины в организм). Было определено, что препарат в дозе 5000 мг/кг не вызывал гибели мышей F1(CBAxC57B1). При подкожном введении мышам препарата в дозе 500 мг/кг отсутствовали признаки раздражающего действия и выпадение волосяного покрова. В опыте по изучению миграционной активности колонии образующихся клеток селезенки с отрицательным контролем (физиологический раствор) и положительным контролем (продигиозан) было подтверждено, что сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона обладает выраженным иммуномодулирующим действием [87].

В опытах на грызунах, собаках, обезьянах, овцах и свиньях были изучены фармакологическая активность, безвредность и противолучевая эффективность сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона: в дозах до 100 мг/кг он не оказывает эмбриотоксического действия и не нарушает репродуктивную функцию крыс и кроликов. Кроме того, сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона не оказывает влияния на функцию центральной нервной системы, имеет слабое сосудорасширяющее действие и несколько ослабляет сосудосуживающий эффект α-адреномиметиков [88]. Препарат выводится главным образом через почки. Было показано, что данный препарат обладает широким спектром биологической активности: противоопухолевым, антибактериальным, противовирусным действием, а также тормозит аутоиммунные процессы и стимулирует кроветворение [88–90].

На основании этих данных можно с большой долей уверенности говорить о его высоком уровне безопасности для использования у человека. Сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона является перспективным в качестве иммуноадъюванта в составе различных профилактических и терапевтических вакцин и препаратов как против соматических, так и против инфекционных заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время повышения эффективности вакцин в основном добиваются благодаря использованию неспецифических стимуляторов. Актуальным остается улучшение существующих и создание новых профилактических препаратов. Это значит, несмотря на существующие достижения, разработки перспективных адъювантов продолжаются.

ЛИТЕРАТУРА

1. M.R. Hilleman. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries // Vaccine. 2000. V. 18. № 15. P. 1436–1447.
2. D.T. O'Hagan. Recent developments in vaccine delivery systems // New Generation Vaccines, 2nd / Ed. by M.M. Levine, J.B. Kaper, R. Rappuoli, M. Liu, M.F. Good. – New York: Marcel Dekker, 2004. P. 259–270.
3. S. McCartney, W. Vermi, S. Gilfillan, M. Cella, T.L. Murphy, R.D. Schreiber, K.M. Murphy, M. Colonna. Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly (I: C)-mediated activation of mouse NK cells // J. Exp. Med. 2009. V. 206. № 13. P. 2967–2976.
4. A.S. McKee, M.W. Munks, P. Marrack. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants // Immunity. 2007. V. 27. № 5. P. 687–690.
5. D.T. O'Hagan, E. De Gregorio. The path to a successful vaccine adjuvant–'The long and winding road' // Drug Discovery Today. 2009. V. 14. P. 541–551.
6. Е.Ю. Исаенко, Е.М. Бабич, И.В. Елисеева, Л.А. Ждамарова, В.И. Белозерский, С.А. Колпак. Адъюванты в современной вакцинологии // Annals of Mechnikov Institute. 2013. № 4. С. 5–21.
7. Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, В.П. Бондарев, Р.А. Волкова, Н.И. Лонская, Е.В. Лебединская, Н.В. Медуницын, А.Н. Миронов, Н.А. Озерецковский, А.А. Солдатов, В.А. Шевцов. Вакцины с адъювантами. Доклинические исследования // Биопрепараты. 2015. № 1(53). С. 15–20.
8. R. Edelman. Vaccine adjuvants // Rev. Infect. Dis. 1980. V. 2. P. 370–383.
9. J. Beran. Safety and immunogenicity of a new hepatitis B vaccine for the protection of patients with renal insufficiency including pre-haemodialysis and haemodialysis patients // Expert Opinion on Biological Therapy. 2008. V. 8. № 2. P. 235–247.
10. A. Podda. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: Experience with the MF59-adjuvanted vaccine // Vaccine. 2001. V. 19. P. 2673–2680.
11. A. Banzhoff, R. Gasparini, F. Laghi-Pasini, T. Staniscia, P. Durando, E. Montomoli, P. Capecchi, P. di Giovanni, L. Sticchi, C. Gentile, A. Hilbert, V. Brauer, S. Tilman, A. Podda. MF59-adjuvanted H5N1 vaccine induces immunologic memory and heterotypic antibody responses in non-elderly and elderly adults // PLoS ONE. 2009. V. 4. № 2. P. e4384.
12. J. Boyle, D. Eastman, C. Millar, S. Camuglia, J. Cox, M. Pearse, J. Good, D. Drane. The utility of ISCOMATRIX adjuvant for dose reduction of antigen for vaccines requiring antibody responses // Vaccine. 2007. V. 25. № 14. P. 2541–2544.
13. T.F. Schwarz, T. Horacek, M. Knuf, H.G. Damman, F. Roman, M. Drame, P. Gillard, W. Jilg. Single dose vaccination with AS03-adjuvanted H5N1 vaccines in a randomized trial induces strong and broad immune responsiveness to booster vaccination in adults // Vaccine. 2009. V. 27. № 45. P. 6284–6290.
14. G. Galli, D. Medini, E. Borgogni, L. Zedda, M. Bardelli, C. Malzone, S. Nuti, S. Tavarini, C. Sammicheli, A.K. Hilbert, V. Brauer, A. Banzhoff, R. Rappuoli, G. Del Giudice, F. Castellino. Adjuvanted H5N1 vaccine induces early $CD4^+$ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 3877–3882.
15. I. Leroux-Roels, F. Roman, S. Forgus, C. Maes, F. De Boever, M. Drame, P. Gillard, R. van der Most, M. Van Mechelen, E. Hanon, G. Leroux-Roels. Priming with AS03 A-adjuvanted H5N1 influenza vaccine improves the kinetics, magnitude and durability of the immune response after a heterologous booster vaccination: An open non-randomised extension of a doubleblind randomised primary study // Vaccine. 2010. V. 28. № 3. P. 849–857.
16. P. Vandepapeliere, Y. Horsmans, P. Moris, M. Van Mechelen, M. Janssens, M. Koutsoukos, P. Van Belle, F. Clement, E. Hanon, M. Wettendorff, N. Garcon, G. Leroux-Roels. Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers // Vaccine. 2008. V. 26. № 10. P. 1375–1386.
17. G. Galli, K. Hancock, K. Hoschler, J. DeVos, M. Praus, M. Bardelli, C. Malzone, F. Castellino, C. Gentile, T. McNally, G. Del Giudice, A. Banzhoff, V. Brauer, E. Montomoli, M. Zambon, J. Katz, K. Nicholson, I. Stephenson. Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 7962–7967.
18. J.W. Huleatt, A.R. Jacobs, J. Tang, P. Desai, E.B. Kopp, Y. Huang, L. Song, V. Nakaar, T.J. Powell. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity // Vaccine. 2007. V. 25. № 4. P. 763–775.
19. S. Khurana, W. Chearwae, F. Castellino, J. Manischewitz, L.R. King, A. Honorkiewicz, M.T. Rock, K.M. Edwards, G. Del Giudice, R. Rappuoli, H. Golding. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus // Science Translational Medicine. 2010. V. 2. № 15. pp. 15ra5.
20. L. Malherbe, L. Mark, N. Fazilleau, L.J. Mc Heyzer-Williams, M.G. Mc Heyzer Williams. Vaccine adjuvants alter TCR-based selection thresholds // Immunity. 2008. V. 28. P. 698–709.
21. A.C. Allison, N.E. Byars. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects // Mol. Immunol. 1991. № 28. P. 279–284.
22. N.N. Blagowechensky. Dur´ee du s´ejour de l'antig`ene dans l'organisme et immunit´e // Rev Immunol Par´ıs. 1938. № 4. P. 161.
23. R.S. Walls. Eosinophil response to alum adjuvants: involvement of T cells in non-antigen-dependent mechanisms // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1977. V. 156(3). P. 431-435.
24. R.K. Gupta. Aluminum compounds as vaccine adjuvants // Advanced Drug Delivery Reviews. 1998. V. 32. № 3. P. 155–172.
25. J.C. Aguilar, E.G. Rodríguez. Review. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine. V. 25. № 19. 2007. P. 3752–3762.
26. C.R. Kensil. Saponins as vaccine adjuvants // Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1996. № 13. P. 1–55.
27. H. Takahashi, T. Takeshita, B. Morein, S. Putney, R.N. Germain, J.A. Berzofsky. Induction of $CD8^+$ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs // Nature. 1990. V. 344. P. 873–875.
28. H.S. Warren, L.A. Chedid. Future prospects for vaccine adjuvants // CRC Crit Rev Immunol. 1986. V. 4. P. 369–388.
29. K. Dalsgaard. Adjuvants // Vet. Immunol. Immunopathol. 1987. V. 17. P. 145–153.
30. Bomford RHR. The differential adjuvant activity of $Al(OH)_3$ and saponin // Immunopharmacology of infectious diseases: vaccine adjuvants and modulators of non-specific resistance / Ed. by J. Madje. – New York: Alan R. Liss, 1987. P. 65–70.

31. B. Ronnberg, M. Fekadu, B. Morein. Adjuvant activity of nontoxic *Quillaja saponaria* Molina components for use in iscom-matrix // Vaccine. 1995. V. 13. P. 1375–1382.

32. C.R. Kensil, U. Patel, M. Lennick, D. Marciani. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex // Journal of Immunology. 1991. V. 146. P. 431–437.

33. C.R. Kensil, J.-Y. Wu, S. Soltysik. Structural and immunological characterization of the vaccine adjuvant QS-21. // Vaccine design: the subunit and adjuvant approach / Ed. by M.F. Powell, M.J. Newman. – New York: Plenum Press, 1995. P. 525–541.

34. F.M. Audibert, L.D. Lise. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects // Immunol. Today. 1993. V. 14. P. 281–284.

35. J.M. Brewer, M. Conacher, A. Satoskar, H. Bluethmann, J. Alexander. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production // European journal of immunology. 1996. V. 26(9). P. 2062–2066.

36. S. Kotani, Y. Watanabe, T. Shimoto, T. Narita, K. Kato, D.E.S. Stewart-Tull et al. Immunoadjuvant activities of cells walls, their water soluble fractions and peptidoglycan subunits, prepared from various gram-positive bacteria, and of synthetic *N*-acetylmuramyl peptides // Z Immunitatsforsch. 1975. 149S. P. 302–305.

37. M.A. Tomai, A.G. Johnson. T cell and interferon-gamma involvement in the adjuvant action of a detoxified endotoxin // J. Biol. Resp. Modifiers. 1989. V. 8. P. 625–630.

38. M.R. Hilleman, A.F. Woodhour, A. Friedman, A.H. Phelps. Studies for safety of adjuvant 65 // Ann. Allergy. 1972. V. 30. P. 477–480.

39. J.W. Smith, W.B. Fletcher, M. Peters, M. Westwood, F.G. Perkins. Response to influenza vaccine in adjuvant 65-4 // J. Hyg. (Camb). 1975. V. 74. P. 251–259.

40. R.E. Weibel, A. McLean, A.F. Woodhour, A. Friedman, M.R. Hilleman. Ten-year follow-up study for safety of Adjuvant 65 influenza vaccine in man // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1973. V. 143. P. 1053–1056.

41. N.E. Byars, A.C. Allison. Immunologic adjuvants: general properties, advantages, and limitations // Laboratory Methods in Immunology / Ed. by H. Zola. – Boca Raton: CRC Ress, 1990. P. 39–51.

42. J. Freund. The mode of action immunological adjuvants // Adv. Tuberc. Res. 1956. V. 7. P. 50–55.

43. G.L. Jones. Peptide vaccine derived from a malarial surface antigen: effect of dose and adjuvant on immunogenicity // Immunol. Lett. 1990. V. 24. P. 253–260.

44. V.W. Bramwell, Y. Perrie. Particulate delivery systems for vaccines // Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 2005. V. 22. P. 151–214.

45. A.C. Allison, G. Gregoriadis. Liposomes as immunological adjuvants // Nature. 1974. V. 252. No. 5480. Article 252.

46. J. De Souza Reboucas, I. Esparza, M. Ferrer, M.L. Sanz, J.M. Irache, C. Gamazo. Review Article. Nanoparticulate Adjuvants and Delivery Systems for Allergen Immunotherapy // Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2011. V. 2012. P. 1–13.

47. M. Taneichi, H. Ishida, K. Kajino, K. Ogasawara, Y. Tanaka, M. Kasai et al. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are crosspresented to CD8+ T cells and induce potent antitumor immunity // J. Immunol. 2006. V. 177. P. 2324–2330.

48. A. des Rieux, V. Fievez, M. Garinot, Y.J. Schneider, V. Preat. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach // Journal of Controlled Release. 2006. V. 116. № 1. P. 1–27.

49. J.H. Eldrige, J.K. Staas, J.A. Meulbroek, T.R. Tice, R.M. Gilley. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system // Mol. Immunol. 1991. V. 28. P. 287–290.

50. J.H. Eldrige, J.K. Staas, J.A. Meulbroek, T.R. Tice, R.M. Gilley. Biodegradable and biocompatible poly (dl-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for Staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies // Infect. Immun. 1991. V. 59. P. 2978–2983.

51. M. Singh, J. Kazzaz, M. Ugozzoli, P. Malyala, J. Chesko, D.T. O'Hagan. Polylactide-co-glycolide microparticles with surface adsorbed antigens as vaccine delivery systems // Curr. Drug. Deliv. 2006. V. 3. P. 115–120.

52. L.D. Falo Jr., M. Kovacsovics-Bankowski, K. Thompson, K.L. Rock. Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity // Nat. Med. 1995. V. 1. P. 649–653.

53. T. Fifis, A. Gamvrellis, B. Crimeen-Irwin, G.A. Pietersz, J. Li, P.L. Mottram et al. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors // J. Immunol. 2004. V. 173. P. 3148–3154.

54. J.P. Scheerlinck, S. Gloster, A. Gamvrellis, P.L. Mottram, M. Plebanski. Systemic immune responses in sheep, induced by a novel nano-bead adjuvant // Vaccine. 2006. V. 24. P. 1124–1131.

55. A.F. Antonis, C.J. Bruschke, P. Rueda, L. Maranga, J.I. Casal, C. Vela et al. A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure // Vaccine. 2006. V. 24. P. 5481–5490.

56. S.L.Young, M. Wilson, S. Wilson, K.W. Beagley, V. Ward, M.A. Baird. Transcutaneous vaccination with virus-like particles // Vaccine. 2006. V. 24. P. 5406–5412.

57. K. Dell, R. Koesters, M. Linnebacher, C. Klein, L. Gissmann. Intranasal immunization with human papillomavirus type 16 capsomeres in the presence of non-toxic cholera toxin-based adjuvants elicits increased vaginal immunoglobulin levels // Vaccine. 2006. V. 24. P. 2238–2247.

58. C. Heufler, F. Koch, G. Schuler. Granulocyte/macrophage colonystimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells // J. Exp. Med. 1988. V. 167. P. 700–705.

59. J.M. Lynch, D.E. Briles, D.W. Metzger. Increased protection against pneumococcal disease by mucosal administration of conjugate vaccine plus interleukin-12 // Infect. Immun. 2003. V. 71. P. 4780–4788.

60. C.P. Bradney, G.D. Sempowski, H.X. Liao, B.F. Haynes, H.F. Staats. Cytokines as adjuvants for the induction of anti-human immunodeficiency virus peptide immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies in serum and mucosal secretions after nasal immunization // J. Virol. 2002. V. 76. P. 517–524.

61. P.D. Cooper. Vaccine adjuvants based on gamma inulin // Vaccine design: the subunit and adjuvant approach / Ed. by M.F. Powell, M.J. Newman. – New York: Plenum Press, 1995. P. 559–580.

62. P.D. Cooper, E.J. Steele. Algammulin: a new vaccine adjuvant comprising gamma inulin particles containing alum, preparation and in vitro properties // Vaccine. 1991. V. 9. P. 351–357.

63. P.D. Cooper, C. McComb, E.J. Steele. The adjuvanticity of algammulin, a new vaccine adjuvant // Vaccine. 1991. V. 9. P. 408–415.

64. D.G. Silva, P.D. Cooper, N. Petrovsky. Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses // Immunol. Cell. Biol. 2004. V. 82. P. 611–616.

65. N.K. Tong, J. Beran, S.A. Kee, J.L. Miguel, C. Sanchez, J.M. Bayas et al. Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients // Kidney Int. 2005. V. 68 P. 2298–2303.

66. S.L. Giannini, E. Hanon, P. Moris, M. Van Mechelen, S. Morel, F. Dessy, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only // Vaccine. 2006. V. 24. P. 5937–5949.

67. D.M. Harper, E.L. Franco, C. Wheeler, D.G. Ferris, D. Jenkins, A. Schuind et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial // Lancet. 2004. V. 364. P. 1757–1765.

68. А.Н. Никифорова. Безопасность и иммуногенность тривалентной инактивированной гриппозной вакцины с новым адъювантом: дис. … канд. биол. наук. – СПб. 2015. 136 с.

69. Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, А.В. Некрасов, Р.И. Атауллаханов, Б.В. Пинегин, Н.Г. Пучкова, А.С. Иванова. Полиоксидоний – иммуномодулятор последнего поколения: итоги трехлетнего клинического применения // Аллергия, астма и клиническая иммунология. 1999. № 3. С. 3–6.

70. С.А. Кедик, А.А. Вагина, А.В. Панов, Е.С. Жаворонок, Е.В. Ворфоломеева, В.В. Суслов. Влияние различных факторов на коэффициент поглощения водных растворов сополимеров N-винилпирролидона с 2-метил-5-винилпирдином // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Том 49. № 6. С. 47–50.

71. Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин. Основные принципы иммуномодулирующей терапии // Аллергия, астма и клиническая иммунология. 2000. № 1. С. 9–16.

72. Л.В. Крамарь, О.А. Карпухина, Ю.О. Хлынина. Современные возможности иммуномодулирующей и иммунокорригирующей терапии при инфекционных заболеваниях у детей // Лекарственный вестник. 2011. № 3(43). Т. 6. С. 15–23.

73. Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин. Современные представления о защите организма от инфекции // Иммунология. 2000. № 1. С. 7–13.

74. Патент РФ № 2073031. Производное поли-1,4-этиленпиперазина, обладающее иммуномодулирующей, противовирусной и антибактериальной активностью / А.В. Некрасов, Н.Г. Пучкова, А.С. Иванова и др. 1997.

75. Л.В. Лусс, М.П. Костинов. Проблемы терапии и профилактики гриппа: мифы об опасностях поствакцинальных реакций, результаты анализа поствакцинальных осложнений после прививки против гриппа у детей пермского края // Иммунология. 2009. № 1. С. 13–21.

76. Е.И. Бурцева, А.Н. Слепушкин, Е.Н. Власова и др. Опыт вакцинопрофилактики гриппа у лиц пожилого возраста. Сообщение I. Реактогенность и иммуногенность инактивированных гриппозных вакцин // Журн. Микробиол. 2000. № 5. С. 44–45.

77. Г.А. Ельшина, М.А. Горбунов, В.И. Шерварли и др. Оценка эффективности гриппозной тривалентной полимер-субъединичной вакцины «Гриппол» // Журн. Микробиол. 1998. № 3. С. 40–43.

78. А.В. Некрасов, Н.Г. Пучкова. Полиоксидоний: основы синтеза и свойства // Иммунология. 2002. № 6. С. 329–333.

79. Ф.П. Сидельковская. Химия N-винилпирролидона и его полимеров. – М.: Наука, 1970. 328 с.

80. Ю.Э. Кирш. Поли-N-винилпирролидон и другие поли- N-виниламиды: синтез и физико-химические свойства. – М.: Наука, 1988. 236 с.

81. Полимеры медицинского назначения / Под ред. С. Манабу. – М.: Медицина, 1981. 218 с.

82. Н.А. Плате, А.Е. Васильев. Физиологически активные полимеры. – М.: Химия, 1986. 302 с.

83. Ю.В. Кочкина. Разработка технологии получения сополимера N-винилпирролидона с 2-метил-5-винилпиридином и разработка лекарственной формы на её основе: дис. … канд. фарм. наук. – М. 2014. 139 с.

84. Патент РФ № 2415876 С1, МПК С08F226/10, А61К31/79. Сополимеры на основе N-винилпирролидона / С.А. Кедик, В.И. Свергун, Ю.В. Черта и др.; заявитель и патентообладатель С.А. Кедик. – № 2010105912/04; заявл. 19.02.2010; опубл. 10.04.2011, Бюл. № 10. – 10 с.

85. Патент РФ № 2459838 С1, МПК С08F226/10, А61К31/79. Сополимер, содержащий звенья N-винилпирролидона, 2-метил-5-винилпиридина и 4-винилпиридина / С.А. Кедик, А.В. Панов, Ю.В. Кочкина и др.; заявитель и патентообладатель С.А. Кедик. – № 2011140410/04; заявл. 05.10.2011; опубл. 27.08.2012, Бюл. № 24. – 13 с.

86. С.А. Кедик, А.В. Панов, И.В. Сакаева, Ю.В. Кочкина (Черта), Д.В. Еремин, В.В. Суслов. Синтез и молекулярно-массовые характеристики сополимеров N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпирдина // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46, № 8. С. 19–22.

87. Патент РФ № 2000004, МПК А 61К 31/79. Сополимеры 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона, обладающие иммуностимулирующим действием / С.А. Кедик, Е.К. Федоров, В.И. Свергун, В.А. Гаврилов, М.М. Зубаиров. – Заявл. 16.07.1992; опубл. 15.02.1993.

88. В.Г. Калистратов, С.А. Кедик, В.И. Свергун. Противолучевые и другие биологические свойства сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона // Медицинская радиология. 1993. Т. 38. № 10. С. 21–25.

89. Патент РФ № 2415876 С1, МПК С08F226/10, А61К31/79. Сополимеры на основе N-винилпирролидона / С.А. Кедик, В.И. Свергун, Ю.В. Черта и др.; заявитель и патентообладатель С.А. Кедик. – № 2010105912/04; заявл. 19.02.2010; опубл. 10.04.2011, Бюл. № 10. – 10 с.

90. Патент РФ № 2015993 С1, МПК5 С08F226/10, А61К31/79, С08F226/10, С08F226/06. Сополимер 2-метил-5-винилпиридина и N- винилпирролидона, обладающий противоопухолевой активностью / С.А. Кедик, В.И. Свергун, Е.И. Ярцев и др.; заявитель и патентообладатель фармацевтическая фирма «Ковидон». – № 5054916/05; заявл. 16.07.1992; опубл. 15.07.1994, Бюл. № 27-2000. – 10 с.

11–13 ОКТЯБРЯ 2017

БИОИНДУСТРИЯ

КОНГРЕССНО-ВЫСТАВОЧНЫЙ ЦЕНТР **ЭКСПОФОРУМ**

МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА-КОНКУРС

ИННОВАЦИОННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ

Петербургский международный ФОРУМ ЗДОРОВЬЯ ПМФЗ

Выставка-конкурс проходит в рамках Петербургского международного форума здоровья

РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ

1 **БИОТЕХНОЛОГИИ В СФЕРЕ ИНДУСТРИИ ЗДОРОВЬЯ**

2 **СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ И ПИЩЕВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ**

3 **БИОТЕХНОЛОГИИ В СФЕРЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ**

4 **ЛАБОРАТОРНОЕ И АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

ДЕЛОВАЯ ПРОГРАММА

- КОНКУРС ИННОВАЦИОННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ
- КОНФЕРЕНЦИЯ-ПРЕЗЕНТАЦИЯ ИННОВАЦИОННЫХ РАЗРАБОТОК «БИОИНДУСТРИЯ НА ПУТИ К ТЕХНОЛОГИЯМ БУДУЩЕГО»
- КРУГЛЫЙ СТОЛ ПО ВОПРОСАМ КОММЕРЦИАЛИЗАЦИИ БИОМЕДИЦИНСКИХ РАЗРАБОТОК

ОРГАНИЗАТОР

EXPOFORUM

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ МЕДИАПАРТНЕР

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 57.083.3

РОЛЬ НУКЛЕОТИДНЫХ ПРЕПАРТОВ И NO-СИНТАЗ В ИМУННОЙ ЗАЩИТЕ ОРГАНИЗМА

В.С. Орлова[1], Е.В. Орлова[2]*, А.М. Стойнова[1], Я.М. Станишевский[1]

Резюме. Данная статья описывает возможность использования полученных из биологических объектов нуклеотидов и нуклеозидов (в том числе из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*), а также их различных производных в практической медицине при лечении заболеваний или для коррекции патологически измененных метаболических процессов в организме при воздействии неблагоприятных факторов.

Ключевые слова: нуклеотиды, нуклеозиды, дрожжи.

THE ROLE OF NUCLEOTIDE SUBSTANSES AND NO-SYNTHASE IN THE IMMUNE PROTECTION OF THE ORGANISM

V.S. Orlova[1], E.V. Orlova[2]*, A.M. Stoinova[1], Ya.M. Stanishevskiy[1]

Abstract. The present article describes the biochemical mechanisms and the possibility of nucleotides and nucleosides substances naturally produced (i.e. *Saccharomyces cerevisiae* and others) medicine application in field of correction of pathologically altered metabolic processes in the body under the influence of adverse factors.

Keywords: nucleotides, nucleosides, yeasts.

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

2 – ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), 142290, Россия, г. Пущино, ул. Институтская, 3

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

2 – Institute of Theoretical and Experimental Biophysics (ITEB) RAS, 3, Institutskaya str., Puschino, Moscow District, 142290, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: eaglson@mail.ru
Тел.: 8(499) 936-85-99

ВВЕДЕНИЕ

Среди важнейших внутриклеточных компонентов особое положение занимают вещества нуклеотидной природы, которые в качестве кофакторов и в составе ДНК и РНК участвуют в таких жизненно важных процессах живых организмов, как биосинтез белков, регуляция биохимических процессов, энергетического обмена, иммунитета и функционирования наследственного аппарата. В настоящее время существенно возрос интерес к поиску и разработке лекарственных препаратов на основе природных нуклеотидов, которые могут стать эффективными средствами регуляции различных функций организма и метаболической терапии [1].

Известна также ключевая роль некоторых нуклеотидов в синтезе оксида азота – NO, которому принадлежит важная роль в регуляции многих биохимических процессов, в частности активировании гуанилатциклазы, фосфолипазы С, влиянии на синтез инсулина, адреналин- и дофаминергическую системы. Кроме того, NO является нейротрансмиттером и веществом, участвующим в регуляции артериального давления, иммунореактивности и многих других важных физиологических процессов [1].

В связи с тем, что влияние нуклеотидов на синтез NO в организме осуществляется путем изменения активности NO-синтаз (NOS), в частности, Ca^{2+}-зависимой NO-синтазы, поиск препаратов, влияющих на активность NOS, является одной из актуальных задач современной биологии и медицины.

Наше внимание привлекла возможность получения нуклеотидных препаратов из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которые, по данным [2], обладают выраженной биологической активностью, низкой токсичностью и перспективны для разработки на их основе лекарственных препаратов для повышения иммунореактивности организма, коррекции метаболических нарушений и нормализации физиологических процессов при развитии ряда патологических состояний.

Нуклеотиды и нуклеозиды являются универсальными биомолекулами, которые присутствуют во всех клетках животных и растительных организмов, в качестве коферментов принимают участие во многих жизненно важных обменных и регуляторных процессах, являются структурными единицами нуклеиновых кислот, участвуют в хранении, передаче и реализации генетической информации.

В этой связи возможность использования полученных из биологических объектов нуклеотидов и нуклеозидов, а также их различных производных в практической медицине при лечении заболеваний или для коррекции патологически измененных метаболических процессов в организме при воздействии неблагоприятных факторов привлекает пристальное внимание исследователей [1].

ПРИМЕНЕНИЕ НУКЛЕОТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ТЕРАПИИ

Нуклеотидные препараты стимулируют иммунореактивность и поэтому применяются при терапии ретровирусных инфекций [3], кроме того, присутствие в нуклеотидных препаратах других клеточных метаболитов (витамины, свободные аминокислоты) позволяет использовать эти препараты для неспецифической стимулирующей терапии при хронических воспалительных заболеваниях, в качестве адаптогенов, а также при патологических состояниях различного генеза, сопровождающихся оксидативным стрессом [4].

В последние годы химически модифицированные нуклеотиды и нуклеозиды все шире используются при лечении многих вирусных заболеваний, в том числе вызванных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), так как установлено, что механизм их противовирусного действия обусловлен ингибированием обратной вирусной транскриптазы [5]. Показано также, что нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ) приобретают противовирусную активность только после их фосфорилирования. Фосфорилированные НИОТ конкурируют с природными дезоксирибонуклеозидтрифосфатами (нуклеозидами), и встраивание фосфорилированных НИОТ в вирусную ДНК обрывает ее дальнейший синтез.

Устойчивость к НИОТ определяется двумя основными механизмами. При первом из них в результате мутации создается *стерическое препятствие к* распознаванию обратной транскриптазой различий между нуклеозидами и их аналогами; в результате вместо НИОТ в вирусную ДНК начинают встраиваться обычные нуклеозиды. Такой механизм имеет место, например при мутации M184V [6].

Второй механизм – *фосфоролиз* АТФ или пирофосфата, в результате которого из растущей цепи ДНК элиминируется уже встроенный НИОТ. Этот механизм опосредуется мутациями M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y и K219Q [6].

Препараты нуклеотидной природы нашли практическое применение в качестве средств иммуностимулирующей терапии. Из них наиболее широкое распространение получил нуклеинат натрия.

Коммерческий препарат «Натрия нуклеинат» – натриевая соль низкомолекулярной РНК из пекарских дрожжей, – представляет собой белый порошок с кремоватым или сероватым оттенком. Легко растворим в воде с образованием опалесцирующего раствора. «Нуклеинат натрия» увеличивает фагоцитарную активность, активирует поли- и мононуклеары, усиливает эффективность антимикробного действия тетрациклинов при смешанной инфекции, вызванной стафилококком и синегнойной палочкой [7].

При профилактическом введении «Нуклеинат натрия» проявляет противовирусную активность, так как обладает выраженными интерфероногенными свойствами [7].

«Нуклеинат натрия» улучшает формирование прививочного иммунитета, увеличивает его качество и позволяет снижать дозировку вакцин. Препарат оказывает позитивный эффект при лечении больных с вирусным паротитом, различными формами респираторных вирусных инфекций и хроническим воспалением легких. «Нуклеинат натрия» увеличивает содержание РНК и белка в макрофагах в 1,5 раза и гликогена в 1,6 раза, увеличивает активность лизосомальных ферментов и завершенность фагоцитоза макрофагами. Под влиянием препарата увеличивается содержание лизоцима и нормальных антител, если их уровень был снижен [7]. Из побочных эффектов, характерных для «Нуклеината натрия» при парентеральном введении, следует отметить аллергические реакции из-за наличия в нем материала РНК.

Особое место среди препаратов нуклеиновых кислот занимает иммунная РНК макрофагов, которая представляет собой информационную РНК, вносящую в клетку фрагмент антигена, и под его влиянием развивается неспецифическая стимуляция иммунокомпетентных клеток нуклеотидами. Неспецифическими стимуляторами являются синтетические двухцепочечные полинуклеотиды, которые стимулируют антителообразование, усиливают антигенный эффект неиммуногенных доз антигена, обладающего противовирусными свойствами, связанными с индукцией интерферонов [4]. Их механизм действия сложен и недостаточно изучен. Установлено, что данные препараты включаются в систему регуляции синтеза белка в клетке, активно взаимодействуя с клеточной мембраной [8].

Большое применение нуклеотидные производные, а именно адениновые нуклеотиды, нашли в кардиологической практике [9]. Впервые лечебные эффекты внутривенного введения адениновых нуклеотидов (АН) при нарушениях сердечного ритма были описаны в 1929 г. A.N. Drury и G.A. Szent [10]. Уже в 1930 г. R.M. Honey и соавторы [11] сообщили о предполагаемых механизмах положительного действия аденозина (Ад) при нарушениях ритма сердца у человека. Вместе с тем эпоха широкого клинического применения АН

началась с 1955 г. и продолжалась в течение последующих двадцати лет, АН использовались в кардиологии исключительно для купирования ПТ [12].

Высокая стоимость АН-препаратов, сравнительно низкая эффективность, наличие побочных реакций (тошнота, рвота, снижение артериального давления, увеличение температуры тела, нарушение функции печени, лимфопения) и отсутствие надежных схем использования привели к ограничению их применения.

В связи с расширением знаний, полученных при изучении патогенеза многих заболеваний, было установлено, что их возникновение сопровождается активацией свободнорадикальных реакций перекисного окисления липидов и что нуклеотидные препараты оказались эффективными при терапии состояний, сопряженных с оксидативным стрессом [13].

Для понимания обоснованности клинического применения нуклеотидных препаратов при лечении ряда заболеваний, сопровождающихся оксидативным стрессом, представляется целесообразным рассмотреть механизмы его возникновения и систему антиоксидантной защиты организма.

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА

В нормальном состоянии функционирования организма скорость свободнорадикальных реакций (СРР) пероксидации липидов клеточных мембран и липопротеидов относительно мала, что обусловлено низким уровнем образования радикалов-инициаторов и действием сбалансированной системы антиоксидантной защиты [14]. Однако в процессе возникновения, развития воспалительных и ряда других заболеваний это равновесие нарушается, резко возрастает продукция радикалов-инициаторов и наблюдается инактивация системы антиоксидантной защиты, развивается так называемый оксидативный стресс [15].

Образующиеся в клетке радикалы могут инициировать другие реакции, вступая во взаимодействие с различными клеточными компонентами: белками, нуклеиновыми кислотами, липидами и др. [15] (рисунок 1).

В результате этих реакций происходит деградация молекул-мишеней с образованием более или менее стабильных продуктов реакций, идентификация и определение количества которых могут быть показателями, определяющими скорость СРР. Наиболее часто используемым маркёром инициации СРР является определение продуктов перекисной деградации



Рисунок 1. Взаимодействие радикалов-инициаторов, активных форм кислорода (O_{2}^{-}, H_2O_2, OH•) с различными компонентами клеток

фосфолипидов клеточных мембран и липопротеидов плазмы крови [16].

Все радикалы, образующиеся в организме как в норме, так и при возникновении и развитии так называемых свободнорадикальных патологий, можно подразделить на две группы: природные и чужеродные. Природные радикалы, в свою очередь, подразделяются по способу их образования и участию в дальнейших реакциях на первичные, вторичные и третичные [17].

Первичные радикалы образуются в реакциях с участием специализированных молекулярных механизмов. Для непосредственного образования вторичных радикалов специальных молекулярных механизмов в клетке нет, и они формируются из первичных радикалов в результате последующих реакций.

Ко вторичным радикалам следует отнести гидроксильный радикал, образующийся из перекиси водорода при участии ионов металлов переменной валентности, и в какой-то мере пероксинитрит (ONOO), который является продуктом реакции между оксидом азота (NO) и супероксидным анион-радикалом кислорода [17].

Вторичные радикалы обладают значительно большей активностью и поэтому могут оказывать более выраженное повреждающее действие. И наконец, к третичным радикалам следует отнести радикалы, которые образуются при взаимодействии первичных и вторичных с молекулами антиоксидантов или каких-либо других легко окисляющихся веществ [18].

Первичные и вторичные радикалы являются в основном продуктами модификации молекулярного кислорода. Молекулярный кислород обычно не вступает в прямые неферментативные химические реакции с органическими соединениями тканей организма. Реакции с участием кислорода в живой клетке чаще всего происходят с участием ферментов – оксидаз. В ходе этих реакций могут образовываться промежуточные свободнорадикальные продукты восстановления кислорода, которые получили название активные формы кислорода (АФК) [19].

- O_{2^-} – супероксид анион радикал кислорода;
- $^1O_2$ – синглетный кислород;
- H_2O_2 – перекись водорода;
- OH• – гидроксильный радикал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как уже отмечалось, многие патологические процессы протекают в условиях активации СРР перекисного окисления [19] и сопровождаются двумя хорошо контролируемыми процессами – нарушением микроциркуляции (ишемия) и восстановлением кровотока (реперфузия). Поэтому при описании механизмов активации СРР при различных патологических состояниях рассматривают механизмы продукции АФК в цикле или циклах ишемия – реперфузия (И/Р) [20].

Среди систем или механизмов, обеспечивающих увеличение продукции АФК, способных запускать СРР перекисной модификации липидов клеточных мембран и липопротеидов, следует выделить следующие [15]:

1. Нарушение транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий.
2. Интенсификация синтеза и окисления катехоламинов.
3. Активация системы «ксантин-ксантиноксидаза».
4. Активация фагоцитов.
5. Появление пула каталитически активных ионов металлов переменной валентности.

Следовательно, в процессе возникновения и развития различных патологических состояний, в частности воспалительных заболеваний, или при воздействии ряда физических факторов, например ионизирующих излучений, резко увеличивается активность механизмов, продуцирующих АФК, и концентрация каталитически активных ионов Fe^{2+} в циркулирующей крови или локально в очаге воспаления [19].

Все это, вместе взятое, приводит к усиленной наработке свободных радикалов-инициаторов, способных запускать СРР с участием различных субстратов, в том числе перекисное окисление липидов клеточных мембран, липопопротеидов плазмы крови и сульфгидрильных групп, а также смещение равновесия в системе NO-синтаз: iNOS/Ca^{2+}-зависимая NOS в сторону iNOS изоформы [21].

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ по программе реализации комплексных проектов по созданию высокотехнологичного производства (постановление Правительства РФ № 218 от 09.04.2010 г., шифр конкурса 2016-218-09). Договор № 03. G25.310258.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дж. Монтеро, А.Б. Данилов. Роль нуклеотидов в лечении периферических нейропатий: обзор // Manage pain. 2015. № 4. С. 33–38.
2. В.В. Заерко, Ю.А. Оболенский. Состояние вязкости крови у больных псориазом в процессе лечения производными пурина // Вестник дерматологии. 2000. № 3. С. 29–30.
3. Патент № 2245149. Иммуностимулирующие нуклеиновые кислоты / А.М. Криг, К. Шеттер, Й. Фольльмер. – № 2002111006/15; заявл. 25.09.00; опубл. 27.01.05.
4. Н.Б. Серебрянная. Нуклеотиды и нуклеозиды как регуляторы иммунного ответа: от теории к практике // Аллергология и иммунология. № 1. Т. 8. 2007.
5. В.Х. Фазылов, В.П. Чуланов. Определение вариантов полиморфизма гена интерлейкина-28В у пациентов с сочетанной инфекцией ХГС/ВИЧ // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2013. № 3. С. 29–32.
6. L.K. Naeger, N. A. Margot. ATP-Dependent Removal of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase // Antimicrob Agents Chemother. 2002. № 46(7). P. 2179–2184.
7. С. Воронин, А. Гуменюк. Натрия нуклеинат – эффективный иммуномодулятор // Животноводство России. 2015. № 7. С. 21.
8. H. Tawarahara, I. Kuraoka, S. Iwai. Facile preparation of a fluorescent probe to detect the cellular ability of nucleotide excision repair // Analytical Biochemistry. 2017. V. 526. P. 71–74.
9. О. Лондоно, М.М. Медведев. Адениновые нуклеотиды в современной клинической аритмологии // Вестник Аритмологии. 2002. № 29. С. 66–74.
10. A.N. Druri, A. Szent-Georgy. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart // J. Physiol. (Lond). 1929. V. 68. P. 213–237.
11. R.Honey, V.T.Ritchie, W.Thomson. The action of adenosine upon the human heart // Quart. J. Med. 1930. V. 23. P. 485–489.
12. Н.В. Топчий, А.С. Топорков. Возможности применения тиотриазолина в качестве средства метаболической терапии // Русский медицинский журнал. 2015. С. 890–894.
13. S.Prakash, S.Agrawal. Significance of pharmacogenetics and pharmacogenomics research in current medical practice // Current Drug Metabolism. 2016. V 17. P. 862–876.
14. R.T. Di-Giulio, G.W. Winstonand. Pro-oxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms // Aquat. Toxicology. 1991. P. 137–167.
15. Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. 252 с.
16. M.R. Hayden. Islet Amyloid, Metabolic Syndrome, and the Natural Progressive History of Type 2 Diabetes Mellitus // JOP. J Pancreas. 2002. P. 126–138.
17. Ю.А. Владимиров. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образовательный журнал. 2000. Т. 6. № 12. С. 13–19.
18. И.А. Фридович. Свободные радикалы в биологии. – М.: Наука, 1979.
19. Ю.А. Владимиров, О.А. Азизова. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Биофизика. 1992. Т. 29. С. 3–250.
20. Р.А. Мухамадияров, Е.А. Сенокосова. Влияние ишемической гипоперфузии изолированного сердца пустыми липосомами и липосомами с антиоксидантами на ультраструктуру миокарда // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 2. С. 123.
21. Е.В. Орлова. Изучение влияния кальциевого антагониста верапамила и иммуномодуляторов (т-активина и циклофосфамида) на кинетические свойства Ca^{2+}-зависимой NOS из тимоцитов и гепатоцитов крыс // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2005. № 4. С. 26–29.

УДК 615.322

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ СУХОГО ЭКСТРАКТА МОРИНДЫ ЦИТРУСОЛИСТНОЙ КОРНЕЙ

Р.К. Агбади[1], И.Е. Каухова[1]*, В.А. Вайнштейн[1], С.А. Минина[1], М.В. Яковлева[2], М.А. Власенко[2], А.У. Кутлушина[1]

Резюме. Целью исследования является разработка технологии сухого экстракта из корней моринды цитрусолистной как перспективной фитосубстанции для получения лекарственных средств. Изучено влияние факторов на процесс экстрагирования действующих веществ из корней моринды цитрусолистной. Разработаны режимы экстрагирования: время экстрагирования – 60 мин, гидромодуль – 1:30, экстрагент – 70% этиловый спирт. Разработана технология получения сухого экстракта. Предложена технологическая схема производства сухого экстракта. Установлены параметры стандартизации сухого экстракта моринды цитрусолистной корней.

Ключевые слова: корни моринды цитрусолистной, сухой экстракт, режимы экстрагирования, параметры стандартизации.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGICAL PROCESSES OF THE DRY EXTRACTS OF MORINDA CITRIFOLIA ROOTS

R.K. Agbadi[1], I.E. Kaukhova[1]*, V.A.Vanshtein[1], S.A. Minina[1], M.V. Yakovleva[2], M.A. Vlasenko[2], A.Y. Kutlushina[1]

Abstract. The aim of this study is to develop the technology of dry extracts from the roots of *Morinda citrifolia* as a prospective phytoactive pharmaceutical ingredient (API) for obtaining medicinal products. Factors influencing the extraction process of active ingredients from the roots of *Morinda citrifolia* were investigated. The modes of extraction were formulated: extraction time of 60 minutes, the hydromodule was established to be 1:30, the extractant – 70% ethyl alcohol. The study developed a technological process of obtaining dry extracts.The technological scheme of production of dry extracts was proffered. The parameters of standardization of the dry extract of *Morinda citrifolia* roots were established.

Keywords: the roots of *Morinda citrifolia*, dry extract, extraction, standardization.

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

2 – ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифоова» МЧС России, 194044, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 4/2

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

2 – Federal State Bulgetary Institute «A.M. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine» of the Ministry for Civil Defense, Emergencies and Elimination of Consequences of Natural Disasters of Russian Federation, 4/2, Ak. Lebedev str., Saint-Petersburg, 194044, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: irina.kaukhova@pharminnotech.com
Тел.: 8 (911) 917 06 55

ВВЕДЕНИЕ

С каждым годом растение моринда цитрусолистная (M*orinda Citrifolia* L.) все больше привлекает внимание специалистов в области получения и применения фитопрепаратов. Это объясняется широким спектром фармакологического действия растения. Моринда цитрусолистная, известная также как нони, обладает антибактериальным, противовирусным, противогрибковым, противоопухолевым, противоглистным, болеутоляющим, гипотензивным, противовоспалительным и иммуномодулирующим действиями [1]. Моринда цитрусолистная распространена на Таити и Гавайях, встречается также в Малайзии, Индонезии, Тайване, Индии, Африке, Австралии [2, 3].

На современном фармацевтическом рынке из сырья моринды выпускается ряд БАД к пище, в основном это сок плодов нони, а также гранулы порошка смеси листьев *Morinda citrifolia* и *Morinda officinalis* в капсулах, гранулы измельченной смеси плодов, корней и листьев *Morinda citrifolia* в капсулах. В настоящее время плоды моринды цитрусолистной включены во Вьетнамскую Фармакопею IV издания в качестве слабительного и мочегонного средства, средства поддержания артериального давления и повышения иммунитета [4].

Ранее в результате проведенной нами сравнительной фитохимической оценки содержания основных групп биологически активных веществ в растении моринда цитрусолистная было установлено, что антрахиноны содержатся только в корнях, дубильные кислоты обнаружены в корнях и листьях, флавоноиды – во всех органах растения, причем наибольшее количество флавоноидов содержалось в корнях [4]. Таким образом, моринда цитрусолистная, в частности корни, является перспективным сырьем для получения лекарственных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили высушенные корни растения моринда цитрусолистная, собранные на территории Ганы.

Экстракцию сырья проводили методом мацерации следующим образом: навеску растительного сырья, измельченного до размера частиц 1,0–1,5 мм, загружали в экстрактор, заливали экстрагентом – спиртом 70%. Время экстракции и соотношение сырья и экстрагента (гидромодуль) варьировалось.

Качественный анализ флавоноидов в сухом экстракте моринды цитрусолистной корней проводили методом тонкослойной хроматографии в системе бутан-1-ол – ледяная уксусная кислота – вода (БУВ) в соотношении 4:1:2. На линию старта хроматографической пластинки марки Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ (Россия) размером 10×10 м наносили в виде пятен спиртоводный раствор сухого экстракта и растворы стандартных образцов (СО) рутина [Rutin hydrate R5143 SIGMA, ≥94% (HPLC)] и апегинина [Apigenin 1040683 United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard]. Пластинку с нанесенными пробами высушивали на воздухе и помещали в вертикальную камеру для хроматографирования, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей бутан-1-ол – ледяная уксусная кислота – вода в ссоотношении 4:1:2, и хроматографировали восходящим потоком. После прохождения фронтом растворителя заданного участка хроматограмму вынимали из камеры и просматривали в УФ-свете до и после обработки 2% раствором алюминия хлорида в спирте этиловом 95%.

С целью количественного определения суммы флавоноидов в сухом экстракте около 0,15 г (точная навеска) экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 30 мл спирта 70%, перемешивали в течение 40 мин, доводили объем 70% спиртом до метки, перемешивали и фильтровали, отбрасывая первые 10 мл фильтрата (раствор А). Испытуемый раствор готовили следующим образом: переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл 1 мл раствора А, добавляли 2 мл 2% спиртового раствора алюминия хлорида, доводили объем раствора спиртом этиловым до метки и перемешивали (раствор Б). Измеряли оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре UV-mini-1240 (Shimadzu, Япония) при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1 мл раствора А, 1 капли разведенной уксусной кислоты, и доводили спиртом до метки в колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно проводили измерение оптической плотности раствора рабочего стандартного образца (РСО) рутина.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сухом экстракте (X) рассчитывали по формуле

$$X(\%) = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора РСО рутина; m_0 – масса РСО рутина, г; m_1 – масса сухого экстракта, г; W – потеря в массе при высушивании сухого экстракта, %

Примечание 1. **Приготовление раствора РСО рутина.** 0,05 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного при температуре 130–135 °С, растворяли в 85 мл 96% этилового спирта в колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждали до комнатной температуры, доводили объем раствора до метки тем же спиртом и тщательно перемешивали. Переносили 10 мл раствора в мерную колбу вместимостью 25 мл и добавляли 1 мл 2% раствора алюминия хлорида в спирте 96% и 1 каплю 2% раствора уксусной кислоты, доводили объём раствора до метки тем же спиртом.

Примечание 2. **Приготовление алюминия хлорида спиртового раствора 2%.** 2 г алюминия хлорида гексагидрата растворяли в 40 мл спирта 96% в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводили объём раствора тем же спиртом до метки.

Анализ элементного состава сухого экстракта проведен с помощью метода масс-спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) Определение содержания химических элементов в сухом экстракте осуществляли в соответствии с методическими указаниями [6]. Для проведения исследований на приборе ICP-MS X Series II фирмы Termo Elemental (США) использовали по 3 пробы образца массой около 0,1 г (точная навеска). Представленные данные обработаны статистически и выражены как средние арифметические со стандартным отклонением (SD). Для оценки различий между экспериментальными данными использовали критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне вероятности $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка технологии экстрагирования моринды цитрусолистной корней

С целью определения оптимального режима экстракции корней моринды цитрусолистной исследовано влияние таких основных технологических факторов, как продолжительность настаивания, гидромодуль. Результаты исследования влияния гидромодуля (соотношение сырья и экстрагента 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50) и времени экстракции (20, 30, 60, 90, 120 мин) на выход экстрактивных веществ из сырья приведены в таблице 1 и на рисунке 1. Ранее было показано, что наилучшей экстрагирующей способностью обладает 70% спиртоводный экстрагент [5].

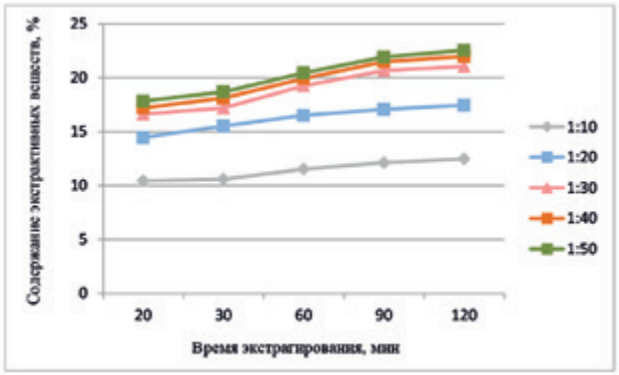


Рисунок 1. Кинетика содержания экстрактивных веществ в вытяжке в зависимости от времени и гидромодуля

Исследования показали, что количество извлеченных экстрактивных веществ прямо пропорционально времени экстрагирования. Однако после 90 мин экстракции переход их в вытяжку незначителен, не более 2,04%.

Поскольку разность концентрации является движущей силой диффузионного процесса, то гидромодуль (соотношение сырья и экстрагента) значительно влияет на выход экстрактивных веществ. Результаты свидетельствуют о том, что использование соотношения сырья к экстрагенту 1:30 обеспечивает высокий выход экстрактивных веществ, дальнейшее увеличение гидромодуля неэффективно.

Разработка технологии и стандартизация сухого экстракта моринды цитрусолистной корней

Сухой экстракт получали по следующей технологической схеме. Расчетное количество сырья, измельченного до размера частиц 1,0–1,5 мм, загружали в экстрактор, заливали экстрагентом – спиртом 70% в соотношении сырьё : экстрагент 1:30 и экстрагировали в течение 90 мин. Полученная в разработанных условиях вытяжка из корней моринды цитрусолистной отстаивалась в течение 24 ч при температуре не выше 8 °С для удаления балластных веществ, отфильтровывалась и направлялась на стадию сгущения на роторно-плёночном испарителе до густой консистенции. Сушку экстракта проводили в вакуум-сушильном шкафу при температуре 60–65 °С при разряжении до остаточного влагосодержания в экстракте не более 5%. Сухой экстракт измельчали до размера частиц 0,5–1,0 мм

В разработанных условиях наработаны 5 серий сухого экстракта моринды цитрусолистной корней и проведена их стандартизация в соответствии с требованиями ГФ XIII [7]. Качественный анализ БАВ в сухом экстракте проводили методом ТСХ. При разделении раствора сухого экстракта методом тонкослойной хроматографии в системе бутан-1-ол – ледяная уксусная кислота – вода очищенная (4:1:2) образуются 2 пятна с R_f=0,64, R_f=0,90. В результате сравнения полученных для пятен значений R_f и их окраски с таковыми для растворов сравнения можно говорить о наличии в экстракте флавоноидов рутина и апегинина.

Методом УФ-спектрофотометрии установлено содержание в сухом экстракте суммы флавоноидов в пересчете на рутин – 12,71±0,37.

В сухом экстракте определен элементный состав. В процессе исследований определены эссенциальные элементы (жизненно важные для человека) – K, Ca, P, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Se, Zn и потенциально токсичные – Al, Ba, Cd, Pb, As (таблица 2).

Общее содержание тяжелых металлов в сухом экстракте составило 0,00417 мг/г, что удовлетворяет нормам содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственных растительных препаратах в соответствии с требованиями ГФ XIII [7].

Установленные показатели качества сухого экстракта моринды цитрусолистной корней приведены в таблице 3.

Таблица 1.

Влияние гидромодуля и времени на количество экстрактивных веществ (%) в извлечении корней моринды цитрусолистной

Время экстракции, мин / Гидромодуль	20	30	60	90	120
1:10	10,44±0,53	10,59±0,34	11,53±0,52	12,13±0,37	12,48±0,34
1:20	14,46±0,32	15,53±0,50	16,51±0,46	17,07±0,16	17,46±0,32
1:30	16,63±0,55	17,20±0,15	19,25±0,41	20,67±0,63	21,05±0,63
1:40	17,2±0,16	18,11±0,25	19,93±0,45	21,49±0,49	21,97±0,53
1:50	17,73±0,45	18,69±0,48	20,16±0,41	21,86±0,52	22,64±0,29

Таблица 2.

Результаты определения элементного состава сухого экстракта моринды цитрусолистной корней

№ п/п	Образец Элементы	Сухой экстракт	Единицы измерения	№ п/п	Образец Элементы	Сухой экстракт	Единицы измерения
1	2	3	4	1	2	3	4
1	Бериллий	0,001	мкг/г	17	Цинк	648,511	мкг/г
2	Бор	10,077	мкг/г	18	Германий	0,194	мкг/г
3	Натрий	13370,150	мкг/г	19	Мышьяк	0,408	мкг/г
4	Магний	9375,205	мкг/г	20	Селен	0,105	мкг/г
5	Алюминий	179,425	мкг/г	21	Рубидий	45,178	мкг/г
6	Кремний	436,630	мкг/г	22	Стронций	11,597	мкг/г
7	Фосфор	7274,841	мкг/г	23	Молибден	2,565	мкг/г
8	Калий	60365,826	мкг/г	25	Серебро	<0.000	мкг/г
9	Кальций	2717,996	мкг/г	26	Кадмий	0,616	мкг/г
10	Ванадий	0,355	мкг/г	27	Олово	4,602	мкг/г
11	Хром	60,329	мкг/г	28	Йод	1,357	мкг/г
12	Марганец	100,334	мкг/г	29	Цезий	2,208	мкг/г
13	Железо	296,491	мкг/г	30	Барий	0,007	мкг/г
14	Кобальт	0,284	мкг/г	31	Ртуть	0,042	мкг/г
15	Никель	3,265	мкг/г	32	Талий	45,991	мкг/г
16	Медь	0,000	мкг/г	33	Свинец	3,511	мкг/г

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучен процесс экстрагирования суммы экстрактивных веществ из корней моринды цитрусолистной методом мацерации при разных модулях экстракции. Результаты исследований показали, что оптимальными параметрами получения извлечений из сырья являются: экстрагент – 70%-й этиловый спирт, соотношение сырье : экстрагент – 1:30, продолжительность экстракции – 90 мин. Разработана технология сухого экстракта из корней моринды цитрусолистной. Установлено, что содержание суммы флавоноидов в экстракте должно быть не менее 12,00%.

Проведен анализ элементного состава сухого экстракта из корней моринды цитрусолистной. В процессе исследований были определены эссенциальные элементы (жизненно важные для человека) – K, Ca, P, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Se, Zn и потенциально токсичные – Al, Ba, Cd, Pb, As. При этом общее содержание тяжелых металлов в сухом экстракте удовлетворяет требованиям ГФ XIII.

Предложены показатели качества сухого экстракта моринды цитрусолистной корней, который может являться перспективной фитосубстанцией в технологии лекарственных средств растительного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. K. Duduku, N. Rajesh, S. Rosalam. Phytochemical Constituents and Activities of *Morinda citrifolia* L. // Agricultural and Biological Sciences. 2012. P. 141–144.
2. D.R. Singh. *Morinda citrifolia* L. (Noni): A review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties // Journal of Diabetes and Endocrinology. 2012. V. 3(6). P. 78–85.
3. A. Abbott. The geographic origin of the plants most commonly used for medicine by Hawaiians // J. Ethnopharmacol. 1985. V. 14. P. 213–222.
4. Vietnamese Pharmacopoeia Commission. 4rd ed. 2010.
5. I.E. Kaukhova, R.K. Agbadi, S.K. Minina, A.U. Kutlushina. Roots, herbs and fruits of *Morinda citrifolia* as perspective drug substance in the technology of phytopreparations // Фармация. 2017. Т. 66. № 4. С. 25–27.
6. Л.Г. Подунова и др. Методика определения микроэлементов в диагностируемых биосубстратах атомной спектрометрией с индуктивно связанной аргоновой плазмой. Методические рекомендации (утв. ФЦ ГСЭН 29.01.2003). – М.: ФЦГСЭН МЗ РФ, 2003. 50 с.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. – М. 2015. URL: http://www.femb.ru/feml (дата обращения).

Таблица 3.

Спецификация показателей качества сухого экстракта моринды цитрусолистной корней

Тесты	Методы	Нормы	Эксперименталь ные значения
Описание	Визуально	Порошок темно-коричневого цвета со специфическим запахом	Порошок темно-коричневого цвета со специфическим запахом
Подлинность флавоноидов	ТСХ ГФ XIII	Не менее двух пятен с R_f=0,64 и R_f=0,90, соответствующих флавоноидам	Не менее двух пятен с R_f=0,64 и R_f=0,90, соответствующих флавоноидам
Количественное содержание флавоноидов, %	Спектрофотометрический ГФXIII	Не менее 12	12,71±0,37
Потеря в массе при высушивании, %	ГФ XIII	Не более 5,0	1,81±0,47
Тяжелые металлы, %	ГФ XIII	Не более 0,01	0,00417
Упаковка	По 5 г в герметичную полимерную тару с широким горлышком на 15 мл		
Хранение	В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С		

УДК 615.074

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕРПИСТЕНА В МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

Е.И. Молохова[1]*, Д.Е. Липин[2], Р.В. Кириллова[1]

Резюме. Представлены результаты валидации аналитической методики количественного определения серпистена в мази методом УФ-спектрометрии. Методика валидирована по таким показателям, как специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность.

Ключевые слова: валидация, количественное определение, мазь, серпистен, УФ-спектрометрия.

VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD OF ASSAY OF SERPISTEN IN OINTMENT

E.I. Molokhova[1]*, D.E. Lipin[2], R.V. Kirillova[1]

Abstract. In this work are presented the results of analytical method validation of potency assay of serpisten in ointment according to the UF-spectrometry method. A method is validated on such indicators as specificity, range, linearity, trueness and a precision.

Keywords: validation, potency assay, ointment, serpisten, UF-spectrometry method.

1 – ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, Россия, г. Пермь, ул. Екатерининская, 101

2 – ОАО «Ирбитский химико-фармацевтический завод», 623850, Россия, Свердловская область, г. Ирбит, ул. Кирова, 172

1 – Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Healthcare, 101, Ekaterininskaya str., Perm, 614990, Russia

2 – Joint Stock Company «Irbit Chemical and Pharmaceutical Plant», 172, Kirova str., Irbit, Sverdlovsk region, 623850, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: profmol17@gmail.com
Тел.: 8 (912) 582 84 42

ВВЕДЕНИЕ

Одним из интенсивно исследуемых классов биологически активных веществ растений являются аналоги гормона линьки насекомых – фитоэкдистероиды – благодаря своему широкому спектру фармакологического действия, высокой активности и отсутствию токсического действия [1]. В результате многолетних исследований ученые Института биологии Коми научного центра Российской Академии наук интродуцировали растение *Serratula coronata* L. (серпуха венценосная), которое накапливает в условиях северных широт около 2% фитоэкдистероидов (в пересчете на сухое сырье), а также запатентовали технологию выделения из сырья фитоэкдистероидной фракции под названием серпистен, содержащей не менее 75% 20-гидроксиэкдизона и не менее 10% 25S-инокостерона [2].

Установлено, что фитоэкдистероиды обладают противовоспалительным [3] и противомикробным действием [4], а также влияют на дифференциацию кератиноцидов человека *in vitro* [3], что дает основание полагать наличие у них репаративных свойств. Известны составы мазей на основе фитоэкдистероидов, получаемых, в частности, из растений родов *Silene* и *Ajuga*. Однако в то же время в доступных источниках практически отсутствует информация о методах стандартизации мягких лекарственных форм (МЛФ) с экдистероидами, что делает актуальной разработку методики стандартизации мягких лекарственных форм, содержащих в качестве действующего вещества серпистен. Ранее нами показана возможность определения серпистена в мягкой лекарственной форме спектрофотометрическим методом [5]. Для доказательства достоверности и воспроизводимости результатов анализа проведена процедура валидации методик подлинности и количественного определения серпистена в мази, рекомендуемых для включения в проект нормативной документации.

Целью данной работы явилось изучение пригодности предлагаемой аналитической методики для стандартизации мази серпистена по показателям «подлинность» и «количественное содержание», а также проведение валидации по следующим характеристикам: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы: субстанция серпистен (ТУ 1115-017-38576-2003, ООО «Комибиофарм»), Aerosil®200 (Evonik Industries AG, Герма-

ния), вазелин (ФСП 42-0526-5201-04, ООО «НПО «Ликом»), масло вазелиновое (ЛСР-007829/08-061008, АО «Медхим»), эмульгатор Т2 (ТУ 9145-005-54402189-02, ЗАО «Ласкрафт»), спирт этиловый 95% (ФС 001331-260216, ООО «Нижнефарм»), вода очищенная (ФС 2.2.0020.15).

Приборы и аппаратура: весы прецизионные лабораторные ВМ153М- II (ООО «ОКБ Веста») спектрофотометр СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр»), СФ-103 (ЗАО «НПКФ Аквилон»).

Методика количественного определения: в химический стакан помещали около 2,0 г (точная навеска) мази, добавляли около 15 мл воды очищенной, подогретой до 60 °С, энергично встряхивали в течение 10 мин. Надосадочную жидкость декантировали и помещали в морозильную камеру на 15 мин. К осадку добавляли около 10 мл воды очищенной, подогретой до 60 °С, энергично встряхивали в течение 5 мин. Затем химический стакан с раствором мази помещали в морозильную камеру на 15 мин. Перед определением оптической плотности обе вытяжки фильтровали через один мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Вытяжки объединяли и доводили объем до 25 мл водой очищенной. На спектрофотометре снимали показания оптической плотности испытуемого раствора при длине волны 250 нм в кювете толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Для снижения случайных и систематических ошибок при анализе серпистена в мази использовали метод расчета при помощи рабочего стандартного образца (РСО) серпистена, полученного от ООО «Комибиофарм». Валидацию количественного определения проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [6] по следующим характеристикам: специфичность (specifity); аналитическая область (range); линейность (linearity); правильность (trueness); прецизионность (precision).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения специфичности проводили анализ образцов водных растворов серпистена в диапазоне концентраций 5–100 мкг/мл с учетом малой растворимости субстанции в воде (1 г в 500 мл воды). При изучении спектров поглощения водных растворов серпистена, представленных на рисунке 1, установлен максимум поглощения при 250±2 нм, который использован в качестве аналитической длины волны. Рабочей концентрацией раствора серпистена выбрали концентрацию 20–25 мкг/мл, при которой значение оптической плотности укладывается в рекомендуемые интервалы [7].

Специфичность методики теста «подлинность» определяли сравнительным анализом модельного состава основы мази, мази серпистена и водного раствора серпистена. Критерием приемлемости служило отсутствие у раствора основы мази максимума поглощения серпистена, одинаковое значение максимума поглощения водного извлечения мази и водного раствора серпистена, относительная погрешность единичного результата (ε) менее 5%. Полученные результаты отражены в таблице 1. Из таблицы 1 видно, что компоненты основы не мешают открытию серпистена из водного извлечения мази. Водное извлечение мази серпистена (рисунок 2) и водный раствор серпистена имеют максимум поглощения при 250 нм, относительную погрешность единичного результата 0,27% и 0,14% соответственно, что позволяет говорить о специфичности доказательства подлинности серпистена в мази спектрофотометрическим методом.

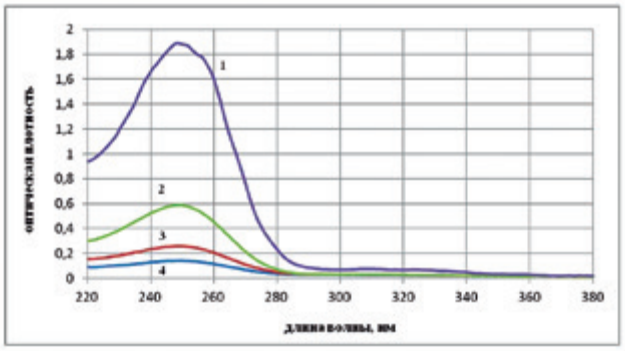


Рисунок 1. Спектр поглощения водных растворов серпистена:

1 – содержание серпистена 100 мкг/мл; 2 – содержание серпистена 25 мкг/мл; 3 – содержание серпистена 10 мкг/мл; 4 – содержание серпистена 5 мкг/мл

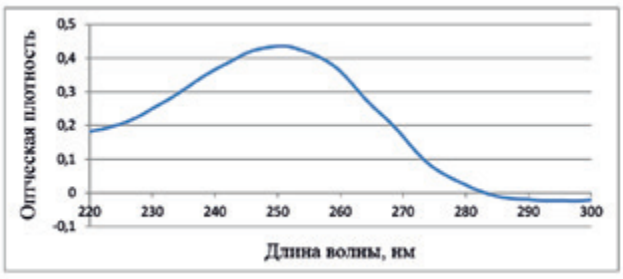


Рисунок 2. Спектр поглощения водного раствора мази серпистена

При изучении специфичность методики «количественное содержание» спектрофотометрическим методом критерием приемлемости служило отсутствие у раствора основы мази максимума поглощения серпистена, одинаковое количество обнаруженного серпистена в водном извлечении и водном растворе серпистена, относительная погрешность единичного результата (ε) менее 5%. По результатам экспериментальных данных, представленных в таблице 2, установлено отсутствие серпистена в основе мази, доказано, что отрываемость серпистена в водном извлечении из мази соответствует содержанию серпистена в водном растворе.

Таблица 1.

Результаты оценки специфичности спектрофотометрического метода в испытании «подлинность»

Наименование пробы	Максимум поглощения, нм	Метрологические характеристики
Водное извлечение основы мази	Отсутствует	
	Отсутствует	
	Отсутствует	
	Отсутствует	
	Отсутствует	
Водное извлечение мази	249,6	$\bar{X}$=249,92; S^2=0,057; S=0,239; S_x=0,107; RSD=0,10%; t (95%, 4)=2,78; $\Delta\bar{x}$=±0,30; ε=0,27%
	249,8	
	250,1	
	249,9	
	250,2	
Водный раствор серпистена	249,8	$\bar{X}$=249,92; S^2=0,017; S=0,130; S_x=0,058; RSD=0,05%; t (95%, 4)=2,78; $\Delta\bar{x}$=0,16; ε=0,14%
	250,0	
	249,9	
	249,8	
	250,1	

Примечание: $\bar{X}$ – среднее значение выборки; S^2 – дисперсия; S – стандартное отклонение; S_x – стандартное отклонение среднего результата; RSD – относительное стандартное отклонение среднего результата (коэффициент вариации); $\Delta\bar{x}$ – значение доверительного интервала среднего результата определения; ε – относительная ошибка результата отдельного определения.

При определении линейности методики проводили анализ 5 растворов РСО серпентина с концентрациями от 5 до 25 мкг/мл. По полученным значениям построен калибровочный график, выражающийся уравнением Y=219X+0,0175 (r=0,997) и приведенный на рисунке 3.

Отклонение концентраций калибровочных растворов (80, 100, 120%), рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в таблице 2.

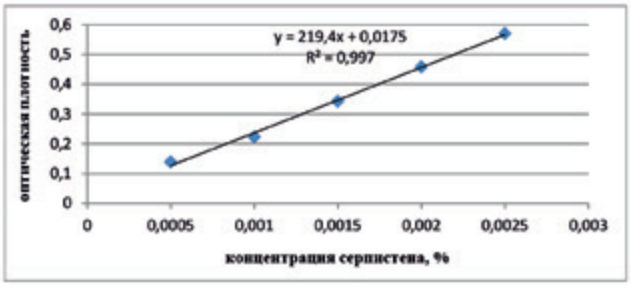


Рисунок 3. **График зависимости оптической плотности серпистена от концентрации**

Установлено, что в пределах аналитической области определения серпистена наблюдается линейная зависимость определяемой величины, при этом полученные отклонения соответствовали нормам (не более 20% для нижнего диапазона линейности, не более 15% для остальных точек).

Таблица 2.

Результаты оценки специфичности спектрофотометрического метода в испытании «количественное содержание»

Наименование пробы	Обнаружено серпистена, мг/г	Метрологические характеристики
Водное извлечение основы мази	Не обнаружено	
	Не обнаружено	
	Не обнаружено	
	Не обнаружено	
	Не обнаружено	
Водное извлечение мази	0,196	$\bar{X}$=0,200; S^2=1,23×10^{-5}; S=3,51×10^{-3}; S_x=1,57×10^{-3}; RSD=0,79%; t (95%, 4)=2,78; $\Delta\bar{x}$=0,004; ε=4,87%; $\bar{\varepsilon}$=2,18%
	0,201	
	0,198	
	0,202	
	0,205	
Водный раствор серпистена	0,199	$\bar{X}$=0,200; S^2=5,00×10^{-6}; S=2,24×10^{-3}; S_x=1,00×10^{-3}; RSD=0,56%; t (95%, 4)=2,78; $\Delta\bar{x}$=0,003; ε=3,11%; $\bar{\varepsilon}$=1,39%
	0,197	
	0,203	
	0,201	
	0,200	

Правильность методики устанавливали на идентичных образцах мази серпистена с добавлением известного количества РСО серпистена. Проводили по три испытания образца на трёх разных уровнях (навесках мази). Критерий приемлемости – средний процент восстановления при использовании растворов заданных концентраций, скорректированный на 100%, средняя величина которого должна находиться в пределах 95–105% (таблица 3).

Прецизионность методики оценивалась в трех вариантах: повторяемость (сходимость), внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность, при этом критерием приемлемости служило значение относительного стандартного отклонения (RSD) менее 2% [8], а также межлабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Таблица 3.

Результаты оценки правильности спектрофотометрического метода в испытании «количественное содержание»

Уровни	1	1	1	2	2	2	3	3	3
Навеска мази, г	1,8	1,8	1,8	2,0	2,0	2,0	2,2	2,2	2,2
Оптическая плотность	0,3392	0,3428	0,3305	0,3752	0,3730	0,3843	0,4072	0,4174	0,4256
Содержание серпистена, мкг/мл	176,9	180,7	175,0	199,9	198,7	204,7	221,4	219,0	217,5
Добавлено РСО серпистена*, мкг/мл	20,0	20,0	20,0	30,0	30,0	30,0	40,0	40,0	40,0
Содержание серпистена (ожидаемое), мкг/мл	196,9	200,7	195,0	229,9	228,7	234,7	261,4	259,0	257,5
Оптическая плотность	0,3652	0,3780	0,3655	0,4273	0,4239	0,4414	0,4793	0,4832	0,4866
Содержание серпистена (полученное), мкг/мл	194,4	201,2	194,7	227,6	225,8	235,1	255,3	257,4	259,2
Отклик, %**	98,73	100,25	99,85	99,00	98,73	100,17	97,67	99,38	100,66

Примечание: *РСО серпистена добавлялся в водное извлечение мази в виде концентрированного (0,02%) раствора. К уровню 1 добавлялось 0,1 мл концентрированного раствора, к уровню 2–0,15 мл, к уровню 3–0,2 мл.

**Процент восстановления (отклик) рассчитывался следующим образом:

$$\text{Отношение} = \frac{\text{Содержание серпистена (полученное)} \cdot 100\ \%}{\text{Содержание серпистена (ожидаемое)}}\ [7].$$

Показано, что процент восстановления находится в интервале от 97,67 до 100,66%, а его средняя величина составляет 99,38%.

Определение сходимости выполнялось одним сотрудником при одних и тех же условиях: в одной лаборатории на одном приборе (спектрофотометр СФ-2000, Россия) в течение короткого промежутка времени проведено 5 параллельных испытаний количественного содержания серпистена в мази. Данные приведены в таблице 4. Установлено, что относительное стандартное отклонение составляет 0,72%, что, в свою очередь, говорит о высокой сходимости результатов количественного определения.

Внутрилабораторную прецизионность методики оценивали посредством определения количественного содержания серпистена в мази в пределах одной лаборатории. Анализ выполняли два химика в разные дни на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 4.

Результаты оценки сходимости методики выполнения теста «количественное содержание»

Обнаружено серпистена, мкг/г	Метрологические характеристики
196,0	$\bar{X}$=201,3; S^2=12,7; S=3,56; S_x=1,45; RSD=0,72%; t (95%, 5)=2,57; $\Delta\bar{x}$=3,7; ε=4,55%; $\bar{\varepsilon}$=1,85%
201,0	
199,0	
202,0	
206,0	
204,0	

Таблица 5.

Результаты оценки повторяемости методики теста «количественное содержание»

№ серии	Дата	Сотрудник	Обнаружено серпистена, мкг/г	Метрологические характеристики
10612	02.07.12	Сотрудник 1	197,2	$\bar{X}$=198,8; S^2=3,1; S=1,76; S_x=0,72; RSD=0,36%; t (95%, 5)=2,57; $\Delta\bar{x}$=1,9; ε=2,28%; $\bar{\varepsilon}$=0,93%
10612	02.07.12	Сотрудник 1	199,7	
10612	03.07.12	Сотрудник 1	198,2	
10612	03.07.12	Сотрудник 2	197,5	
10612	03.07.12	Сотрудник 2	201,9	
10612	03.07.12	Сотрудник 2	198,1	

Полученные результаты позволяют утверждать, что аналитическая методика количественного определения серпистена в мази характеризуется внутрилабораторной прецизионностью.

На заключительном этапе нами изучалась межлабораторная прецизионность. С этой целью проанализированы три серии мази серпистена двумя сотрудниками на двух приборах: СФ-2000 (сотрудник 1) и СФ-103 (сотрудник 2), в разные промежутки времени. Критерием приемлемости служило выполнение следующего неравенства:

$$F\ (95\%, 8, 8) \geq F_{выч},$$

где F (95%, 8, 8) – значение критерия Фишера при уровне значимости 95% и числах степеней свободы равных 8; $F_{выч}$ – вычисленное значение критерия Фишера, который является отношением большей дисперсии к меньшей. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Результаты оценки внутрилабораторной воспроизводимости методики теста «количественное содержание»

№ серии	Дата	Сотрудник	Обнаружено серпистена, мкг/г	Метрологические характеристики
10612	02.07.12	Сотрудник 1	197,2	$\bar{X}$=200,5; S_1^2=6,02; S=2,45; S_x=0,82; RSD=0,41%; t (95%, 8)=2,36; $\Delta\bar{x}$=1,9; ε=2,88%; $\bar{\varepsilon}$=0,97%
10612	02.07.12	Сотрудник 1	199,7	
10612	02.07.12	Сотрудник 1	204,6	
20712	16.07.12	Сотрудник 1	202,2	
20712	16.07.12	Сотрудник 1	199,0	
20712	16.07.12	Сотрудник 1	201,4	
30812	07.08.12	Сотрудник 1	200,6	
30812	07.08.12	Сотрудник 1	202,4	
30812	07.08.12	Сотрудник 1	197,3	
10612	04.07.12	Сотрудник 2	204,8	$\bar{X}$=202,1; S_2^2=3,2; S=1,79; S_x=0,60; RSD=0,30%; t (95%, 8)=2,36; $\Delta\bar{x}$=1,4; ε=2,09%; $\bar{\varepsilon}$=0,70%
10612	04.07.12	Сотрудник 2	199,7	
10612	04.07.12	Сотрудник 2	203,3	
20712	18.07.12	Сотрудник 2	203,7	
20712	18.07.12	Сотрудник 2	199,4	
20712	18.07.12	Сотрудник 2	201,9	
30812	09.08.12	Сотрудник 2	201,6	
30812	09.08.12	Сотрудник 2	203,1	
30812	09.08.12	Сотрудник 2	201,8	

Рассчитанное значение $F_{выч}$ оказалось меньше табличного [F (95%, 8, 8)=3,44], что позволяет сделать вывод об отсутствии статистически значимого различия между выборками, таким образом, оба массива данных можно объединять в одну генеральную совокупность.

На заключительном этапе нами проведен сравнительный анализ средних значений массивов, полученных двумя аналитиками, в ходе которого установлено, что экспериментальное значение t-критерия Стьюдента не превышает табличного значения. Таким образом, результаты количественного определения серпистена, полученные разными аналитиками на двух разных приборах в разное время, статистически неразличимы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения серпистена в мягкой лекарственной форме – мази методом УФ-спектрофотометрии. Пригодность методики подтверждена ее валидацией по следующим характеристикам: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность. Данная методика использована в нормативных документах для стандартизации серпистена в мягких лекарственных формах.

ЛИТЕРАТУРА

1. В.В. Володин, Ю.С. Сидорова, В.К. Мазо. 20-гидроксиэкдизон – растительный адаптоген: анаболическое действие, возможное использование в спортивном питании // Вопросы питания. 2013. № 6. С. 24–30.
2. С.О. Володина, В.В. Володин, И.Ф. Чадин. Ресурсы, биотехнология и использование экдистероидсодержащих растений // Известия Самарского науч. центра Российской академии наук. 2010. Т. 12. № 1(3). С. 668–674.
3. Y.Al. Naggar, M. Ghorab, K. Mohamed. Phytoecdysteroids: isolation and biological applications // American journal of life sciences. 2017. V. 5. Is. 1. P. 7–10.
4. N.Z. Mamdalieva, D. Egamberdieva, R. Lafont, J.P. Girault. Phytoecdysteroids and antibacterial activity of the plant Coronaria flos-cuculi // Chemistry of Natural Compounds. 2008. V. 44. № 3. P. 404–406.
5. Д.Е. Липин, Н.А. Левочкина. Определение параметров для количественного определения суммы фитоэкдистероидов в лекарственных формах // Вестник Перм. гос. фармац. акад. 2013. № 10. С. 84–85.
6. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик.
7. И.Д. Гулякин и др. Валидация методики количественного определения ЛХС-1208 в лиофилизированной форме // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 3. С. 118–122.
8. Н.А. Эпштейн. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ-методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Хим.-фармац. журн. 2004. Т. 38. № 4. С. 40–56.

Новое поколение лабораторных биореакторов

Minifors 2

UNBEATABLE IN ITS CLASS.

Лабораторный биореактор Minifors 2 пришел на смену Minifors, но как и его предшественник позволяет проводить культивирование бактерий ***(E.coli, Pseudomomas и др.)***, грибов (***Aspergillus, Streptomyces и др.)***, дрожжей ***(P. pastoris, Saccharomyces и др.)*** и иных клеточных культур.



Отличительные особенности:

- Рабочий объем: 1,5, 3 и 6 л
- Скорость смесителя: 150 - 1600 об/мин
- Температура: от +5 до 60°C
- Полностью автоматизированная система одновременной подачи 2-х газов (воздух, смесь воздуха и кисло рода, смесь воздуха и азота)
- 4 насоса, настроенные различными способами в зависимости от задачи

Биореакторы Infors - мощное решение для ферментации!

INFORS HT

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.ru

info@phct.ru

УДК 578.083; 577.15.04; 615.01

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ИЗ БИОМАССЫ ЖЕНЬШЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*PANAX GINSENG* C.A. MEY) С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *IN VITRO*

И.А. Лупанова[1]*, Н.С. Цыбулько[1], Т.А. Савина[1], Е.В. Ферубко[1]

Резюме. Настоящая работа посвящена оценке адаптогенной активности суспензионной культуры женьшеня обыкновенного, штамм Pa.g(B)05ВИЛАР, в сравнении со спиртовым экстрактом из корней женьшеня обыкновенного (*Panax Ginseng* C.A. Mey) с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro*, основанных на ферментах антиоксидантной защиты, каталазы и глутатионредуктазы. Были выявлены выраженные адаптогенные свойства изученных образцов. Суспензионная культура женьшеня обыкновенного может быть использована как альтернативный источник сырьевой базы биологически активных веществ.

Ключевые слова: экстракт из биомассы женьшеня обыкновенного, специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, биологическая активность.

STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE EXTRACT OF PANAX GINSENG (*PANAX GINSENG* C.A. MEY) BIOMASS EXTRACT USING SPECIFIC ENZYMATIC TEST SYSTEMS *IN VITRO*

I.A. Lupanova[1]*, N.S. Tsibulko[1], T.A. Savina[1], E.V. Ferubko[1]

Abstract. The objects of study are Panax ginseng suspension culture, strain Pa.g(B)05ВИЛАР in comparison with the dry extract of Panax ginseng (*Panax Ginseng* C.A. Mey). To study the extract of Panax ginseng biologically active properties, we were using the specific enzyme biotest systems *in vitro* glutathione reductase- and catalase-base. These biotest systems administration can detect respectively compounds with antioxidant, antimicrobial and adaptogenic activity can be detected using complex of these specific enzyme biotest systems. It was found the adaptogenic activity of biologically active substances contained in a dry extract of Panax ginseng.

Keywords: extract of Panax ginseng biomass, specific enzymatic biotest systems, biological activity.

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, 7

1 – National Institute of Herbal and Aromatic Plants, 7, Grina str., Moscow, 117216, Ruassia

* адресат для переписки:
E-mail: iriss86@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Женьшень обыкновенный (*Panax ginseng* C.A. Mey) принадлежит к многочисленному роду *Panax* семейства аралиевых (Araliaceae). Обнаруженные в нем биологически активные вещества (сапонины, активные полиацетилены, полисахариды, различные макро- и микроэлементы, витамины, эфирные масла и другие) оказывают противовоспалительное действие, благотворно влияют на сердечно-сосудистую систему, углеводный обмен, повышают физическую и умственную работоспособность [1].

Однако культивирование женьшеня очень сложно и трудоемко, запасы данного вида сырья невелики. В связи с этим широко разрабатывается получение продуктов метаболизма женьшеня обыкновенного из клеточных культур растений. В ФГБНУ «ВИЛАР» получен клеточный штамм женьшеня обыкновенного с высокими ростовыми и биосинтетическими характеристиками. Определение целесообразности проведения с данным штаммом дальнейших исследований достаточно актуально. Поэтому оценка биологической активности метаболитов данной клеточной культуры может являться ключевым показателем перспективности проводимых исследований.

Для оптимизации выявления биологической активности растительных экстрактов целесообразно применение специфических ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro*. Информативность разработанных в ФГБНУ «ВИЛАР» специфических ферментных биотест-систем определяется в условиях опытов *in vitro* сродством изучаемых биологически активных веществ (БАВ) к соответствующим ферментам, играющим

ключевую роль в проявлении целевой биологической активности. Использованные в данной работе ферментные биотест-системы входят в состав биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС) ФГБНУ ВИЛАР. Они многофункциональны, позволяют оценить основной вектор биологической активности БАВ, механизм и характер их действия в зависимости от дозы, возможность негативного влияния БАВ на организм и др. Так, адаптогенные свойства экстрактов изучаются в условиях опытов *in vitro* с помощью каталазной (КАТ) ферментной биотест-системы в комбинации с глутатионредуктазной (ГР) биотест-системой [2–4]. Глутатионредуктазная реакция является лимитирующим звеном восстановленного внутриклеточного глутатионового цикла, играющего исключительно важную роль в защите белков, нуклеиновых кислот, липидов, внутриклеточных мембран от окислительного стресса. А каталаза катализирует разложение образующегося в процессе биологического окисления пероксида водорода на воду и молекулярный кислород ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$), а также окисляет в присутствии пероксида водорода низкомолекулярные спирты и нитриты [5].

Биологическую активность суспензионной культуры женьшеня обыкновенного линии Pa.g(S)14ВИЛАР, полученной в результате селекции из исходного штамма Pa.g(B)05ВИЛАР, изучали в условиях опытов *in vitro* с помощью глутатионредуктазной и каталазной специфических ферментных биотест-систем [2–4]. Исследованная в данной работе культура женьшеня обыкновенного входит в состав биологической коллекции клеточных культур лекарственных растений ФГБНУ ВИЛАР.

Методы выявления искомой биологической активности по влиянию БАВ на скорость каталазной, глутатионредуктазной реакций *in vitro* отличаются высокой специфичностью и чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, меньшей трудоемкостью, чем известные методики, не требуют наличия гомогената клеток и дорогостоящих реактивов.

Цель настоящей работы заключалась в изучении биологической активности спиртового экстракта из биомассы женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* C.A. Mey) в сравнении с образцом спиртового экстракта из корней женьшеня обыкновенного с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы: глутатион окисленный, высокоочищенные ферменты – глутатионредуктаза (ГР), каталаза (КАТ), НАДФН (все реактивы фирмы Sigma-Aldrich, США); соляная кислота класса «ос.ч.», фосфат натрия и калия, хлорид калия и магния, перекись водорода – отечественные реактивы.

Объекты исследования: суспензионная культура женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* C.A. Mey) – линия Pa.g(S)14ВИЛАР, полученная в результате селекции из исходного штамма Pa.g(B)05ВИЛАР (СК), с содержанием экстрактивных веществ до 30% и образец сравнения (ОС) – 70% спиртовой экстракт из корней женьшеня обыкновенного.

Скорость глутатионредуктазной реакции определяли спектрофотометрически [6] по убыли поглощения при 340 нм за счет окисления НАДФН эквимолярным количеством восстановленного глутатиона. Измерения проводились на анализаторе для клинической химии Clima MC-15. Объем пробы 0,5 мл. Исследования проводили при 24 °С.

Для определения скорости каталазной реакции использовали метод [7], основанный на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс, то есть измерения вели по убыли перекиси водорода в процессе реакции. Измерения проводились на анализаторе для клинической химии Clima MC-15.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ статистического анализа *Statistica 6,0* (StatSoft, США). Для оценки значимости отличий между выборками с распределением, приближающимся к нормальному, использовался t-критерий Стьюдента [8]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Данные в тексте и таблицах представлены в виде M±m, где M – средняя арифметическая величина, m – ошибка средней арифметической.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В начале экспериментальной работы нами было показано, что скорость изучавшихся ферментативных реакций зависит от концентрации объектов исследования и описывается кривой с максимумом. Далее везде – результаты комплексного исследования влияния образца сухого экстракта из биомассы женьшеня обыкновенного и препарата сравнения в наиболее эффективных концентрациях (3,3 мкг/мл и 6,6 мкг/мл) на активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты в опытах *in vitro*.

Результаты определения прямого влияния изучавшихся образцов на скорость глутатионредуктазной и каталазной реакций в условиях опытов *in vitro* представлены на рисунке 1.

Из рисунка видно, что согласно [2] все образцы проявляли адаптогенные свойства, ускоряя ГР-реакцию и снижая скорость КАТ-реакции. При этом

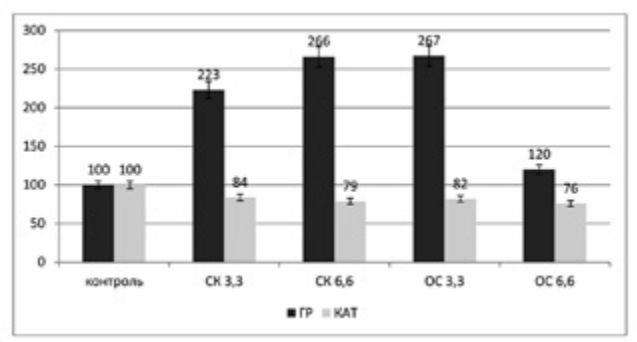


Рисунок 1. Влияние образцов на скорость глутатионредуктазы и каталазы *in vitro*

Примечание: *статистическая значимость отличий от контроля при p<0,05

спиртовая настойка суспензионной культуры женьшеня обыкновенного в большей концентрации ускоряла ГР-реакцию в 2,2 раза сильнее, чем образец сравнения.

Таким образом, суспензионная культура женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* C.A. Mey) обладает адаптогенной активностью и может быть использована как альтернативный источник сырьевой базы биологически активных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении экстракта из биомассы женьшеня обыкновенного и образца сравнения с известными адаптогенными свойствами с применением КАТ и ГР – специфических биотест-систем в условиях опытов *in vitro* – были выявлены выраженные адаптогенные свойства изученных образцов. Экстракт суспензионной культуры женьшеня обыкновенного проявлял более выраженные адаптогенные свойства, ускорял ГР-реакцию в 2,2 раза сильнее, чем образец сравнения.

Применение чувствительных и специфичных ферментных биотест-систем, разработанных на основе взаимодействия БАВ с биологическими мишенями в условиях *in vitro*, является новым инновационным подходом к проведению доклинических испытаний, а также к экспресс-оценке качества биотехнологического сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г.Р. Бушуева, Ю.А. Леонидова, Т.А. Савина, Е.В. Ферубко. Изучение биологической активности 30% настойки из клеточной культуры женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* C.A. Mey) // Сборник научных трудов второй научно-практической конференции. Молодые ученые и фармация XXI века. 2014. С. 338–340.
2. Патент РФ № 2181890. Способ выявления веществ, обладающих адаптогенными свойствами, *in vitro* / В.А. Быков, М.Ф. Минеева, В.А. Дубинская, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир; заявитель и патентообладатель ФГБНУ ВИЛАР. – № 2001115328/14; заявл. 06.06.01; опубл. 27.04.02.
3. Патент РФ № 2181891. Способ выявления веществ, обладающих противомикробными и противовирусными свойствами, *in vitro* / В.А. Быков, М.Ф. Минеева, В.А. Дубинская, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир; заявитель и патентообладатель ФГБНУ ВИЛАР. – № 2001115329/14; заявл. 06.06.01; опубл. 27.04.02.
4. Патент РФ № 2181892. Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, *in vitro* / В.А. Быков, М.Ф. Минеева, В.А. Дубинская, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир; заявитель и патентообладатель ФГБНУ ВИЛАР. – № 2001115330/14; заявл. 06.06.01; опубл. 27.04.02.
5. И.А. Лупанова, М.Ф. Минеева, В.К. Колхир, Л.Б. Стрелкова, Т.А. Сокольская. Применение специфических ферментных биотест-систем *in vitro* для исследования биологической активности некоторых природных соединений // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012. Т. 10. № 1. С. 172–177.
6. H. Aebi. Glutathione reductase // Methods in enzymatic analysis / Ed. by H.V. Bergmeyer. 2nd ed. – 1974. P. 673-678.
7. М.А. Королюк, М.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – М.: Медицина. 1988. № 1. С. 1-8.
8. Р.У. Хабриев. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ // 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. 832 с.

Международная конференция

GEP-RUSSIA 2017

Надлежащая инженерная практика

Москва **18-19 октября**

Тема конференции:

«Производство стерильных ЛС и Биотехнология – технологии, технические решения, чистые помещения, системы и оборудование»

Организатор:

favea

+7 499 550 22 30

conf@gep-russia.ru



Информационная поддержка:

Новости GMP

Чистые Помещения и технологические среды

Фармацевтическая отрасль
Интернет-каталог оборудования
www.cphem.com

Казахстанский Фармацевтический Вестник

DEPHARM

Научно-производственный журнал
Разработка и регистрация лекарственных средств

Фармацевтические технологии и упаковка
Лекарства по GMP
Медицинский бизнес

Фармацевтическое обозрение Казахстана
www.pharm.reviews

УДК 615.31

N-АРИЛБЕНЗАМИДИНОВ ГИДРОХЛОРИДЫ. СИНТЕЗ И СТРОЕНИЕ

Е.В. Куваева[1]*, Е.В. Федорова[1], Г.В. Ксенофонтова[1], Т.Л. Семакова[1], И.П. Яковлев[1]

Резюме. Изучена реакция получения N-арилбензамидинов гидрохлоридов. Строение синтезированных соединений доказано с помощью современных физико-химических методов анализа: ^{1}H-ЯМР-, ^{13}C-ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа (РСА).

Ключевые слова: N-арилбензамидины, N-арилбензамидинов гидрохлориды, ЯМР-спектроскопия, рентгеноструктурный анализ.

N-ARYLBENZAMIDINES HYDROCHLORIDES. SYNTHESIS AND STRUCTURE

E.V. Kuvaeva[1]*, E.V. Fedorova[1], G.V. Ksenofontova[1], T.L. Semakova[1], I.P. Yakovlev[1]

Abstract. The reaction of obtaining N-arylbenzamidines hydrochlorides was studied. The structure of synthesized compounds was proved with the help of modern physicochemical methods of analysis: NMR ^{1}H-, ^{13}C-spectroscopy, X-ray diffraction analysis (RSA).

Keywords: N-arylbenzamidines, N-arylbenzamidines hydrochlorides, NMR spectroscopy, X-ray diffraction analysis.

1 – ФГОУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГОУ ВО СПХФА Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14, лит А

1 – Saint-Petersburg Chemical and Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of Russia, 14/A, Prof. Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: elena.kuvaeva@pharminnotech.com
Тел: 8 (921) 446 2013

ВВЕДЕНИЕ

Низкая растворимость полученных *N*-арилбензамидинов в воде и большинстве органических растворителей является существенным недостатком этих соединений с позиции создания новых лекарств. Наиболее эффективным преодолением этого недостатка является изменение баланса липофильно-гидрофильных свойств путем введения в их молекулы различных заместителей, изменяющих биологическую активность веществ, их транспорт и биодоступность в организме, или получение солей, обладающих более высокой растворимостью, чем соответствующие *N*-арилбензамидины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

N-арилбензамидины (III а-к) были получены взаимодействием ариламинов (II а-к) с бензонитрилом (I а) в присутствии безводного алюминия хлорида (рисунок 1) [1–3].

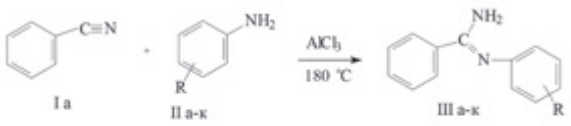


Рисунок 1. Синтез N-арилбензамидинов

Было установлено, что *N*-арилбензамидинов гидрохлориды (IV а-к) можно получить при пропускании сухого хлороводорода через суспензию *N*-арилбензамидинов (III а-к) в этиловом спирте (рисунок 2).

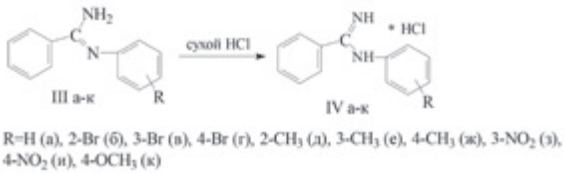
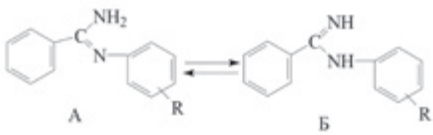


Рисунок 2. Синтез N-арилбензамидинов гидрохлоридов

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Строение N-арилбензамидинов гидрохлоридов.

Полученные *N*-арилбензамидинов гидрохлориды потенциально могут существовать в двух таутомерных формах (А, Б).



Строение *N*-арилбензамидинов гидрохлоридов (IV а-к) нами доказано методами ^{1}H-ЯМР-, ^{13}C-ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа (РСА).

Спектры ^{1}H-ЯМР *N*-арилбензамидинов гидрохлоридов (IV а-к) в ДМСО-d_6 характеризуются наличием резонансных сигналов протонов ароматических колец (~7,11–8,42 м.д.), сигналов в области ~2,30–2,38 м.д. (CH_3-Ar) в спектрах соединений (IV д-ж), протонов группы OCH_3 при 3,82 м.д. (IV к), а также трех сигналов в области ~8,66–12,36 м.д., протонов групп =NH, –NH и HCl полученных соединений.

На рисунке 3 представлен спектр ^{1}H-ЯМР *N*-4-метокси-фенилбензамидина гидрохлорида (IV к) в ДМСО-d_6. Наличие трех сигналов при 8,8 м.д., 9,8 м.д. и 11,6 м.д. с интегральной интенсивностью по ~1H позволяет говорить о том, что это соединение в растворе ДМСО-d_6 имеет преобладающую протонированную форму Б.

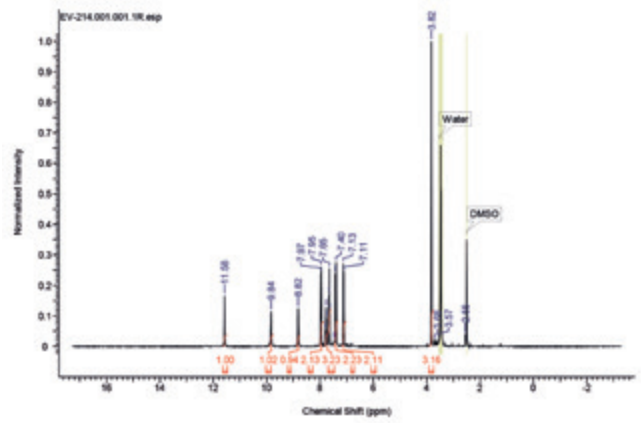


Рисунок 3. Спектр ЯМР раствора ^{1}H N-4-метоксифенилбензамидина гидрохлорида (IV к) в ДМСО-d_6

В спектрах ^{13}C-ЯМР соединений (IV а-к), помимо сигналов атомов углерода бензольных колец в области ~115,61–146,87 м.д. и сигналов углерода метильных и метоксигрупп (~17,54–17,89 и 55,98 м.д.), в слабом поле при ~163,34–163,92 м.д. наблюдается сигнал углерода группы –C=N(–N).

Спектр ^{13}C-ЯМР соединения (IV к) в ДМСО-d_6 представлен на рисунке 4.

Строение полученных *N*-арилбензамидинов гидрохлоридов (IV а-к) в кристаллическом состоянии было однозначно доказано монокристальным рентгеноструктурным анализом (рисунок 5). *N*-арилбензамидинов гидрохлориды (IV а-к) в отличие от оснований *N*-арилбензамидинов (III а-к) существуют в *N*-ариламино-иминной протонированной форме (Б).

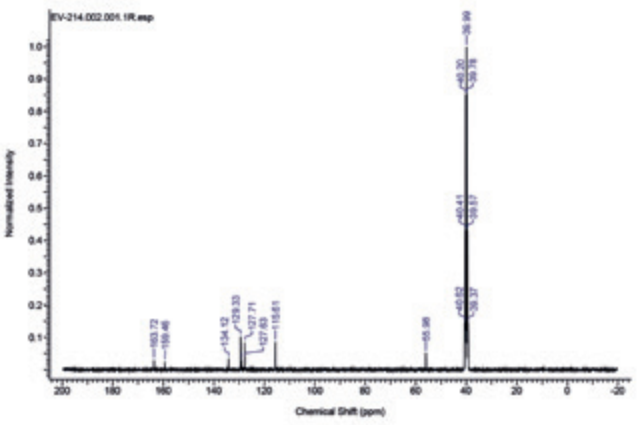


Рисунок 4. Спектр ^{13}C-ЯМР раствора N-4-метоксифенилбензамидина гидрохлорида (IV к) в ДМСО-d_6

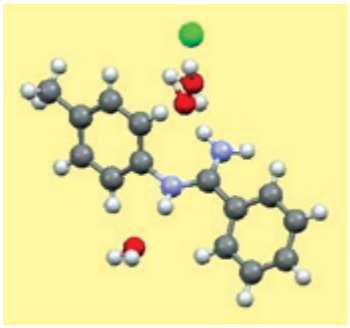


Рисунок 5. Молекулярное строение N-4-метилфенилбензамидина гидрохлорида (IV ж)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами установлено, что *N*-арилбензамидинов гидрохлориды целесообразно получать, пропуская через суспензию *N*-арилбензамидинов в абсолютном этиловом спирте сухой хлороводород. По данным ^{1}H-ЯМР-, ^{13}C-ЯМР-спектроскопии, РСА *N*-арилбензамидины существуют в *N*-арилимино-аминной таутомерноной форме, а их гидрохлориды – в *N*-ариламино-иминной таутомерной форме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.В. Куваева, Е.В. Федорова, В.В. Зайцев, И.П. Яковлев, В.И. Захаров, Т.Л. Семакова. Синтез и строение гидрохлоридов ароиламидинов и N-арилбензамидинов // Журнал органической химии. 2011. Т. 8. С. 221–225.
2. Е.В. Куваева, Е.В. Федорова, И.П. Яковлев, Е.Н. Кириллова, Г.В. Ксенофонтова, В.И. Захаров. Особенности синтеза *N*-арилбензамидинов // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (Технологического университета). 2012. № 14(40). С. 58–61.
3. Е.В. Куваева, Е.В. Федорова, Е.Н. Кириллова, В.В. Зайцев. Влияние температуры на синтез *N*-арилбензамидинов // Тезисы докладов Российская научная конференция с международным участием «Актуальные проблемы токсикологии и радиобиологии». – Санкт-Петербург. 2011. С. 18.

УДК 547.458

СИНТЕЗ ГИДРАЗИДОВ КАРБОКСИЭТИЛАЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Т.И. Тарадейко[1]*, Т.М. Седёлкина[1], С.Н. Галашева[1], А.А. Иозеп[1]

Резюме. Изучена реакция ацилирования гидразингидрата амидом карбоксиэтилальгиновой кислоты. Определено влияние температуры реакции, характеристик исходного амида и гидразина на выход гидрозида карбоксиэтилальгиновой кислоты.

Ключевые слова: альгиновая кислота, амид карбоксиэтилальгиновой кислоты, гидразинокарбонилэтилальгиновая кислота, ацилирование, полимераналогичная реакция.

SYNTHESIS OF HYDRAZIDE OF CARBOXYETHYLALGINIC ACID

T.I. Taradeyko[1]*, T.M. Sedelkina[1], S.N. Galasheva[1], A.A. Iozep[1]

Abstract. The acylation of hydrasine hydrate by amide of carboxyethylalginic acid was studied. The influence of reaction's temperature, characteristics of mother amide and hydrazine to delivery end of hydrazinocarbonilethylalginic acid were determinated.

Keywords: alginic acid, amide of carboxyethyl alginic acid, hydrazide of carboxyethyl alginic acid, acylation, polymeranalogous reaction.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14, лит. А

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

*** адресат для переписки:**
E-mail: tania91@bk.ru
Тел: 8 (965) 772 77 63

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные вещества нередко представляют собой гидразиды карбоновых кислот и гидразоны карбонильных соединений и применяются для лечения различных заболеваний (например, широко известные изониазид, фтивазид, салюзид, метазид, производные нитрофурана и некоторые другие). Собственной активностью могут обладать и гидразиды полисахаридкарбоновых кислот, однако не менее важным является их значение при конструировании физиологически активных полимеров. Они используются в синтезе полимерных гидразонов, оказывающих противомикробную активность [1], и в синтезе азидов, активных ацилирующих агентов в реакциях с N-нуклеофилами, особенно таких малоустойчивых, как антибиотики, ферменты и другие белки [1]. В этой связи большой интерес представляют гидразиды карбоксиэтилальгиновой кислоты (гидразиды КЭАК), так как сама альгиновая кислота (АК) (CAS № 9005-32-7) обладает ценными биологическими свойствами, а химическая модификация её дает возможность синтезировать новые и совершенствовать уже известные лекарства. Однако эти производные АК не описаны в литературе, поэтому нашей задачей были синтез и анализ гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали альгиновую кислоту (CAS № 9005-32-7, Acros organics, США). Ранее методом гель-хроматографии на сефадексе G-200 было установлено [2], что она состоит из пяти полисахаридных фракций с молекулярной массой до 200000 Да, которые после алкилирования альгиновой кислоты в основном сохраняются, изменяя лишь скорость элюирования из колонки. Содержание карбоксильных групп после переосаждения – 97% , а после очистки водной щелочью – 100%.

ИК-спектры регистрировали в таблетках с KBr с помощью ИК-фурье-спектрометра ФСМ-1201 (ЗАО «ЛОиП», Россия). Содержание азота определяли фотометрическим методом с реактивом Несслера (ч.д.а., ЗАО «Вектон», Россия). Оптическую плотность образцов определяли на фотоколориметре КФК-2 (Загорский оптико-механический завод, Россия). Для кондуктомет-

рического титрования использовали лабораторный кондуктометр АНИОН-4120 (сертификат Госстандарта RU.C.31.060.A № 25048, ООО «НПП «Инфраспак-Аналит», Россия).

Ацилирование гидразин гидрата

Методика 1

0,5 г синтезированного ранее нами амида КЭАК растворяли в 5 мл гидразингидрата (имп., ЗАО «Вектон», Россия) в плоскодонной конической колбе на магнитной мешалке AREC.T (VELP SCIENTIFICA, Италия) (НД). Реакционную массу выдерживали при температурах 20, 40, 50, 60, 70, 80 °С в течение периода от 1–12 ч до 7 суток. Затем к ней приливали избыток этанола, выпавший в осадок продукт растворяли в водной щелочи и снова осаждали этанолом для удаления ионносвязанного гидразина, после этого сушили в вакууме (20–25 мм. рт. ст.) при 61 °С в течение 2 ч. Выход составил 75–82% от теоретического.

Гидразингидрат взрывоопасен, горюч, токсичен. Все работы необходимо проводить в вытяжном шкафу в средствах индивидуальной защиты.

Методика 2

В круглодонную колбу объемом 50 мл загружали 5 мл бутанола, 5 мл толуола и 5 мл гидразингидрата, реакционную массу нагревали до 100–102 °С на глицериновой бане и отгоняли 6,2 мл азеотропной смеси бутанол – толуол – вода. Затем к остатку добавляли 0,5 г амида КЭАК и выдерживали при 60 °С в течение 3, 5, 7 ч. Затем к реакционной массе приливали избыток этанола, выпавший в осадок продукт растворяли в водной щелочи и снова осаждали этанолом для удаления ионно-связанного гидразина, после этого сушили в вакууме (20–25 мм. рт. ст.) при 61 °С в течение 2 ч. Выход составил 70–76% от теоретического.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гидразиды полисахаридкарбоновых кислот получают ацилированием гидразина разными методами. Например, Ансон и соавт. [3] в реакциях с гидразингидратом использовали альгиновую кислоту и её сложные эфиры. Установлено также, что для этих целей пригодны и амиды карбоксиэтилполисахаридов [4]. В связи с тем, что сама КЭАК и её эфиры не изучены, а синтез её амидов нами разработан [5], последний метод получения гидразидов представляется наиболее удобным (рисунок 1).

В выбранном методе ацилирующим агентом является натриевая соль амида КЭАК, поэтому с гидразингидратом реагируют в основном аминокарбонилэтильные группы и образуются гидразиды этилкарбоксильных групп (гидразинокарбонилэтильные группы). Карбоксилат-ионы уроновых и этилкарбоновых кислот с гидразином не взаимодействуют, и селективность реакции выше, чем при использовании карбоксиэтилальгиновой кислоты, т.к. в этом случае карбоксильные группы уроновых и этилкарбоновых кислот образуют два типа гидразидов.

Амиды КЭАК синтезировали алкилированием АК акриламидом в водной щелочи (амиды^{в}) и в диоксане в присутствии тетраметиламмоний гидроксида (амиды^{д}), как описано в работе [5]. В результате были получены два ряда амидов, которые отличались как по содержанию карбоксиэтильных групп, так и по свойствам.

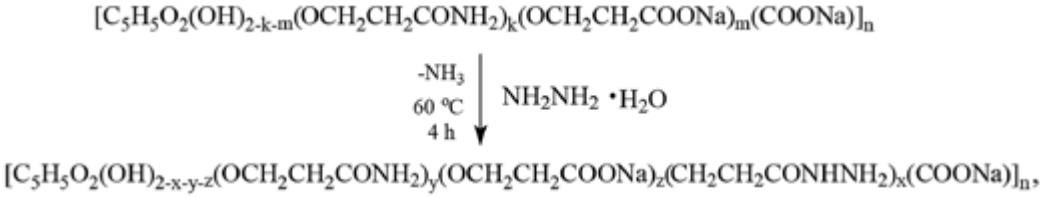
Синтез гидразидов КЭАК проводили двумя способами, описанными выше.

Полученные гидразиды представляют собой белые аморфные порошки, растворимые в воде, нерастворимые в этиловом спирте, эфире и других полярных и неполярных органических растворителях.

ИК-спектры полученных образцов натриевых солей гидразида КЭАК мало информативны, т.к. полосы поглощения «амид I» амидных и гидразидных групп в области 1650–1690 см$^{-1}$ перекрываются.

Однако в ИК-спектрах образцов гидразида, не содержащих амидные группы, имеются полосы поглощения, характерные для валентных колебаний «амид I» гидразида (1660–1675 см$^{-1}$), а также полосы поглощения карбоксилат-ионов уроновых кислот (1610–1620 см$^{-1}$) и карбоксиэтильной группы (1573–1580 см$^{-1}$). В некоторых образцах наблюдается полоса поглощения в области 1698–1706 см$^{-1}$, характерная для валентных колебаний «амид I» диацилгидразина.

Количество гидразидных групп в синтезированных образцах определяли йодометрическим тит-



где y и z могут быть равны нулю.

Рисунок 1. Схема синтеза гидразида карбоксиэтилальгиновой кислоты

рованием и гидроксамовым методом [6], карбоксиэтильных – объемным кондуктометрическим титрованием, а оставшихся амидных – методом с реактивом Несслера [6].

Полученные образцы характеризовали степенью гидразинокарбонилэтилирования $С_{гкэ}$, аминокарбонилэтилирования $С_{акэ}$ и карбоксиэтилирования $С_{кэ}$ (число гидразидных, амидных или карбоксиэтильных групп соответственно, приходящихся на моносахаридный фрагмент полимера), а реакцию – по степени гидразидирования $С_г$ (процент превращения амидных групп АКЭАК в гидразидные). Относительная погрешность определения введенных групп разными методами не превышает 5%.

При исследовании влияния числа амидных групп в ацилирующем агенте на степень превращения их в гидразидные группы при 60 °С в течение 4 ч было установлено: чем больше амидных групп в альгиновой кислоте, тем выше $С_{гкэ}$ в продукте реакции и степень превращения амидных групп в гидразидные $С_г$ (таблица 1).

Таблица 1.

Влияние количества амидных групп в исходном полисахариде на результаты реакции амида карбоксиэтилальгиновой кислоты с гидразингидратом (60 °С; 4 ч; методика 1)

Характеристика амида КЭАК		Характеристика гидразида КЭАК		
$С_{акэ}$, моль/моль	$С_{кэ}$, моль/моль	$С_{акэ}^{*}$, моль/моль	$С_{гкэ}^{**}$, моль/моль по результатам	
			йодометрии	цветной реакции
1	2	3	4	5
амид[д]				
0,3	0	0,02	0,06 (20%)	–
0,5	0	0	0,10 (20%)	–
0,7	0	0,03	0,14 (20%)	0,15 (24%)
1,28	0,05	0,14	0,46 (36%)	0,33 (26%)
1,33	0,05	0,16	0,55 (41%)	0,45 (34%)
1,46	0	0,18	0,66 (45%)	0,57 (39%)
амид[в]				
0,61	0,57	0,03 (0,18)	0,18 (30%)	0,19 (30%)
0,98	0,56	0,11 (0,30)	0,31(32%)	0,27(28%)
1,26	0,64	0,07 (0,23)	0,41 (33%)	0,33 (26%)

Примечание: * – в скобках в столбце 3 указана степень карбоксиэтилирования ($С_{кэ}$); ** – в скобках в столбцах 4, 5 указана степень превращения амидных групп в гидразидные ($С_г$).

При этом в полисахаридных образцах, полученных из амида[д], полностью отсутствуют карбоксиэтильные группы и сохраняется не более 12% первоначальных амидных; в случае амидов[в] сохраняются амидные и карбоксиэтильные группы (до 12% и 36% от их исходного содержания соответственно). При величинах $С_{акэ}$≥1 в ацилирующем агенте образуется не только гидразид карбоксиэтилальгиновой кислоты, но и диацилгидразин, поэтому результат спектрофотометрического анализа несколько ниже иодометрического титрования.

Для определения условий реакции натриевой соли амида КЭАК с гидразингидратом, позволяющих получать высокий выход целевого продукта, было исследовано влияние температуры реакции на степень гидразинокарбонилэтилирования полисахарида.

Как оказалось, результаты взаимодействия гидразингидрата с амидами карбоксиэтилальгиновой кислоты, полученных в водной щелочи и диоксане, по методике 1 при разных температурах несколько отличаются (таблицы 2 и 3). С амидами[в] при 20 °С (7 суток) и температурах от 60 °С до 80 °С в течение 5 ч реакция идёт примерно с одинаковым выходом гидразидов. В случае амидов[д] с увеличением температуры выше 60 °С число гидразидных групп, а также степень превращения амидов в гидразиды уменьшается, что, вероятно, связано с малой величиной $С_{акэ}$=0,5 в исходном амиде.

Таблица 2.

Влияние температуры на результаты реакции гидразингидрата с натриевой солью амида карбоксиэтилальгиновой кислоты ($С_{акэ}$=0,5), полученного в диоксане (5 ч, методика 1)

Температура, °С	Характеристика гидразида КЭАК		$С_г$,%
	$С_{акэ}$, моль/моль	$С_{гкэ}$, моль/моль	
20*	0.11 ($С_{кэ}$=0.17)	0,07	14
40	0,17	0,11	22
50	0	0,11	22
60	0	0,10	20
70	0	0,10	20
80	0	0,09	18

Примечание: * – 7 суток.

Объясняется это, вероятно, тем, что процесс получения гидразидов КЭАК является сложным равновесием следующих, одновременно протекающих химических реакций:

1) нуклеофильное замещение аминогруппы на гидразин;

2) гидролиз амида АК до карбоновой кислоты и образование соли поликислоты с гидразином;

3) отщепление акриламида от АК и обратная реакция – алкилирование АК акриламидом;

4) отщепление гидразида акриловой кислоты от АК и обратная реакция – алкилирование АК акрилоилгидразином;

5) гидролиз амидов и гидразидов акриловой кислоты до акрилатов гидразиния, что препятствует реакции алкилирования АК.

Таблица 3.

Влияние температуры на результаты реакции гидразингидрата с натриевой солью амида карбоксиэтилальгиновой кислоты ($C_{акэ}$=1,19; $C_{кэ}$=0,47), полученного в водной щелочи (5 ч; методика 1)

Температура, °С	Характеристика гидразида КЭАК			$C_г$, %
	$C_{акэ}$, моль/моль	$C_{кэ}$, моль/моль	$C_{гкэ}$, моль/моль	
20*	0	0,24	0,28	24
40	0,22	0,36	0,51	42
60	0,05	0,31	0,29	25
70	0,05	0,22	0,28	24
80	0,04	0,26	0,29	25

Примечание: * – время реакции 7 суток.

При температуре 60–80 °С равновесие реакции в случае амидов[в] устанавливается при значениях $C_{гкэ}$ 0,27–0,29 моль на моль-звено полимера. При этом в полисахаридных образцах отсутствуют или практически отсутствуют амидные группы, которые в основном отщепляются от полисахарида в виде акриламида и превращаются в гидразиды лишь на 18–20 и 24–25% в случае амидов[д] и амидов[в] соответственно. Соли карбоксиэтильных групп в этих условиях более прочно связаны с альгиновой кислотой, чем гидразинокарбонилэтильные и амидные группы, и сохраняются в полимере на 43–66%.

Однако наибольший выход гидразидов КЭАК в том и другом случае, как и при алкилировании альгиновой кислоты акриламидом (рисунок 2), наблюдается при 40–50 °С. Вероятно, при этой температуре скорость отщепления производных акриловой кислоты от полисахарида наименьшая и равновесие смещается в сторону образования гидразидов альгиновой кислоты.

При этой температуре из амида[в] получаются полисахаридные образцы с $C_{гкэ}$=0,51, а степень превращения амидных групп в гидразиды достигает 42%, (более, чем в 1,5 раза выше, чем при других температурах)

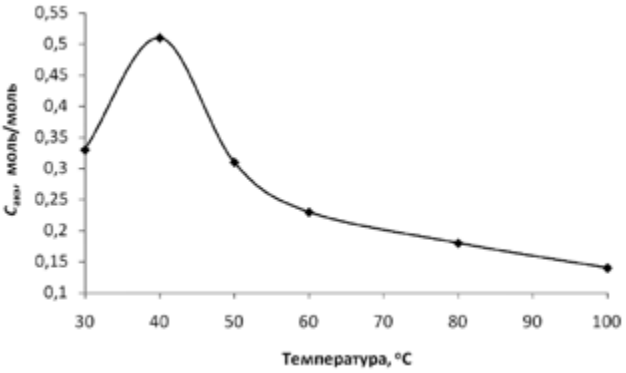


Рисунок 2. Влияние температуры на результаты реакции альгиновой кислоты с акриламидом в водном растворе щелочи (10 моль акриламида на моль-звено альгиновой кислоты, 4 ч, концентрация щелочи 7%)

(таблица 3). Однако в продукте реакции сохраняется достаточно много амидных групп, что усложняет дальнейшую модификацию полисахарида. В связи с этим в дальнейшем гидразиды получали при температуре 50 °С, увеличив время реакции до 12 ч для уменьшения содержания амидных групп в продукте реакции.

Из амида[д] при температурах 40–50 °С получаются образцы гидразида КЭАК со $C_{гкэ}$=0,11моль/моль-звено и степенью превращения амидных групп в гидразиды до 22% (таблица 2). Меньшие значения этих характеристик, чем в случае амидов[в], можно объяснить малой степенью замещения исходного амида. Для повышения числа гидразидных групп в продукте, полученного из амида[д], в дальнейшем увеличивали время реакции и использовали образцы амида с большим числом амидных групп.

Таблица 4.

Результаты реакции гидразингидрата с натриевой солью амидов карбоксиэтилальгиновой кислоты в выбранных условиях (12 ч; методика 1)

Характеристика амида		Характеристика гидразида КЭАК		$C_г$, %
$C_{акэ}$, моль/моль	$C_{кэ}$, моль/моль	$C_{акэ}$, моль/моль	$C_{гкэ}$, моль/моль	
амид[в], 50 °С				
0,45	0	0,15	0,24	53
0,74	0,08	0,19	0,45	61
1,00	0,05	0,19	0,64	64
амид[д], 40 °С				
0,52	–	0,19	0,24	46
0,59	0,07	0,18	0,27	46
0,60	–	0,23	0,34	57

Оказалось, что степень превращения амидных групп в гидразидные в предложенных нами условиях увеличилась с 42% до 53–64% и с 22% до 46–57% в случае амида[В] при 50 °С и амида[Д] при 40 °С соответственно. Практически полностью исчезли карбоксиэтильные группы, однако избавиться от амидных групп в продукте реакции не удалось.

Синтез гидразида КЭАК по методике 2, согласно которой на первом этапе увеличивается концентрация гидразина за счет азеотропной отгонки воды из реакционной массы, мы осуществляли с целью повышения выхода целевого продукта и улучшения его качества (таблица 5).

Таблица 5.

Результаты реакции амида карбоксиэтилальгиновой кислоты с гидразингидратом при использовании методики 2 ($С_{акэ}$=1,19; $С_{кэ}$=0,47)

Время, ч	Характеристика гидразида КЭАК				$С_г$**, %
	$С_{акэ}$, моль/моль	$С_{кэ}$, моль/моль	$С_{гкэ}$, моль/моль, по результатам		
			йодометрии	гидроксамовой реакции*	
1	2	3	4	5	6
3	0,22	0,34	0,52	0,36 (69)	44 (30)
5	0,15	0,38	0,51	0,27 (53)	43 (23)
7	0,07	0,44	0,52	0,24 (46)	44 (20)

Примечание: * – в скобках в столбце 5 указано процентное содержание незамещенных гидразидных групп в продукте реакции; ** – в скобках в столбце 6 указан процент амидных групп, превратившихся в незамещенные гидразидные группы.

Уже через 3 ч в реакции устанавливается равновесие, при котором величина $С_{гкэ}$ достигает значения 0,52 ($С_г$~44%) и при дальнейшем увеличении времени реакции не повышается, при этом количество амидных групп в полисахариде за счет отщепления и гидролиза уменьшается, а карбоксиэтильных – увеличивается. Однако спектрофотометрический метод анализа показал, что число незамещенных гидразидов в полученных образцах не превышает 70% от общего числа и при увеличении времени реакции уменьшается. Дальнейшие исследования показали, что такие гидразиды альгиновой кислоты в зависимости от степени «сшивки» плохо или вообще не растворяются в водных кислотах и в реакциях с карбонильными соединениями или при синтезе азидов дают низкий выход. Из-за этих и других недостатков методику 2 в дальнейшем для синтеза гидразидов КЭАК мы не использовали.

Оказалось также, что в одинаковых условиях (5 ч, 40 °С) увеличение концентрации гидразина в используемом реагенте от 60 до 100% понижает выход целевого продукта и степень превращения амидных групп в гидразидные.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при нагревании натриевых солей амида карбоксиэтилальгиновой кислоты в среде гидразингидрата при температурах 40–50 °С в течение 12 ч происходит превращение примерно 50–60% амидных групп в гидразидные. Степень превращения амидных групп в гидразидные повышается при увеличении числа амидных групп в карбоксиэтилальгиновой кислоте. При синтезе гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты нагреванием соответствующих амидов в бутанол-толуол-гидразингидратной смеси (методика 2, таблица 5) при 60 °С высокая степень гидразидирования (~40%) сопровождается сшиванием полисахаридных молекул за счет образования диацилгидразина и ухудшением качества продукта реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.С. Серебренникова, В.Л. Давыдова, С.В. Гурина, А.А Иозеп. Изучение антимикробной активности некоторых производных альгиновой кислоты // Проблемы медицинской микологии. 2013. Т.15. № 4. С. 60–62.
2. Е.С. Серебренникова, М.С. Мороз, А.И. Черёмушкин, А.А Иозеп. Реакции карбоксиметилальгиновой кислоты с некоторыми N-нуклеофилами // Бутлеровск. сообщ. 2012. Т. 31. № 7. С. 18–23.
3. С.И. Ансон, Е.В. Новикова, А.А. Иозеп. О гидразиде альгиновой кислоты и исследование его реакции с ароматическими альдегидами // ЖПХ. 2008. Т. 81. № 4. С. 611–614.
4. А.А. Иозеп, Н.К. Бессонова, Б.В. Пассет. Синтез гидразидов, азидов и замещенных амидов карбоксиэтилполисахаридов // ЖПХ. 1998. Т. 71. № 6. С. 998–1003.
5. Т.И. Тарадейко, Т.М. Седёлкина, Т.А. Тарасова, А.А. Иозеп. Алкилирование альгиновой кислоты акриламидом // ЖОХ. 2016. Т. 86. Вып. 6. С. 1345–1349.
6. С. Сиггиа, Г.Дж. Ханна. Количественный органический анализ по функциональным группам. – М.: Химия, 1983. 672 с.

hielscher

Ультразвуковые гомогенизаторы **VialTweeter** от Hielscher Ultrasonic

стр. 266





- гомогенизация образцов
- клеточный лизис
- фрагментация и деградация ДНК
- экстракция белка
- диспергирование клеточных скоплений и бактерий
- подготовка наночастиц

Ультразвуковые колебания высокой частоты 20-26 кГц создают эффект кавитации, образуя турбулентные потоки в жидкости, что гарантирует превосходный результат смешивания и гомогенизации

Ультразвуковые гомогенизаторы **Hielscher Ultrasonic** – немецкое качество в ультразвуковой обработке химико-фармацевтических продуктов

Pharmcontract® group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

УДК 604.2; 615.074; 543.422.7

МЕТОДИКА ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИАНАТА КАЛИЯ В СУБСТАНЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА КАРБАМИЛИРОВАННОГО ДАРБЭПОЭТИНА

А.Д. Аскретков[1]*, М.А. Жученко[2], Н.В. Орлова[2]

Резюме. Разработана методика количественного определения цианата калия в субстанции карбамилированного дарбэпоэтина альфа. Методика основана на дериватизации цианата метиловым эфиром антраниловой кислоты с последующим образованием бициклического производного (1-H,3-H-хиназолиндиона), которое обладает способностью к флуоресценции. Исследована возможность применения данной методики для определения цианата калия в белковых препаратах. Изучено влияние вспомогательных веществ субстанции на получаемые результаты. Проведена валидация методики по характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения.

Ключевые слова: цианат, метилантранилат, дериватизация, флуориметрия, дарбэпоэтин, карбамилированный дарбэпоэтин.

METHOD OF FLUORIMETRIC DETERMINATION OF POTASSIUM CYANATE IN CARBAMYLATED DARBEPOIETIN ALPHA DRUG SUBSTANCE

A.D. Askretkov[1]*, M.A. Zhuchenko[2], N.V. Orlova[2]

Abstract. Method of determination of potassium cyanate in carbamylated darbepoietin alpha drug substance was developed. The method is based on derivatization of cyanate by methyl ester of anthranilic acid followed by formation bicyclic derivative (1-H,3-H-quinazolinedione), which is able to fluorescence. Application of this method to determine potassium cyanate in protein drugs was investigated. Interference of excipients on this method was evaluated. The validation was performed: specificity, linearity, accuracy, precision, limit of quantitication.

Keywords: cyanate, methyl anthranilate, derivatization, fluorimetry, darbepoietin, carbamylated darbepoietin.

1 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (Институт тонких химических технологий), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, 86

2 – ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» («ГосНИИгенетика»), 117545, Россия, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

1 – Moscow Technological University (MITHT), 86, Vernadsky prosp., Moscow, 119571, Russia

2 – Scientific Center of Russian Federation «Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms», 1, 1st Dorozhniy pr., Moscow, 117545, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: askretkov.a.d@gmail.com; sashamitxt@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время чрезвычайно важной проблемой в здравоохранении являются нарушения мозгового кровообращения. Ишемический инсульт – острое нарушение мозгового кровообращения, сопровождающееся повреждением тканей головного мозга. Число случаев инсульта, по данным ВОЗ, неуклонно возрастает [1]. Ввиду опасности заболевания, а также тяжелых последствий, вплоть до смерти или полной потери трудоспособности, необходима немедленная госпитализация и медикаментозное лечение. Гибель нервных клеток происходит вследствие некроза и апоптоза [2] соответственно одним из терапевтических подходов к лечению ишемии является нейропротекция.

Одним из перспективных лекарственных средств для ингибирования апоптоза является карбамилированный дарбэпоэтин альфа – рекомбинантный белок, производное человеческого гормона эритропоэтина.

Эритропоэтин (ЭПО) – глюкопротеидный гормон, ингибитор апоптоза клеток, а также стимулятор кроветворения [3]. Лекарственные препараты на его основе применяются для лечения анемий, вызванных различными факторами. Несмотря на ингибирование апоптоза, его применение при ишемическом инсульте строго противопоказано [4] ввиду повышения артериального давления, увеличения вязкости крови, увеличения риска тромбообразования. Аналогом ЭПО является дарбэпоэтин альфа (ДЭПО), который за счет большего гликозилирования имеет большее время полужизни в крови. ДЭПО имеет схожие с ЭПО показания и противопоказания.

Карбамилированный ДЭПО (сДЭПО) является карбамилированным вариантом ДЭПО [5]. Он обладает выраженным антиапоптозным дейст-

вием, отсутствием гемопоэтической активности, а также большим временем пребывания в крови по сравнению с ЭПО. Перспективен для терапии ишемии.

Технология производства сДЭПО включает в себя получение ДЭПО экспрессией в штамме клеток яичника китайского хомячка [6, 7], его очистку, перевод в буфер для карбамилирования, карбамилирование, очистку, замену буфера и стерильную фильтрацию. Стадия карбамилирования белка проводится с помощью цианата калия в боратном буферном растворе [5].

В соответствии с требованиями GMP использование концентрированного раствора цианата калия с измеренной LD_{50} должно сопровождаться риск-анализом, основанным на показании лекарственного средства, его ожидаемой фармакологии и спектре побочных эффектов. Для оценки терапевтически неэффективной и токсикологически безопасной концентрации используются процедуры расчёта максимально допустимого переноса контаминирующего агента в финальный продукт и дозы, не обуславливающей побочных эффектов. Расчётные значения показателей не должны превышать значения, измеренные инструментально [8].

На данный момент разработано большое количество методик определения солей циановой кислоты. Среди наиболее часто используемых можно выделить гравиметрическое определение цианата с солями серебра [9]; измерение оптической плотности производного, полученного путём разложения цианата до аммиака с последующей обработкой реактивом Несслера [10] или пиридин-пиразольным реагентом [11]; метод проточно-инжекционного анализа с фотометрической детекцией аммония при помощи модифицированной реакции Бертлота [12]; спектрофотометрическую или флуориметрическую детекцию цианата, дериватизованного антраниловой кислотой [13] либо 2-нитро-5-тиокарбамоилбензойной кислотой [14, 15].

Отдельно стоит выделить хроматографические подходы к определению солей цианата, включающие йонобменную хроматографию с детекцией по электропроводности [16] и непрямой УФ-детекции [17], а также флуориметрическую детекцию производных антраниловой кислоты [18, 19].

Основными недостатками приведённых методов являются низкая чувствительность и специфичность, токсичность и низкая доступность используемых реагентов, необходимость в узкоспециализированном оборудовании.

Вышеперечисленные методики имеют недостатки, и имеется необходимость разработки методики, способной достичь необходимого предела определения цианата в субстанции сДЭПО, которая будет являться простой, не будет требовать редкого оборудования и малодоступных реактивов.

Целью данной работы являлась разработка и валидация простой и доступной методики определения цианата калия флуориметрическим методом, которая могла бы быть применимой как для субстанции сДЭПО, так и для ряда других продуктов, содержащих остаточные количества солей цианата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматограф жидкостный Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific), термостат CH-100 (Biosan, Латвия), мультифункциональный планшетный ридер Infiniti M200 Pro (Tekan, Швеция), центрифуга Eppendorf 5418 (Eppendorf, Германия), концентраторы Sartorius VS0102 с пределом отсечения молекулярной массы 10000 кДа (Sartorius Stedium Biotech GmbH, Германия).



Хроматограф жидкостный Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific)

Объекты исследования

Субстанция карбамилированного дарбэпоэтина альфа (ООО «Фармапарк», Россия).

Реактивы

Уксусная кислота [meets analytical specifications of USP, FCC, NF, EP (Ph. Eur.), BP, and/or JP., 27225, Sigma-Aldrich, Германия], метилантранилат (≥98%, W268208, Sigma-Aldrich, Индия), полисорбат-80 (tested according to Ph.Eur., 59924, Fluka analytical, Швейцария), трифторуксусная кислота (99%, 302031, Sigma-Aldrich, США), хлористоводородная кислота (ACS reagent, 37%, 320331, Sigma-Aldrich, Германия), серная кислота (х.ч., ТД «Химмед», Россия), цианат калия (96%, 215074, Sigma-Aldrich, США).

Калибровочные растворы цианата калия готовили в воде с концентрациями 7, 10, 14, 18, 21 мкмоль/л.

Рабочий раствор метилантранилата (МА) – 0,02 М раствор МА в 100% уксусной кислоте.

Флуориметрическое определение цианата калия

Пробоподготовка

250 мкл испытуемого образца (субстанция сДЭПО) помещали в концентраторы для избавления от белка. Далее проводили центрифугирование при 10000 об/мин в течение 15 мин.

Анализ

В стеклянные пробирки вносили по 200 мкл фильтрата испытуемого образца и калибровочных растворов цианата калия, добавляли 200 мкл рабочего раствора метилантранилата в уксусной кислоте, перемешивали. Инкубировали пробирки при комнатной температуре 20 мин, далее инкубировали при 45 °С в термостате в течение 30 мин. После окончания инкубации останавливали реакцию, помещая пробирки в лед. Далее в пробирки добавляли 400 мкл раствора 5 М серной кислоты, перемешивали и инкубировали при 75 °С в течение 8 мин. После окончания инкубации пробирки помещали в лед на 10 мин. Измеряли флуоресценцию при длине волны 410 нм (длина волны возбуждения – 310 нм).

Строили калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции от содержания цианата калия в растворе и с его помощью вычисляли его содержание в испытуемом растворе.

Оптимизация флуориметрического определения цианата калия

Подбор условий проведения первой стадии реакции дериватизации

К 200 мкл водного раствора цианата калия с концентрацией 10 ммоль/л добавляли 200 мкл 0,02 М растворов МА в: воде, фосфатном буферном растворе (pH 4,7) (ФБР), растворе трифторуксусной кислоты (ТФУ) 1%, растворе уксусной кислоты 10%, уксусной кислоте 100%, инкубировали при 45 °С в течение 50 мин. После инкубации проводили анализ реакционной смеси при помощи ВЭЖХ.

Анализ реакционной смеси после первой стадии реакции

Для анализа образцов использовали колонку Supelco C8 150x4,6 мм, 5 мкм, Температура колонки 30 °С. Программа градиента представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Программа градиентного элюирования для анализа реакционной смеси

Время, мин	Вода + 0,9% ТФУ, %	Ацетонитрил + 0,9% ТФУ, %
0	95	5
5	95	5
17	10	90
21	10	90
23	95	5
27	95	5

Скорость потока – 1 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Детектирование поглощения осуществляли при длине волны 280 нм. Время анализа – 27 мин.

Подбор условий проведения стадии циклизации

Растворы цианата калия с концентрациями (7, 10, 14, 18, 21 мкмоль/л), обработанные раствором 0,02 М МА в 100% уксусной кислоте, использовали для оценки протекания второй стадии реакции. Для этого проводили следующие эксперименты со временем инкубации 0, 2, 8, 20 мин при температуре 75 °С:

- добавление 400 мкл 12 М хлористоводородной кислоты;
- добавление 400 мкл концентрированной серной кислоты;
- добавление 400 мкл 5 М серной кислоты;
- добавление 200 мкл 1,8 М раствора гидроксида калия с последующим добавлением 6 М серной кислоты 400 мкл.

После инкубации пробирки помещали в лед на 5 мин и далее измеряли флуоресценцию при 410 нм (длина волны возбуждения – 310 нм).

Оценка влияния вспомогательных веществ на результаты анализа

Готовили растворы цианата калия с концентрациями (7, 10, 14, 18, 21 мкмоль/л) в воде, фосфатном буферном растворе (0,1 М, pH 6,0) (ФБР с pH 6,0), растворе полисорбата-80 0,005% в ФБР с pH 6,0 и в растворе субстанции сДЭПО. Определение цианата проводили по разработанной методике.

Валидация методики

Валидацию методики количественного определения цианата калия в субстанции карбамилированного дарбэпоэтина альфа проводили на основании ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи РФ XIII издания по параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор дериватизирующего реагента

Так как антраниловая кислота является прекурсором, то дериватизирующий реагент выбирали схожей структуры и реакционной способности, не являющийся строго контролируемым веществом. Как наиболее близкий аналог антраниловой кислоты был выбран МА. Данное вещество широко распространено, дешево, нетоксично.

Определение допустимой концентрации цианата калия в субстанции сДЭПО

Поскольку для цианата калия не показан какой-либо терапевтический эффект, расчёт допустимой концентрации проводили с использованием токсико-

логического подхода. Рассчитывали дозу цианата, не оказывающую побочных эффектов при попадании в организм (NOEL, мг/кг), по формуле:

$$NOEL=LD_{50} \times F,$$

$$NOEL=320 \text{ мг/кг} \cdot 0{,}0002=0{,}064 \text{ мг/кг},$$

где LD_{50} – летальная доза цианата калия (взята для мышей обоего пола при внутрибрюшинном введении, 320 мг/кг [20]); F – безразмерный эмпирический фактор (0,0002).

Далее рассчитывали дозу цианата, приводящую к NOEL (ADI), по формуле:

$$ADI=NOEL \times AAW \times SF,$$

$$ADI=0{,}064 \text{ мг/кг} \cdot 70 \text{ кг} \cdot 0{,}0001 = 0{,}000448 \text{ мг},$$

где AAW (Average adult weight) – средний вес взрослого человека (70 кг); SF (Safety factor) – безразмерный фактор безопасности (0,0001).

Далее из полученного значения ADI рассчитывали концентрацию цианата в препарате, приводящую к NOEL. По результатам вычислений максимально допустимая концентрация цианата калия в объёме препарата, равном 400 мкл, составила 14 мкмоль/л. На основании расчёта концентрации, приводящей к NOEL, было решено установить требуемую чувствительность методики не ниже 11,2 мкмоль/л (80% от максимально допустимого значения) [21]. Аналитический диапазон методики впоследствии расширили до 50–150% от концентрации цианата, приводящей к NOEL.

Подбор условий реакции дериватизации

Дериватизация цианата калия антраниловой кислотой и ее производными проводится в две стадии (рисунок 1). На первой стадии осуществляется реакция с образованием метил-2-уреидобензоата (МУБ), на второй стадии проводится циклизация в среде сильной минеральной кислоты или щелочи [13, 22, 23] с образованием 1-H,3-H-хиназолиндиона (ХД).

В методиках дериватизации цианата антраниловой кислотой первую стадию реакции проводят в воде [19], ФБР или в растворе 6 М хлористоводородной кислоты [13] при температуре 40 °С. Подбор условий проведения первой стадии реакции осуществляли с целью достижения наибольшего выхода МУБ, что проводилось путем сравнения площадей пиков МА и МУБ на хроматограммах реакционной смеси (рисунок 2). МУБ был получен синтезом по методике, представленной в статье [23].

По данным хроматограмм наиболее подходящей является реакция с раствором МА в 100% уксусной кислоте, при этом выход МУБ можно считать почти количественным (при равенстве коэффициентов экстинкции МУБ и МА).

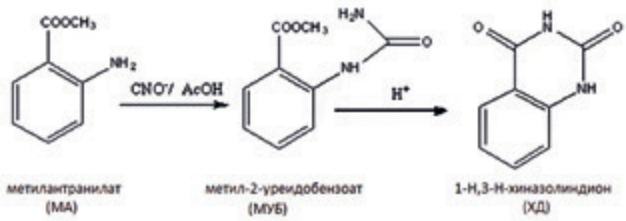


Рисунок 1. Схема дериватизации цианата калия метилантранилатом

Условия стадии циклизации МУБ в ХД подбирали с целью достижения максимального выхода флуоресцирующего продукта и, соответственно, максимальной чувствительности метода. Результаты оценивали по флуоресценции, снимаемой в кварцевой кювете.

Добавление концентрированной серной кислоты не привело к наличию линейной зависимости флуоресценции от концентрации цианата: значения для различных концентраций цианата имели беспорядочный характер.

Проведение стадии циклизации в растворе гидроксида калия приводило к огромным значениям флуоресценции для всех образцов, что может быть связано с флуоресценцией МА. Добавление кислоты после щелочной стадии привело к таким же результатам, как и для 12 М хлористоводородной кислоты (рисунок 3). Проведение реакции в 5 М серной кислоте со временем инкубации 8 мин (рисунок 4) показало наилучшие результаты как с точки зрения хорошей линейности, так и с точки зрения удобства работы (отсутствие едких паров).

Влияние вспомогательных веществ и белка в матриксе аналита на результаты анализа

Была проведена оценка влияния вспомогательных веществ на результаты анализа (рисунок 5).

Как видно из графика, влияние значения флуоресценции для ФБР с pH 6,0 сравнимы со значениями для водных растворов. Наличие полисорбата приводит к сильному завышению значений флуоресценции в верхней части калибровочной прямой, что требует удаления полисорбата из раствора. Как было обнаружено, влияние полисорбата возможно нивелировать с помощью ультрафильтрации.

Результаты для методики с ультрафильтрацией приведены на рисунке 6.

Валидация методики

Специфичность

Для проверки специфичности анализировали матрикс субстанции сДЭПО, не содержащий активное вещество (цианат калия и карбамилированный дарбэпоэтин альфа), но содержащий все остальные компо-

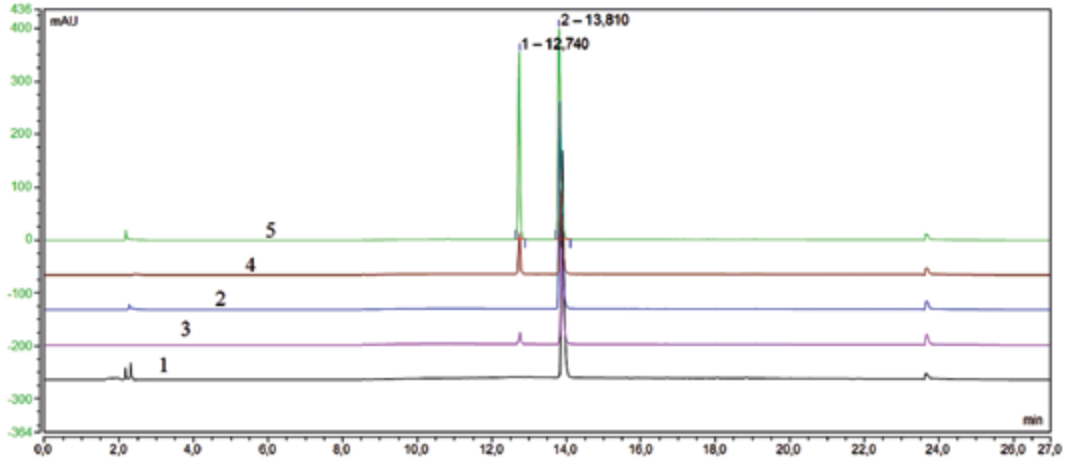


Рисунок 2. Хроматограммы реакции МА с цианатом: 1 – в водной среде, $S_{МУБ}/S_{МА}$=0; 2 – ФБР с pH 4,7, $S_{МУБ}/S_{МА}$=0; 3 – 1% ТФУ, $S_{МУБ}/S_{МА}$=0,08; 4 – 10% уксусной кислоте, $S_{МУБ}/S_{МА}$=0,33; 5 – 100% уксусной кислоте, $S_{МУБ}/S_{МА}$=0,5. Время удерживания МА – 13,2–13,4 мин, время удерживания МУБ – 12,8–12,7 мин

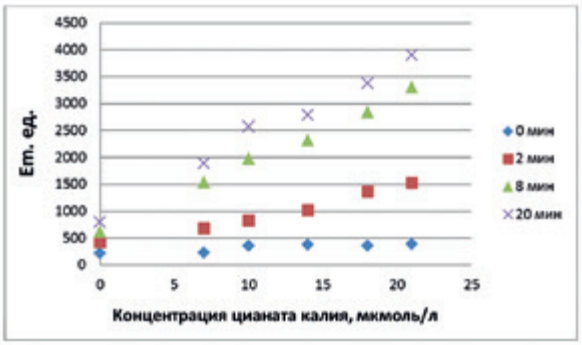


Рисунок 3. Зависимость флуоресценции от концентрации цианата калия для 12 М хлористоводородной кислоты

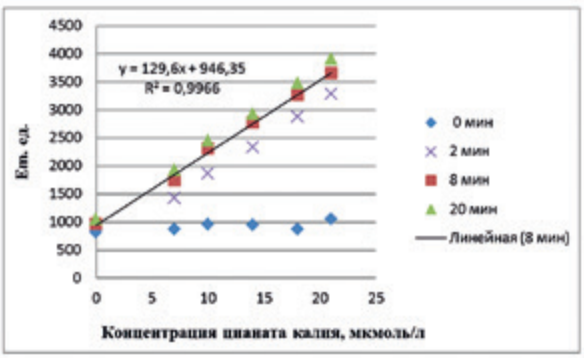


Рисунок 4. Зависимость флуоресценции от концентрации цианата калия для 5 М серной кислоты

ненты в трёх повторностях, и сравнивали со значением нулевой и нижней точки калибровки (7 мкмоль/л).

Среднее значение флуоресценции в матриксе составило 873 ед., значение в нулевой точке калибровки – 892 ед., значение нижней точки калибровки – 1813 ед.

Флуоресценция в образце матрикса не превышает флуоресценции нулевой точки калибровки более чем в 3 раза, а также не превышает флуоресценции калибровки с концентрацией цианата калия 7 мкмоль/л.

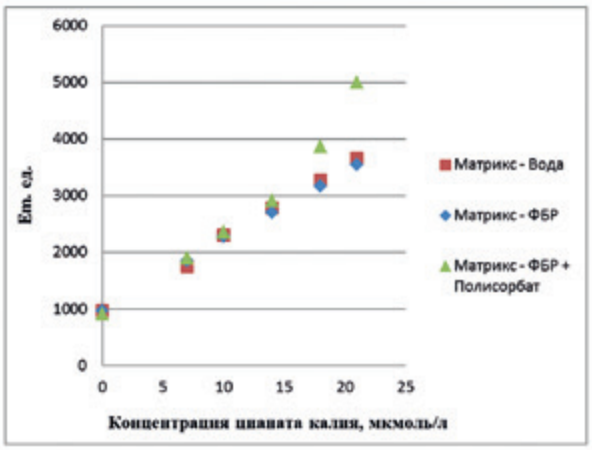


Рисунок 5. Калибровочные прямые, построенные для различных матриксов аналита

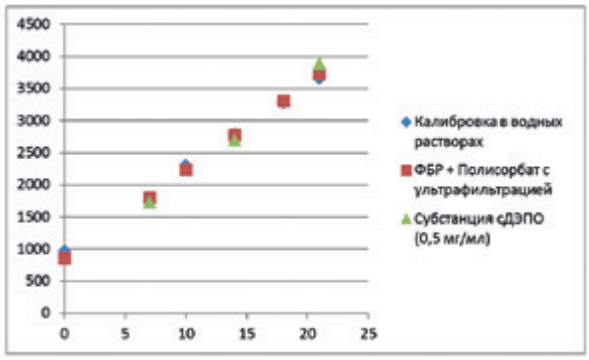


Рисунок 6. Влияние присутствия белка в пробе на результаты анализа

Линейность

Проводили анализ водных растворов цианата калия с концентрацией 7, 10, 14, 18, 21 мкмоль/л в трех повторностях. По полученным данным строили график (рисунок 7), а также оценивали разброс данных (таблица 2).

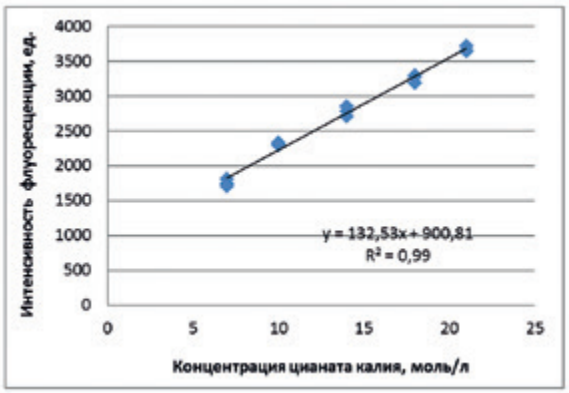


Рисунок 7. Калибровочный график зависимости интенсивности флюоресценции от концентрации цианата калия

Коэффициент корреляции (r^2=0,99) не ниже 0,99.

Таблица 2.

Значение отклонений концентраций калибровочных растворов от истинных значений

$C_{действ}$, мкмоль/л	7	10	14	18	21
$C_{рассчит}$, мкмоль/л	6,4	10,6	14,2	17,8	20,9
Остатки, %	7,92489	6,3299	1,4428	1,27225	0,321221
Норма	Не более 15%				

Коэффициент корреляции и значение отклонений соответствуют нормам.

Правильность

Для установления правильности анализировали 3 раствора субстанции сДЭПО с прибавлением раствора цианата калия до концентраций 7, 14, 21 мкмоль/л. Измеряли значения концентрации цианата и рассчитывали отклик (таблица 3).

Среднее значение отклика составляет 108,25% и не выходит за диапазон 85–115%.

Прецизионность

Прецизионность методики характеризовали по повторяемости и промежуточной прецизионности.

Повторяемость оценивали, исходя из данных, полученных при оценке линейности методики. Для них рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD), результаты представлены в таблице 4.

Таблица 3.

Оценка правильности методики

Образец	$C_{действ}$, мкмоль/л	$C_{измер}$, мкмоль/л	$C_{измер\ сред.}$, мкмоль/л	Отклик, %
TRU1	7	8,1	79	112,86
		7,6		
		7,9		
TRU2	14	15,5	14,8	105,71
		14,2		
		14,6		
TRU3	21	21,3	22,3	106,19
		22,5		
		23,1		
Среднее				108.25

Таблица 4.

Оценка повторяемости методики

Концентрация калибровочного раствора, мкмоль/л	7	10	14	18	21
Измерение 1	1813	2292	2784	3278	3656
Измерение 2	1749	2330	2853	3192	3723
Измерение 3	1703	2310	2712	3300	3648
Среднее значение	1755	2311	2783	3257	3676
RSD, %	3,15	0,82	2,53	1,75	1,12

Относительное стандартное отклонение не превышает 10%.

Для оценки промежуточной прецизионности проводили три аналитические сессии в разные дни, в каждой из которых анализировали образец субстанции сДЭПО с концентрацией цианата калия 14 ммоль/л. Рассчитывали RSD, данные приведены в таблице 5.

Таблица 5.

Оценка промежуточной прецизионности метода

№ сессии	$C_{измер}$, мкмоль/л	$C_{измер\ сред.}$, мкмоль/л
1	15,6	14,8
	14,2	
	14,6	
2	13,4	13,9
	13,7	
	14,6	
3	14,7	14,7
	14,2	
	15,3	
Среднее значение, мкмоль/л		14,5
Стандартное отклонение, мкмоль/л		0,049
RSD, %		3,41

RSD не превышает 15%.

Предел количественного определения

Для определения предела количественного определения (ПКО) анализировали 3 раствора субстанции сДЭПО, не содержащей цианата калия, затем рассчитывали ПКО по формуле:

$$ПКО=10 \times S/b,$$

где S – стандартное отклонение сигнала нулевого образца (шум); b – тангенс угла наклона калибровочной прямой.

Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Определение предела количественного определения методики

Образец	Флуоресценция, ед.
1	973
2	824
3	845
Стандартное отклонение сигнала (S), ед.	80,5
Угол наклона (b)	132,53
ПКО, мкмоль/л	6,1

ПКО равен 6,1 мкмоль/л и находится на нижней границе аналитического диапазона методики.

Таким образом, была проведена валидация методики определения примеси цианата калия в субстанции сДЭПО. Были установлены специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения методики.

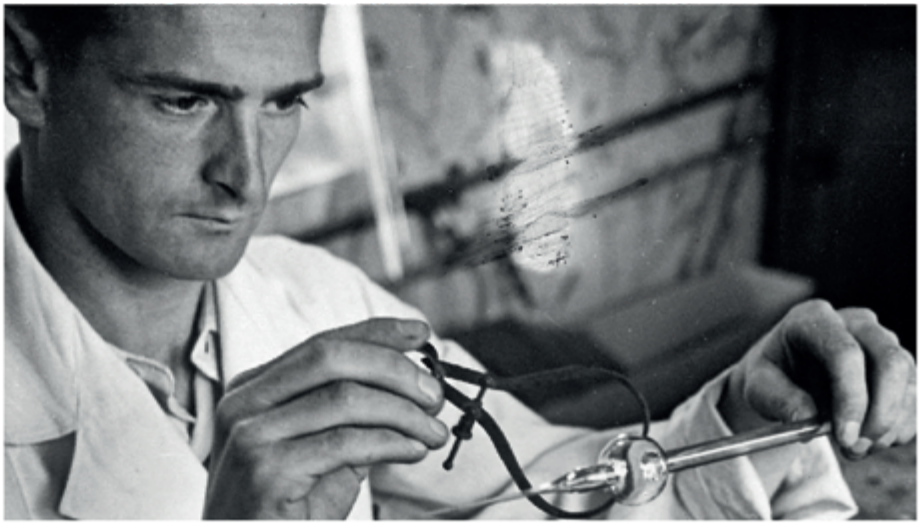
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика количественного определения примеси цианата калия в субстанции карбамилированного дарбэпоэтина методом флуориметрии. Методика позволяет определять концентрации цианата калия в диапазоне 50–150% от максимальной безопасной концентрации цианата (14 мкмоль/л) в препарате. Проведена валидация методики по параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения. Данная методика может быть применена для определения примеси цианата калия в субстанции карбамилированного дарбэпоэтина альфа.

ЛИТЕРАТУРА

1. 10 ведущих причин смерти в мире. Информационный бюллетень / Всемирная организация здравоохранения. Январь, 2017. URL: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/ (дата обращения 07.06.2017).
2. R.A. Gottlieb. Cell Death Pathways in Acute I/R Injury // J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 2011. V. 16(3–4). P. 233–238.
3. W. Jelkman. Regulation of erythropoietin production // J. Physiol.2011. V. 589. P. 1251–1258.
4. J. Minnerup,H. Wersching, W-R. Schäbitzet al. Erythropoietin for stroke treatment: dead or alive? // Crit. Care. 2011. V. 15 (2). P. 129.
5. Патент РФ № 2575773. Карбамилированный дарбэпоэтин 9c-depo, способ его получения и применение его в качестве лекарственного средства с цитопротекторным действием / Р.Р. Шукуров, Р.Р. Хамитов, И.С. Кряжевских; патентообладатель ООО «Фармапарк». – № 2013131194/15; заявл. 09.07.2013, опубл. 20.02.2016. Бюл. № 5.
6. Р.Р. Шукуров, Н.В. Лобанова, И.Н. Савинова и др. Создание стабильной клеточной линии-продуцента рекомбинантного дарбэпоэтина-альфа на основе клеток CHO // Биотехнология. 2013. № 2. С. 46–54.
7. А.А. Нурбаков, Н.В. Лобанова, И.Н. Савинова и др. Оптимизация технологии культивирования клеток CHO, экспрессирующих рекомбинантный дарбэпоэтин-альфа, в замкнутом объеме с подпиткой // Биотехнология. 2012. № 12. С. 55–65.
8. M. A. Dorato, J.A. Engelhardt. The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: Use, issues, and definition(s) // Regul. Toxicol. Pharmacol.2005. V. 42(3). P. 265–74.
9. Handbook of Anion Determination / W John Williams. – London: Butterworth-Heinemann, 1979. 640 p.
10. W. H. R. Shaw, J. J. Bordeaux.Semimicromethod for Determination of Cyanate Ion in Presence of Interfering Substances//Anal. Chem. 1955. V. 27(1). P. 136–138.
11. J. M. Kruse, M. G. Mellon. Colorimetric Determination of Ammonia and Cyanate // Anal. Chem. 1953. V. 25 (8). P. 1188–1192.
12. V.M. Luque-Almagro, R. Blasco, J.M. Fernández-Romero, M.D. Luque de Castro. Flow-injection spectrophotometric determination of cyanate in bioremediation processes by use of immobilised inducible cyanase // Anal. Bioanal. Chem. 2003. V. 377. P. 1071–1078.
13. M. Guilloton, F. Karst. A Spectrophotometric Determination of Cyanate Using Reaction with 2-Aminobenzoic Acid // Anal. Biochem. 1985. V. 149. P. 291–295.
14. S. Eiger, S.D. Black. Analysis of Plasma Cyanate as 2-Nitro-5-thiocarbamylbenzoic Acid by High-Performance Liquid Chromatography // Anal. Biochem. 1985. V. 146. P. 321–326.
15. T.H.K. Ohe, A.A. da Silva, T.́ıs da S.Rocha et al. A Fluorescence-Based Method For Cyanate Analysis In Ethanol/Water Media: Correlation Between Cyanate Presence And Ethyl Carbamate Formation In Sugar Cane Spirit // J. Food Sci. 2014. V. 79 (10). P. 1950–1955.
16. S.B. Black , R.S. Schulz. Ion chromatographic determination of cyanate in saline gold processing samples // J. Chromatogr. A. 1999. V. 855. P. 267–272.
17. P. Fagan, B. Paull, P.R. Haddad et al. Ion chromatographic analysis of cyanate in gold processing samples containing large concentrations of copper(I) and other metallocyanide complexes // J. Chromatogr. A. 1997. V. 770. P. 175–183.
18. P. Lundquist. B. Backmangullers.B. Kagedal. H. Rosling. Fluorometric Determination of Cyanate in Plasma by Conversion to 2,4(1H,3H)-Quinazolinedione and Separation by High-Performance Liquid Chromatography // Anal. Biochem. 1993. V. 211(1). P. 23–27.
19. B. Widner, M.R. Mulholland, K. Mopper. Chromatographic Determination of Nanomolar Cyanate Concentrations in Estuarine and Sea Waters by Precolumn Fluorescence Derivatization // Anal. Chem. 2013. V. 85 (14). P. 6661–6666.
20. Potassium cyanate ANACHEMIA MSDS Canada. Version 2.2. Prepared by MSDS Department/Département de F.S. January 2013. 4 p.
21. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея РФ. XIII изд. Т. 1. – М., 2016.
22. P. Lundquist, B. Backman-Gullers, B. Kågedal et al. Fluorometric determination of cyanate in plasma by conversion to 2,4(1H,3H)-quinazolinedione and separation by high-performance liquid chromatography // Anal. Biochem. 1993. V. 211(1). P. 23–27.
23. X. Deng, L. Guo, L.Xu et al. Discovery of Novel Potent and Selective Ligands for 5-HT2A Receptor with Quinazoline Scaffold // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015. V. 25(18). P. 3970–3974.





1957 Запущен в массовое производство первый ротационный испаритель

BUCHI Rotavapor®



Специальные условия на Rotavapor® R-300
Празднуем 60-летие BUCHI Rotavapor®

Только до 31 декабря 2017 года передовой ротационный испаритель Rotavapor® R-300 со скидкой до 36’000 рублей.

Освободите себя от рутинных лабораторных задач.
www.buchi.ru/rotavapor

Официальный дистрибьютор BUCHI:
8 800 333 42 24 (Бесплатный звонок по России)
info@phct.ru || www.phct.ru

Фармконтракт
группа компаний

www.buchi.ru

Quality in your hands

УДК 604.2; 615.074; 543.422.7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИСОРБАТОВ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

А.Д. Аскретков[1]*, П.М. Исайкина[1], С.А. Черепушкин[2], Н.В. Орлова[2]

Резюме. Разработана методика определения полисорбата-20 и полисорбата-80 в лекарственных препаратах на основе рекомбинантных белков методом спектрофотометрии. Выделение полисорбата из раствора проводится с помощью твердофазной экстракции с последующим элюированием полисорбата ацетонитрилом. Ацетонитрильный раствор упаривается, и полисорбат дериватизуется железотиоцианатным реагентом, полученный дериватизат извлекается в органическую фазу, и измеряется оптическая плотность. Подобраны наиболее оптимальные условия дериватизации, экстракции в органическую фазу и измерения полисорбата. Проведена валидация методики: определены её специфичность, линейность, правильность, прецизионность, устойчивость, предел количественного определения.

Ключевые слова: валидация, рекомбинантные белки, полисорбат, твердофазная экстракция, твин, тиоцианат железа.

DETERMINATION OF POLYSORBATES BY SPECTROPHOTOMETRY IN DRUGS BASED ON RECOMBINANT PROTEINS

A.D. Askretkov[1]*, P.M. Isaykina[1], S.A. Cherepushkin[2], N.V. Orlova[2]

Abstract. Method of determination of polysorbate 20 and polysorbate 80 in recombinant protein drugs based on spectrophotometry has been designed. Isolation of polysorbate from solution is carried out by solid phase extraction followed by elution of polysorbate with acetonitrile. Acetonitrile solution is evaporated and then polysorbate is derivatized with ferrous-thiocyanate reagent. Obtained derivative is extracted into organic phase and optical density is measured. The most optimal conditions of derivatization, extraction into organic phase and measurment was chosen. The validation was performed: specificity, linearity, accuracy, precision, robustness, limit of quantification.

Keywords: validation, recombinant proteins, polysorbate, solid phase extraction, tween, iron thiocyanate.

1 – ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (Институт тонких химических технологий), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, 86

2 – ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» («ГосНИИгенетика»), 117545, Россия, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

1 – Moscow Technological University (MITHT), 86, Vernadsky Av., Moscow, 119571, Russia

2 – Scientific Center of Russian Federation «Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms», 1, 1st Dorozhniy pr., Moscow, 117545, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Белки являются малостабильными веществами, склонными к физической и химической деградации. Это приводит к образованию агрегатов, потере белком специфической биологической активности либо химическим изменениям (дезамидирование, окисление, гидролиз и т.д.). Наличие агрегатов, неактивного и химически измененного белка критически влияет на качество, безопасность и эффективность лекарственных препаратов, поэтому необходим строгий контроль данных показателей. Агрегацию белка на всех стадиях технологического процесса производства лекарственной формы уменьшают путем добавления неионогенных поверхностно-активных веществ (НПАВ): полисорбата-20 (ПС-20), полисорбата-80 (ПС-80) [1, 2], полоксамеров и т.д. ПС значительно уменьшают агрегацию белков [3], сорбцию на поверхностях [4]. Также было показано, что ПС защищают белки от агрегации при механическом воздействии (размешивание, встряхивание) [5], заморозке-оттаивании [6], лиофилицации и последующем растворении [7].

Так как ПС сорбируется на многих поверхностях, мембранах для ультрафильтрации, стерилизующих фильтрах [8], то поддержание концентрации ПС в растворах белков на всех стадиях технологического процесса и в готовой лекарственной форме важно с точки зрения сохранения стабильности препарата. Для определения ПС на каждой стадии процесса необходима достаточно быстрая и простая методика.

ПС представляют собой полиоксиэтилированные эфиры сорбитана с остатком высшей жирной карбоновой кислоты: лауриновой кислоты – ПС-20, олеиновой кислоты – ПС-80. Определение ПС в белковых лекарственных препаратах является важной задачей, однако имеется несколько обстоятельств, затрудняющих анализ данного вещества:

- гетерогенная структура ПС: ПС не является одной молекулой с конкретной формулой, а является смесью, состоящей из более чем 1500 различных типов молекул [9], отличающихся степенью оксиэтилирования по разным положениям ядра сорбитана, неоднородностью жирных кислот, наличием примесей (например, ПС-80 содержит только около 60% лауриновой кислоты от общей суммы жирных кислот [10]);
- отсутствие хромофорных групп, что не позволяет проводить прямую детекцию по оптическому поглощению;
- связывание ПС с белком, что влияет на его содержание в растворе и не позволяет проводить количественное извлечение ПС из растворов экстракционными методами.

На данный момент разработано большое количество методик количественного определения ПС. Хроматографические методы включают в себя обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) со спектрофотометрической детекцией, детекцией светорассеянием [11], масс-спектрометрической детекцией [12], детекцией заряженных аэрозолей, рефрактометрической детекцией [13] и детекцией поляризации флуоресценции [14].

Данные методы являются достаточно чувствительными, однако происходит быстрое забивание хроматографической колонки белком, пик ПС имеет большую ширину и может сливаться с пиками других компонентов на хроматограмме. Применяемый метод спектрофотометрической детекции определяет не сам аналит, а примесь, содержащуюся в нем, что дает невоспроизводимые результаты при анализе ПС разных серий/производителей. Определение ПС проводится также с помощью газовой хроматографии [15], однако данный метод требует предварительной стадии дериватизации, а также малодоступных реактивов для её осуществления. Имеются работы, в которых ПС определяется колориметрически при помощи реакции полисорбата с йодокрахмальным комплексом [16], однако данный метод имеет низкую чувствительность и плохую повторяемость.

Существует также колориметрический способ определения ПС путем образования комплекса с тиоцианатами кобальта [8], железа [17], молибдена [18] и экстракции образовавшегося комплекса в органическую фазу с дальнейшей детекцией оптической плотности органической фазы. Для данных методов необходимо отсутствие белка в растворе ПС, что обеспечивается жидкостной экстракцией ПС [8] или твердофазной экстракцией [19] с последующим выпариванием раствора ПС в органическом растворителе. Жидкостная экстракция ПС с последующей дериватизацией и колориметрией является очень трудозатратным методом, а также не обеспечивает необходимой точности. Твердофазная экстракция ПС с последующей дериватизацией и колориметрией имеет сильный разброс и нестабильность значений оптической плотности во времени.

В связи с этим стоит задача разработать методику количественного определения ПС, подходящую для быстрого и точного определения ПС.

Целью данной работы являлась разработка и валидация методики количественного определения ПС твердофазной экстракцией с последующей дериватизацией железотиоцианатным реагентом и колориметрическим определением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Исследование проводили, используя спектрофотометр Smart Spec Plus (Bio Rad laboratories, США). Снятие УФ-ВИД-спектров проводили на спеткрофотометре Ultrospec 8000 (GE Healthcare Life Sciences, Великобритания). Взятие навесок осуществляли с помощью аналитических весов «Сартогосм» CE-1502-C (ООО «Сартогосм», Россия). Твердофазную экстракцию проводили, используя систему Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (кат № 57250-U, SUPELCO, США), картриджи для твердофазной экстракции использовались Supel™-Select HLB SPE Tube (объем – 1 мл, масса сорбента – 30 мг) (кат. № 54181-U, SUPELCO, США). Для упаривания растворов применялся вакуумный концентратор RVC 2-18 HCL (Christ, Германия). Для центрифугирования образцов применялась центрифуга 5417R (Eppendorf, Германия).



Спеткрофотометр Ultrospec 8000 GE Healthcare

Приготовление рабочего раствора железотиоцианатаного реагента

1,4 г хлорида железа (III) гексагидрата (кат. № 31232, Sigma Aldrich, США) растворяли в 40 мл воды, добавляли 1,6 г тиоцианата аммония (кат. № 31120, Sigma Aldrich, Испания), доводили объем водой до 50 мл. К 9 мл полученного раствора при перемешивании по каплям добавляли 1 мл концентрированний серной кислоты (рабочий раствор). Рабочий раствор использовали свежеприготовленным.

Подготовка испытуемых образцов и калибровочных растворов

Испытуемые образцы разбавляли водой до концентрации ПС 0,01–0,03 мг/мл.

Растворы для калибровки готовили в воде с концентрациями ПС 0,3; 0,5; 1; 1,5; 2 мг/мл. Твердофазная экстракция для калибровочных растворов не проводилась. 20 мкл калибровочных растворов добавляли в пробирки непосредственно перед стадией дериватизации железотиоцианатным реагентом.

Проведение анализа

В установку для твердофазной экстракции Visiprep™ SPE Vacuum Manifold помещали картриджи для твердофазной экстракции Supel-Select HLB SPE Tube. Проводили кондиционирование картриджей пропусканием 1 мл 96% этанола, далее промывали картриджи 1 мл воды, наносили испытуемый образец в количестве 1 мл и пропускали сквозь картридж. Проводили промывку картриджей 1 мл 4 М раствора гидрохлорида гуанидина (кат. № G3272, Sigma Aldrich, США), далее промывали водой 2 раза по 1 мл. В установку под картриджи помещали полипропиленовые пробирки объемом 2 мл с завинчивающейся крышкой (Sarstedt). Элюировали ПС с картриджей ацетонитрилом 2 раза по 0,7 мл (Panreac, UHPLC Hypergradient). Упаривали ацетонитрил досуха на вакуумном концентраторе (CHRIST RVC2-18HCL). Далее проводили дериватизацию: добавляли 0,5 мл рабочего раствора железотиоцианатного реагента и 0,5 мл хлористого метилена, взбалтывали пробирки, проводили центрифугирование (10000 об/мин, 10 мин). Для калибровки 20 мкл калибровочных растворов помещали в полипропиленовые пробирки и проводили дериватизацию по описанной методике. Далее отбирали органическую фазу и измеряли оптическую плотность при 510 нм. Строили калибровочный график и определяли содержание ПС в образцах средствами Microsoft Office (2010), Microsoft, США.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Метод определения НПАВ, содержащих оксиэтиленовые звенья, экстракцией комплекса с тиоцианатом кобальта в органическую фазу был предложен изначально как качественная реакция [20], в дальнейшем было показано, что возможно применение данного метода для количественного определения [21]. Однако скоро выяснилось, что определению НПАВ сильно мешают некоторые компоненты пробы, такие как белки и ионные ПАВ [22]. Как следствие, появился метод экстракции ПС органическими растворителями [8] с последующим упариванием органической фазы и проведением дериватизации [23]. Однако данный метод является очень трудоемким, а также не обеспечивает необходимой точности анализа (из-за невозможности количественного извлечения ПС), также при экстракции ПС из белковых растворов часто образуется эмульсия, слабо расслаивающаяся при центрифугировании. Проведение выделения ПС методом твердофазной экстракции [19] значительно упростило анализ и позволило избежать многих проблем, однако данная методика имеет два недостатка:

- низкий коэффициент экстинкции для комплекса ПС с кобальтотиоционатным реагентом при длине волны поглощения 620 нм;
- сильный разброс и значительное падение значений оптической плотности с течением времени (рисунок 1).

Выбор реагента для дериватизации

ПС образует окрашенные комплексы с тиоцианатами молибдена, кобальта, железа (III) [17]. При сравнении спектров поглощения данных комплексов (в растворе хлористого метилена) у кобальта наблюдаются максимумы поглощения при λ=320 нм и λ=620 нм. Максимум при 320 нм имеет относительно высокий удельный показатель поглощения $A^{1\%}_{1\,см} = 90$, а при 620 нм – $A^{1\%}_{1\,см} = 20$. Детекция при 320 нм нежелательна, так как многие примеси в пробе поглощают в том же диапазоне длин волн. При 620 нм интенсивность поглощения достаточно мала, что негативно влияет на чувствительность метода.

Комплексы молибдена с ПС имеют пики в области 325 и 475 нм. Удельные показатели поглощения для обоих пиков – $A^{1\%}_{1\,см} = 70$.

Комплекс тиоцианата железа (III) имеет максимум поглощения при 510 нм и $A^{1\%}_{1\,см} = 130$ (рисунок 1).

Таким образом, в качестве дериватизирующего реагента был выбран тиоцианат железа (III) как наиболее чувствительный реагент и мало подверженный влиянию примесей, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра.

Устранение сильного разброса и падения значений оптической плотности со временем

При дериватизации железотиоцианатным реагентом, как и при дериватизации кобальтотиоцианатным реагентом [17], наблюдались сильный разброс и падение значений оптической плотности с течением времени (рисунок 2), что негативно влияло на количественное определение ПС.

Изначально было предположено, что падение и сильный разброс значений вызваны гетерогенностью системы (присутствием водной эмульсии с дериватизирующим агентом в органической фазе). Центрифугирование образцов со скоростями вплоть до 20000 об/мин не дало положительного эффекта.

Было обнаружено, что добавление кислоты позволяет повысить стабильность комплекса, уменьшить разброс значений оптической плотности, а также предотвратить падение значений оптической плотности с

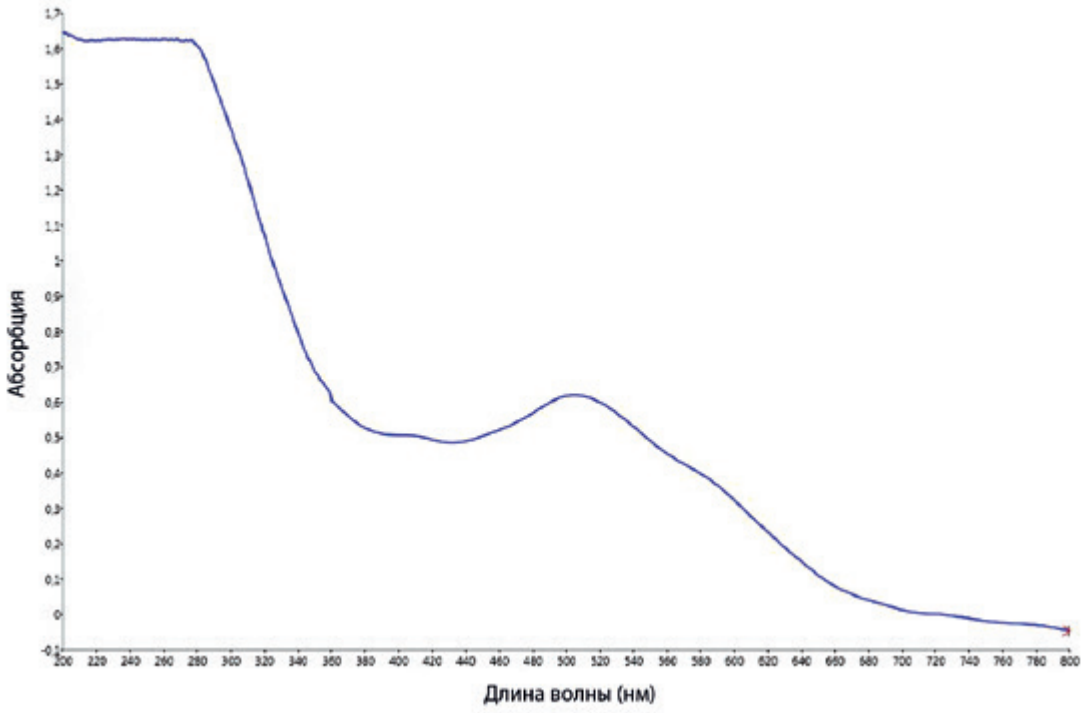


Рисунок 1. **Спектр комплекса тиоцианата железа с полисорбатом-80 в хлористом метилене. Концентрация ПС-80 – 1,2 мг/мл. Наблюдается максимум поглощения при 508–510 нм**

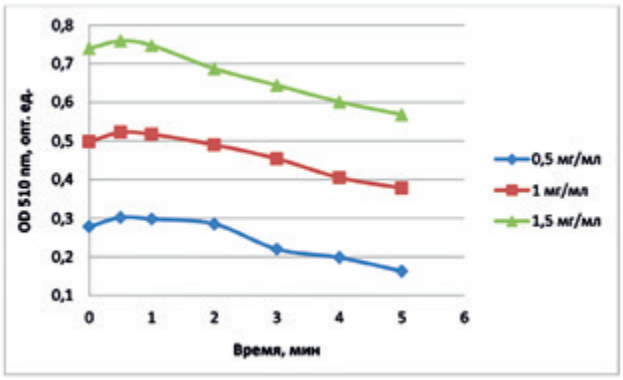


Рисунок 2. **График зависимости оптического поглощения комплекса ПС 80 с железо-тиоцианатным реагентом от времени для трех концентраций ПС**

течением времени. Наиболее оптимальным являлось добавление концентрированной серной кислоты в количестве 10% от объема дериватизирующего агента.

Загрязнение кюветы

Измерение оптической плотности проводили в кварцевых микрокюветах. При этом возникала проблема окраски стенок кюветы комплекса ПС с железо-тиоцианатным реагентом, что приводило к последующему завышению значений оптической плотности. Для очистки кювет после каждого измерения промывали кювету сначала 96% этанолом, потом хлористым метиленом и затем измеряли следующий образец.

Калибровочные кривые для ПС-20 и ПС-80 представлены на рисунке 3.

Экстракция растворов для калибровки

Как было обнаружено, извлечение полисорбата картриджами для твердофазной экстракции проходило почти количественно и поэтому в дальнейшем для уменьшения расхода картриджей калибровку проводили без твердофазной экстракции.

Валидация методики

Валидация методики проводилась для определения ПС-80 по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, устойчивость, предел количественного определения. В качестве раствора белка была взята экспериментальная серия субстанции адалимумаба 0020616 (производство ООО «Фармапарк», Россия, срок годности до 15.06.17) с концентрацией белка 75 мг/мл и концентрацией ПС-80 1,0 мг/мл.

Специфичность

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов [24]. Определялась путем сравнения оптической плотности матрикса белка (не содержащего ПС-80) с калибровочным раствором, не содержащим ПС-80, и с калибровочным раствором с концентрацией ПС-80 0,3 мг/мл. Оптическая плотность в матриксе составила 0,081; в калибровочном растворе, не содержащем ПС-80, – 0,042, в калибровочном растворе с 0,3 мг/мл ПС-80 – 0,160. Измеренная оптическая плотность в образце матрикса меньше, чем оптическая плотность в калибровочном растворе с концентрацией ПС-80 0,3 мг/мл (минимальная точка калибровки), и не пре-

вышает уровень фона более чем в 3 раза (за фон берется калибровочный раствор, не содержащий ПС-80). Матрикс субстанции не оказывает влияние на анализ, специфичность установлена.

Линейность

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики [24]. Определялась измерением оптической плотности растворов ПС пяти концентраций по 3 повтора каждый (рисунок 3). Квадрат коэффициента линейной регрессии (r^2) равен 0,996, что соответствует требованиям $r^2 \geq 0{,}99$.

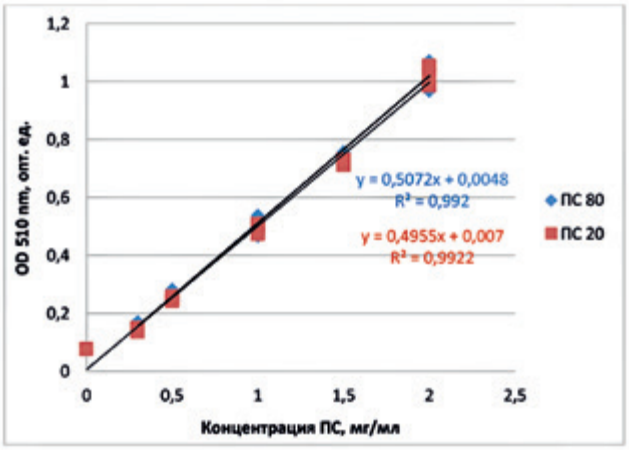


Рисунок 3. График зависимости оптической плотности от концентрации ПС-20 и ПС-80

Правильность

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное [24]. Правильность оценивали определением концентраций ПС-80 в образце субстанции белка, содержащем известные концентрации ПС-80 (таблица 1). Среднее значение степени извлечения составляет 101,2%, что попадает в диапазон 85–115%. Правильность установлена.

Прецизионность

Прецизионность устанавливали по параметрам «повторяемость» и «внутрилабораторная прецизионность».

Повторяемость оценивали, исходя из значений оценки линейности (таблица 2). Относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 10%. Повторяемость установлена.

Внутрилабораторную прецизионность оценивали, проведя 3 аналитические сессии в разные дни, на разном оборудовании и с разным оператором. Результаты представлены в таблица 3. Относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 15%. Внутрилабораторная прецизионность установлена.

Таблица 1.

Оценка правильности методики

Концентрация ПС-80 в образце ($C_{теор}$), мг/мл	Измеренная концентрация ПС-80 в образце, мг/мл	Степень извлечения, %
0,40	0,43	107,5
	0,42	105
	0,40	100
0,80	0,83	103,8
	0,84	105
	0,78	97,5
1,40	1,38	98,6
	1,31	93,6
	1,40	100
Среднее		101,2

Таблица 2.

Оценка повторяемости методики

Концентрация ПС-80 в растворе, мг/мл	0,3	0,5	1	1,5	2
Измерение 1	0,170	0,254	0,516	0,733	1,065
Измерение 2	0,143	0,259	0,468	0,756	0,969
Измерение 3	0,167	0,282	0,537	0,748	1,07
Среднее значение	0,160	0,265	0,507	0,746	1,035
RSD, %	7,55	4,60	5,70	1,28	4,49

Таблица 3.

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики

№ сессии	Значение измеренного содержания ПС-80, мг/мл	Среднее значение измеренного содержания ПС-80, мг/мл
1	0,83	0,82
	0,82	
	0,80	
2	0,84	0,83
	0,83	
	0,81	
3	0,78	0,81
	0,84	
	0,82	
Среднее значение содержания полисорбата-80, мг/мл		0,85
Стандартное отклонение, мг/мл		0,01
RSD, %		1,4

Предел количественного определения

Для оценки предела количественного определения провели измерение стандартного отклонения сигнала для калибровочных растворов, не содержащих ПС-80 (таблица 4). Как видно из графика, предел количественного определения ПС-80 равен 0,059 мг/мл при пересчете на 20 мкл образца белка, использованных для анализа. То есть 0,0012 мг/мл при использовании 1 мл раствора белка для анализа.

Таблица 4.

Определение предела количественного определения методики

Концентрация ПС-80, мг/мл	OD 510 nm, опт. ед.	Стандартное отклонение (σ)
0	0,081	0,003
	0,076	
	0,079	
Угол наклона (b)		0,5072
Предел количественного определения (LOQ=10·σ/b), мг/мл		0,059

Устойчивость

Устойчивость методики оценивали по отношению к изменению свойств ПС-80 у различных производителей и различных серий продукта. Были приготовлены образцы ПС-80 с концентрацией 1 мг/мл и проведена оценка разброса оптических плотностей различных ПС-80 (таблица 5).

Таблица 5.

Оценка устойчивости методики к изменению серий ПС-80

Производитель и lot. ПС-80	Концентрация, мг/мл	OD 510 nm, опт. ед.	RSD, %
Fluka lot. BCB D5524	1	0,507	2,23
Fluka lot.BCBL9041V	1	0,498	
Sigma-Aldrich lot. 59924	1	0,485	

RSD не превышает 10%. Устойчивость по отношению к фактору различия производителей и серий ПС-80 установлена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, было показано, что улучшенная и адаптированная нами методика количественного определения ПС-80 с помощью твердофазной экстракции с последующей дериватизацией железотиоцианатным реагентом и колориметрическим определением пригодна для количественного определения ПС-80 в белковых растворах и обеспечивает получение достоверных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. E.Y. Chi, S. Krishnan, T.W. Randolph, J.F. Carpenter. Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation // Pharm. Res. 2003. V. 20(9). P. 1325–1336.
2. B.A. Kerwin. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathway // J. Pharm. Sci. 2008. V. 97(8). P. 2924–2935.
3. M. Agarkhed, C. O'Dell, M.C. Hsieh et al. Effect of Polysorbate 80 Concentration on Thermal and Photostability of a Monoclonal Antibody // AAPS Pharm. Sci. Tech. 2013. V. 14(1). P. 1–9.
4. W. Norde. Adsorption of proteins at solid-liquid interfaces (Review) // Cells and Materials. 1995. V. 5(1). P. 97–112.
5. S. Kiese, A. Pappenberger., W. Friess, H.C. Mahler. Shaken, not stirred: mechanical stress testing of an IgG1 antibody // J. Pharm. Sci. 2008. V. 97(10). P. 4347–4366.
6. L. Kreilgaard, L.S. Jones, T.W. Randolph et al. Effect of tween 20 on freeze-thawing- and agitation-induced aggregation of recombinant human factor XIII // J. Pharm. Sci. 1998. V. 87(12). P. 1597–1603.
7. L.S. Jones, T.W. Randolph, U. Kohnert. et al. The effects of Tween 20 and sucrose on the stability of anti-L-selectin during lyophilization and reconstitution // J. Pharm. Sci. 2001. V. 90(10). P. 1466–1477.
8. J.X. Zhou, J. Qiua, G. Jiangb et al. Non-specific binding and saturation of Polysorbate-20 with aseptic filter membranes for drug substance and drug product during mAb production // J. Membrane Sci. 2008. V. 325(2). P. 735–741.
9. T.H. Tani, J.M. Moore, T.W. Patapoff. Single step method for the accurate concentration determination of polysorbate 80 // J. Chromatogr. A. 1997. V. 786(1). P. 99–106.
10. D. Ilko, A. Braun, O. Germershaus et al. Fatty acid composition analysis in polysorbate 80 with high performance liquid chromatography coupled to charged aerosol detection // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2015. V. 94. P. 569–574.
11. D. Lee, S. Rumbelow, S.K.R. Williams. Identification and Quantitation of Trace Impurities in Fatty Alcohol Ethoxylates Using HPLC and MALDI-TOF Mass Spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2009. V. 654(1). P. 59–63.
12. S.D. Baker, M. Zhao, P. He et al. Simultaneous analysis of docetaxel and the formulation vehicle polysorbate 80 in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry // Anal. Biochem. 2004. V. 324(2). P. 276–284.
13. M. Liu, C. Xie, W. Xu, W. Lu. Separation of polyethylene glycols and their amino-substituted derivatives by high-performance gel filtration chromatography at low ionic strength with refractive index detection // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1046(1-2). P. 121–126.
14. M.D. Wenger, A.M. Bowman, M.V. Thorsteinsson et al. An automated homogeneous method for quantifying polysorbate using fluorescence polarization // Anal. Biochem. 2005. V. 337(1). P. 48–54.
15. Z. Wei, S. Bilbulian, J. Li et al. Universal method for the determination of nonionic surfactant content in the presence of protein // J. Sep. Sci. 2015. V. 38(8). P. 1318–1325.
16. N.B. Cucakovich. Determination of Tween 80 in tissue culture media, vaccines, and related products // Anal. Biochem. 1971. V. 40(1). P. 183–186.
17. N. Savjani, E. Babcock, H.K. Khor, A. Raghani. Use of ferric thiocyanate derivatization for quantification of polysorbate 80 in high concentration protein formulations // Talanta. 2014. V. 130. P. 542–546.
18. H. Yang, B.W. Glickman, G. de Boer Johan. Sex-specific induction of mutations by PhIP in the kidney of male and female rats and its modulation by conjugated linoleic acid // Environ. Mol. Mutagen. 2002. V. 40(2). P. 116–121.
19. J. Kim, J. Qiu. Quantitation of low concentrations of polysorbates in high protein concentration formulations by solid phase extraction and cobalt-thiocyanate derivatization // Anal. Chim. Acta. 2014. V. 806. P. 144–151.
20. J.A. Van der Hoeve. Analysis of textile auxiliary products // Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. 1948. V. 67(8), P. 649–664.
21. Analytical Methods Committee. Examination of detergent preparations. Analyst. 1951. V. 76. P. 279–286.
22. U. Zoller, R. Romano. Determination of nonionic detergents in municipal wastewater // Environ. Int. 1983. V. 9(1). P. 55–61.
23. E.G. Brown, T.J. Hayes. The absorptiometric determination of polyethyleneglycol mono-oleate // Analyst. V. 80(955). P. 755–767.
24. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея РФ. XIII изд. Т. 1. – М., 2015.

УДК 581.82; 615.322

ГИСТОХИМИЯ ТРИХОМ ОФИЦИНАЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ASTERACEAE

К.Н. Разаренова[1]*, Е.В. Бабушкина[1], П.Д. Смирнов[2], О.В. Костина[3], Л.Е. Муравник[3]

Резюме. В настоящей работе методами световой микроскопии и гистохимии исследованы железистые трихомы, локализованные на поверхности цветков некоторых официнальных представителей семейства Asteraceae. Получены данные по морфологии и размерам железистых трихом изученных видов. Обнаружено, что секреторные структуры всех исследуемых видов продуцируют терпеноиды, сесквитерпеновые лактоны, полифенолы. Показана возможность использования гистохимических реакций для анализа секреторных структур эфиромасличных лекарственных растений.

Ключевые слова: Asteraceae, железистые трихомы, секреторные структуры, гистохимия.

HYSTOCHEMISTRY OF GLANDULAR TRICHOMES OF MEDICINAL PLANTS FROM ASTERACEAE

K.N. Razaryonova[1]*, E.V. Babushkina[1], P.D. Smirnov[2], O.V. Kostina[3], L.E. Muravnik[3]

Abstract. Glandular trichomes localized on the flowers of some medicinal species of Asteraceae were studied by light microscopy and histochemistry. The trichome morphology and dimensions are presented in the text. The secretory structures have been shown to contain phenolic substances, terpenoids, sesquiterpene lactones. Histochemistry is a perspective method to analyze glandular trichomes of medicinal plants containing essential oil.

Keywords: Asteraceae, glandular trichomes, secretory structures, histochemistry.

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

2 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7/9

3– ФГБУН Ботанический институт им. В. Л. Комарова РАН, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 2

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

2 – Saint-Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya nab., Saint-Petersburg, 199034, Russia

3 – Komarov Botanical Institute, 2, Professor Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: ksenia.rasarenova@pharminnotech.com
Тел.: 8 (911) 007 61 47

ВВЕДЕНИЕ

Эфиромасличные лекарственные растения широко применяются в пищевой и парфюмерной промышленности, а также в фармацевтической практике для получения медицинских препаратов [1, 2]. Для определения подлинности лекарственного растительного сырья большое значение имеет микроскопический анализ [3, 4]. До настоящего времени в микроскопических исследованиях лекарственного сырья практически не применяли гистохимические тесты, с помощью которых можно установить состав содержащихся в нем классов химических соединений [4]. В представленной работе изучены возможности использования гистохимических реакций для анализа секреторных структур эфиромасличных лекарственных растений, относящихся к семейству Asteraceae.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В качестве объектов исследования использовали пять представителей семейства Asteraceae: *Matricaria recutita* L., *Achillea millefolium* L., *Arnica montana* L., *Tanacetum vulgare* L., *Artemisia absinthium* L. Растения были собраны на территории питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России (Ленинградская область, Всеволожский район) летом 2015 года. У видов семейства Asteraceae исследовали трубчатые и ложноязычковые цветки. Для исследования использовали цветки, срезанные с живых растений.

Световая микроскопия. Цветки смотрели целыми. Наблюдения осуществляли на микроскопе AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Germany) с видеокамерой AxioCam RMc5 (Carl Zeiss, Germany).

Гистохимические тесты. Терпены определяли при взаимодействии с реактивом НАДИ по фиолетовому окрашиванию [5]. Сесквитерпеновые лактоны под воздействием концентрированной соляной кислоты приобретали оранжевую окраску [6]. Полифенолы обнаруживали в реакции с толуидиновым синим по зеленому окрашиванию [7].

Методики приготовления реактивов. Реактив НАДИ получали, смешивая 0,5 мл 10% α-нафтола в 40% спирте, 0,5 мл 1% хлористого диметилпарафенилендиамина и 49 мл 0,05 М фосфатного буфера с pH 7,2 [5]. В качестве реактива на полифенолы использовали 0,05% водный раствор толуидинового синего.

Образцы выдерживали в соответствующем реактиве в течение 5 мин, избыток реактива удаляли фильтровальной бумагой, а затем помещали на предметное стекло в каплю воды.

Морфометрия и статистическая обработка результатов. Измерение трихом производили в программе ZEN 2.3. (Carl Zeiss, Germany). Измеряли диаметр секреторной головки (в самой широкой части) и высоту трихомы. При измерении высоты трихомы учитывали высоту секреторной головки (с субкутикулярным пространством) и высоту ножки. Выборка включала 10 измерений, статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel (Microsoft, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Строение железистых трихом представителей семейства Asteraceae. Известно, что железистые трихомы, характерные для семейства Asteraceae, достаточно однообразны в отличие от нежелезистых, представленных многочисленными морфологическими типами [8]. Среди железистых трихом наиболее обычным является двурядный тип, обнаруженный у многих представителей семейства [8–13]. Он представляет собой структуру, состоящую из нескольких лежащих друг на друге пар клеток. В трихоме верхние 2–3 слоя клеток являются секреторными, а нижние выполняют функцию ножки.

Ниже и в таблице 1 приводятся полученные нами данные по морфологии и размерам железистых трихом у видов Asteraceae. У *Matricaria recutita, Achillea millefolium, Tanacetum vulgare* и *Artemisia absinthium* железистые трихомы состоят из 10 клеток: одна пара базальных клеток, одна пара клеток ножки и три пары секреторных клеток (рисунки 1-4, А). У *Arnica montana* железистые трихомы включают пару базальных клеток, пару клеток ножки и шесть пар секреторных клеток (рисунок 5А). Среди изученных в настоящей работе видов Asteraceae самые крупные железистые трихомы отмечены у *A. millefolium*, наименьшие – у *A. montana.*

У видов Asteraceae на поверхности секреторной головки железистых трихом формируется субкутикулярная полость, в ней накапливается секрет, который выводится наружу в случае ее разрыва [8–10]. У *M. recutita, A. millefolium, T. vulgare* и *A. absinthium* субкутикулярное пространство образуется над несколькими рядами секреторных клеток, в то время как у *A. montana* только верхние секреторные клетки участвуют в ее образовании (рисунки 1–5, А).

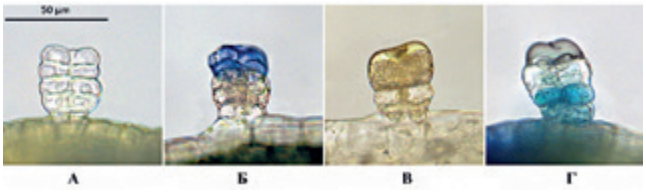


Рисунок 1. Общий вид железистых трихом *Matricaria recutita* без окраски и после действия гистохимических красителей. А – неокрашенная трихома; Б – с реактивом НАДИ; В – с концентрированной HCl; Г – с толуидиновым синим

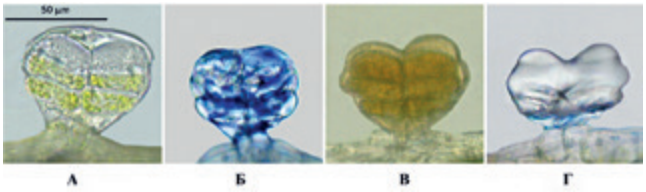


Рисунок 2. Общий вид железистых трихом *Achillea millefolium* без окраски и после действия гистохимических красителей. А – неокрашенная трихома; Б – с реактивом НАДИ; В – с концентрированной HCl; Г – с толуидиновым синим

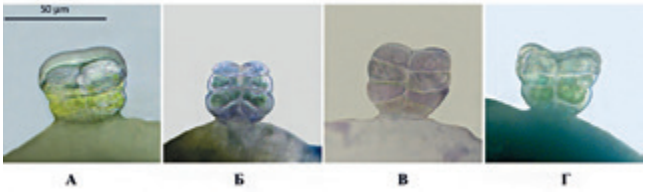


Рисунок 3. Общий вид железистых трихом *Artemisia absinthium* без окраски и после действия гистохимических красителей. А – неокрашенная трихома; Б – с реактивом НАДИ; В – с концентрированной HCl; Г – с толуидиновым синим

Таблица 1.

Размеры железистых трихом изучаемых видов Asteraceae

Вид	d	h
Matricaria recutita	39,3±2,7	49,6±4,6
Arnica montana	28,5±2,7	63,5±5,0
Artemisia absinthium	48,4±3,4	45,5±4,1
Achillea millefolium	76,2±3,7	75,2±1,5
Tanacetum vulgare	59,0±5,6	46,2±5,2

Примечание: d – диаметр секреторной головки, мкм; h – высота железки (с учетом секреторной головки, субкутикулярного пространства и ножки), мкм.

Гистохимия железистых трихом. Наши исследования показали характерное окрашивание клеток разных типов, которое является результатом взаимо-

действия реактивов с детектируемыми компонентами и приводит к их специфическому связыванию [14].

Результаты проведения гистохимических реакций для выявления вторичных метаболитов в трихомах представителей семейства Asteraceae представлены в таблице 2 и на рисунках 1–5.

Таблица 2.

Выявление вторичных метаболитов гистохимическими методами в трихомах представителей семейства Asteraceae

Выявленные вещества / вид	*Matricaria recutita*	*Achillea millefolium*	*Arnica montana*	*Tanacetum vulgare*	*Artemisia absinthium*
Терпеноиды	++	+	++	+	+
Сесквитерпеновые лактоны	+	++	+	+	+
Полифенолы	++	–	+	–	+

Примечание: «–» – реакция отрицательная; «+» – реакция положительная, эффект слабо выражен; «++» – реакция положительная, эффект сильно выражен.

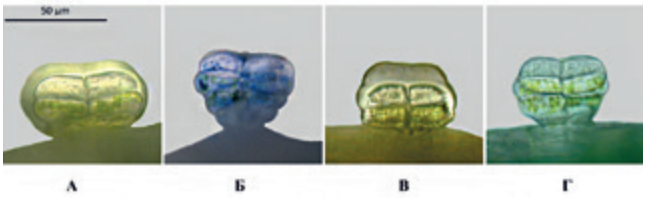


Рисунок 4. Общий вид железистых трихом *Tanacetum vulgare* без окраски и после действия гистохимических красителей. А – неокрашенная трихома; Б – с реактивом НАДИ; В – с концентрированной HCl; Г – с толуидиновым синим

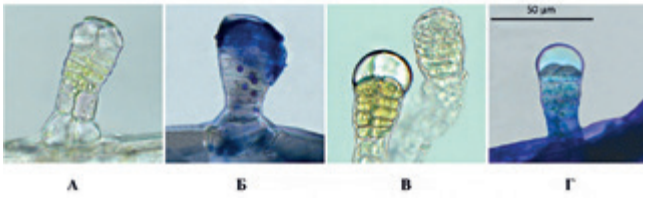


Рисунок 5. Общий вид железистых трихом *Arnica montana* без окраски и после действия гистохимических красителей. А – неокрашенная трихома; Б – с реактивом НАДИ; В – с концентрированной HCl; Г – с толуидиновым синим

Синее окрашивание клеток секреторной головки под действием реактива НАДИ показало присутствие терпеноидов в железистых трихомах изученных видов Asteraceae (рисунки 1–5, Б). Наличие полифенолов в железистых трихомах *M. recutita, A. absinthium* и *A. montana* было подтверждено их зеленой окраской под действием толуидинового синего (рисунки 1Г, 3Г, 5Г). Разные клетки секреторной головки показали отличное друг от друга окрашивание в этой реакции, что свидетельствует о разной концентрации содержащихся в них фенольных соединений. Положительная реакция с концентрированной соляной кислотой демонстрирует присутствие сесквитерпеновых лактонов в составе клеток секреторной головки железистых трихом у изученных нами видов Asteraceae (рисунки 1–5, В).

Таким образом, гистохимические тесты выявили локализацию в секреторных структурах изучаемых Asteraceae терпеноидов, а также сесквитерпеновых лактонов. Кроме того, в железистых трихомах *M. recutita, A. absinthium* и *A. montana* обнаружены полифенолы. Полученные результаты согласуются с литературными данными по вторичным метаболитам у изучаемых видов Asteraceae. Так, фенольные соединения (флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты) были идентифицированы в соцветиях *M. recutita* [15], *A. montana* [16–18], в надземной части *A. millefolium* [19], *T. vulgare* [20, 21] и *A. absinthium* [18, 22]. Сесквитерпеновые лактоны были выделены из соцветий *M. recutita* [23, 24], *A. montana* [16, 25], из надземной части *A. millefolium* [26], *T. vulgare* [27], *A. absinthium* [22, 28, 29]. Эфирное масло всех изучаемых Asteraceae включает терпеноидные соединения, среди которых у *M. recutita* [30, 31] и *A. montana* [32] преобладают сесквитерпеноиды, а у *T. vulgare* [20, 33] и *A. absinthium* [22] доминируют монотерпеноиды. В состав эфирного масла *A. millefolium* входят монотерпеноиды и сесквитерпеноиды (содержание сесквитерпеноидов может быть от следовых количеств до 40% в зависимости от хемотипа) [34]. По данным Andreuccii [10], в железках *M. recutita* гистохимическими методами ранее также, как и в нашей работе, были обнаружены терпеноиды и сесквитерпеновые лактоны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено сравнительное изучение секреторных структур некоторых официнальных представителей семейств Asteraceae методами световой микроскопии в сочетании с гистохимическими тестами. На поверхности трубчатых и ложноязычковых цветков у всех изученных видов обнаружены морфологически различные железистые трихомы. Проведенные гистохимические тесты продемонстрировали, что секреторные структуры всех исследуемых видов Asteraceae продуцируют терпеноиды, сесквитерпеновые лактоны, полифенолы. Таким образом, показана возможность использования гистохимических реакций для анализа секреторных структур эфиромасличных лекарственных растений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке компании «ОПТЭК» (грант поддержки молодых ученых ведущих высших учебных заведений и научных исследовательских центров 2014 года).

ЛИТЕРАТУРА

1. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Сем. Asteraceae (Compositae). – СПб.: Наука, 1993. 352 с.
2. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Сем. Hippuridaceae – Lobeliaceae. – СПб.: Наука, 1991. 200 с.
3. Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества. – М. 2009. 295 с.
4. Государственная фармакопея СССР. XI изд. Вып. 2. – М. 1989. 400 с.
5. R. David, J.-P. Carde. Coloration differentiele des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophilles du pin maritime au moyen du reactif nadi // Comptes rendus de l'Académie des Sciences. 1964. V. 258. Is. 12. P. 1338–1340.
6. T.A. Geissmann, T.S. Griffin. Sesquiterpene lactones: acid-catalysed color reactions as an aid in structure determination // Phytochemistry. 1971. V. 10. Is. 10. P. 2475–2485.
7. M. Gutmann. Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semi-thinsections of plant tissue // Journal of Microscopy. 1995. V. 179. Is. 3. P. 277–281.
8. D. Ciccarelli, F. Garbari, A.M. Pagni. Glandular hairs of the ovary: a helpful character for Asteroideae (Asteraceae) taxonomy? // Annales Botanici Fennici. 2007. V. 44. № 1. P. 1–7.
9. C.A. Figueredo, M. Salomé, S. Pais. Ultrastructural aspects of the glandular cells from the secretory trichomes and from the cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium* // Annals of Botany. 1994. V. 74. Is. 2. P. 179–190.
10. A.C. Andreucci, D. Ciccarelli, I. Desider, A.M. Pagni. Glandular hairs and secretory ducts of *Matricaria chamomilla* (Asteraceae): morphology and histochemistry // Annales Botanici Fennici. 2008. V. 45. № 1. P. 11–18.
11. M.Q. Hayat, M. Ashraf, M.A. Khan, G. Yasmin, N. Shaheen, S. Jabeen. Diversity of foliar trichomes and their systematic implications in the genus *Artemisia* (Asteraceae) // International Journal of Agriculture and Biology. 2009. V. 11. № 5. P. 542–546.
12. K.K. Guerreiro, V. Bobek, V.L.P. Santos, C.R.C. Franco, J.P. Paula, P.V. Farago, J.M. Budel. Análise farmacobotânica de folha e caule de *Tanacetum vulgare* (L.) // Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 2015. V. 18. № 1. P. 89–95.
13. M. Salehi, G. Karimzadeh, M.R. Naghavi, H.N. Badi, S.R. Monfared. Comparative assessment of five Iranian *Artemisia* species in view of glandular trichomes, using sem technique // 4th National Congress on Medicinal Plants. 12–13 May 2015. Tehran-Iran. P. 369.
14. M. Chwil, R. Nurzyńska-Wierdak, S. Chwil, R. Matraszek, J. Neugebauerová. Histochemistry and micromorphological diversity of glandular trichomes in *Melissa officinalis* L. leaf epidermis // Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus. 2016. Is. 15(3). P. 153–172.
15. O. Singh, Z. Khanam, N. Misra, M.K. Srivastava. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview // Pharmacognosy Review. 2011. V. 5. Is. 9. P. 82–95.
16. G. Willuhn. *Arnica montana* L. – Porträt einer Arzneipflanze // Pharmazeutische Zeitung. 1991. H. 136. S. 2453–2468.
17. M. Ganzera, C. Egger, C. Zidorn, H. Stuppner. Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography // Analytica Chimica Acta. 2008. V. 614. Is. 2. P. 196–200.
18. O. Craciunescu, D. Constantin, A. Gaspar, L. Toma, E. Utoiu, L. Moldovan. Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts // Chemistry Central Journal. 2012. V. 6. P. 97.
19. M.I. Dias, L. Barros, M. Duenas, E. Pereira, A.M. Carvalho, R.C. Alves, M.B.P.P. Oliveira, C. Santos-Buelga, I.C.F. Ferreira. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction // Food Chemistry. 2013. V. 141. Is. 4. P. 4152–4160.
20. M. Keskitalo, E. Pehu, J.E. Simon Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes // Biochemical Systematics and Ecology. 2001. V. 29. Is. 3. P. 267–285.
21. M. Juan-Badaturuge, S. Habtemariam, C. Jackson, M.J. Thomas. Antioxidant principles of *Tanacetum vulgare* L. aerial parts // Natural Product Communications. 2009. V. 4. Is. 11. P. 1561–1564.
22. H.T. Nguyen, Z.É. Németh. Sources of variability of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oil // Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 2016. V. 3. Is. 4. P. 143–150.
23. C. Tschiggerl, F. Bucar. Guaianolides and volatile compounds in chamomile tea // Plant Foods for Human Nutrition. 2012. V. 67. Is. 2. P. 129–135.
24. M. Flemming, B. Kraus, A. Rascle, G. Jürgenliemk, S. Fuchs, R. Fürst, J. Heilmann. Revisited anti-inflammatory activity of matricine in vitro: comparison with chamazulene // Fitoterapia. 2015. V. 106. P. 122–128.
25. J. Staneva, P. Denkova, M. Todorova, L. Evstatieva. Quantitative analysis of sesquiterpene lactones in extract of *Arnica montana* L. by ^{1}H NMR spectroscopy // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2011. V. 54. Is. 1. P. 94–99.
26. A. Ulubelen, S. Öksüz, A. Schuster. A sesquiterpene lactone from *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* // Phytochemistry. 1990. V. 29. № 12. P. 3948–3949.
27. J.F. Sanz, J.A. Marco. NMR studies of tatridin A and some related sesquiterpene lactones from *Tanacetum vulgare* // Journal of Natural Products. 1991. V. 54. № 2. P. 591–596.
28. A. Turak, S.-P. Shi, Y. Jiang, P.-F. Tu. Dimeric guaianolides from *Artemisia absinthium* // Phytochemistry. 2014. V. 105. P. 109–114.
29. L.M. Silveira de Almeida, L.S. Aleixo de Carvalho, M.C. Gazolla, P.L. Silva Pinto, M.P. Nascimento da Silva, J. De Moraes, F.A.A. Da Silva. Flavonoids and sesquiterpene lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* Worms // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016. 9 p. URL: http://dx.doi.org/10.1155/2016/9521349 (дата обращения 10.05.2017).
30. J.A. Pino, F. Bayat, R. Marbot, J. Aguero. Essential oil of chamomile *Chamomilla recutita* (L.) Rausch. from Iran // Journal of Essential Oil Research. 2002. V. 14. Is. 6. P. 407–408.
31. A. Pirzad, H. Alyari, M.R. Shakiba, S. Zehtab-Salmasi, A. Mohammadi. Essential oil content and composition of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) at different irrigation regimes // Journal of Agronomy. 2006. V. 5. Is. 3. P. 451–455.
32. R. Kowalski, D. Sugier, P. Sugier, B. Kołodziej. Evaluation of the chemical composition of essential oils with respect to the maturity of flower heads of *Arnica montana* L. and *Arnica chamissonis* Less. cultivated for industry // Industrial Crops and Products. 2015. V. 76. P. 857–865.
33. M.L. Mureşan, I. Oniga, C. Georgescu, R. Paltinean, F. Gligor, M.T. Crăciunaş, R. Oprean. Botanical and phytochemical studies on *Tanacetum vulgare* L. from Transylvania // Acta Medica Transilvanica. 2014. V. 2. N. 4. P. 300–302.
34. D. Mockute, A. Judzentiene. Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* growing wild in Lithuania // Biochemical Systematics and Ecology. 2003. V. 31. Is. 9. P. 1033–1045.

УДК 615.072

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТРЕБОВАНИЙ К КАЧЕСТВУ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ПЛОДЫ ТМИНА, ФЕНХЕЛЯ И АНИСА ОБЫКНОВЕННОГО

И.А. Самылина[1], В.М. Баева[1]*, Р.М. Кузнецов[1]

Резюме. Совершенствование требований к качеству фармацевтических субстанций растительного происхождения является основой безопасности и эффективности лекарственных препаратов на его основе. Использование современных методов диагностики позволило уточнить и дополнить нормативные требования на плоды тмина, аниса обыкновенного и фенхеля для проектов новых фармакопейных статей.

Ключевые слова: совершенствование требований, контроль качества, фармацевтические субстанции растительного происхождения, плоды тмина, фенхеля и аниса обыкновенного.

IMPROVEMENT OF QUALITY REQUIREMENTS FOR CRUDE HERBAL DRUGS OF FRUCTUS CARVI, FRUCTUS FOENICULI AND FRUCTUS ANISI VULGARIS

I.A. Samylina[1], V.M. Baeva[1]*, R.M. Kuznetsov[1]

Abstract. Improvement of the quality requirements for the herbal pharmaceutical substances is the basis for the safety and efficacy of drugs produced from it. Modern diagnostic methods made it possible to clarify and to elaborate the regulatory requirements for Fructus Carvi, Fructus Foeniculi and Fructus Anisi vulgaris and to create innovated pharmacopoeial articles.

Keywords: improvement of requirements, quality control, herbal pharmaceutical substances, Fructus Carvi, Fructus Foeniculi and Fructus Anisi vulgaris.

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: verabaeva@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Вопросы пересмотра стандартов качества фармацевтической субстанции растительного происхождения (ФСРП) в настоящее время, как никогда, являются своевременными и актуальными. Основой системы стандартизации ФСРП является разработка и обновление как общих фармакопейных статей, так и фармакопейных статей на сырьё (ФС) для нового издания Государственной фармакопеи РФ (ГФ РФ). Требования, предъявляемые к ФСРП, предусматривают установление определённых норм качества. Это особо актуально, как указывают ведущие эксперты научного центра экспертизы средств медицинского применения, для традиционных (издавна применяемых) видов сырья [1]. К этой группе ФСРП и относятся плоды тмина, фенхеля и аниса обыкновенного, широко применяемые в медицине для изготовления настоев, в качестве отхаркивающего средства при воспалительных заболеваниях дыхательных путей [2–4].

Стандарты качества фармацевтических субстанций растительного происхождения определяются в первую очередь стремлением обеспечить сохранение здоровья и безопасность пациента.

В основу проектов легли фармакопейные статьи на плоды аниса обыкновенного ГФ XI, вып. 2, статья № 30, на плоды фенхеля – ГФ XI, вып. 2, статья № 33, плоды тмина – ГФ XI, вып. 2, статья № 31 [5].

Лекарственное растительное сырье плоды аниса обыкновенного, тмина и фенхеля входит в фармакопеи многих стран. Например, в Европейской Фармакопее монографии на плоды аниса, тмина и фенхеля включают название сырья на английском и латинском языке, описание внешних признаков, микроскопического строения, в том числе и порошка. Качественный состав действующих веществ определяется с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) в

системе этилацетат – толуол (5:95), в качестве стандартных растворов используют карвон, фенхон и анетол или линалоол и анисовый альдегид (соответственно) и оливковое масло в этилацетате. На хроматограмме должны определяться основные компоненты соответствующего эфирного масла. Нормируется его содержание, а также содержание влаги и золы общей [6].

Плоды изучаемых нами зонтичных являются традиционным сырьем и входили во многие отечественные фармакопеи, начиная с первой. В ГФ XI издания описываются как отхаркивающее эфирномасличное сырье. К сожалению, здесь приведены не все показатели подлинности и качества этих видов сырья, а такие, как качественные реакции по определению основных биологически активных веществ, позволяющие эффективно использовать ФСРП и их препараты, вообще отсутствуют.

Цель нашего исследования – уточнить и дополнить нормативные требования, используя современные методы диагностики и анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили зрелые и высушенные плоды дикорастущего и культивируемого двухлетнего травянистого растения тмина обыкновенного – *Carum carvi* L., высушенные зрелые плоды культивируемого однолетнего травянистого растения аниса обыкновенного – *Anisum vulgare* Gaertn., зрелые и высушенные плоды культивируемого двухлетнего и многолетнего травянистого растения фенхеля обыкновенного – *Foeniculum vulgare* Mill. семейства сельдерейные – Apiaceae.

Требования, предъявляемые к фармацевтическим субстанциям растительного происхождения, предусматривают установление определённых норм качества, включающее испытания по установлению содержания действующих веществ, влаги, золы общей, золы нерастворимой в 10% хлористоводородной кислоте, содержания примесей и др. в соответствии с фармакопейными методиками [7].

В раздел «Определение основных биологически активных веществ» включили для дополнения нормативных требований по их определению с использованием метода тонкослойной хроматографии оптимальные условия идентификации основных компонентов эфирного масла плодов тмина, фенхеля и аниса обыкновенного.

Для этого использовали фармакопейные методики: готовили спиртовые извлечения 1:10 [5, 7], а для вновь включенного подраздела «Определение основных биологически активных веществ» подобрали экспериментально условия для хроматографии, «Тонкослойная хроматография» и «ГЖХ-МС» [8].

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) судана Ш. Около 0,005 г СО судана Ш растворяли в 10 мл этилового спирта 96%. Срок годности раствора не более 3 мес. при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Раствор стандартного образца (СО) ментола. Около 0,01 г СО ментола растворяли в 10 мл спирта 96%. Срок годности раствора не более 3 мес. при хранении в прохладном, защищенном отсвета месте.

Ванилина раствор. Смешивали последовательно: 0,5 мг ванилина, 10 мл уксусной кислоты ледяной, 85 мл спирта 96% и 5 мл серной кислоты концентрированной. Срок годности раствора 30 суток при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г сырья, измельченного до отсутствия цельных плодов, помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 10 мл спирта 96% и кипятили с обратным холодильником на водяной бане в течение 20 мин. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтровали через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикогеля на полимерной подложке размером 10х10 см в виде полос длиной 10 мм и шириной не более 3 мм наносили 20 мкл испытуемого раствора и рядом по 5 мкл раствора СО судана и раствора СО ментола.

Пластинку с нанесенными пробами сушили при комнатной температуре, помещали в камеру, предварительно насыщенную в течение 30 мин смесью растворителей толуол – этилацетат (95:5), и хроматографировали восходящим способом. Когда фронт растворителей проходил 80–90% длины пластинки от линии старта, её вынимали из камеры и сушили до удаления следов растворителей. Пластинку обрабатывали ванилина раствором, выдерживали в сушильном шкафу при 100–105 °С в течение 2–3 мин, после чего сразу же просматривали при дневном свете. На хроматограмме обнаруживали зону адсорбции синего или красновато-фиолетового цвета раствора СО судана Ш, и зону адсорбции сине-фиолетового или сине-голубого цвета СО ментола.

Также в этот раздел включили ГЖХ-МС.

ГЖХ-МС проводили при следующих условиях: прибор фирмы Agilent Technologies, состоящий из газового хроматографа 7820А/5977 (колонка HP-5, 30 м х 0,25 мм х 0,25 мм) и автосамплера G 4513A с квадрупольным масс-анализатором; температурная программа хроматографирования: 50 °С изотерма 2 мин; далее программируемый нагрев до 150 °С

со скоростью 15 °С/мин и при 280 °С изотерма 10 мин. Ввод 1 мкл. Инжектор с делением потока 1:20. Температура инжектора – 280 °С. Температура интерфейса – 280 °С. Газ-носитель – гелий; скорость потока – 0,8 мл/мин. Хроматограмма образцов – по полному ионному току. Программное обеспечение – ChemStation E 02,00. Условия масс-спектрометрического анализа: энергия ионизирующих электронов – 7-эВ; регистрация масс-спектров в положительных ионах в диапазоне (m/z) от 20 до 450 полных масс-спектров NIST-05 и соответствующим значениям хроматографических индексов Ковача со скоростью 2,5 кан/с. Идентификацию компонентного состава (качественный анализ) проводили по библиотеке полных масс-спектров NIST-05 и соответствующим значениям хроматографических индексов Ковача [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Раздел «Подлинность» включает подразделы: «Внешние признаки», «Микроскопия» и «Определение основных биологически активных веществ». В подразделе «Внешние признаки» дополнили подробно описание сырья с указанием всех диагностических признаков, а также добавили фотографии сырья (рисунок 1).



Рисунок 1. Внешний вид плодов изучаемых видов зонтичных

В подразделе «Микроскопия» привели характеристику подлинности цельного сырья и визуальную характеристику его диагностических признаков, подробно описали характеристики экзо-, мезо-, эндокарпия и эндосперма. Диагностические признаки плодов подтвердили фотографиями.

При изучении химического состава спиртовых извлечений изучаемых плодов были получены следующие данные.

- Для спиртового извлечения плодов тмина установили не менее 4 зон адсорбции (в порядке возрастания): одна из них розово-сиреневого цвета, две сиреневого цвета на уровне ментола и четвёртая – красно-фиолетовая между ментолом и суданом Ш; допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (рисунок 2А).
- Для спиртового извлечения плодов фенхеля выявили не менее 5 зон адсорбции, которые должны обнаруживаться (в порядке возрастания): одна из них сиреневого цвета, одна фиолетового цвета на уровне ментола, третья жёлтого цвета, четвёртая фиолетового цвета между ментолом и суданом Ш; пятая сине-фиолетового цвета над суданом III, допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (рисунок 2Б).
- Для спиртового извлечения плодов аниса должны обнаруживаться не менее 7 зон адсорбции (в порядке возрастания): одна из них голубого цвета, синяя – на уровне ментола, выше – жёлтого и четвёртая – фиолетового цвета, на уровне судана Ш – розово-фиолетового, выше – фиолетового и сине-фиолетового цвета зоны адсорбции. Допускается обнаружение дополнительных зон адсорбции (рисунок 2В).

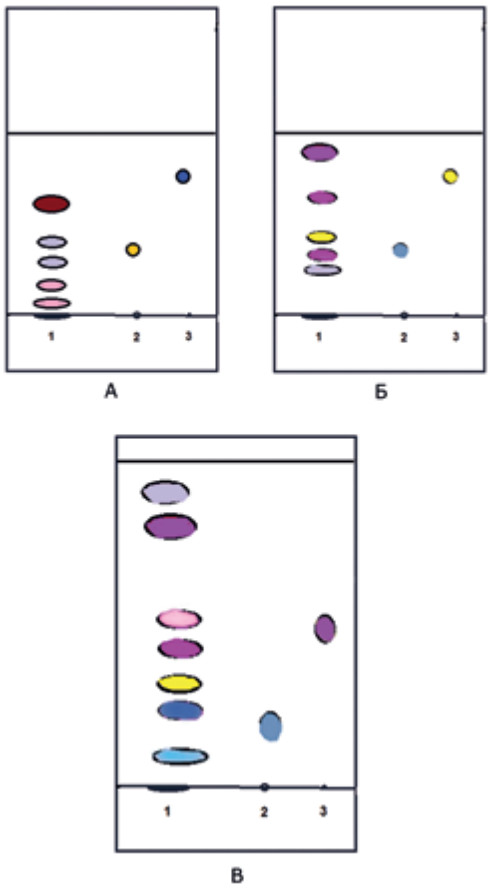


Рисунок 2. Схема ТСХ спиртовых извлечений плодов.

А. Тмина обыкновенного: 1 – спиртовое извлечение; 2 – СО ментола; 3 – СО судана Ш. Зоны адсорбции: 1 – Rf-0,54; 2 – Rf-0,27; 3 – Rf-0,24; 4 – Rf-0,12.

Б. Укропа аптечного: 1 – спиртовое извлечение; 2 – СО ментола; 3 – СО судана Ш. Зоны адсорбции: 1 – Rf-0,2; 2 – Rf-0,3; 3 – Rf-0,4; 4 – Rf-0,6; 5 – Rf-0,9.

В. Аниса обыкновенного: 1 – спиртовое извлечение; 2 – СО ментола; 3 – СО судана Ш. Зоны адсорбции: 1 – Rf-0,1,4; 2 – Rf-0,3; 3 – Rf-0,34; 4 – Rf-0,5; 5 – Rf-0,7; 6 – Rf-0,8 7 – Rf-0,9



Хромато-масс-спектрометр Agilent Technologies 5977E

Также в этот раздел включили ГЖХ-МС. Результаты ГЖХ-МС приведены на рисунке 2 и в таблицах 1–3, где указаны времена выхода основных БАС, в том числе карвона, лимонена, фенхона, анетола, анисового альдегида и др.

Для нового раздела «Испытания» в подразделах «Влажность», «Зола общая», «Зола, нерастворимая в 10% хлористоводородной кислоте» наряду с цельным сырьем охарактеризованы нормы этих показателей и для порошка. Нормы содержания всех показателей разработали с учетом данных ГФ XI, и полученных при анализе трех партий плодов тмина, и по пяти партиям фенхеля и аниса обыкновенного, которые приведены в таблицах 4–6. Кроме того, акцентировали внимание на безопасности сырья, показатели которой, методы её определения и нормы приведены в соответствующих общих статьях ГФ XIII.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные проекты ФС на плоды тмина, фенхеля и аниса обыкновенного включают все требования, предъявляемые к лекарственному растительному сырью как к фармацевтической субстанции растительного происхождения: «Тяжелые металлы», «Радионуклиды», «Остаточные количества пестицидов» и «Микробиологическая чистота», где указаны методики их определения и нормы.

В соответствии с современными требованиями дополнены диагностические признаки и уточнены характеристики подлинности для этого вида сырья.

Разработаны оптимальные условия проведения методики тонкослойной хроматографии и ГЖХ-МС для идентификации компонентов эфирного масла плодов тмина, фенхеля и аниса обыкновенного.

В соответствии с современными требованиями ОФС добавлены подразделы, характеризующие безопасность ФСРП плодов тмина, фенхеля и аниса обыкновенного. Раздел «Количественное определение» оставлен без изменения. Все дополнения и изменения новых проектов ФС приведены в таблице 7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т.Н. Боковикова, Е.П. Герникова, Л.А. Стронова и др. Основные проблемы экспертизы качества фармацевтических субстанций // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2016. С. 37–41.
2. Растительные ресурсы СССР. – Л.: Наука, 1988. Т. 4. С. 92–93.

Таблица. 1.

Данные анализа спиртового извлечения плодов тмина

	[INT TIC: Tmin alcohol extract.D\ data.ms]										
	Time=	Fri Feb 26 12:14:59 2016									
Pct Max	Header=	Peak	R.T.	First	Max	Last	PK TY	Height	Area	Pct Max	Pct Total
0										0	0
100	3=	Carvone	11,458	1623	1639	1674	rBV	32255924	68329407	100	47,729
98,59	2=	Limonene	8,048	998	1009	1023	rBV	37108417	67362787	98,59	47,054
3,84	8=	Ethyl Oleate	19,545	3130	3133	3147	rBV	2008551	2621910	3,84	1,831
2,36	6=	Oleic+Linoleic Acid	19,366	3087	3100	3122	rBV2	419030	1611684	2,36	1,126
2,21	7=	Ethyl linoleate	19,518	3122	3128	3130	rVV	1215734	1511242	2,21	1,056
1,03	4=	(?)	15,94	2460	2467	2492	rBV	388167	703974	1,03	0,492
0,92	5=	Ethyl palmitate	18,419	2918	2925	2936	rBV	533135	627638	0,92	0,438
0,58	1=	Myrcene	7,361	874	882	893	rVB	235218	393366	0,58	0,275

3. Флора СССР. В 30 т. / Ред. тома Б.К. Шишкин. – М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1950. Т. XVI. С. 648.
4. Государственный реестр лекарственных средств. Официальное издание: в 2 т. – М.: Медицинский совет, 2009. Т. 2. Ч. 1. 568 с.; Ч. 2. 560 с.
5. Государственная фармакопея XI издания, вып. 2. 1990. С. 398.
6. Европейская Фармакопея 7 издание на русском языке. – Страсбург. 2011. Т. 1 и 2. С. 1812.
7. Государственная фармакопея РФ XIII изд. URL: http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/11materialy-po-deyatelnosti-deparatamtnta/stranitsa-856/spisok-obschih-farmakopeynyh-statey (дата обращения 11.10.2016).
8. В.М. Баева, Н.М. Молодожникова, Р.М. Кузнецов. Сравнительное исследование качественного состава биологически активных соединений в листьях и плодах плюща кавказского // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 1(18). С. 130–132.

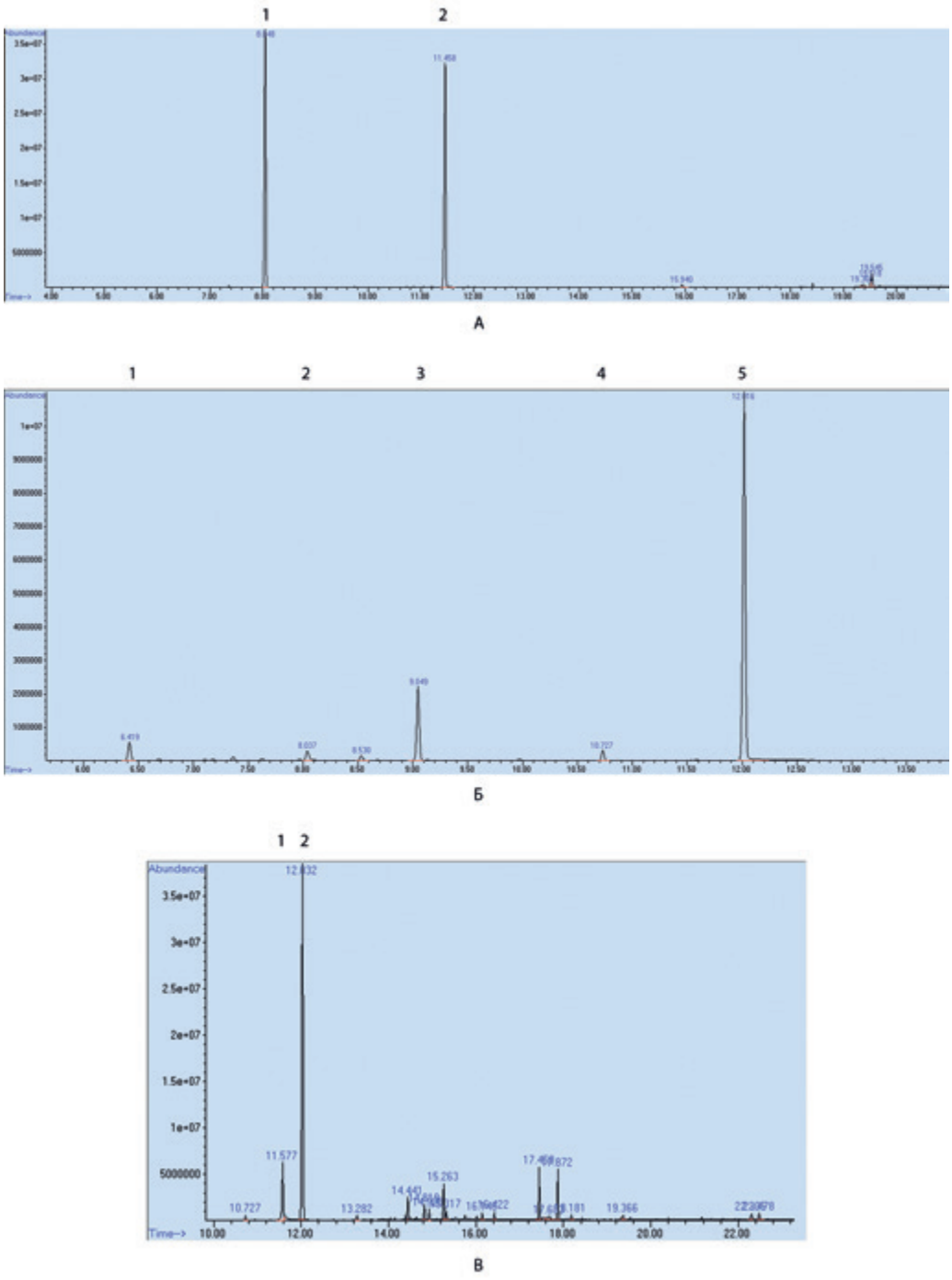


Рисунок 3. Хроматографический профиль спиртового извлечения плодов.

А. Тмина (испытуемый раствор): 1 – лимонен, время выхода – 8,048; 2 – карвон, время выхода – 11,458 мин.

Б. Фенхеля (испытуемый раствор): 1 – пинен, время выхода – 6,419 мин; 2 – лимонен, время выхода – 8,037 мин; 3 – фенхон, время выхода – 9,049 мин; 4 – эстрагол, время выхода – 10,727мин; 5 – анетол, время выхода – 12,016 мин.

В. Аниса (испытуемый раствор): 1 – анисовый альдегид; 2 – анетол

Таблица 2.

Данные анализа спиртового извлечения плодов фенхеля 0,93

[contents]										
count=1										
Name=	G:\Masshunter\GCMS\1\data\RRR\Baeva\Fenxel-alc-1.D									
1=	INT TIC: Fenxel-alc-1.D\data.ms[									
[INT TIC: Fenxel-alc-1.D\data.ms]										
Time=	Thu Mar 31 16:31:35 2016									
Header=	Peak	R.T.	First	Max	Last	PK TY	Height	Area	Pct Max	Pct Total
1=	alpha-Pin	6,419	696	708	719	rBV	543225	973865	5,44	3,972
2=	2	6,695	744	759	768	rBV 2	31575	69862	0,39	0,285
3=	Sabinene	7,106	826	835	842	rVB2	22311	40587	0,23	0,166
4=	4	7,177	842	848	857	rBV2	33229	64936	0,36	0,265
5=	5	7,361	874	882	891	rBV	103519	174698	0,98	0,713
6=	6	7,626	920	931	945	rVB	47925	92896	0,52	0,379
7=	7	7,967	986	994	999	rBV	29729	49463	0,28	0,202
8=	Limonene	8,037	999	1007	1016	rVV	282561	543118	3,03	2,215
9=	9	8,53	1090	1098	1113	rBV	147138	250329	1,4	1,021
10=	10	8,676	1118	1125	1134	rVB9	11319	21681	0,12	0,088
11=	Fenchone	9,049	1177	1194	1205	rBV	2206122	3615555	20,2	14,747
12=	12	9,136	1205	1210	1218	rVB2	17898	31014	0,17	0,127
13=	13	9,97	1357	1364	1373	rBV	40930	70714	0,4	0,288
14=	Esdragol	10,727	1496	1504	1517	rBV	300685	511529	2,86	2,086
15=	15	11,528	1644	1652	1656	rBV3	10883	18279	0,1	0,075
16=	16	11,583	1656	1662	1677	rVB	19913	46390	0,26	0,189
17=	Anethol	12,016	1730	1742	1783	rBV	11019569	17897831	100	73,003
18=	18	14,819	2257	2260	2267	rVB3	12367	19015	0,11	0,078
19=	19	15,258	2332	2341	2348	rBV5	10255	24722	0,14	0,101

Таблица 3.

Данные анализа спиртового извлечения плодов аниса обыкновенного

	[INT TIC: Anis alcohol extract-1.D\data.ms]				
	Time=	Fri Feb 26 11:45:36 2016			
Pct Max	Header=	Peak	R.T.	Pct Max	Pct Total
100	3=	Anethol	12,032	100	56,765
16,4	2=	Anis Aldehyde	11,577	16,4	9,31
9,66	21=	(?)	17,45	9,66	5,483
8,9	23=	(?)	17,872	8,9	5,053
7,66	14=	(?)	15,263	7,66	4,351
4,69	C15H24	(?)	14,441	4,69	2,665
3,01	22=	(?)	17,683	3,01	1,71
2,99	12=	Anis Aldehyde Diethyl Acetal	14,819	2,99	1,698
2,13	27=	(?)	22,305	2,13	1,207
2,09	28=	(?)	22,478	2,09	1,186
2,05	13=	Anis Aldehyde Diethyl Acetal	14,928	2,05	1,163
1,84	15=	(?)	15,317	1,84	1,044
1,51	20=	(?)	16,422	1,51	0,857
1,43	19=	(?)	16,146	1,43	0,814
1,43	25=	Linoleic + Oleic Acid	19,366	1,43	0,81
1,23	24=	Palmitic acid	18,181	1,23	0,699
1,12	1=	Estragol	10,727	1,12	0,637
1,1	4=	Anisyl methyl ketone	13,282	1,1	0,622
0,96	18=	(?)	16,021	0,96	0,544
0,81	17=	(?)	15,75	0,81	0,459
0,8	C15H22	Ar-Curcumene	14,381	0,8	0,455
0,74	16=	(?)	15,528	0,74	0,421
0,7	C15H24	beta-Bisabolene	14,641	0,7	0,399
0,65	5=	(?)	13,851	0,65	0,368
0,62	C15H24	Zingiberene	14,505	0,62	0,35
0,59	6=	Ethyl 4-methoxyphenyl ketone (?)	14,04	0,59	0,336
0,54	26=	(?)	21,174	0,54	0,307
0,51	C15H24	alpha-Himachalene (?)	14,148	0,51	0,289
				176,16	100,002

Таблица 4.

Результаты анализа трех партий сырья – плоды тмина

Наименование сырья	Серия	Поставщик	Эфирного масла %	Микробиологическая чистота, КОЕ в 1 г			Содержание радионуклидов, Бк/кг		Содержание тяжелых металлов, мк/кг			Содержание мышьяка	Содержание пестицидов, мг/кг			
				Общее число грибов	Общее число бактерий	Кол-во *E. coli*	Цезия-137	Стронция-90	Свинец	Кадмий	Ртуть		Гексахлорцик-логексан	ДДТ и его метаболиты	Гептахлор	Алдрин
Тмина плоды	20513	ООО «Фитопродукт»	2,05	$1,2x10^4$	$1,8x10^6$	менее 10^2	4±7	0±12	–	–	–	–	–	–	–	–
	31013	ООО «Ива»	2,8	$1,6x10^4$	$1,9x10^5$	менее 10^2	1±14	39±76	–	–	–	–	–	–	–	–
	61113	ООО «Ива»	3,0	$1,4x10^4$	$4,1x10^5$	менее 10	3±4	0±64	–	–	–	–	–	–	–	–

Таблица 5.

Результаты анализа пяти партий сырья – плоды фенхеля

Наименование сырья	Серия	Поставщик	Эфирного масла %	Микробиологическая чистота, КОЕ в 1 г			Содержание радионуклидов, Бк/кг		Содержание тяжелых металлов, мк/кг			Содержание мышьяка	Содержание пестицидов, мг/кг			
				Общее число грибов	Общее число бактерий	Кол-во *E. coli*	Цезия-137	Стронция-90	Свинец	Кадмий	Ртуть		Гексахлор-циклогексан	ДДТ и его метаболиты	Гептахлор	Алдрин
Фенхеля плоды	111213	ООО «Биоресурс»	4,34	$3,0x10^3$	$4,0x10^5$	менее 10	3±4	0±70	0,108±0,033	0,043±0,013	менее 0,0001	менее 0,025	менее 0,001	менее 0,001	менее 0,001	менее 0,001
	50814	ООО «Кедр»	4,18	$4,1x10^4$	$4,5x10^6$	менее 10	2±4	0±78	0,074±0,026	0,004±0,001	менее 0,0001	менее 0,0025	менее 0,001	менее 0,001	менее 0,001	менее 0,001
	91014	ООО «Время и К»	2,54	$1,2x10^4$	$9,8x10^3$	менее 10	0±4	0±75	0,027±0,009	0,009±0,003	менее 0,001	0,034	менее 0,001	менее 0,001	менее 0,001	менее 0,001
	40215	ООО «Экогрин»	1,84	$4,2x10^4$	$2,9x10^6$	менее 10^2	0±4	0±72	0,106±0,037	0,059±0,018	менее 0,001	менее 0,025	менее 0,001	менее 0,001	менее 0,001	менее 0,001
	140915	ООО «Меган 2000»	4,5	$2,8x10^3$	$5,2x10^4$	менее 10	8±5	5±99	0,012±0,004	0,010±0,003	менее 0,001	0,10	менее 0,001	менее 0,001	менее 0,001	менее 0,001

Таблица 6.

Результаты анализа пяти партий сырья – плоды аниса обыкновенного

№ пп	Наименование сырья	Серия	Поставщик	Эфирного масла %	Микробиологическая чистота, КОЕ в 1 г			Содержание радионуклидов, Бк/кг		Содержание тяжелых металлов, мк/кг			Содержание мышьяка	Содержание пестицидов, мг/кг			
					Общее число грибов	Общее число бактерий	Кол-во *E. coli*	Цезия-137	Стронция-90	Свинец	Кадмий	Ртуть		Гексахлорцикло-гексан	ДДТ и его метаболиты	Гептахлор	Алдрин
1	Аниса плоды	61014	ООО «Биоресурс»	1,8	$9{,}0x10^2$	$1{,}9x10^4$	менее 10	3±4	61±110	–	–	–	–	–	–	–	–
		20315	ООО «Биоресурс»	2,0	$4{,}0x10^2$	$3{,}0x10^3$	менее 10	4±4	0±86	–	–	–	–	–	–	–	–
		50615	ООО «Экогрин»	2,6	$5{,}7x10^3$	$1{,}1x10^6$	менее 10	12±6	0±75	–	–	–	–	–	–	–	–
		70915	ООО «Экогрин»	2,4	$4{,}0x10^3$	$1{,}0x10^6$	менее 10	12±6	0±75	–	–	–	–	–	–	–	–
		20216	ООО «Экогрин»	3,36	$1{,}0x10^3$	$2{,}8x10^4$	менее 10	0±4	0±66	–	–	–	–	–	–	–	–

Таблица 7.

Фармакопейные требования к сырью

А. Тмина

Характеристики сырья	Европейская Фармакопея	Государственная фармакопея РФ XI изд.	Государственная фармакопея РФ XIII изд.
Название сырья	есть	есть	обновлённое
Название производящего растения и семейства	отсутствует	есть	есть
Сырьевая база	отсутствует	есть	есть
Внешние признаки	есть	есть, только для цельного сырья	есть, для цельного и для порошка, с фотографиями
Микроскопия	есть	есть описание, для цельного сырья, без фотографий	есть, для цельного и для порошка, с фотографиями
Качественный анализ	ТСХ	отсутствует	ТСХ и ГЖХ-МС
Содержание эфирного масла	весообъёмный метод	весообъёмный метод	весообъёмный метод
Числовые показатели	содержание эфирного масла, влага и зола общая, только для цельного сырья	содержание эфирного масла, влажность, зола общая и зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, посторонние примеси, органическая и минеральная примеси, только для цельного сырья	содержание эфирного масла, влажность, зола общая и зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, посторонние примеси, органическая и минеральная примеси, только для цельного сырья и для порошка
«Тяжелые металлы»	отсутствует	отсутствует	есть
«Радионуклиды»	отсутствует	отсутствует	есть
«Остаточные количества пестицидов»	отсутствует	отсутствует	есть
«Микробиологическая чистота»	отсутствует	отсутствует	есть
«Упаковка»	отсутствует	есть	отсутствует
«Срок годности	отсутствует	есть	отсутствует
Фармакологическая группа	отсутствует	есть	отсутствует

Б. Фенхеля

Характеристики сырья	Европейская Фармакопея	Государственная фармакопея РФ XI изд.	Государственная фармакопея РФ XIII изд.
Название сырья	есть	есть	обновлённое
Название производящего растения и семейства	отсутствует	есть	есть
Сырьевая база	отсутствует	есть	есть
Внешние признаки	есть	есть, только для цельного сырья	есть, для цельного и для порошка, с фотографиями
Микроскопия	есть	есть описание, для цельного сырья, без фотографий	есть, для цельного и для порошка, с фотографиями
Качественный анализ	ТСХ	отсутствует	ТСХ и ГЖХ-МС
Содержание эфирного масла	весообъёмный метод	весообъёмный метод	весообъёмный метод
Числовые показатели	содержание эфирого масла, влага и зола общая, только для цельного сырья	содержание эфирного масла, влажность, зола общая и зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, посторонние примеси, органическая и минеральная примеси, только для цельного сырья	содержание эфирного масла, влажность, зола общая и зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, посторонние примеси, органическая и минеральная примеси, только для цельного сырья и для порошка
«Тяжелые металлы»	отсутствует	отсутствует	есть
«Радионуклиды»	отсутствует	отсутствует	есть

Окончание таблицы 7

В. Аниса обыкновенного

Характеристики сырья	Европейская Фармакопея	Государственная фармакопея РФ XI изд.	Государственная фармакопея РФ XIII изд.
Название сырья	Fructus Anisi vulgaris	Fructus Anisi vulgaris	Anisi vulgaris fructus обновлённое
Название производящего растения и семейства	отсутствует название семейства	Anisum vulgare Apiaceae	Anisum vulgare Apiaceae
Сырьевая база	отсутствует	культивируемое	культивируемое
Внешние признаки	характеристика подлинности, без иллюстраций	характеристика подлинности, без иллюстраций	характеристика подлинности, для цельного сырья с фотографиями
Микроскопия	описание	описание, для цельного сырья, без фотографий	описание, для цельного сырья, с фотографиями
Качественный анализ	хроматографическая характеристика	отсутствует	две хроматографические характеристики
Содержание эфирного масла	весообъёмный метод	весообъёмный метод	весообъёмный метод
Числовые показатели	содержание эфирого масла, влага и зола общая, для цельного сырья	содержание эфирного масла, влажность, зола общая и зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, посторонние примеси, органическая и минеральная	содержание эфирного масла, влажность, зола общая и зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, посторонние примеси, органическая и минеральная примеси
«Тяжелые металлы»	по общей ФС	отсутствует	есть, по общей ФС
«Радионуклиды»	по общей ФС	отсутствует	есть, по общей ФС
«Остаточные количества пестицидов»	по общей ФС	отсутствует	есть, по общей ФС
«Микробиологическая чистота»	по общей ФС	отсутствует	есть, по общей ФС
«Упаковка»	отсутствует	есть	отсутствует
«Срок годности	отсутствует	есть	отсутствует
Фармакологическая группа	отсутствует	есть	отсутствует



УДК 615.074

СРЕДЫ РАСТВОРЕНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В РАЗРАБОТКЕ И КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

О.В. Дружининская[1]*, И.Е. Смехова[1]

Резюме. В обзоре представлены основные среды, рекомендуемые для проведения испытания «Растворение» в России и за рубежом, показаны возможные области применения биорелевантных сред и сред, содержащих поверхностно-активные вещества. На основе проведенного анализа существующих на сегодняшний день сред растворения сделан вывод, что для конкретного лекарственного препарата необходимо подбирать соответствующие условия растворения, способные обеспечить стабильность активных фармацевтических ингредиентов в ходе всего этапа исследования. Более того, при разработке среды растворения исследователю необходимо учитывать химическую структуру входящих в состав лекарственного препарата активных фармацевтических ингредиентов, состав вспомогательных веществ и участка ЖКТ, где и происходит растворение АФИ.

Ключевые слова: тест «Растворение», биовейвер, среды растворения, биорелевантные среды.

DISSOLUTION MEDIA USED IN DEVELOPMENT AND QUALITY CONTROL OF DRUGS

O.V. Druzhininskaya[1]*, I.E. Smekhova[1]

Abstract. The main dissolution media recommended for the Dissolution test in Russia and abroad are represented in the review. Possible applications of biorelevant media and media with surfactants are also shown. Based on the analysis of dissolution media authors concluded that it's necessary to select appropriate dissolution conditions for particular drug. These dissolution conditions should be able to ensure the stability of the active pharmaceutical ingredients throughout the whole stage of the study. Moreover, when developing a dissolution medium, the researcher needs to take into account the chemical structure of the active pharmaceutical ingredients in the drug, the composition of the auxiliary substances and the site of the gastrointestinal tract, where the API dissolves.

Keywords: dissolution test, biowaiver, dissolution media, biorelevant media.

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 – St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, 14A, Professor Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: oxana.druzhininskaya@pharminnotech.com
Тел.: 8 (931) 202 05 96

ВВЕДЕНИЕ

Первые исследования, направленные на установление взаимосвязи между растворением и биодоступностью лекарственных средств (ЛС), стали проводиться начиная с 1950-х годов. Тест «Растворение» как метод контроля качества ЛС был впервые включен в Фармакопею США в 1970 году, а начиная с 1980-х он стал рассматриваться как прогностический инструмент поведения ЛС в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) [1].

Уже более 40 лет испытание «Растворение» является одним из важнейших инструментов в области контроля качества ЛС. В настоящее время новым направлением применения данного теста стало его использование с целью оценки взаимозаменяемости воспроизведенных ЛС (процедура «биовейвер») [2]. Испытание проводится в модельных средах (буферных растворах).

СРЕДЫ, РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЯ «РАСТВОРЕНИЕ»

Фармакопейные среды растворения

Выбор среды для растворения осуществляется на этапе разработки ЛС и методики проведения испытания. Среда для теста «Растворение» должна обеспечивать условия, максимально приближенные к физиологическим, а также стабильность ЛС на протяжении всего испытания [1]. Для каждого лекарственного препарата (ЛП) выбирают среду растворения с учетом химической структуры и биофармацевтических свойств активного фармацевтического ингредиента (АФИ), входящего в его состав, используемых вспомогательных веществ [3].

Согласно общей фармакопейной статье (ОФС) 1.4.2.0014.15 Государственной фармакопеи (ГФ) XIII издания «Растворение для твердых до-

зированных лекарственных форм» в качестве среды растворения рекомендуется использование воды очищенной, раствора хлористоводородной кислоты (HCl) 0,1 М, буферных растворов с pH 6,8-7,8, а также других растворов. Для твердых или мягких желатиновых капсул или таблеток, покрытых оболочкой, в состав которых входит желатин, в случае получения неудовлетворительных результатов по показателю «Растворение» допустимо добавление в среду растворения пепсина (активностью не более 750000 Ед на 1 л) или панкреатина (активностью не более 1750 Ед протеазной активности на 1 л). Использование водных растворов с добавлением ферментов, поверхностно-активных веществ (ПАВ), органических растворителей должно быть обосновано на стадии разработки испытания [4].

Американской и Европейской фармакопеями в качестве сред растворения предложены буферные растворы с диапазоном pH от 1,0 до 7,5, искусственный желудочный или кишечный сок без добавления ферментов [5, 6].

Требования Японской Фармакопеи по выбору среды для теста «Растворение» гармонизированы с фармакопеями США и Европы [7].

ГФ Белоруссии регламентирует проведение теста «Растворение» в одной из буферных сред со значением pH, установленным в диапазоне 1,0–8,0, причем представлено большое количество рекомендуемых значений (1,0; 1,2; 1,5; 4,5; 5,5; 5,8; 6,8; 7,2 и 7,5). В качестве кислых сред растворения ГФ Белоруссии предлагает среды с HCl (в отличие от других фармакопей среды с pH 1,2 и 1,5 готовят с использованием натрия хлорида или калия хлорида). Слабокислый диапазон pH обеспечивают фосфатный и ацетатный буферные растворы. При необходимости использования сред, близких к нейтральным, рекомендован фосфатный буферный раствор; также приведены составы искусственных кишечного и желудочного соков [8].

Применение воды очищенной при проведении теста «Растворение» в целом нежелательно по причине низкой буферной ёмкости и возможного изменения pH при растворении препарата [9]. Кроме того, такие характеристики воды, как pH, поверхностное натяжение, электропроводность, содержание CO_2, зависят от источника воды и могут меняться в процессе исследования из-за влияния свойств самого ЛС и абсорбции или реабсорбции углекислого газа воздуха [10]. Вода может рассматриваться в качестве дополнительной среды, особенно в случае неустойчивости АФИ в буферных средах в такой степени, что данные являются непригодными для использования [1].

Среды растворения, применяемые при проведении СТКР и процедуры «биовейвер»

При разработке воспроизведенных ЛС незаменимым инструментом является использование сравнительного теста кинетики растворения (СТКР) [9]. Более 900 методик испытания кинетики растворения ЛС, преимущественно в твердых дозированных, а также некоторых мягких и инъекционных лекарственных формах (ЛФ), представлено в базе данных FDA [11]. В качестве кислых сред наиболее часто в этих методиках рассматривается 0,1 М раствор HCl, встречаются и 0,01 М и 0,001 М растворы HCl, а также 0,01 М раствор фосфорной кислоты. Для создания слабокислого диапазона pH обычно рекомендуются ацетатные и цитратные буферные растворы. Среды со значениями pH, близкими к нейтральным, как правило, представлены различными фосфатными буферами, а слабощелочные – фосфатными и боратными буферами [12].

СТКР используется для установления эквивалентности профилей растворения исследуемого препарата по отношению к препарату сравнения и в условиях, близких к физиологическим условиям ЖКТ.

В Российской Федерации проведение СТКР регулируется «Руководством по экспертизе лекарственных средств» (Том 1, 2013 г.; Том 3, 2014 г.) [13, 14], Правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (2016 г.) [15], методическими указаниями «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств» (2008 г.) [16], «Методическими рекомендациями по изучению сравнительной кинетики растворения генерических лекарственных средств для производителей» (2010 г.) [17]. Данные документы в качестве основных сред растворения рассматривают, как правило, среды с pH 1,2; 4,5; 6,8, и в то же время указывается, что для контроля качества может использоваться другая среда, приведенная в нормативной документации на ЛП.

СТКР является одним из элементов так называемой процедуры «биовейвер», на основании которой за рубежом проводятся установление взаимозаменяемости и регистрация дженериков. Для данного испытания разными документами рекомендуются различные среды [18–21].

Согласно руководству FDA по регуляторным требованиям, касающимся процедуры «биовейвер», сравнительное испытание проводится в каждой из сред: 0,1 М раствор HCl или искусственный желудочный сок без добавления ферментов, буферный раствор с pH 4,5, буферный раствор с pH 6,8 или искусственный кишечный сок без добавления ферментов [18]. В то же время регуляторные документы ВОЗ и EMA для данного испытания предлагают водные растворы HCl с pH 1,2, ацетатный (с pH 4,5) и фосфатный (с pH 6,8) буферные растворы [19–21]. Документ EMA допускает также проведение исследования при значении pH, при котором АФИ имеет минимальную растворимость. Использование любых ПАВ недопустимо [21].

Биорелевантные среды растворения

По данным литературы, для некоторых ЛС применение классических фармакопейных буферных растворов не отражает с достаточной степенью достоверности поведение ЛП в условиях *in vivo* [22]. Для решения данной проблемы разрабатываются среды растворения, имитирующие свойства физиологических сред ЖКТ.

Решающими факторами для растворимости и, таким образом, абсорбции ЛС в ЖКТ являются состав и объем физиологических сред. Последние характеризуются такими параметрами, как поверхностное натяжение, осмолярность, вязкость, pH, содержание солей желчных кислот, фосфолипидов и других амфифильных соединений. Наличие амфифильных соединений в физиологических средах играет большую роль в солюбилизации малорастворимых АФИ. В первую очередь они снижают поверхностное натяжение жидкостей ЖКТ, тем самым улучшая изначальное смачивание ЛС. Однако более важным является наличие кишечных амфифилов, формирующих смешанные мицеллы и, возможно, другие коллоидные структуры, которые ускоряют растворение АФИ и повышают их растворимость. Смешанные мицеллы, состоящие из солей желчных кислот/фосфолипидов, способствуют диффузии ЛС из просвета кишечника через слизистый слой, достигая стенки кишечника [23–25].

В настоящее время знания о составе и свойствах сред ЖКТ расширились. Физиологические среды кишечника, помимо упомянутых выше солей желчных кислот и фосфолипидов, содержат моноглицериды, свободные жирные кислоты и холестерол [26].

K. Kleberg и соавторы обобщили доступные данные о составе и важных физико-химических показателях физиологических сред двенадцатиперстной и тонкой кишки (таблица 1) [25].

Концентрации солей желчных кислот в двенадцатиперстной и тонкой кишке в состоянии натощак находятся в диапазоне от 1,5 до 5,9 мМоль; после еды показатели изменяются и колеблются в пределах от 0,5 до 24 мМоль (таблица 1). Фосфолипиды попадают в просвет кишечника с желчью, а также в качестве составной части многих продуктов питания, в связи с чем концентрация фосфолипидов зависит от вида принимаемой пищи. Фосфолипиды – липофильные ПАВ и части смешанных мицелл, необходимые для смачиваемости и солюбилизации ЛС. По данным литературы, различные значения уровней солей желчных кислот и фосфолипидов обусловлены методами их определения, используемой аппаратурой, различиями в месте и времени отбора проб, потреблением жидкости испытуемыми, а также индивидуальными особенностями участников исследований [25].

После приема пищи поглощенные жиры и продукты их расщепления способствуют солюбилизации липофильных соединений. Триглицериды пищи под действием желудочных и панкреатических липаз превращаются в моноглицериды и свободные жирные кислоты, которые, как доказано, способствуют солюбилизации многих липофильных соединений, что зачастую приводит к большей биодоступности малорастворимых ЛС [25, 27].

Таблица 1.

Состав физиологических сред кишечника человека [25]

Локализация	Соли ЖК, мМоль	ФЛ, мМоль	МГ, мМоль	СЖК, мМоль	pH	ПН, мН/м	Осмолярность, мОсм/кг
Натощак							
ДПК	5,9±1,8	–	–	–	6,8	–	–
ДПК	3,5±1,8	0,1±0,1	–	–	6,5±0,5	–	–
ДПК	2,6	–	–	–	6,2	32,3	178
ДПК	2,82	–	–	–	6,7	33,6	197
ДПК	2,6±1,6	–	–	–	7,0±0,4	–	137±54
ДПК	2,5	0,4	–	–	–	–	–
ДПК	2,7	0,6	–	–	6,6	41,2	224
ТК	2,9±2,9	–	–	–	7,1±0,6	–	271±15
ТК	1,5±1,8	–	–	–	6,7±0,9	33,7±2,8	278±16
ТК	3,5±1,6	–	–	–	6,8±0,4	–	200±68
ТК	2±0,2	0,2±0,07	–	0,09	7,5	28±1	–
После еды							
ДПК	13,4±4,3	1,9±0,4	–	–	6,4	–	–
ДПК	14,5±8,8	4,8±1,8	–	–	–	–	–
ДПК	9,3±0,8	2,4±0,35	–	–	5,7	–	–
ДПК	11,8	4,31	5,95	39,4	6,5	27,8	416
ДПК	24	1,5	–	–	–	–	–
ДПК	3,6	1,8	–	–	5,9	35	285
ДПК	5,2	1,2	–	–	6,1	35	278
ТК	8±0,1	3±0,3	2,2	13,2	6,1	27±1	–
ТК	12	–	–	–	6,6	28	400
ТК	0,5–8,6	0,1–3,9	–	–	–	–	–
ТК	16,19±1,51	–	–	–	–	–	–
ТК	15	–	–	–	–	–	–

Примечание: ЖК – желчные кислоты; ФЛ – фосфолипиды; МГ – моноглицериды; СЖК – свободные жирные кислоты; ПН – поверхностное натяжение; ДПК – двенадцатиперстная кишка; ТК – тонкий кишечник

В то же время не установлено значимой разницы по показателю pH между состоянием физиологических сред натощак и после приема пищи (6,8±0,4 и 6,2±0,3 соответственно) [25].

Влияние осмолярности на солюбилизацию ЛС – наименее изученный фактор. Значения осмолярности в двенадцатиперстной кишке в состоянии натощак гипотоничны, в тонком кишечнике – стремятся к изотоничности (таблица 1, [25]). В состоянии после приема пищи наблюдается большой разброс значений, наиболее вероятно связанный с различиями как в характере пищи, так и во времени ее приема, а также времени отбора проб.

Поверхностное натяжение физиологических жидкостей значительно ниже в сравнении с водой, а диапазон достаточно узкий. Значения поверхностного натяжения после приема пищи несколько ниже, чем в состоянии натощак (31 и 34 мОсм/кг соответственно) [25].

Помимо вышеуказанных параметров (содержание солей желчных кислот, фосфолипидов и других амфифильных соединений, pH, осмолярность, поверхностное натяжение), необходимо также учитывать объем и вязкость среды.

Объем физиологических сред желудка составляет в среднем 300 мл в состоянии натощак и 500 мл и более после приема пищи; объем жидкости в тонком кишечнике – 200 мл и около 1 л в состоянии натощак и после еды соответственно [26]. Данный параметр является важным фактором при разработке модели растворения, в особенности для малорастворимых АФИ, для которых растворимость является лимитирующей стадией процесса абсорбции. Нередко объем среды растворения *in vitro* превышает соответствующие физиологические объемы [25].

Вязкость – это параметр, влияющий на опорожнение желудка [28]. Вязкость имеет большое значение и при проведении теста «Растворение», поскольку оказывает влияние на дезинтеграцию ЛФ и диффузию АФИ [29, 30]. Из уравнения Стокса – Эйнштейна, описывающего процесс диффузии, следует, что изменение величины вязкости может стать причиной изменения диффузии АФИ (D, $см^2/с$):

$$D = \frac{kT}{6\pi\rho r},$$

где D – коэффициент диффузии, $см^2/с$; k – постоянная Больцмана, эВ/К; T – температура, К; ρ – вязкость, г (см × с) и r – радиус молекулы ЛС, см [25].

С учетом представленных ранее свойств были разработаны биорелевантные среды (biorelevant media), позволяющие моделировать поведение ЛС, их растворение и абсорбцию в ЖКТ, прогнозировать влияние состава вспомогательных веществ, эффектов пищи и других факторов на растворение и биодоступность ЛС для внутреннего применения.

Биорелевантные среды – это среды растворения, максимально приближенные к физиологическим средам ЖКТ по химическому составу и физико-химическим свойствам (pH, осмолярность, буферная емкость, поверхностное натяжение) [1]. Биорелевантные среды растворения моделируют условия принятия пищи или отсутствия процесса пищеварения.

Впервые состав сред, моделирующих состав кишечного сока натощак (FaSSIF – Fasted state simulated intestinal fluid) и после еды (FeSSIF – Fed state simulated intestinal fluid), был опубликован в 1998 г. [31] и незначительно модифицирован авторами в ходе дальнейших исследований [32]. В состав обеих сред были включены натрия таурохолат, лецитин, калия хлорид, натрия гидроксид, вода деминерализованная, а также калия дигидрофосфат (FaSSIF) и кислота уксусная (FeSSIF) (таблица 2) [31].

Таблица 2.

Состав и физико-химические свойства биорелевантных сред растворения, моделирующих состав кишечного сока

Ингредиент	FaSSIF	FaSSIF-V2	FeSSIF	FeSSIF-V2
Натрия таурохолат, мМоль/л	5	3	15	10
Лецитин, мМоль/л	1,5	0,2	4	2
KH_2PO_4, моль/л	0,029	–	–	–
Кислота уксусная, моль/л	–	–	0,144	–
KCl, моль/л	0,22	–	0,19	–
NaOH, мМоль/л	q.s. pH 6,8	34,8	q.s. pH 5,0	81,65
Вода деминерализованная q.s.	1 л	–	1 л	–
Кислота малеиновая, мМоль/л	–	19,12	–	55,05
NaCl, мМоль/л	–	68,62	–	125,5
Глицерилмоноолеат, мМоль/л	–	–	–	5
Натрия олеат, мМоль/л	–	–	–	0,8
Показатель				
pH	6,5	6,5	5,0	5,8
Осмоляльность, мОсМоль/кг	280–310	180±10	485–535	390±10
Буферная ёмкость, мМоль/л	10±2	10	76±2	25
Поверхностное натяжение, мН/м	–	54,3	–	40,5±0,2

Добавление в среду растворения натрия таурохолата как имитатора присутствия желчных кислот, пепсина, а также лецитина в качестве ПАВ может существенным образом повысить растворимость малорастворимых АФИ по сравнению с растворимостью в водных растворах [1]. Так, Bakatselou и соавт., Wiedmann и соавт. сообщили, что физиологические смеси солей желчных кислот способствовали повы-

шению растворимости стероидных ЛС [33, 34]. Дополнительное включение лецитина в среду растворения, содержащую соли желчных кислот, увеличивало растворимость АФИ в еще большей степени, о чем свидетельствуют результаты исследований [34–36]. В состоянии натощак концентрации солей желчных кислот и лецитина относительно ниже, чем после приема пищи [37].

Многолетний опыт применения биорелевантных сред растворения привел к модифицированию их состава и позволил еще точнее приблизить по свойствам к желудочному и кишечному сокам человека (таблица 2, среды FaSSIF-V2, FeSSIF-V2) [1, 38].

Разработаны также среды растворения, позволяющие моделировать поведение ЛС в желудке натощак (FaSSGF – Fasted state simulated gastric fluid) и после еды (FeSSGF – Fed state simulated gastric fluid) (таблица 3) [39, 40].

Таблица 3.

Состав и физико-химические свойства биорелевантных сред растворения, моделирующих состав желудочного сока [39, 40]

Ингредиент	FaSSGF	Ингредиент	FeSSGF
Пепсин, мг/мл	0,1	NaCl, мМоль	237,02
Натрия таурохолат, мкМоль	80	Кислота уксусная, мМоль	17,12
Лецитин, мкМоль	20	Натрия ацетат, мМоль	29,75
NaCl, мМоль	34,2	Молоко : буферный раствор	1:1
–	–	HCl/NaOH	q.s. pH 5,0
Показатель			
pH	1,6	pH	5,0
Осмоляльность, мОсМоль/кг	120,7±2,5	Осмоляльность, мОсМоль/кг	400±10
Поверхностное натяжение, мН/м	42,6	Буферная ёмкость, мМоль/л	25

Преимущество использования биорелевантных сред в исследованиях по изучению кинетики высвобождения АФИ из ЛП отражено в ряде работ. В исследованиях J. Dressman изучалась кинетика растворения модельных ЛС, содержащих активные ингредиенты с разными биофармацевтическими свойствами: АФИ I класса биофармацевтической классификационной системы (БКС) (парацетамол, метопролол), II класса БКС (даназол, мефенамовая кислота, кетоконазол), в воде, биорелевантных и фармакопейных средах. По результатам исследования был сделан вывод о принципиальной необходимости использования биорелевантных сред при изучении липофильных субстанций II класса БКС, а также малорастворимых слабых кислот [41, 42]. В исследовании [43] на примере мелоксикама установлено, что FaSSIF как биорелевантная среда обеспечивала профиль растворения малорастворимых слабых кислот из ЛФ, аналогичный физиологическому.

В отличие от фармакопейных буферных растворов посредством биорелевантных сред возможно максимально приближенное к реальному моделирование фармакокинетических профилей растворения, а также достижение корреляции *in vitro – in vivo* (*In vitro – in vivo* correlation, IVIVC) [38, 44, 45]. Наиболее информативным и самым высоким является уровень корреляции А, который представляет собой взаимосвязь вида «точка-к-точке» между скоростью растворения *in vitro* и скоростью высвобождения АФИ из твердой дозированной ЛФ *in vivo* [44].

Такой уровень корреляции был установлен в ряде исследований с использованием биорелевантных сред для соединений II класса БКС, таких как монтелукаст, диклофенак натрия, целекоксиб, даназол [25].

В настоящее время результаты научных исследований в области биорелевантных сред имеют высокую значимость. Использование таких сред может влиять на фармакокинетические исследования, нацеленные на оптимизацию дозирования и рецептуры препаратов. Биорелевантные среды находят свое применение в испытаниях, изучающих кинетику растворения (в том числе процедуре «биовейвер» и сравнительном тесте кинетики растворения), для оценки взаимозаменяемости воспроизведенных ЛС [46]. Они подходят для установления корреляции между результатами, полученными *in vitro* и *in vivo*, для испытаний с высокой дискриминаторной способностью в процессе разработки ЛП на 2 и 3 стадиях клинических испытаний [47].

Однако следует отметить, что, по данным некоторых авторов, биорелевантные среды растворения не пригодны для фармакопейных тестов, так как имеют высокую стоимость и могут вызвать затруднения при количественном определении АФИ [47]. Для упрощения процесса изготовления и снижения стоимости данных сред применяют концентраты FaSSIF и FeSSIF, а также порошковые смеси [1, 38, 48].

Среды растворения, содержащие ПАВ

Ввиду высокой стоимости биорелевантных сред в ряде случаев предложено использование сред растворения, содержащих ПАВ [1, 38, 49–51]. В частности, их введение в среду возможно при испытании некоторых ЛС II и IV классов БКС (малорастворимые ЛС) при условии, если концентрация ПАВ не превышает критическую концентрацию мицеллообразования для данного растворителя. Так, допустимо введение таких ПАВ, как натрия лаурилсульфат (в концентрации 0,23%), твин-80 (0,002%), цетримид (0,04%) [1, 52, 53].

Добавление ПАВ в среду растворения зависит и от свойства АФИ. Так, для малорастворимых АФИ с pH-зависимой растворимостью рекомендуется ис-

пользовать буферные среды без добавления ПАВ, обеспечивающие адекватную растворимость АФИ в зависимости от физико-химических свойств соединения [49]. В то же время для pH-независимых соединений, малоионизируемых и липофильных АФИ рекомендуется буферный раствор с добавлением ПАВ. Оптимальным считается комбинация ПАВ + кислота либо буферный раствор или желчные кислоты в виде смесей [47]. В некоторых случаях, когда АФИ имеет pH-зависимую растворимость, однако использования одного буферного раствора недостаточно для адекватного высвобождения АФИ, для улучшения условий растворения добавляют ПАВ (например, растворение спиронолактона в среде с pH 1,2 с добавлением натрия лаурилсульфата) [49].

При добавлении ПАВ в среду или при выборе среды с ПАВ необходимо помнить о дискриминаторности теста. Например, описан подход к выбору концентрации ПАВ при разработке ЛФ, сохраняющий дискриминаторность теста «Растворение». Согласно данному подходу испытание проводится в средах с добавлением ПАВ в возрастающих концентрациях, по отношению к базовой среде рассчитываются факторы подобия (f_2), на основании которых выносится заключение о наиболее допустимой концентрации ПАВ для данной ЛФ [1].

В любом случае добавление ПАВ, органических растворителей и т.п. должно быть обосновано на стадии разработки теста «Растворение» [47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выбор среды растворения важен на каждом этапе жизненного цикла ЛС (на стадии разработки ЛП, при оценке его стабильности, при проведении клинических исследований, при масштабировании производства и пострегистрационных изменениях, а также при рутинном контроле качества ЛС на фармацевтическом предприятии) и зависит от целей проводимого испытания.

Для каждого конкретного ЛП рекомендуется подбирать условия растворения, максимально приближенные к физиологическим и обеспечивающие стабильность АФИ на протяжении эксперимента. Состав среды растворения следует разрабатывать с учетом химической структуры и биофармацевтических свойств АФИ, входящих в состав препарата, состава вспомогательных веществ, а также участка ЖКТ, в котором происходит растворение и абсорбция АФИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. Шохина И.Е. – М.: Перо, 2015. 320 с.
2. Г.В. Раменская, И.Е. Шохин. Современные подходы к оценке генерических лекарственных средств при их регистрации (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43. № 9. С. 30–34.
3. 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. С. 37–40.
4. Государственная фармакопея РФ, XIII изд. Т. 2. – М., 2015. URL: http://femb.ru/feml (дата обращения 08.05.2017).
5. The United States Pharmacopeia and The National Formulary (USP 37–NF 32); The United States Pharmacopeial Convention. Inc.: Rockville, MD, 2014.
6. European Pharmacopeia, 8th edition. European Directorate for the Quality of Medicines; Council of Europe. – Strasbourg: EDQM, 2014.
7. Japanese Pharmacopoeia, 17th edition (English Version). The ministry of health, labour and welfare. 2016.
8. Государственная фармакопея Республики Беларусь, II изд. Т. 1 / Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; под общ. ред. А.А. Шерякова. – Молодечно: Победа, 2012. 1220 с.
9. Д.Ю. Гребёнкин, Я.М. Станишевский, И.Е. Шохин. Современные подходы к проведению сравнительного теста кинетики растворения (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1(14). С. 166–171.
10. А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Т.Ю. Лутцева. Сравнительная оценка уровня требований к испытанию «Растворение» // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. № 1. С. 39–45.
11. И.Е. Шохин. База данных по растворению FDA – незаменимый инструмент для разработчиков воспроизведенных ЛС (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2012. № 1(1). С. 3–12.
12. Dissolution Methods: U.S. Department of Health and Human Services, Drug Approvals and Databases, FDA. URL: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution (дата обращения 08.05.2017).
13. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. Глава 7. – М.: Гриф и К., 2013. 328 с.
14. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. III. Глава 11. – М.: ПОЛИГРАФ-ПЛЮС, 2014. 344 с.
15. Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза. Утверждены решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85).
16. Методические указания Минздравсоцразвития России «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств». Приложение 4. – М., 2008.
17. В.Г. Кукес, Г.Ф. Василенко, К.С. Давыдова, Л.М. Красных, Г.В. Раменская, А.Ю. Савченко, И.Е. Шохин. Методические рекомендации для разработчиков и производителей лекарственных средств по изучению сравнительной кинетики растворения твердых дозированных лекарственных форм (утв. Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития). – М.: Ремедиум, 2010. 28 с.
18. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research – Rockville, MD, 2015.
19. Multisourse (Generic) Pharmaceutical Products: Guidelines on registration Requirements to Establish Interchangeability. – WHO Technical Report Series. № 937, Annex 7. 2015.

20. General notes on Biopharmaceutics Classification System (BCS)-based biowaiver applications. WHO Prequalification of Medicines Programme. Guidance Document. November. 2014. URL: https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/documents/35%20Biowaiver%20general_Nov2014.pdf (дата обращения 08.05.2017).
21. Guidelines on the investigation of bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr, EMA. 2010.
22. R. Löbenberg, V. Shan, J. Krämer, G.L. Amidon, J.B. Dressman. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: dissolution behavior of glibenclamide // Pharm. Res. 2000. № 17(4). P. 439–444.
23. C.J. Porter, N.L. Trevaskis, W.N. Charman. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs // Nat Rev Drug Discov. 2007. V. 6. P. 231–248.
24. P.C. de Smidt, M.A. Campanero, I.F. Troconiz. Intestinal absorption of penclomedine from lipid vehicles in the conscious rat: contribution of emulsification versus digestibility // Int J Pharm. 2004. V. 270. P. 109–118.
25. K. Kleberg, J. Jacobsen, A. Müllertz. Characterising the behaviour of poorly water soluble drugs in the intestine: application of biorelevant media for solubility, dissolution and transport studies // JPP. 2010. V. 62. P. 1656–1668.
26. B.B. Nitin, V.Y. Adhikrao, S.M. Sachin, A.K. Rohan, A.H. Ashok, S.S. Sachin, J.N. Sameer. A review on development of biorelevant dissolution medium // Journal of Drug Delivery & Therapeutics. 2014. № 4(2). P. 140–148.
27. D.G. Fatouros, I. Walrand, B. Bergenstahl, A. Müllertz. Colloidal structures in media simulating intestinal fed state conditions with and without lipolysis products // Pharm Res. 2009. № 26(2). P. 361–374.
28. J.H. Meyer, Y. Gu, J. Elashoff, T. Reedy, J. Dressman, G. Amidon. Effects of viscosity and fluid outflow on postcibal gastric emptying of solids // Am J Physiol. 1986. V. 250. № 2. G. 161–164.
29. D. Horter, J.B. Dressman. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract // Adv Drug Deliv Rev. 2001. V. 46. P. 75–87.
30. J. Parojcic, D. Vasiljevic, S. Ibric, Z. Djuric. Tablet disintegration and drug dissolution in viscous media: paracetamol IR tablets // Int J Pharm. 2008. № 355(1-2). P. 93–99.
31. E. Galia, E. Nicolaides, D. Hörter, R. Löbenberg, C. Reppas, J.B. Dressman. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs // Pharm. Res. 1998. № 15(5). P. 698–705.
32. J.B. Dressman, G.L. Amidon, C. Reppas, V.P. Shah. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms // Pharm. Res. 1998. № 15(1). P. 11–22.
33. V. Bakatselou, R.C. Oppenheim, J.B. Dressman. Solubilization and wetting effects of bile salts on the dissolution of steroids // Pharm. Res. 1991. V. 8. P. 1461–1469.
34. T.S. Wiedmann, W. Liang, L. Kamel. Solubilization of drugs by physiological mixtures of bile salts // Pharm. Res. 2002. V. 19. P. 1203–1208.
35. L.J. Naylor, V. Bakatselou, J.B. Dressman. Comparison of the mechanism of dissolution of hydrocortisone in simple and mixed micelle systems // Pharm. Res. 1993. V. 10. P. 865–870.
36. B.L. Pedersen, A. Müllertz, H. Brøndsted, H.G. Kristensen. A comparison of the solubility of danazol in human and simulated gastrointestinal fluids // Pharm. Res. 2000. V. 17. P. 891–894.
37. S. Clarysse, J. Tack, F. Lammert, G. Duchateau, C. Reppas, P. Augustijns. Postprandial evolution in composition and characteristics of human duodenal fluids in different nutritional states // J. Pharm. Sci. 2009. V. 98. P. 1177–1192.
38. Е.А. Волкова, И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, А.Ю. Савченко. Биорелевантные среды растворения – современный инструмент для моделирования процессов растворения и всасывания лекарственных средств // Биомедицина. 2011. № 3. С. 133–140.
39. M. Vertzoni, J. Dressman, J. Butler, J. Hempenstall, C. Reppas. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds // Eur J. Pharm. Biopharm. 2005. V. 60. P. 413–417.
40. E. Jantratid, N. Janssen, C. Reppas, J.B. Dressman. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update // Pharm Res. 2008. V. 25. P. 1663–1676.
41. E. Kostewicz, U. Brauns, R. Becker, J. Dressman. Forecasting the oral absorption behavior of poorly soluble weak bases using solubility and dissolution studies in biorelevant media // Pharmaceutical Research. 2002. V. 19. № 3. P. 345–349.
42. Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, А.Ю. Савченко, Е.А. Волкова. Испытание «Растворение» в средах, моделирующих физиологические условия, как способ оценки поведения лекарственных средств *in vivo* // Биомедицинская химия. 2011. Т. 57. Вып. 5. С. 482–489.
43. Е.А. Волкова, Г.Ф. Василенко, И.Е. Шохин. Опыт применения биорелевантных сред растворения в контроле качества и оценке взаимозаменяемости лекарственных средств (на примере мелоксикама) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 114–121.
44. Guidance for industry: Extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of *in vitro/in vivo* correlations. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). CDER: September 1997. P. 24.
45. Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms (EMA/CPMP/EWP/280/96 Corr1). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). 2014. P. 46.
46. Е.А. Волкова, И.Е. Шохин, А.Ю. Савченко. Использование биорелевантных сред в контроле качества и оценке взаимозаменяемости лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 2(7). С. 114–121.
47. И.Е. Смехова, Ю.М. Перова, И.А. Кондратьева, А.Н. Родыгина, Н.Н. Турецкова. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 50–61.
48. B. Kloefer, P. Van Hoogevest, R. Moloney et al. Study of a standardized taurocholate-lecithin powder for preparing the biorelevant media FeSSIF and FaSSIF dissolution technologies // Dissolution Technologies. 2010. V. 17. P. 6–13.
49. J. Dressman. Evolution of dissolution media over the last twenty years // Dissolution Technologies. 2014. V. 21(3). P. 6–10.
50. T. Zoeller, S. Klein. Simplified biorelevant media for screening dissolution performance of poorly soluble drugs // Dissolution Technologies. 2007. V. 14(4). P. 8–13.
51. H. Jogia, T. Mehta, M. Patel. Evaluation of dissolution media containing a novel synthetic surfactant by in vitro testing of BCS class II drugs // Dissolution Technologies. 2009. V. 16(3). P. 14–19.
52. K. Gowthamarajan, S.K. Singh. Dissolution testing for poorly soluble drugs: a continuing perspective // Dissolution Technologies. 2010. V. 17(3). P. 24–32.
53. S.A. Qureshi. Drug Dissolution Testing: Selecting a Dissolution Medium for Solid Oral Products // Am Pharm Rev. 2009. January/February. URL: http://americanpharmaceuticalreview.com (дата обращения 08.05.2017).

ГОТОВЫЕ РЕШЕНИЯ ПО СОЗДАНИЮ И ОСНАЩЕНИЮ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ КЛИНИК (ВИВАРИЕВ) ПО СТАНДАРТАМ GLP



ВИВАРИЙ - ВАЖНАЯ ЧАСТЬ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИСПЫТАТЕЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ, ЗАНИМАЮЩИХСЯ РАЗРАБОТКОЙ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Ведущий химико-фармацевтический холдинг России ГК «Фармконтракт» оказывает широкий спект услуг по созданию вивария с нуля, проводит реконструкцию объекта, выполняя проектирование, строительно-монтажные работы и оснащая/переоснащая помещения соответствующим типом оборудования от известных мировых производителей, для проведения доклинических исследований инновационных лекарственных препаратов, дженериков, БАВ.

Помещения для содержания животных
SPF-животных и нестерильных конвенциональных животных



Биохимические и гематологические лаборатории



Гистологические лаборатории



Помещения для хранения фармацевтических субстанций и препаратов



Соответствующая международным стандартам GLP лаборатория доклинических испытаний позволяет проводить исследования по изучению токсикологических воздействий на живой организм, оценку эффективности действия разработанных молекул на патофизиологические состояния биологических тест-систем, фармакокинетики и фармакодинамики препаратов.

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

УДК 616-092.9

МЕТОДИКА ЭМБОЛИЗАЦИИ ПОРТАЛЬНОЙ ВЕНЫ КРОЛИКА

Г.В. Ванатиев[1], Я.А. Гущин[1], М.А. Горячева[1], И.Е. Макаренко[1], М.А. Ковалева[1]*, М.Н. Макарова[1]

Резюме. В последние годы значительно возросло число случаев новообразований печени во всем мире. Основным методом терапии данной нозологии является хирургическое вмешательство, в ряде случаев невозможное без предварительной стимуляции регенерации печени. Для этих целей в последнее время активно используют эмболизацию и/или химиоэмболизацию сосудов печени. Один из наиболее распространенных способов – эмболизация портальной вены (ПВЭ). Выявление соотношения «польза – риск» для агентов ПВЭ является актуальной задачей доклинических исследований. Целью данного исследования являлась оценка методики введения микросфер в портальную вену кролика. В качестве средства для эмболизации использовали микросферы на основе поливинилового спирта (ПВС) размером 0,1÷0,3 мм. В результате проведенной работы была воспроизведена методика внутрипортальной эмболизации печени кролика.

Ключевые слова: микросферы, эмболизация, портальная вена, кролик.

RABBIT'S PORTAL VEIN EMBOLISATION METHODS

G.V. Vanatiev[1], Y.A. Gushchin[1], M.A. Goryacheva[1], I.E. Makarenko[1], M.A. Kovaleva[1]*, M.N. Makarova[1]

Abstract. There are a huge of number people with liver tumors. The main method of treatment of this pathology is surgery, in some cases, impossible without prior stimulation of liver regeneration. For these purposes in recent years increasingly used embolization and/or chemoembolization of liver vessels. One of the most common ways – portal vein embolization (PVE). Identification of the benefit – risk ratio for PVE agents is very actually aim of studies in preclinical fields. The aim of this study was to evaluate the methods of administration of the microspheres in the portal vein of the rabbit. As means embolic microspheres used a polyvinyl alcohol with a size 0,1÷0,3 mm. In the course of this work was reproduced method of rabbit's PVE.

Keywords: microspheres, embolization, portal vein, rabbit.

1 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмоловский, ул. Заводская, 3, к. 245

1 – CJSC «Saint-Petersburg Institute of Pharmacy», 3/245, Zavodskaja str., v. Kuz'molovskiy, Vsevolozhskiy district, Leningrad region, 188663, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: kovaleva.ma@doclinika.ru
Тел.: +7 (960) 231 55 46

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения), в настоящий момент гепатоцеллюлярная карцинома занимает второе место среди всех новообразований по степени летальности [1]. Ежегодно во всем мире умирает более 800 тысяч человек от данной нозологии. Пятилетняя выживаемость данных больных составляет не более 30% [2, 3]. Одним из основных методов лечения гепатоцеллюлярной карциномы является хирургическое вмешательство (оперативное удаление новообразования или трансплантация печени). Для проведения операции на печени остаточная масса непораженного органа должна быть не менее 20%. В ряде случаев у пациентов отмечается меньший процент неповрежденного органа. С целью индукции гепатоцеллюлярной регенерации, увеличения количества здоровой ткани проводят предоперационную эмболизацию портальной вены печени (ПВЭ), что в дальнейшем ведет к увеличению процентного соотношения непораженного органа, что в свою очередь дает возможность прооперировать данных пациентов [4–7]. В ряде случаев эмболы нагружают различными противоопухолевыми агентами, проводят так называемую химиоэмболизацию, что приводит к снижению количества метастазов в дооперационный период [3].

Несмотря на важность использования эмболизации для лечения пациентов, в русскоязычной литературе практически отсутствует описание методик для тестирования различных эмболов на доклиническом этапе. Тщательный, всесторонний анализ эмболизирующих агентов на доклиническом этапе позволяет сократить время их регистрации и повысить безопасность применения у людей.

В этой статье рассматривается методика введения эмболов в портальную вену кролика на примере эмболизации микросферами. Соглас-

но литературным данным, кролики являются одним из самых популярных видов животных для проведения эмболизации [7, 8]. Это объясняется рядом причин. Во-первых, портальная вена кролика представляет собой крупный сосуд, диаметр которого составляет 5-8 мм, что позволяет провести введение в него веществ без использования специального оборудования. Во-вторых, печень кролика состоит из четырех долей, анатомическое расположение одной из которых (каудальной) не позволяет эмболизировать ее без специальных проводников [8, 9]. Таким образом, при введении в портальную вену минимум 20% печени (каудальная доля) будут неповрежденными, что обеспечивает регенерацию органа. Несмотря на то, что у кролика больше долей печени, чем у человека (4 и 2 соответственно), строение печени кролика анатомически близко к строению человеческой печени (рисунок 1).

Таким образом, **целью данного исследования** являлась оценка методики введения микросфер на основе поливинилового спирта (ПВС) в портальную вену кролика.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Данное исследование было проведено на 6 самках кроликов породы калифорнийская. К началу исследования масса животных составила 4–5 кг. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Проведение исследования было одобрено на заседании биоэтической комиссии ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации».

Эмбол

В качестве средства для эмболизации использовали микросферы на основе поливинилового спирта (ПВС) размером 0,1÷0,3 мм.

Процедура введения

Процедуру внутрипортального введения проводили в ходе оперативного вмешательства. Для общей анестезии кроликов использовали смесь раствора Золетил®100 (Virbac, Франция) (в дозе 20 мг/кг) с 2% раствором ксилазина (в дозе 3 мг/кг). После введения животных в наркоз им наносили глазную мазь («Офтагель») для предотвращения повреждения глазного эпителия за счет потери влаги. Хирургический доступ осуществляли под углом 45–50° к белой (срединной) линии живота на 1 см ниже реберной дуги (7-го ребра).

После формирования хирургического доступа у всех животных проводилась визуализация портальной вены (рисунок 2).

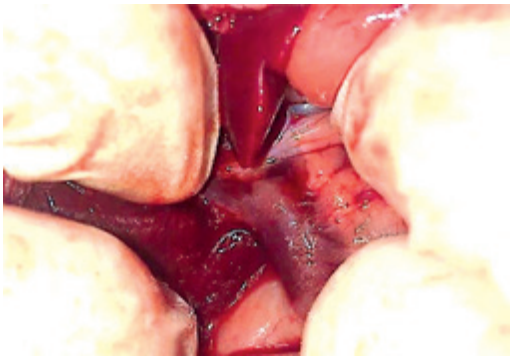


Рисунок 2. Визуализация портальной вены (стрелкой показана портальная вена)

Микросферы вводили в портальную вену при помощи катетеров [22 G (0,8×25 мм)] в объеме 5 мл. После введения микросфер в воротную вену также вводили 2 мл физиологического раствора, для того чтобы протолкнуть оставшиеся в просвете сосуда микросферы дальше по току крови, препятствуя их попаданию в каудальную долю печени. Катетер извлекали из портальной вены и аккуратно, но плотно

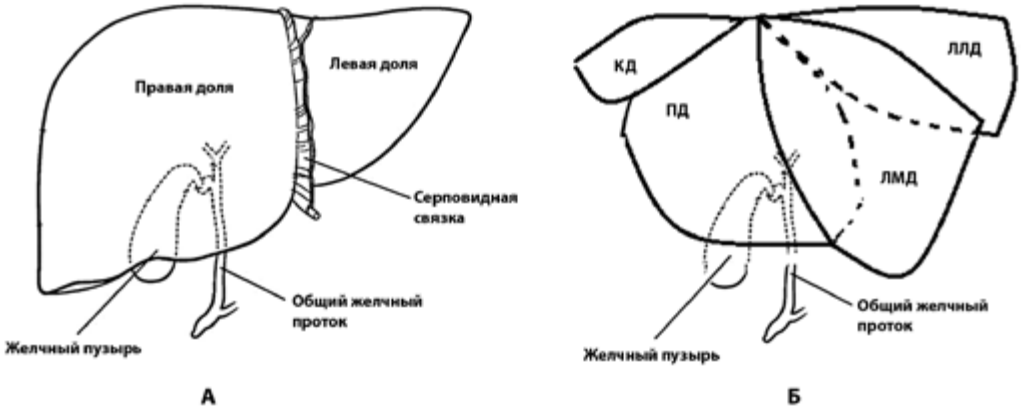


Рисунок 1. Печень человека (А) и кролика (Б). Четыре главные доли печени кролика: ПД – правая доля, ЛМД – левая медиальная доля, ЛЛД – левая латеральная доля, КД – каудальная доля

прижимали место инъекции стерильным марлевым тампоном на 3–5 мин для гемостаза. Все инородные предметы извлекались из брюшной полости, брюшную стенку зашивали послойно, соблюдая правила асептики и антисептики. Кожный шов обрабатывали террамицином.

Послеоперационный уход

После ушивания операционной раны и до выхода из наркоза животные содержались в клетках, снабженных термопластинами для предотвращения потери тепла. Во время всего этого периода за животными велось непрерывное наблюдение.

Также в послеоперационный период кроликам внутримышечно вводили кетопрофен в дозе 3 мг/кг 1 раз в день 5 дней для предотвращения развития болевого синдрома [10].

Эвтаназия, патоморфология и гистология животных

Эвтаназию первой половины животных (3 кролика) проводили через 30 мин, оставшихся – через 7 дней. Эвтаназию осуществляли передозировкой анестетика (золетил – 60 мг/кг и ксилазин – 20 мг/кг). После эвтаназии у всех животных оценивали локализацию микросфер путем морфологического анализа ткани печени. Для животных, подвергнутых эвтаназии на 7-й день исследования, проводили морфологическое исследование печени.

Для морфологического исследования образцы тканей печени были вырезаны, обезвожены, пропитаны парафином, нарезаны на срезы, окрашены гематоксилином и эозином. Исследование гистологических препаратов печени проводилось при помощи светооптического микроскопа Axio Scope A1 (Германия) при увеличении 100. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры Axio Cam ICc 1 (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка локализации микросфер в тканях печени

Для оценки локализации микросфер в печени проводили макроскопию долей печени непосредственно после эвтаназии. Критерием оценки являлось обнаружение микросфер в долях печени.

При макроскопии животных, эвтаназированных через 30 мин после введения, печень характеризовалась неравномерностью окраски ткани, что было обусловлено зоной ишемии (рисунок 3).

На 7-й день исследования поверхность печени была мелкобугристой, с напряженной тусклой капсулой коричневого цвета с мелкими белесоватыми пят-

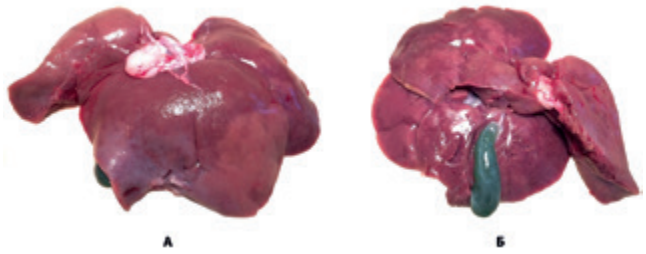


Рисунок 3. Диафрагмальная (А) и висцеральная (Б) поверхность печени через 30 мин после введения микросфер

нами неправильной формы, на разрезе ткань тусклая, отечная, выделяются диффузно расположенные белесовато-желтые участки неправильной формы (рисунок 4).

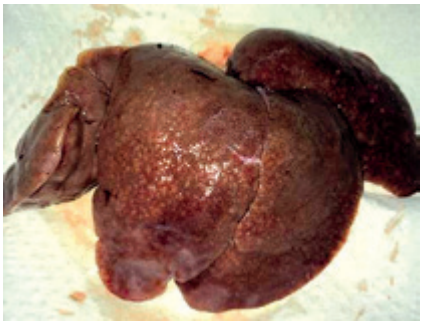


Рисунок 4. Висцеральная поверхность печени, 7-й день исследования

При эвтаназии всех животных вне зависимости от срока исследования во всех долях печени, кроме каудальной, в просвете сосудов были выявлены микросферы (рисунок 5).

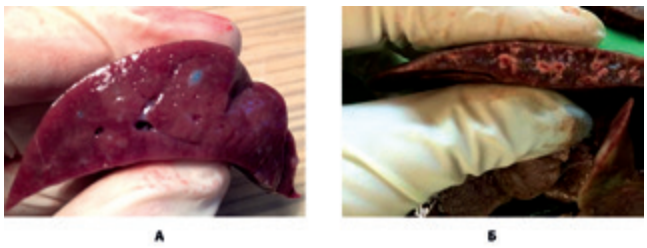


Рисунок 5. Визуализация микросфер в доле печени через 30 мин после введения микросфер (А) и на 7-й (Б) день исследования

Результаты гистологического исследования печени

У животных, эвтаназированных через 30 мин после введения, гистологический анализ ткани печени не проводили в связи с малой информативностью этой процедуры. Данные животные использовались только для подтверждения попадания микросфер в ткань печени. На 7-й день исследования в тка-

ни печени наблюдались массивные очаги некроза с признаками организации. Гистологическое строение печени во всех отделах нарушено. В междольковых венах прослеживались крупные эозинофильные округлые массы (микросферы), или смешанные тромбы, частично или полностью обтурирующие просвет венозных сосудов крупного и среднего калибров. Вокруг триад ткани сдавлены, с массивной воспалительной инфильтрацией, очагами некроза и формирующейся грануляционной тканью (грануляционный вал), состоящей из молодой соединительной ткани, вновь образованных сосудов и клеток воспаления (лимфоциты, макрофаги, плазмоциты). При этом во вновь образующуюся ткань пролиферируют гепатоциты, часть из которых – с полиплоидными ядрами, что может свидетельствовать о повышенной регенеративной активности. Расположенные рядом желчные протоки, вовлеченные в патологический процесс, – с дистрофичным эпителием (рисунки 6, 7).

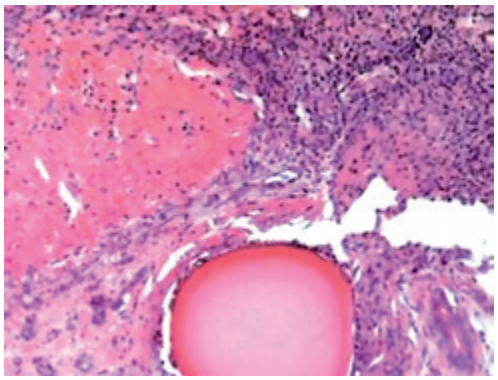


Рисунок 6. Среди некротизированной ткани вена, обтурированная микросферой, грануляционный вал (ув. 50). Окраска гематоксилин-эозином

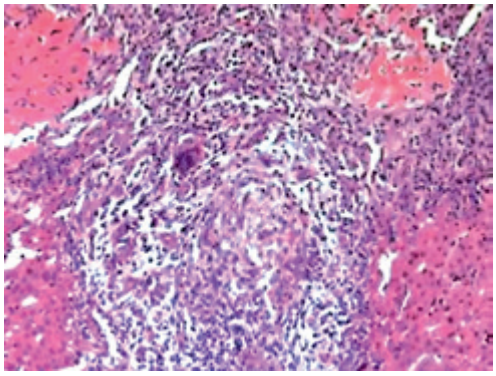


Рисунок 7. Некротизированная ткань, частично замещенная грануляционной с пролиферирующими в нее гепатоцитами (ув. 100). Окраска гематоксилин-эозином

Таким образом, на основании гистологического исследования был сделан вывод об адекватности используемой методики в качестве оценки средств для эмболизации. По аналогии с клиническим применением в ответ на эмболизацию было выявлено формирование очагов некроза, грануляционного вала. Тем не менее также было отмечено увеличение регенераторных свойств печени, что в дальнейшем значительно увеличит массовую долю здоровой печеночной ткани в условиях гепатоцеллюлярной карциномы и позволит провести операционное лечение пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения данной работы был воспроизведен способ внутрипортальной эмболизации печени кролика. При макроскопическом анализе печени было установлено, что микросферы при внутрипортальном введении равномерно распределяются в краниальных долях печени, практически не затрагивая каудальную долю. Гистологическое исследование печени после эмболизации микросферами показало, что введение микросфер приводит к поражению ткани печени и, как следствие, активации регенераторных свойств.

Таким образом, по результатам макроскопического и гистологического исследования была доказана адекватность использования внутрипортальной эмболизации печени кролика в качестве метода тестирования эмболов в доклинических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рак: Информационный бюллетень, № 297, февраль 2017 / Всемирная организация здравоохранения. URL: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/ru (дата обращения: 11.05.2017).
2. K. Han, J.H Kim. Transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma treatment: Barcelona clinic liver cancer staging system // World Journal of Gastroenterology. 2015. V. 21(36). P. 10327–10335.
3. V.A. Saraswat, G. Pandey, S. Shetty. Treatment algorithms for managing hepatocellular carcinoma // Journal of Clinical and Experimental Hepatology. 2014. V. 4(S3). P. S80–S89.
4. K.P. Van Lienden. Radiological aspects of portal vein embolization: PhD thesis. – 2012. 231 p.
5. J. W. Van den Esschert, K.P. Van Lienden, W. De Graaf, M.A.W. Maas, J.J.T.H Roelofs, M. Heger, T.M. Van Gulik. Portal vein embolization induces more liver regeneration than portal vein ligation in a standardized rabbit model // Surgery. 2011. V. 149(3). P. 378–385.
6. П.Г. Таразов, Д.А. Гранов, А.А. Поликарпов. Предоперационная эмболизация воротной вены у больных злокачественными опухолями печени // Альманах Института хирургии имени А.В. Вишневского. 2008. Т. 3. № 3. С. 23–28.
7. F. Huisman, K.P. Van Lienden, S. Damude, L.T. Hoekstra, T.M. Van Gulik. A review of animal models for portal vein embolization // Journal of Surgical Research. 2014. V. 191. P. 179–188.
8. W. De Graaf, J.W. Van den Esschert, K.P. Van Lienden, J.J. Roelofs, T.M. Van Gulik. A rabbit model for selective portal vein embolization // Journal of Surgical Research. 2011. V. 171. P. 486–494.
9. L.T. Hoekstra, K.P. Van Lienden, J. Verheij, C.M. Van Der Loos, M. Heger, T.M. Van Gulik. Enhanced tumor growth after portal vein embolization in a rabbit tumor model // Journal of Surgical Research. 2013. V. 180(1). P. 89–96.
10. Guidelines for Rodent & Rabbit Anesthesia, Analgesia and Tranquilization & Euthanasia Methods // Tulane University IACUC. URL: https://tulane.edu/asvpr/iacuc/hsc/upload/Rodent-Rabbit-anesthesia-guidelines.pdf (дата обращения: 11.06.2017).

УДК 615; 615.322

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВИНОГРАДА ЛИСТЬЕВ КРАСНЫХ ЭКСТРАКТА СУХОГО (*VITIS VINIFERA* L.)

Е.В. Ферубко[1]*, Т.Е. Лескова[1], В.К. Колхир[1], В.Н. Дул[1], Н.И. Сидельников[1]

Резюме. В статье представлены результаты изучения фармакологической активности винограда листьев красных экстракта сухого. Установлено, что экстракт обладает антиагрегационными, противовоспалительными, противоотечными, анальгезирующими, капилляропротективными свойствами. Винограда листьев красных экстракт сухой может быть рекомендован для проведения клинических исследований при заболеваниях, связанных с сосудистыми нарушениями, в том числе при хронической венозной недостаточности.

Ключевые слова: винограда листьев красных экстракт, фармакологическая активность.

STUDY OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF THE DRY EXTRACT OF RED GRAPE LEAVES (*VITIS VINIFERA* L.)

E.V. Ferubko[1]*, T.E. Leskova[1], V.K. Kolkhir[1], V.N. Dul[1], N.I. Sidelnikov[1]

Abstract. The article are presented the results of studying of the pharmacological activity of the dry extract of red grape leaves (*Vitis vinifera* L.). The extract has showed anti-aggregation, anti-inflammatory, decongestant, analgesic, capillaroprotective properties. The dry extract of red grape leaves can be recommended for clinical trials in diseases associated with vascular disorders, including chronic venous insufficiency.

Keywords: extract of red grape leaves, pharmacological activity.

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, 7

1 – All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 7, Green's str., Moscow, 117216, Russian

*** адресат для переписки:**
E-mail: ekaterina-ferubko@rambler.ru
Тел.: 8 (495) 388 11 00

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные растения – перспективный источник препаратов для профилактики и лечения заболеваний, связанных с сосудистыми нарушениями, в том числе хронической венозной недостаточности (ХВН). ХВН протекает тяжело, с заметным снижением качества жизни [1, 2]. Поэтому поиск и разработка новых эффективных и безопасных препаратов из лекарственного растительного сырья для лечения ХВН является актуальной задачей современной фармакологии.

Для лечения ХВН применяются, как правило, зарубежные фитопрепараты на основе тритерпеновых и стероидных сапонинов, флавоноидов и других биологически активных веществ – «Детралекс», «Флебодиа 600», «Рутозид», «Венорутон», «Троксерутин», «Троксевазин», «Эсцин», «Венитан» и другие [3–7]. В настоящее время популярность приобретают лекарственные средства на основе экстракта из листьев винограда. Одним из таких препаратов является импортное ангиопротекторное средство «Антистакс» [8, 9].

В связи с этим интерес для изучения специфической активности представляют листья винограда культурного (*Vitis vinifera* L.), выращиваемого в условиях нашей страны [10]. В Центре химии и фармацевтической технологии ФГБНУ «ВИЛАР» разработан способ получения сухого экстракта из красных листьев винограда, содержащего сумму фенольных соединений – 7,94% в пересчете на рутин [11, 23, 24].

Предварительные исследования, проведённые в ФГБНУ «ВИЛАР», по изучению биологической активности винограда листьев красных экстракта сухого (ВЛКЭС) в условиях опытов *in vitro* с применением специфических ферментных биотест-систем показали, что экстракт обладает антиоксидантными и венотонизирующими свойствами [12]; в условиях *in vivo* установлено гастропротективное действие экстракта на слизистую оболочку желудка крыс [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В отделе экспериментальной и клинической фармакологии ФГБНУ ВИЛАР проведено изучение фармакологической активности ВЛКЭС в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг в сравне-

нии с известным растительным лекарственным препаратом Антистакс® («Берингерм Ингельхайм», Швейцария).

Опыты выполнялись на нелинейных мышах обоего пола массой 18–22 г; нелинейных белых крысах обоего пола массой 180–220 г; кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,8–3,5 кг. Производитель мышей и крыс – Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область); производитель кроликов – ООО «КролИнфо» (Московская область). Лабораторных животных содержали в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Исследование проводили в соответствии с рекомендациями [17]. Экстракт растворяли в 1% крахмальном клейстере и вводили внутрижелудочно в дозах 10 и 100 мг/кг. Животные контрольной группы получали внутрь эквивалентный объем 1% крахмального клейстера. Препарат сравнения Антистакс® вводили животным в дозе 100 мг/кг по аналогичной схеме.

Изучение влияния ВЛКЭС на функциональную активность тромбоцитов *in vitro* было проведено в условиях АДФ – индуцированной агрегации тромбоцитов. Гемокоагуляционные свойства экстракта изучались с использованием венозной крови кроликов-самцов породы шиншилла массой 2,8–3,5 кг. Забор крови производили из краевой вены уха методом свободного падения в условиях стабилизации 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Агрегацию тромбоцитов исследовали с помощью компьютеризированного двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов 230 LA «Biola» (НФП «Биола», Россия) [14, 15]. В качестве индуктора агрегации использовали АДФ (НПО «РЕНАМ», Россия) в конечной концентрации $1x10^{-5}$ М. О степени агрегации судили по максимальной величине падения оптической плотности после окончания реакции (A_{max}) по сравнению с исходной величиной.

Изучение нейропротекторной активности ВЛКЭС проводили в опытах *in vivo* с использованием общепринятых тестов, позволяющих оценить стресспротективные, противотревожные, седативные, общеукрепляющие свойства экстракта [17]. Тестирование начинали через 30–45 мин после однократного введения изучаемого экстракта и препарата сравнения. Изучение влияния экстракта на течение острой экссудативной фазы воспаления проводили по методу Тринуса [18]. Через 3 ч на пике воспаления регистрировали прирост объема экссудата. Влияние ВЛКЭС на течение экспериментального перитонита было изучено по методу Либермана [19]. Модель воспроизводили путем внутрибрюшинного введения 0,2% раствора азотнокислого серебра в количестве 1,0 мл/100 г. Через 4–5 ч животных под наркозом CO_2 забивали и измеряли количество образовавшейся серозной жидкости в брюшной полости. Изучение влияния экстракта на проницаемость сосудов кожи животных проводили по методу Ойвина и Монаковой [20]. Критерием сосудистой проницаемости капилляров служила интенсивность окрашивания в очаге воспаления по сравнению с контролем (в баллах). Изучение противоотечного действия ВЛКЭС проводилось на модели интерстициального отека [21]. Объем отека лап животных оценивали онкометрическим методом и рассчитывали скорость рассасывания отека в динамике через 30, 90, 120 мин. Влияние экстракта на течение хронической пролиферативной фазы воспаления проводили по методу *Meier*. На 8-е сутки производили извлечение гранулем и регистрировали количественные изменения во влажном состоянии (антиэкссудативная активность), затем – в высушенном (пролиферативная активность). Для изучения влияния ВЛКЭС на порог болевой чувствительности мышей использовали модель патологической боли. Специфическую химическую болевую реакцию «корчи» воспроизводили по методу C. Cashin [22]. Регистрацию количества специфических ноцицептивных ответов проводили через 45–60 мин воздействия экстракта.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ *Statistica 6.0* (*Stat Soft*, США).

Таблица 1.

Влияние ВЛКЭС на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*

Вещество	Степень агрегации A_{max} (M±m), %					
	Концентрация добавленного вещества в пробе, мг/мл					
	0,00 Контроль	0,01	0,10	0,50	1,00	10,00
ВЛКЭС	34,2±3,5	32,3±0,9*	30,4±2,7	28,0±1,4**	**21,6±1,9***	22,4±1,0*
Антистакс®	34,2±1,0*	33,9±1,3*	32,4±2,0	30,2±2,2	32,8±1,8	30,0±2,3
Аспирин	35,1±1,8*	17,4±1,3*	12,6±2,6	10,7±1,5*	9,2±0,8*	10,2±1,3*

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля при p≤0,05 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов установлено, что ВЛКЭС обладает антиагрегационной активностью в условиях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro,* снижает степень агрегации тромбоцитов на 6–37% в интервале концентраций 0,01–10,0 мг/мл. Наиболее заметный эффект (37% от поглощения в контроле) наблюдается при концентрации экстракта 1,0 мг/мл пробы (таблица 1). Активность препарата сравнения – аспирина – превосходит действие изучаемого экстракта, аспирин уменьшает степень агрегации тромбоцитов на 51–74%. Антистакс® не оказывает влияния на агрегацию тромбоцитов.

Изучение нейропротекторной активности ВЛКЭС с использованием общепринятых тестов, позволяющих оценить стресспротективные, противотревожные, седативные, общеукрепляющие свойства, показало, что экстракт в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг и препарат сравнения «Антистакс» в дозе 100 мг/кг не оказывают отрицательного влияния на ЦНС и поведение животных.

Исследования по изучению влияния экстракта на течение острого экссудативного воспаления представлены в таблице 2. Экстракт при четырехдневном введении ингибировал развитие формалинового отека лап мышей по сравнению с контролем на 20,18%, несколько уступая по активности Антистаксу®. На модели экспериментального перитонита ВЛКЭС проявил выраженный дозозависимый антиэкссудативный эффект. Экстракт в дозе 100 мг/кг достоверно подавлял степень образования экссудата в брюшной полости на 33,04%, Антистакс® – на 12,68%, по сравнению с контрольной группой животных. Одним из механизмов развития отека является увеличение проницаемости сосудов в очаге воспаления. Оценка капилляроукрепляющей активности ВЛКЭС в очаге локального ксилолового воспаления показала, что даже при однократном введении экстракт способен укреплять стенки кожных сосудов, тормозить выход трепановой сини в 1,2 раза по сравнению с контролем. При этом его активность выше активности Антистакса®.

Данные экспериментов по изучению противоотечной активности, представленные в таблице 3, свидетельствуют, что активность экстракта винограда превосходит активность препарата сравнения Антистакс® по ускорению резорбции отека. Наибольший противоотечный эффект экстракт проявляет в дозе 100 мг/кг через 90 мин наблюдения и составляет 45,26% по сравнению с контрольной группой. Активность препарата Антистакс® в данный промежуток времени уступала активности экстракта и составляла 25,25%.

В условиях модели хронического пролиферативного воспаления экстракт винограда и Антистакс® не оказывают существенного антипролиферативного действия (таблица 4). Однако в дозе 100 мг/кг ВЛКЭС проявляет антиэкссудативную активность, уменьшая массу влажных гранулем на 18,93% по сравнению с контролем. Этот эффект превосходит активность препарата сравнения.

Таблица 2.

Влияние ВЛКЭС на течение экссудативной фазы воспаления

Препарат	Доза, мг/кг,	Прирост объема экссудата на пике воспаления, мг, эффект в %	Перитониальный экссудат, мл, эффект в %	Проявления окраски в очаге воспаления, в баллах (отношение к контролю)
Контроль	–	36,33±3,16	2,29±0,31	2,83±0,4
ВЛКЭС	10	32,83±3,62 9,55%	1,98±0,26 3,53%	2,66±0,36 (1,06)
	100	**29,0±2,44* 20,18%**	**1,52±0,25* 33,04%**	**2,33±0,4* (1,2)**
Антистакс®	100	27,5±3,07* 24,30%	1,73±0,17 12,68%	2,50±0,43 (1,13)

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля при p≤0,05 [22].

Таблицы 3.

Изучение противоотечного действия ВЛКЭС

Время наблюдения, мин	Снижение объема конечности по отношению к контролю, в %		
	ВЛКЭС		Антистакс® 100 мг/кг
	10 мг/кг	100 мг/кг	
30	18,07	28,78	13.23
90	36,84*	**45,26***	25,25*
120	34,40*	37,09*	17,50

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля при p≤0,05 [22].

Таблица 4.

Изучение влияния ВЛКЭС на хроническое пролиферативное воспаление

Препарат	Доза, мг/кг,	Масса влажных и сухих гранулем, в мг	
		Влажных гранулем	Сухих гранулем
Контроль	–	46,11±0.18	11,05±0,27
ВЛКЭС	10	42,23±0,1,6	11,23±0,49
ВЛКЭС	100	**37,38±0,17* 18,93%**	11,60±0,36
Антистакс®	100	39,77±1,09	10,72±0,33

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля при p≤0,05 [22].

Результаты изучения анальгетической активности экстракта представлены в таблице 5. При однократном внутрижелудочном введении ВЛКЭС достоверно уменьшает количество специфических ноцицептивных ответов – «корчей» на химический раздражитель, проявляет дозозависимый анальгетический эффект по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы. Коэффициент анальгезии экстракта в дозе 100 мг/кг превосходит активность Антистакса® и составляет 67,21%.

Таблица 5.

Изучение анальгетической активности ВЛКЭС

Препарат	Доза, мг/кг	Количество «корчей», усл. ед.	Коэффициент анальгезии, %
Контроль	–	27,71±1,96	–
ВЛКЭС	10	16,5±2,04*	40,56
	100	**9,16±1,60***	**67,21**
Антистакс®	100	14,00±2,01*	49,57

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля при p≤0,05 [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований установлено, что винограда листьев красных экстракт сухой проявляет антиагрегационную активность в условиях опытов *in vitro*. В опытах на животных ВЛКЭС в дозе 100 мг/кг оказывает достоверно выраженное противовоспалительное антиэкссудативное, капилляроукрепляющее, анальгетическое действие.

Таким образом, ВЛКЭС обладает широким спектром фармакологической активности и является перспективным для разработки отечественных лекарственных препаратов для профилактики и лечения заболеваний, сопровождающихся сосудистыми нарушениями.

ЛИТЕРАТУРА

1. В.С. Савельев, А.В. Покровский, И.И. Затевахин, А.И. Кириенко. Российские клинические рекомендации по диагностики и лечению хронических заболеваний вен // Флебология. 2013. № 2. Т. 2. С. 40–48.
2. Г.Ж. Нерсиян. Консервативное лечение больных с хронической венозной недостаточностью при варикозной болезни нижних конечностей в амбулаторных условиях: автореф. дис. … канд. мед. наук. – Тюмень. 2009. 23 с.
3. А.О. Шекоян, В.Ю. Богачев. Венозная боль: патофизиология и принципы лечения // Флеболимфология. 2010. № 36. С. 2–6.
4. Ю.М. Стойко, Н.А. Ермаков. Флеботоники в терапии хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Лечащий врач. 2005. № 8. С. 84–86.
5. А.В. Покровский, С.В. Сапелкин. Производные полусинтетического диосмина в лечении больных с хронической венозной недостаточностью – результаты проспективного исследования с применением препарата «Флебодиа 600» // Ангиология и сосудистая хирургия. 2005. № 4. С. 73–79.
6. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. URL: http://www.rlsnet.ru/ (дата обращения 15.08.2016).
7. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Выпуск XV. – М. 2014. С. 562.
8. И.И. Кательницкий, А.В. Куринной. Применение препарата Антистакс® в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 2007. № 1. С. 43–46.
9. H. Kiesewetter, J. Kosclelny, U. Kalusetall. Arznein Forsch // Drug Res. 2000. № 50(1). P. 109–117.
10. Ю.М. Стойко, В.Г. Гудымович. Патогенетические аспекты применения препарата Антистакс® в комплексном лечении больных с хронической венозной недостаточностью нижних конечностей // Фарматека. 2005. С. 61–65.
11. В.Н. Дул. Фармакогностическое изучение и стандартизация винограда культурного (*Vitis Vinifera* L.) листьев красных и сухого экстракта на их основе: дис. ... к.фарм.н. – М. 2014. 118 с.
12. Е.В. Ферубко, И.А. Лупанова, В.К. Колхир, Т.А. Сокольская. Исследование биологической активности винограда культурного листьев красных экстрактов сухих с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях *in vitro* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. № 10. С. 23–26.
13. Ю.А. Трифонов, В.К. Колхир, Т.А. Сокольская, Е.В. Ферубко, Т.Р. Курманов. Фармакологическое исследование противоязвенного действия винограда листьев красных экстракта сухого (*Vitis vinifera* L.) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2011. № 11. С. 64–69.
14. K.M. Moser. Venous thromboembolism // Am. Rev. Respir. Dis. 1990. V. 141. P. 235–249.
15. G.V.R. Born. Quantitative investigation into the aggregation of blood platelets // J. Physiol. 1962. P. 67–68.
16. М.Л. Беленький. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Рига. 1959.
17. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I. – М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
18. Ф.Н. Тринус. Методы скрининга и фармакологического изучения противовоспалительных, анальгезирующих и жаропонижающих веществ. – Киев. 1974.
19. С.С. Либерман, С.Н. Кутчан, Э.А. Рудзит, Н.Г. Шахназаров. Противовоспалительная активность эстоцина // Фармакология и токсикология. 1972. № 3. С. 333–335.
20. И.А. Ойвин, К.Н. Монакова. Методика количественного изучения эффективности противовоспалительных средств // Фармакология и токсикология. 1953. Т. 16. № 3. С. 50–51.
21. Патент РФ № 2290189. Средство, обладающее венотонизирующим, противововспалительным и капилляроукрепляющим действием, и способ его получения / И.Ю. Макаров. – Заявл. 17.06.2005; опубл. 27.12.2006.
22. C.H. Cashin, W. Dawson, E.A. Kitchen. To benoxaprofen (2, 4 – chlorophenyl – methyl -5- benzoxazoli acetic acid) LRC 13694, a new compound with anti inflammatory activity apparently unrelated to inhibition of prostaglandin synthetase // J. Pharmacol. 1977. V. 29. P. 330-336.
23. Патент РФ № 2568908. Способ получения средства, обладающего антиоксидантной активностью / В.Н. Дул, Т.Д. Даргаева, А.А. Кирьянов, О.Л. Сайбель и др.; патентообладатель ГНУ ВИЛАР. – 22.08.2014.
24. В.Н. Дул, Т.Д. Даргаева, О.Л. Сайбель. Разработка методик контроля качества сухого экстракта красных листьев винограда культурного // Молодые ученые и фармация XXI века. Сборник научных трудов второй научно-практической конференции. 2014. С. 72–75.

УДК 615.076

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ Z-ПРЕПАРАТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Г.П. Чепурная[1]*, В.А. Карташов[1], Л.В. Чернова[1]

Резюме. В настоящей работе описана методика и приведены экспериментальные данные по определению методом УФ-спектрофотометрии залеплона, золпидема и зопиклона (Z-препаратов), выделенных из ткани печени. Изолирование Z-препаратов проводили с помощью одного из амфифильных растворителей – ацетона, очистку от примесей – путём экстракции *н*-гексаном из кислой среды, для дополнительной очистки использовали метод ТСХ. Идентифицировали Z-препараты путём последовательного применения ТСХ-скрининга и УФ-спектрофотометрии. Для определения количественного содержания исследуемых веществ использовали УФ-спектрофотометрический метод. Установлены параметры и валидационные характеристики метода при исследовании как нативных Z-препаратов, так и выделенных из биологических объектов (линейность, специфичность, робастность, пределы обнаружения и определения).

Ключевые слова: УФ-спектрофотометрия, Z-препараты, валидация, ткань печени.

DEVELOPMENT OF THE TECHNIQUE FOR IDENTIFYING Z-PREPARATIONS IN BIOLOGICAL OBJECTS BY THE METHOD OF UV-SPECTROPHOTOMETRY

G.P. Chepurnaya[1]*, V.A. Kartashov[1], L.V. Chernova[1]

Abstract. In the given article, the technique is described and the experimental data for identifying Zaleplon, Zolpidem and Zopiclone (Z-preparations) by method of UV – spectrophotometry isolated from liver tissue are determined. The isolation of Z-preparations was carried out with one of amphiphilic solvents – acetone; purification of impurities – by H-hexane extraction from an acidic medium; TLC was used for additional purification. The Z-preparations were identified by the sequential application of TLC screening and UV-spectrophotometry. The UV-spectrophotometric method was used to determine the quantitative content of the analysis substances. The parameters and validation characteristics of the method were determined, both in the study of native Z-preparations and those isolated from biological objects (linearity, specificity, robustness, and detection limits).

Keywords: UV-spectrophotometry, Z-preparations, validation, liver tissue.

1 – ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», медицинский институт, фармацевтический факультет, 385000, Россия, Республика Адыгея, г. Майкоп, ул. Советская, 197-а

1 – Maykop State Technological University Pharmaceutical Faculty, Department of Pharmacy, 197-a, Sovetskaya str., Maykop, 385000, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: velichkogalina@yandex.ru,
Тел.: +7 (918) 258 45 04

ВВЕДЕНИЕ

Z-препараты (залеплон, золпидем и зопиклон) являются представителями снотворных лекарственных средств третьего поколения и применяются в медицине для лечения бессонницы. Несмотря на преимущества перед снотворными первого и второго поколения, исследуемые лекарственные вещества обладают токсичностью, описаны случаи смертельных и не смертельных отравлений изучаемыми препаратами (например, 1–3). Для установления факта отравления необходимо определение исследуемых веществ в биологических объектах. Для количественного определения и идентификации токсических веществ, выделенных из трупного материала, широко используется метод УФ-спектрофотометрии, который обладает некоторыми преимуществами перед другими методами и особенно удобен при проведении рутинных анализов.

Целью настоящей работы является разработка УФ-спектрофотометрического метода анализа для количественного определения Z-препаратов, выделенных из ткани печени.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: провести исследование растворов стандартных образцов Z-препаратов методом УФ-спектрофотометрии; установить параметры и валидационные характеристики метода; выполнить эксперименты по экстрагированию из ткани печени исследуемых веществ и определить их параметры валидации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования:

- «Имован», таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 7,5 мг, производства «САНОФИ-АВЕНТИС ФРАНС», Франция, серия 2J56C, срок годности до 12.2015.
- «Ивадал», таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 10 мг, производства «САНОФИ-АВЕНТИС ФРАНС», Франция, серия 2T046, срок годности до 06.2016.
- «Анданте», капсулы 10 мг, твердые желатиновые капсулы размером № 2, производства ОАО «Гедеон Рихтер», Будапешт, Венгрия, серия T47608E, срок годности до 17.2019.

Остальные реактивы были аналитического качества:

- Диметилкетон (ацетон) (ч.д.а., 1 л, ГОСТ 2603-79).
- Гексан (х.ч., 1 л, ТУ 2631-003-05807999-98).
- Трихлорметан (хлороформ) (х.ч., 1,5 кг, ТУ 2631-066-44493179-01).
- Натрий сернокислый, безводный (ч.д.а., 1 кг, ОКП 26 2112 0832 09).
- Приготовление реактива Драгендорфа строго по ГФ XI, том 2, с 125.

Поставщик: ЗАО «Вектон», Санкт-Петербург, «Химреактивы» и «Техническая химия».

Лабораторная посуда и оборудование:

- Перемешивающее устройство LS-110 (ЛАБ-ПУ-01). Соответствует требованиям ГОСТ 12.2.003.-91. ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Санкт-Петербург, Россия.
- Центрифуга лабораторная медицинская ОПн-8, соответствует требованиям ТУ5.375-4261-76. ОАО «ТНК «ДАСТАН», Киргизия, Бишкек. ШХ2.779.040 ПС.
- Химическая посуда: флаконы, воронки, делительные воронки, мерные пипетки, химические стаканы.
- Наборы для тонкослойной хроматографии (пластинки марки Sorbfil, ПТСХ-П-В-УФ, ТУ 26-11-17-89, Краснодар, Россия).
- Шестиместная термостатирующая водяная баня LOIPLB-160 (LB-161), соответствует требованиям ГОСТ 12.2.003.-91. ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Санкт-Петербург, Россия.
- Облучатель хроматографический УФС-254/365, соответствует требованиям ТУ 4215-004-16943778-99. ООО «ИМИД», г. Краснодар, Россия.
- Спектрофотометр СФ-2000, соответствует требованиям ГОСТ 15150-69. ЗАО «ОТК СПЕКТР», Санкт-Петербург, Россия.

Идентификация и количественное определение залеплона, золпидема и зопиклона методом УФ-спектрофотометрии

1. Для выполнения предстоящих экспериментов были приготовлены рабочие стандартные растворы исследуемых веществ (РСО). Для этого содержимое капсулы (залеплон) и по одной таблетке (золпидем и зопиклон), содержащие соответственно 10 мг, 10 мг и 7,5 мг действующих веществ, помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл. В колбы добавляли по 50 мл этанола и встряхивали на перемешивающем устройстве со скоростью 100 об/мин в течение 6 ч, до полного распада таблеток. Объем растворов доводили этанолом до метки, перемешивали, фильтровали через сухой бумажный фильтр, отбрасывая первые 15 мл. Полученные растворы хранили во флаконах из темного стекла при температуре 5 °С.
2. Для УФ-спектрофотометрического анализа исследуемых веществ приготовленные этанольные растворы залеплона и золпидема разбавляли в два раза. Растворы залеплона, золпидема и зопиклона с концентрациями 5 мкг/мл, 5 мкг/мл и 7,5 мкг/мл спектрофотометрировали с помощью прибора СФ-2000, используя в качестве раствора сравнения этиловый спирт. Спектры абсорбции исследуемых веществ и некоторые параметры приведены на рисунке 1 и в таблице 1.

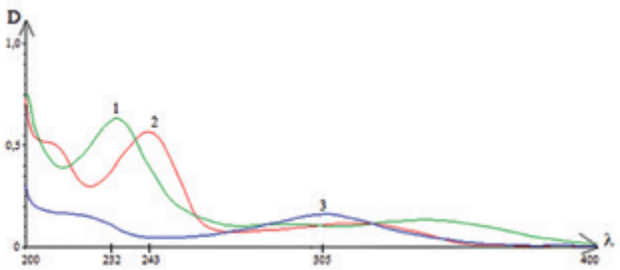


Рисунок 1. Спектры абсорбции залеплона (1), золпидема (2) и зопиклона (3)

Таблица 1.

Параметры УФ-спектрофотометрического анализа исследуемых веществ

Исследуемое вещество	Концентрация, С (мкг/мл)	Длина волны, λ_{max} (нм)	Оптическая плотность, D
Залеплон	5	232	0,632
Золпидем	5	243 316	0,564 0,298
Зопиклон	7,5	305	0,319

Определение валидационных характеристик при исследовании Z-средств методом УФ-спектрофотометрии

С целью установления линейности, пределов обнаружения и количественного определения исследуемых веществ были приготовлены этанольные растворы залеплона и золпидема с концентрациями 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625 мкг/мл и зопиклона с концентрациями 30,0; 15,0; 7,5; 3,75; 1,875 и 0,9375 мкг/мл. Полученные растворы спектрофотометрировали в трёх повторностях в диапазоне 200–400 нм. Спектры абсорбции растворов разных концентраций показаны на рисунках 2, 3, 4, а значения оптических плотностей, измеренные для каждого вещества при длинах волн максимального поглощения, представлены в таблице 2. Математическая (статистическая) обработка результатов и расчет валидационных характеристик проводились с использованием программ «Стат. обработка» и Microsoft Excel.

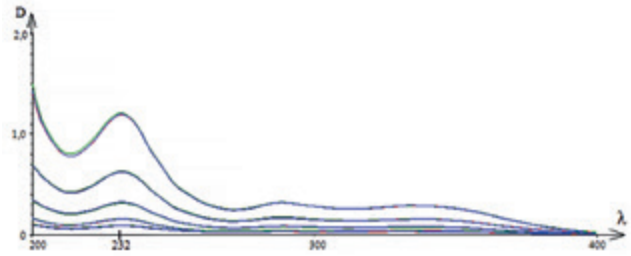


Рисунок 2. Спектры абсорбции раствора залеплона разных концентраций

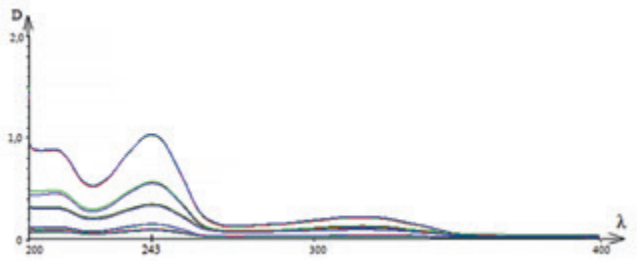


Рисунок 3. Спектры абсорбции раствора золпидема разных концентраций

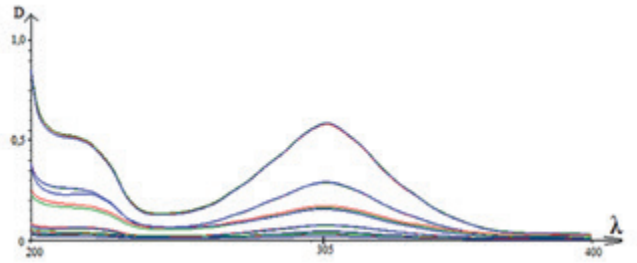


Рисунок 4. Спектры абсорбции раствора зопиклона разных концентраций

Используя полученные данные, были построены калибровочные графики (рисунки 5–7), из которых видно, что в диапазоне всех исследуемых концентраций залеплона, золпидема и зопиклона наблюдается линейная зависимость. Кроме того, по известной формуле (1) были рассчитаны удельные коэффициенты поглощения ($E^{1\%}_{1\ см}$), значения которых соответственно равны: для залеплона – 1268±0,041, золпидема – 1050±0,049 и зопиклона – 439±0,115.

Таблица 2.

Величины оптических плотностей (D) залеплона, золпидема и зопиклона в зависимости от концентрации (n=3, P=95%)

№ n/n	Концентрация, С (мкг/мл)	Залеплон		Золпидем		Зопиклон		
		Оптическая плотность, D	$\overline{X} \pm \Delta\overline{x}$	Оптическая плотность, D	$\overline{X} \pm \Delta\overline{x}$	Концентрация, С (мкг/мл)	Оптическая плотность, D	$\overline{X} \pm \Delta\overline{x}$
1.	10	1,190	1,195±0,015	1,017	1,018±0,080	30	1,160	1,165±0,012
2.		1,202		1,016			1,170	
3.		1,194		1,022			1,166	
1.	5	0,625	0,625±0,007	0,531	0,535±0,010	15	0,577	0,577±0,004
2.		0,628		0,539			0,576	
3.		0,622		0,535			0,579	
1.	2,5	0,317	0,316±0,009	0,283	0,286±0,006	7,5	0,344	0,329±0,032
2.		0,312		0,285			0,324	
3.		0,319		0,288			0,320	
1.	1,25	0,152	0,154±0,005	0,140	0,139±0,005	3,75	0,150	0,150±0,006
2.		0,156		0,137			0,147	
3.		0,153		0,141			0,152	
1.	0,625	0,087	0,088±0,003	0,060	0,056±0,009	1,875	0,080	0,081±0,005
2.		0,089		0,053			0,079	
3.		0,087		0,057			0,083	
1.						0,9375	0,057	0,055±0,014
2.							0,060	
3.							0,049	

$$E^{1\%}_{1\ см} = \frac{D}{\omega \cdot \ell}, \quad (1)$$

где ω – концентрация исследуемого вещества, %; *D* – оптическая плотность анализируемого раствора; *ℓ* – длина кюветы, см; ($E^{1\%}_{1\ см}$), – удельный показатель поглощения.

Предел обнаружения (DL) и предел количественного определения (QL) вычисляли, используя формулы (2):

$$DL = \frac{3{,}3 \cdot SD}{b} \qquad QL = \frac{10 \cdot SD}{b}, \quad (2)$$

где *SD* – стандартное отклонение; *b* – наклон калибровочной кривой.

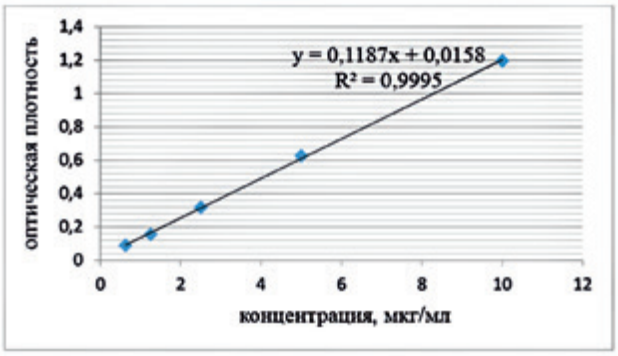


Рисунок 5. График линейной зависимости оптической плотности от концентрации раствора залеплона

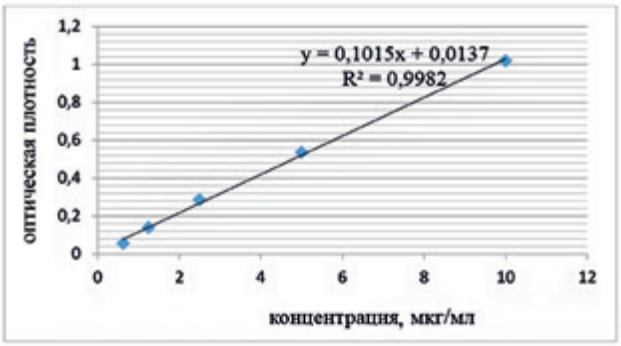


Рисунок 6. График линейной зависимости оптической плотности от концентрации раствора золпидема

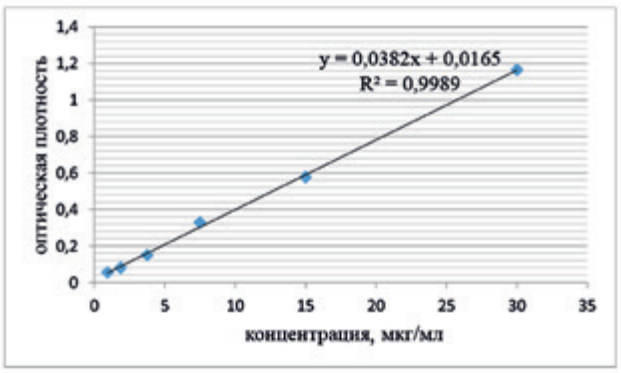


Рисунок 7. График линейной зависимости оптической плотности от концентрации раствора зопиклона

Линейная зависимость наблюдается в пределах концентраций 0,625–10,0 мкг/мл для залеплона и золпидема, 0,9375–30,0 мкг/мл – для зопиклона. Коэффициент корреляции для залеплона (r) равен 0,9995, золпидема – 0,9982 и зопиклона – 0,9989. Пределы обнаружения и количественного определения УФ-спектрофотометрическим методом составляют: для залеплона – 0,203 мкг/мл и 0,614 мкг/мл; для золпидема – 0,693 мкг/мл и 2,100 мкг/мл; для зопиклона – 0,902 мкг/мл и 2,733 мкг/мл соответственно. Коэффициент корреляции исследуемых веществ составляет не менее 0,99.

Прецизионность методики количественного определения залеплона, золпидема и зопиклона оценивали путем воспроизведения методики на трех уровнях для каждого препарата в трех повторностях с последующим определением относительного стандартного отклонения. Оценку методики проводили на водных растворах стандартных веществ в течение одного дня и в разные дни. Результаты, представленные в таблицах 3–5, получены в одинаковых условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в пределах короткого промежутка времени.

Таблица 3.

Результаты повторяемости методики количественного определения залеплона (n=9, P=95%)

Номера опытов	Взято (мкг)	Оптическая плотность (D)	Найдено (мкг)	Найдено (%)
1.	10	1,300	9,94	99,38
2.		1,298	9,92	99,23
3.		1,310	10,02	100,15
4.	2,5	0,327	2,49	99,84
5.		0,326	2,48	99,54
6.		0,323	2,47	98,60
7.	0,625	0,082	0,626	100,16
8.		0,081	0,624	99,84
9.		0,080	0,623	99,68
$\overline{X} \pm \Delta\overline{x}$				99,60±0,386
SD				0,1635
RSD				0,39

Примечание: оптическая плотность стандартного раствора залеплона, содержащего 5 мкг/мл, равна 0,654.

Внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность валидируемой методики оценивали в условиях работы одной лаборатории, в разные дни, разными исполнителями, на разном оборудовании (УФ-спектрофотометры СФ-2000 и ПЭ-3000). Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 4.

Результаты повторяемости методики количественного определения золпидема (n=9, P=95%)

Номера опытов	Взято (мкг)	Оптическая плотность, D	Найдено (мкг)	Найдено (%)
1.	10	1,208	10,02	100,2
2.		1,199	9,94	99,40
3.		1,205	9,99	99,90
4.	2,5	0,299	2,48	99,10
5.		0,301	2,49	99,70
6.		0,298	2,47	98,70
7.	0,625	0,076	0,625	100,00
8.		0,075	0,623	99,68
9.		0,076	0,626	100,16
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$ SD RSD				99,64±0,389 0,1650 0,39

Примечание: оптическая плотность стандартного раствора золпидема, содержащего 5 мкг/мл, равна 0,603.

Таблица 5.

Результаты повторяемости методики количественного определения зопиклона (n=9, P=95%)

Номера опытов	Взято (мкг)	Оптическая плотность, D	Найдено (мкг)	Найдено (%)
1.	30	1,175	29,97	99,90
2.		1,176	30,00	100,00
3.		1,178	30,05	100,17
4.	7,5	0,294	7,50	100,00
5.		0,293	7,47	99,60
6.		0,293	7,47	99,60
7.	1,875	0,074	1,877	100,11
8.		0,073	1,874	99,95
9.		0,073	1,873	99,89
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$ SD RSD				99,91±0,157 0,0665 0,16

Примечание: оптическая плотность стандартного раствора зопиклона, содержащего 15 мкг/мл, равна 0,588.

Полученные результаты (таблицы 5, 6), показали, что отклонение средних величин в единицах оптической плотности и концентрации не превышает 0,5%, что говорит о внутрилабораторной прецизионности методики.

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное. Для оценки правильности методики количественного определения использовали средние результаты, полученные нами и представленные в таблицах 3–6. Среднее значение коэффициента открываемости (R) для залеплона составляет 99,59±0,419, золпидема – 99,58±0,389 и зопиклона – 99,94±0,200, т.е. полученные значения R не выходят за пределы 100±2%.

Таблица 6.

Результаты внутрилабораторной прецизионности методики (n=6, P=95%)

Дни опытов	Взято (мкг)	Оптическая плотность, D	Найдено (мкг)	Найдено (%)
Залеплон				
День 1	10	1,300	9,94	99,38
		1,298	9,92	99,23
		1,310	10,02	100,15
День 2	10	1,299	9,93	99,30
		1,305	9,98	99,80
		1,308	10,00	100,00
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$ SD RSD		1,303±0,005 0,0021 0,38	9,97±0,043 0,0166 0,43	99,64±0,411 0,1598 0,41
Золпидем				
День 1	10	1,208	10,02	100,2
		1,206	10,00	100,0
		1,205	9,99	99,90
День 2	10	1,202	9,97	99,70
		1,207	10,01	100,1
		1,209	10,02	100,2
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$ SD RSD		1,206±0,003 0,0010 0,25	10,00±0,020 0,0079 0,20	100,02±0,204 0,0792 0,20
Зопиклон				
День 1	30	1,175	29,97	99,90
		1,174	29,95	99,83
		1,175	29,97	99,90
День 2	30	1,175	29,97	99,90
		1,176	30,00	100,00
		1,178	30,05	100,17
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$ SD RSD		1,175±0,002 0,0006 0,17	29,99±0,037 0,0145 0,12	99,95±0,127 0,0493 0,13

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение исследуемых веществ в ткани печени

Для изолирования залеплона, золпидема и зопиклона из ткани печени и других биологических объектов мы применили один из амфифильных растворителей – ацетон, который является универсальным и обладает высокой экстрагирующей способностью. В работе В.А. Карташова [4] это было теоретически обосновано и подтверждено на большом экспериментальном материале в модельных опытах, исследованиях на животных, экспертном материале. Учитывая высокую эффективность ацетона, ряд авторов [5–8 и др.] использовали его в качестве экстрагента для изо-

лирования из биологического материала токсических веществ разных химических и фармакологических групп.

Для определения Z-препаратов в ткани печени мы использовали разработанную нами методику, описанную в работах [9–11].

Данные спектрофотометрического анализа исследуемых веществ, выделенных из образцов трупной печени, приведены на рисунках 8–10 и в таблицах 7–9.

Полученные данные показали, что залеплон и золпидем экстрагируются из ткани печени за две ступени и определяются УФ-спектрофотометрическим методом в среднем в количестве 45%, 76% и 48%, соответственно.

Установление линейности, пределов обнаружения и определения Z-препаратов, выделенных из ткани печени

Для установления минимального количества залеплона и других Z-препаратов, которые могут быть выделены из ткани трупной печени по вышеизложен-

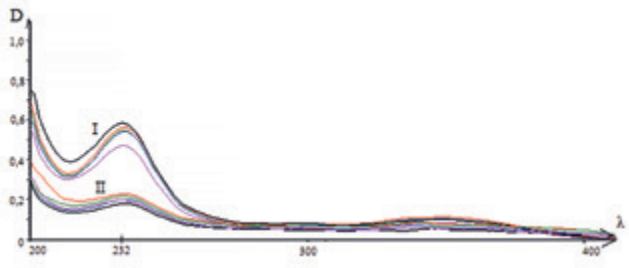


Рисунок 8. Спектр абсорбции залеплона, выделенного из ткани печени:

I, II –ступени экстракции

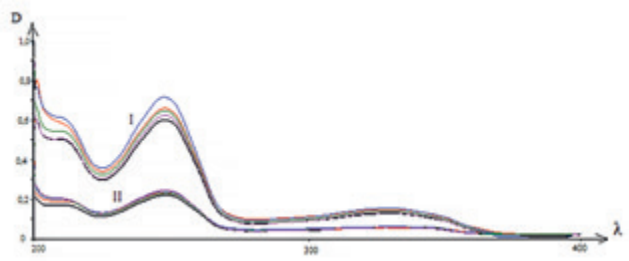


Рисунок 9. Спектр абсорбции золпидема, выделенного из ткани печени:

I, II –ступени экстракции

Таблица 7.

Выход залеплона при экстрагировании из ткани печени (n=5, P=95%)

Номера опытов	1 ступень			2 ступень			Сумма по ступеням	
	Оптическая плотность, D[1]	Выход (мкг)	Выход (%)	Оптическая плотность, D[1]	Выход (мкг)	Выход (%)	Выход (мкг)	Выход (%)
1.	0,514	68,4	34,20	0,210	27,9	13,95	96,3	48,15
2.	0,500	66,5	33,26	0,199	26,5	13,20	93,0	46,46
3.	0,495	65,8	32,93	0,183	24,3	12,19	90,1	45,12
4.	0,533	70,9	35,42	0,166	22,1	11,02	93,0	46,44
5.	0,431	57,3	28,62	0,181	24,1	12,01	81,4	40,63
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,495±0,048	65,8±6,39	32,89±3,20	0,188±0,021	25,0±2,81	12,47±1,41	90,8±7,05	45,31±3,69

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 15,0 мл этанола; 2 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора залеплона, содержащего 5 мкг/мл, равна 0,564.

Таблица 8.

Выход золпидема при экстрагировании из ткани печени (n=5, P= 95%)

Номера опытов	1 ступень			2 ступень			Сумма по ступеням		
	Оптическая плотность, D[1]	Выход (мкг)	Выход (%)	Оптическая плотность, D[1]	Выход (мкг)	Выход (%)	Выход (мкг)	Выход (%)	Выход (%)[2]
1.	0,772	83,01	41,49	0,382	41,08	20,50	124,09	61,99	76,87
2.	0,758	83,51	40,72	0,375	40,32	20,13	123,83	60,85	75,45
3.	0,852	91,61	45,78	0,385	41,40	20,69	133,01	66,47	82,43
4.	0,695	74,73	37,34	0,362	38,92	19,43	113,65	56,77	70,39
5.	0,704	75,70	37,85	0,417	44,84	22,43	120,54	60,28	74,75
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,756± 0,06	81,71± 8,52	40,64± 3,22	0,384± 0,02	41,31± 2,72	20,64± 1,06	123,02 ±8,69	61,28± 3,33	75,98± 4,14

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 10 мл этанола; 2 – в пересчете на основание – молекулярная масса золпидема тартрата – 764,88, основания – 616,88; 3 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора золпидема, содержащего 5 мкг/мл, равна 465.

Таблица 9.

Выход зопиклона при экстрагировании из ткани печени (n=5, P=95%)

Номера опытов	1 ступень			2 ступень			Сумма по ступеням	
	Оптическая плотность, D[1]	Выход (мкг)	Выход (%)	Оптическая плотность, D[1]	Выход (мкг)	Выход (%)	Выход (мкг)	Выход (%)
1.	0,402	102,55	34,18	0,157	40,05	13,35	142,60	47,53
2.	0,415	105,87	35,29	0,146	37,24	12,41	143,11	47,70
3.	0,405	103,32	34,44	0,197	50,26	16,75	153,58	51,20
4.	0,412	105,10	35,03	0,164	41,84	13,95	119,05	48,97
5.	0,408	104,08	34,69	0,143	36,48	12,16	140,56	46,87
$\overline{X} \pm \Delta\overline{x}$	0,408±0,006	104,18±1,66	34,73±0,55	0,161±0,027	41,17±6,86	13,72±2,29	139,78±15,72	48,45±2,14

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 10 мл этанола; 2 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора зопиклона, содержащего 15 мкг/мл, равна 0,588.

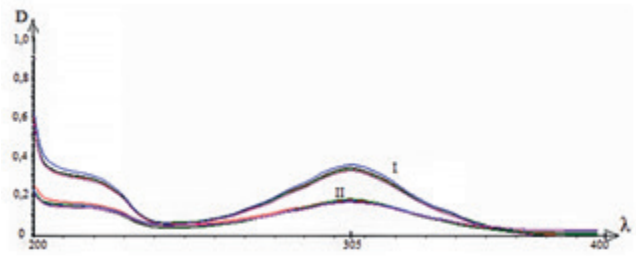


Рисунок 10. Спектры абсорбции зопиклона, выделенного из ткани печени:

I, II –ступени экстракции

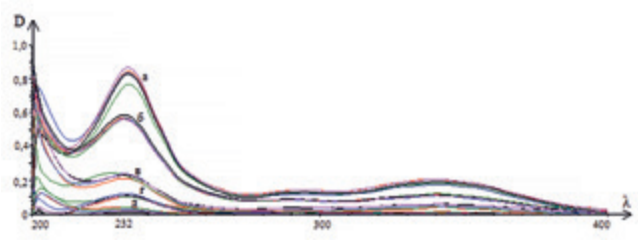


Рисунок 11. Спектры абсорбции залеплона, выделенного из 5,0 г ткани печени, содержащей 100 мкг (а), 50 мкг (б), 25 мкг (в), 10 мкг (г) и 5 мкг (д); 2 серия опытов

ной методике, и определения валидационных характеристик были выполнены эксперименты, описанные ниже.

Экстрагирование залеплона и золпидема из 5,0 г измельченной ткани печени, содержащей по 100; 50; 25; 10; 5 мкг, а в случае зопиклона – 300; 150; 75; 30 мкг проводили, выполняя по 5 параллельных определений и одному холостому для каждой указанной концентрации. Были выполнены две серии опытов, отличающиеся тем, что в первой серии исследуемые вещества детектировали на хроматограммах по флюоресценции и элюировали этанолом, а во второй серии – обнаружение залеплона и золпидема проводили путем обработки реактивом Драгендорфа и элюировали их путем экстракции хлороформом из щелочной среды. Результаты проведенных экспериментов представлены на рисунках 11–13 и в таблицах 10–12. При исследовании залеплона, содержащегося в количестве 5 мкг в образце, он обнаруживался на хроматограмме, но не был количественно определен спектрофотометрическим методом.

Полученные в результате проведенных экспериментов данные использованы нами для установления линейности, пределов обнаружения и определе-

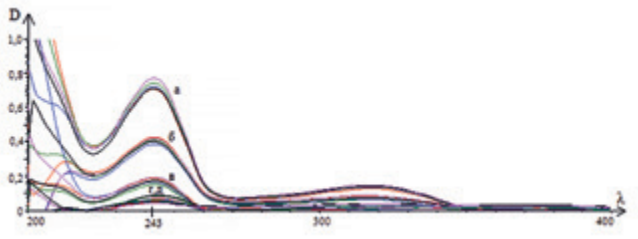


Рисунок 12. Спектры абсорбции золпидема, выделенного из 5,0 г ткани печени, содержащей 100 мкг (а), 50 мкг (б), 25 мкг (в), 10 мкг (г) и 5 мкг (д); 2 серия опытов

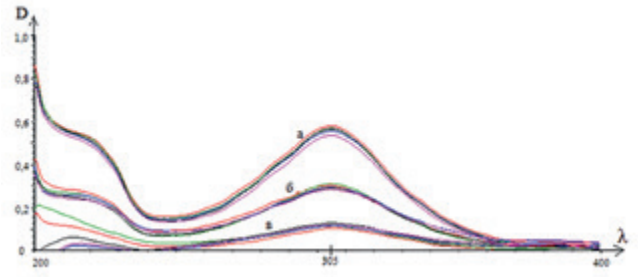


Рисунок 13. Спектры абсорбции зопиклона, выделенного из ткани печени, содержащей 150 мкг (а), 75 мкг (б) и 30 мкг (в) в пробе; 1 серия опытов

Таблица 10.

Данные по экстрагированию из ткани печени разных количеств залеплона (n=5, P=95%)

Количество залеплона в 5 г печени (мкг)	1 серия опытов			2 серия опытов		
	Оптическая плотность, D	Выход (мкг)	Выход (%)	Оптическая плотность, D	Выход (мкг)	Выход (%)
100[1]	0,528	48,37	48,37	0,475	43,50	43,50
	0,490	44,89	44,89	0,432	39,56	39,56
	0,526	48,19	48,19	0,466	42,63	42,63
	0,522	47,78	47,78	0,487	43,77	43,77
	0,541	49,51	49,51	0,489	44,78	44,78
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,521±0,024	47,75±2,14	47,75±2,14	0,468±0,054	42,85±2,48	42,85±2,48
50	0,570	26,10	52,20	0,491	22,48	44,96
	0,564	25,82	51,64	0,518	23,72	47,44
	0,566	25,92	51,84	0,496	22,71	45,42
	0,585	26,79	53,58	0,513	23,49	46,98
	0,560	25,64	51,28	0,504	23,08	46,16
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,569±0,012	26,05±0,55	52,11±1,10	0,504±0,014	23,10±0,64	46,19±1,29
25	0,211	9,66	38,64	0,229	10,49	41,96
	0,230	10,53	42,12	0,211	9,66	38,64
	0,237	10,85	43,40	0,220	10,07	40,28
	0,231	10,58	42,32	0,214	9,80	39,20
	0,236	10,81	43,24	0,224	10,26	41,04
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,229±0,013	10,49±0,60	41,94±2,40	0,220±0,009	10,06±0,42	40,22±1,67
10	0,103	4,72	47,20	0,114	5,22	52,20
	0,102	4,67	46,70	0,105	4,81	48,08
	0,120	5,49	54,95	0,110	5,04	50,40
	0,110	5,04	50,40	0,107	4,90	49,00
	0,107	4,90	49,00	0,109	5,00	50,00
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,108±0,009	4,96±0,41	49,65±4,11	0,109±0,004	4,99±0,19	49,94±1,93
5	0,040	1,83	36,60		–	–
	0,036	1,65	32,97		–	–
	0,026	1,19	23,80		–	–
	0,011	0,50	10,00		–	–
	0,020	0,92	18,40		–	–
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,027±0,014	1,22±0,67	24,35±13,42		–	–
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$			47,86±6,89			44,80±6,69

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 10,0 мл этанола; 2 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора залеплона, содержащего 10 мкг/мл, равна 1,092.

ния при исследовании разных количеств исследуемых веществ, выделенных из ткани печени по предлагаемой методике. Построены калибровочные графики, рассчитаны уравнения калибровочных кривых, из которых видно, что линейная зависимость величины оптической плотности от количества залеплона и золпидема наблюдается при их содержании 5–100 мкг, зопиклона – в пределах 30–300 мкг в 5,0 г ткани печени (рисунки 13–15).

Рассчитаны пределы обнаружения исследуемых веществ, которые составляют для залеплона 3,3 мкг, золпидема – 0,79 мкг, зопиклона – 3,4 мкг, а также пре-

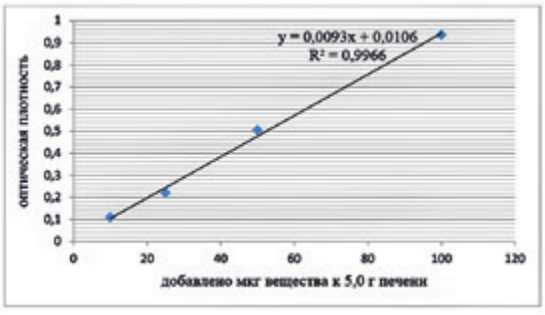


Рисунок 14. График линейной зависимости оптической плотности раствора от количества залеплона, добавленного к трупной печени

Таблица 11.

Данные по экстрагированию из ткани печени разных количеств золпидема (n=5, P=95%)

Количество залеплона в 5 г печени (мкг)	1 серия опытов			2 серия опытов		
	Оптическая плотность, D	Выход (мкг)	Выход (%)[2]	Оптическая плотность, D	Выход (мкг)	Выход (%)[2]
100[1]	0,556	55,82	69,21	0,639	64,16	79,56
	0,584	58,63	72,70	0,663	66,57	82,55
	0,598	60,04	74,45	0,556	55,82	69,22
	0,589	59,14	73,33	0,623	62,55	77,56
	0,605	60,74	75,32	0,584	58,63	72,70
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,586±0,02	58,87±2,35	73,02±2,92	0,613±0,053	61,55±5,36	76,32±6,65
50	0,620	31,12	77,18	0,590	29,62	73,37
	0,598	30,02	74,45	0,567	28,46	70,54
	0,559	28,06	69,59	0,670	33,63	83,48
	0,584	29,32	72,71	0,604	30,32	74,98
	0,613	30,77	76,31	0,626	31,43	78,02
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,595±0,03	29,86±1,52	74,05±3,77	0,611±0,049	30,69±2,44	76,12±6,06
25	0,297	14,91	73,95	0,322	16,16	80,05
	0,277	13,91	68,99	0,295	14,81	73,46
	0,305	15,31	75,94	0,323	16,21	80,40
	0,299	15,01	74,45	0,300	15,06	74,70
	0,318	15,96	79,16	0,290	14,56	72,22
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,299±0,02	15,02±0,92	74,50±4,59	0,306±0,019	15,36±0,96	76,19±4,77
10	0,122	6,12	75,89	0,123	6,17	76,51
	0,125	6,28	77,87	0,120	6,02	74,65
	0,124	6,22	77,13	0,125	6,28	77,87
	0,123	6,17	76,51	0,122	6,12	75,89
	0,127	6,38	79,11	0,139	6,98	86,55
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,124±0,01	6,23±0,13	77,30±1,55	0,123±0,012	6,31±0,48	78,29±5,92
5	0,059	2,96	73,41	0,062	3,11	77,13
	0,071	3,56	88,29	0,060	3,01	74,65
	0,064	3,21	79,61	0,052	2,61	64,73
	0,063	3,16	78,37	0,071	3,56	88,29
	0,053	2,66	65,97	0,066	3,31	82,09
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$	0,062±0,01	3,11±0,41	77,13±10,23	0,062±0,001	3,12±0,44	77,38±10,92
$\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$			75,51±2,00			76,86±1,18

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 10,0 мл этанола; 2 – в пересчете на основание; 3 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора золпидема, содержащего 10 мкг/мл, равна 0,996.

делы количественного определения, равные соответственно 9,8 мкг, 2,3 мкг, 10,2 мкг при исследовании 5,0 г ткани печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов разработан УФ-спектрофотометрический метод определения залеплона, золпидема и зопиклона. Установлены параметры и валидационные характеристики Z-препаратов при исследовании как стандартных растворов, так и веществ, выделенных из трупной печени. Полученные результаты позволяют рекомендовать метод УФ-СФМ для идентификации и количественного определения Z-препаратов в ткани печени по разработанной нами методике.

Таблица 12.

Данные по экстрагированию из ткани печени разных количеств зопиклона (n=5, P=95%)

Количество залеплона в 5 г печени (мкг)	Оптическая плотность, D	Выход (мкг)	Выход (%)
300[1]	0,559	142,60	47,53
	0,561	143,11	47,70
	0,602	153,57	51,19
	0,576	146,94	48,98
	0,551	140,56	46,85
$\overline{X} \pm \Delta\overline{x}$	0,570±0,025	145,36±6,39	48,45±2,13
150	0,579	73,85	49,23
	0,568	72,45	48,30
	0,555	70,79	47,19
	0,566	72,19	48,13
	0,536	68,37	45,57
$\overline{X} \pm \Delta\overline{x}$	0,561±0,020	71,53±2,58	47,69±1,72
75	0,303	38,65	51,53
	0,310	39,54	52,72
	0,296	37,76	50,35
	0,291	37,12	49,49
	0,285	36,35	48,47
$\overline{X} \pm \Delta\overline{x}$	0,297±0,012	37,88±1,56	50,51±2,08
30	0,104	13,27	44,23
	0,116	14,80	49,33
	0,114	14,54	48,47
	0,128	16,33	54,43
	0,121	15,43	51,43
$\overline{X} \pm \Delta\overline{x}$	0,117±0,011	14,87±1,41	49,58±4,69
$\overline{X} \pm \Delta\overline{x}$			49,06±1,98

Примечания: 1 – сухие остатки растворяли в 10,0 мл этанола; 2 – оптическая плотность рабочего стандартного раствора зопиклона, содержащего 15 мкг, равна 0,588.

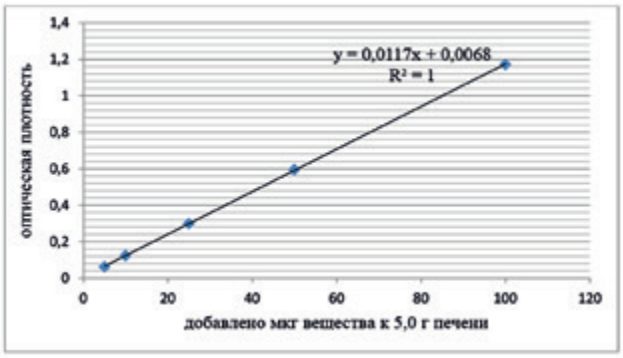


Рисунок 15. График линейной зависимости оптической плотности раствора от количества золпидема, добавленного к трупной печени

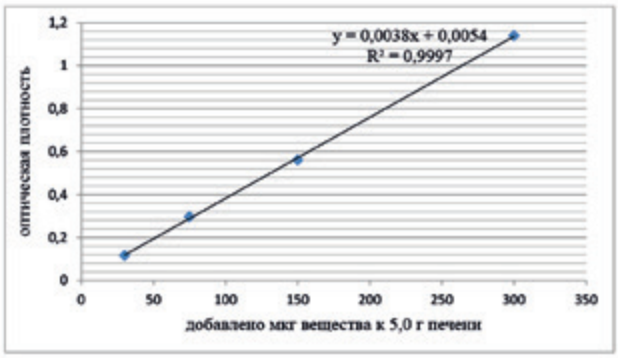


Рисунок 16. График линейной зависимости оптической плотности раствора от количества зопиклона, добавленного к трупной печени

ЛИТЕРАТУРА

1. P.J. Boniface, S.G.G. Russel. Two Cases of Fatal Zopiclone Overdose // J. Analyt. Toxicol. 1996. V. 20. P. 131–133.
2. A.W. Jonas, A. Holgrem. Concentrations of zolpidem and zopiclone in venous blood samples from impaired drivers compared with femoral blood forensic autopsies // Forensic Sci Intern. 2012. V. 222. № 1. P. 118–123.
3. М.Г. Мусина, В.В. Килин, А.А. Мингазов. Смертельное отравление залеплоном // Проблемы экспертизы в медицине. 2010. № 1(2). С. 45–46.
4. В.А. Карташов. Изучение вопросов экстракции лекарственных веществ из биологического материала: дис. … д.фарм.н. – Барнаул. 1990. 316 с.
5. Л.В. Чернова. Изолирование, обнаружение и определение хлорпротиксена, аминазина, амитриптилина и мелипрамина при исследовании биологического материала: дис. … к.фарм.н. – Барнаул. 1990. 219 с.
6. Л.Е. Тимофеева. Химико-токсикологический анализ верапамила: автореферат дис. … к.фарм.н. – Пермь. 1989. 23 с.
7. А.В. Кнауб. Обнаружение кодеина, кофеина, салициловой кислоты, фенацетина, фенобарбитала при комбинированном отравлении // Судеб.-мед. экспертиза. 1998. № 3. С. 95–96.
8. А.С. Ланщиков. Сравнительная оценка методов изолирования хлозепида из печени трупа человека // Судеб.-мед. экспертиза. 1989. № 4. С. 47–48.
9. Г.П. Чепурная. Определение Z-препаратов в трупной крови // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4(13). С. 140-145.
10. Г.П. Чепурная, В.А. Карташов, Л.В. Чернова. Изолирование и определение Z-препаратов в трупной ткани желудка и кишечника // Инновационные технологии в фармации: сб. науч. тр. – Иркутск. 2016. Вып. 3. С. 174–180.
11. Г.П. Чепурная, В.А. Карташов, Л.В. Чернова. Определение Z-препаратов в биологических объектах лабораторных животных // Университетская наука: взгляд в будущее: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвященной 81-летию Курского государственного медицинского университета и 50-летию фарм. фак-та. – Курск. 2016. Т. 3. С. 127–132.

УДК 615.1

АНАЛИЗ СИСТЕМЫ ОРГАНИЗАЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

С.А. Рожнова[1], А.В. Цыпкина[1]*

Резюме. В статье представлена информация об организации процесса фармацевтической разработки. Разработаны и описаны ключевые этапы, стадии и процедуры, составляющие процесс фармацевтической разработки. Представлена и систематизирована методология, используемая на каждом из этапов процесса фармацевтической разработки. Проведен сравнительный анализ методов и установлено, что наименьшее количество методов представлено для отражения процессного подхода к фармацевтической разработке на технологическом этапе и этапе внедрения в производство новых лекарственных препаратов, включая масштабирование. Данные этапы требуют детальной проработки, поскольку нуждаются в больших временных и экономических затратах.

Ключевые слова: фармацевтическая разработка, организация, внедрение, этапы, процесс, методы.

ANALYSIS OF THE SYSTEM ORGANIZATION OF PHARMACEUTICAL DRUG DEVELOPMENT

S.A. Rozhnova[1], A.V. Tsypkina[2]*

Abstract. The article presents information about the organization of the process of pharmaceutical development. Developed and described the key steps, stages and procedures make up the process of pharmaceutical development. Presented and systematized the methodology used at each stage of the process of pharmaceutical development. Comparative analysis of methods and found that the minimum number of methods are presented to reflect the process approach to pharmaceutical development phase and the implementation phase in the production of new drugs, including scaling. These steps require detailed study because they require more time and economic costs.

Keywords: pharmaceutical development, organization, implementation steps, process, methods.

1 – ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» (РНИМУ им. Н.И. Пирогова), Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1

1 – Russian national research medical University named after N.I. Pirogov, 1, Ostrovitjanova str., Moscow, 117997, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: nastenka.tsypkina@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение нового лекарственного препарата (ЛП) в ассортиментный портфель промышленного предприятия является крайне важным, ответственным и сложным процессом, направленным не только на поддержание экономического благополучия производителя за счет повышения рентабельности предприятия, но и на выполнение социальных функций поддержания здоровья населения и национальной безопасности в области лекарственного обеспечения.

Ответственность данного процесса состоит в том, что в ходе фармацевтической разработки (ФР) новый продукт должен приобрести свойства, удовлетворяющие основным требованиям к ЛП – безопасности, эффективности и качеству [10]. В связи с этим к процессу ФР как со стороны регуляторных органов, так и со стороны потенциального потребителя требования достаточно жесткие.

Сложность достижения поставленной цели состоит в том, что часто процессы ФР с последующим внедрением новых ЛП в производство проводятся при отсутствии методического сопровождения.

Одним из средств достижения цели, создания ЛП с надлежащими свойствами, является разработка формализованного методического подхода к процедурам, составляющим процессы ФР и внедрения в производство ЛП.

Организационная индивидуальность каждого промышленного предприятия очевидна. Кроме того, ЛП, разрабатываемые и внедряемые в производство, могут быть самыми разнообразными – от традиционных воспроизведенных лекарственных препаратов до оригинальных, полученных методами инновационных технологий.

Тем не менее объем и требования к результатам ФР установлены действующим законодательством [1–5].

В ноябре 2004 года был разработан проект Q8 Pharmaceutical development (ФР), который был представлен на Международной конференции по гармонизации технических требований к ре-

гистрации ЛП для человека (International Conference of Harmonization, ICH). Согласно данному документу ФР – это комплексные экспериментальные исследования, в рамках которых осуществляется обоснование состава, этапов технологического процесса, условий производства для дальнейшего включения этой информации в регистрационное досье.

Поиск методических подходов по данному направлению продолжается и является актуальным до сих пор, о чем свидетельствуют многочисленные научные публикации и научно-методические труды, посвященные данной теме [6–11]. В настоящее время обсуждается свод правил для исследователей, занимающихся разработкой ЛП, – надлежащая практика исследования. При этом разработанные документы и вступившие в действие нормативно-правовые акты не дают детальной формализации, и решение многих проблем ФР остается на усмотрение разработчика [2, 3].

Необходимо отметить, что вопросы, затрагивающие этапы ФР, предшествующие фармакологическим исследованиям (доклиническим и клиническим), недостаточно отражены в нормах действующего законодательства. Однако биологически активное вещество, прежде чем оно допускается к доклиническим и клиническим исследованиям, проходит длительный, сложный и ответственный путь до статуса ЛП.

Этот период включает процессы, не связанные с фармакологическими исследованиями, а затрагивающие исключительно фармацевтическую сферу исследований. Они выполняются специалистами в области фармацевтической химии, фармацевтической технологии, экономики фармации, фармацевтического права, фармакогнозии, экологии, биологии и занимают значительную часть исследований как по времени, так и по экономико-финансовым затратам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Был использован метод системного анализа для определения и группировки методов, используемых в ходе фармацевтического исследования процесса ФР. Проведена статистическая оценка выявленных методов, результаты обработаны с помощью программы Microsoft Excel и представлены в процентном соотношении в виде диаграмм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было проведено исследование публикаций российских и зарубежных авторов по отчетам ФР ЛП [6–52]. Сведений о систематизации и формализации данных процессов нами в исследуемых источниках не обнаружено. В связи с этим мы посчитали актуальным проведение целенаправленного анализа данных работ и используемой в них методологии с целью систематизирования этапов и постадийной формализации порядка выполнения данного процесса.

Был проведен анализ более пятидесяти научных публикаций, опубликованных за период 2004–2016 г. по данному направлению. В ходе исследования решались задачи по систематизации этапов ФР и анализу методов исследования, используемых на каждом из них.

Процесс ФР рассмотрен как совокупность процессов цикла от создания молекулы до подготовки регистрационного досье на ЛП для проведения его государственной регистрации и включения в Государственный реестр лекарственных средств для медицинского применения (ГРЛС), за исключением этапов проведения доклинических и клинических исследований.

В результате проведенного анализа процесс ФР был разделен на этапы и составляющие их процедуры, представленные в таблице 1.

Изучение методологии процессов, составляющих ФР, выявило многообразие методов, используемых в данном научном направлении. Было определено более пятнадцати часто встречающихся методов, описанных авторами. Для проведения сравнительного анализа данное количество нами были условно приняты за 100%.

Было установлено, что на аналитическом этапе использовались следующие методы: маркетинговый анализ [11–17], экономический анализ [15–17], метод анкетирования [24, 25]. Объединив перечисленные выше методы в одну группу, определили ее как первую. Данная группа методов позволяет провести как юридическую, так и экономическую экспертизу проекта [15–17], а также оценить экономическую целесообразность создания ЛП [15, 25] и изучить ценовые секторы ЛП на фармацевтическом рынке [18–20]. Кроме того, использование данных методик на аналитическом этапе ФР позволяет оценить ряд других показателей, необходимых для детализации и общей оценки ресурсов на данном этапе.

Одним из показателей, для оценки которого использовались вышеприведенные методы, является показатель соотношения доли анатомо-терапевтических групп ЛП в объеме аптечных продаж. Чаще всего этот показатель использовался для оценки экономической рентабельности проведения исследований и начала разработки ЛП. Он характеризует реальный спрос на ЛП данной группы, следовательно, доказывает целесообразность ее присутствия в ассортименте коммерческого предприятия. Для его определения применены методы маркетингового и контент-анализа. Так, в работе Т.И. Акафьевой, М.А. Земляновой (2013 г.) метод применялся для исследования рынка ЛП РФ за период до 2011 г. [11]. В работе И.К. Петрухина и др. (2014 г.) метод использовался в сочетании с экономическим анализом при изучении ассортиментного ряда комбинированных противогриппозных ЛП [12].

Таблица 1.

Этапы и процедуры ФР

Этап	Название	Процедуры
I	Аналитический	• маркетинговый анализ фармацевтического рынка с целью оценки востребованности нового ЛП; • анализ жизненного цикла ЛП; • анализ экономических затрат для реализации проекта; • анализ потенциальных механизмов продвижения нового ЛП при выведении его в обращение; • анализ конкурентов; • анализ потребительских свойств ЛП; • юридическая экспертиза; • анализ подготовленности персонала; • технологический анализ;
II	Планирование внутренних ресурсов	• планирование организации процессов, этапов, стадий, процедур; • определение лиц, ответственных за реализацию этапов ФР; • экономическое планирование ресурсов предприятия для проведения ФР на каждом этапе; • планирование подготовки персонала к ФР;
III	Технологический	• математическое моделирование и синтез новых биологически активных молекул с заданными свойствами; • разработка и/или усовершенствование лекарственной формы и состава ЛП; • выбор и обоснование состава ЛП; • изучение физико-химических свойств вспомогательных веществ ЛП в части их физической, химической и фармацевтической совместимости и совместимости с действующими веществами; • определение лекарственной формы фармацевтической субстанции, позволяющей сохранить свою стабильность при установленных в результате экспериментальных исследований условиях хранения; • отработка технологии изготовления ЛП в лабораторных условиях; • формирование лабораторного регламента в части технологии изготовления ЛП; • определение условий хранения и сроков годности ЛП; • выбор упаковочных материалов, обеспечивающих оптимальные условия хранения фармацевтической субстанции; • изготовление опытных лабораторных образцов ЛП и отработка методов контроля качества; • выбор технологического оборудования для производства ЛП; • определение критических точек и стадий производства ЛП; • валидация критических стадий производства ЛП; • разработка основ обеспечения качества производства ЛП; • проведение государственной регистрации упаковочных материалов в установленном порядке (при необходимости);
IV	Установление показателей качества ЛП, норм и методов контроля	• установление показателей качества ЛП; • разработка методов контроля показателей качества ЛП и валидация аналитических методик; • выбор аналитического оборудования для контроля качества ЛП; • формирование лабораторного регламента в части контроля качества ЛП;
V	Перенос технологий	• перенос (трансферт, масштабирование) процедур изготовления ЛП в лабораторных условиях в условия промышленного производства; • обучение и тренинг персонала; • формирование опытно-пускового регламента производства ЛП;
VI	Фармакологический	• доклинические исследования опытных образцов ЛП; • клинические исследования опытных образцов ЛП;
VII	Документирование	• оформление отчетов о проведенных лабораторных исследованиях по выбору состава ЛП, технологии производства; • оформление отчетов о проведенных исследованиях, показателях качества и методах их контроля; • оформление отчетов о проведенных исследованиях, установление условий хранения и транспортировки, срока годности ЛП и особенностей уничтожения; • оформление отчетов о проведенных доклинических исследованиях; • формирование, согласование и утверждение промышленного регламента и инструкций по его выполнению; • формирование регистрационного досье на ЛП.

Установлено, что методы экономического анализа использованы в научных исследованиях на аналитическом этапе для обработки информации о финансово-хозяйственной деятельности хозяйствующих субъектов. Метод помог авторам провести оценку различных параметров деятельности организации – перспектив разработки и выпуска импортозамещающих ЛП в рамках реализации проектов кластерной политики [12], а также проанализировать стратегические возможности развития регионального фармацевтического рынка ЛП (И.В. Спичак, О.Г. Панкратова, 2009 г.) [14].

Часто применяемые на аналитическом этапе маркетинговые исследования используются при изучении структуры, динамики фармацевтического рынка и влияния отдельных факторов на его развитие, а также позволяют в полной мере провести исследования и обобщить выводы, полученные Н.А. Андреевой (2011 г.) и А.А. Котвицкой (2013 г.). Метод был включен рядом авторов в алгоритм исследований структуры и динамики развития фармацевтического рынка [19–26].

Проведенный анализ показал использование и достаточно редких методов исследований на аналитическом этапе ФР. Так, метод экспертных оценок был использован в работе И.Н. Совершенного и др. (2011 г.) для определения позиции наиболее эффективных и безопасных снотворных ЛП с целью оценки проблемы на основе мнения специалистов (экспертов) и принятия последующего решения о формировании ассортиментного портфеля организации [21].

Положительными свойствами метода являются возможность изучить мнения высококомпетентных специалистов по ряду показателей, позволяющих всесторонне рассмотреть научную или научно-практическую проблему. Причиной достаточно редкого использования метода экспертных оценок в работах по изучаемому направлению может быть трудоёмкость, многоэтапность процесса.

Часто на аналитическом этапе изучается такой показатель, как конкурентоспособность ЛП, с использованием методов системного анализа, сравнительного анализа при проведении доклинических и клинических исследований ЛП, а также методов доказательной фармакотерапии и фармакоэкономики. Так, П.В. Лопатин и др. (2004 г.) использовали метод системного анализа для построения открытой синтетической графической модели процесса разработки ЛП и выведения его на рынок [22].

Показатель конкурентоспособности изучался также с помощью метода контент-анализа, который использован Н.А. Андреевой (2011 г.) для анализа рынка седативных ЛП и Л.Н. Геллер (2012 г.) – для комбинированных противогриппозных ЛП, что позволило выявить основные тенденции в развитии группы ЛП за последние 10 лет [25].

Метод анкетирования относится к категории социологических методов и является достаточно популярным у исследователей в области ФР. В качестве средства для сбора первичных сведений от респондента используется специально оформленный список вопросов в форме анкеты направленного действия. Вопросы анкеты помогают четко сформировать представление об интересующих исследователя аспектах. В изученных работах анкетирование проводилось с целью оценки ассортиментного портфеля предприятия и факторов, которые влияют на количество продаж для различных типов потребителей [21–25]. Работы А.С. Шаблакова (2014 г.) и О.В. Базаркиной (2008 г.), для определения показателей конкурентоспособности ЛП на фармацевтическом рынке могут служить примером использования метода анкетирования [23].

Практически все результаты научно-исследовательской работы требуют визуализации и наглядной подачи полученного материала. Для этого используются графические методы, которые были выделены в отдельную группу. Графический метод был отмечен как самый популярный в изученных публикациях. Он использован множеством авторов для представления полученных результатов при изучении рынка ЛП [20, 23, 25]. Метод направлен на оформление полученных данных в виде диаграмм, рисунков и наглядных схем, что позволяет продемонстрировать результаты исследования в абсолютных и в относительных показателях, а также провести визуализированный сравнительный анализ. При правильном построении графика статистические показатели привлекают к себе внимание, становятся выразительными, лаконичными и запоминающимися. В настоящее время практически все публикации, касающиеся фармацевтической разработки, оформляются с использованием графического метода. Он был применен авторами как на аналитическом этапе для построения диаграмм, так и на технологическом, а также на этапе переноса технологий [21–26].

На этапе планирования ФР авторами публикаций была применена вторая группа методов исследования: методы технико-экономического планирования, бизнес-планирования, экономического прогнозирования. Они направлены на разработку технико-экономического обоснования, планирование основных ресурсов предприятия, разработку бизнес-плана, планирование бюджета научных исследований, а также на разработку оперативных, стратегических и тактических планов для достижения поставленных целей. Данные методы использованы в работах Е.О. Тальц (2015 г.) для определения затрат производителей на вывод дженериковых ЛП на фармацевтический рынок [26].

Проведенное исследование показало, что в настоящее время этап планирования ФР в рассмотренных публикациях описан недостаточно, несмотря на то, что от качества планирования исследования во многом зависит его результативность.

Изучение отчетов о проведенных исследованиях на технологическом этапе ФР, сопряженном с научно-исследовательской работой по изучению технологических аспектов, с разработкой схем производства, показало, что наиболее часто авторами используются фармако-технологические методы, например модельных систем *in vitro*; тест на распадаемость; тест на растворение, тесты динамики и кинетики высвобождения активных фармацевтических ингредиентов (АФИ), сравнительного анализа высвобождения, биодоступности, биоэквивалентности, корреляционного анализа кинетики высвобождения *in vitro* и *in vivo* [27–33]. Представлен ряд работ по моделированию процессов. Примером процессного подхода при создании инновационных биотехнологических препаратов могут служить работы (Ю.В. Власенко 2016 г.) [32–35]. Методы, используемые на технологическом этапе, были отнесены к третьей группе.

Выявлено, что на этапе исследования и определения показателей качества ЛП и отработки методов их контроля используются аналитические методы химического контроля (например, метод градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии DART, высокоэффективной жидкостной хроматографии и др.) и технологического контроля [37–44] (четвертая группа).

Этап переноса пилотных технологий ФР из лаборатории в условия фармацевтического серийного производства включает разработку лабораторного регламента по ФР ЛП, перенос (трансферт, масштабирование) процедур изготовления ЛП в лабораторных условиях в условия промышленного производства, разработка опытно-пускового регламента производств ЛП, а также разработка, согласование и утверждение промышленного регламента производства ЛП. На этапе масштабирования проводится серийное производство опытных образцов ЛП, соответствующих установленным требованиям по качеству. Для решения поставленных задач отечественными и зарубежными исследователями использовались технологические методы и методы моделирования процессов [45–52], отнесенные к пятой группе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в результате исследования данные позволили сгруппировать методы, используемые в ходе ФР ЛП, в соответствии с этапами разработки. Рассмотрена методология для следующих этапов: аналитического, планирования внутренних ресурсов, технологического, установления показателей качества ЛП и этапа переноса технологий (таблица 2).

Проведен сравнительный анализ методов, используемых при ФР ЛП, которые представлены в таблице выше. Исследования показали, что методы, отнесенные к I группе, составляют 33% от всех методов, используемых в ходе ФР, ко II и III группе – 25% и 12% соответственно, методы, отнесенные к IV и V группам, составили 17% и 13% соответственно от всего объема изученных в ходе исследования методов.

Исследование показало, что этап планирования ФР практически не описан авторами исследований в части методологии, несмотря на то, что данный этап является одним из важнейших, так как определяет последовательность и порядок выполнения процессов и процедур при проведении ФР, сроки выполнения, управление персоналом и многие другие составляющие управления процессами.

Полученные результаты представлены на диаграммах на рисунках 1 и 2.

Установлено, что наименьшее количество методов представлено для отражения процессного подхода к ФР на технологическом этапе, этапе внедрения в производство новых ЛП, включая масштабирование. Названные этапы ФР ЛП требуют особого внимания и более глубокого изучения в части методического подхода.

Таблица 2.

Систематизация методов, используемых на этапах ФР ЛП

№ п/п	Этап	Методы анализа
1	Аналитический этап	• экономический анализ; • маркетинговый анализ; • анкетирование; • контент-анализ; • метод экспертных оценок; • графический метод;
2	Этап планирования	• технико-экономическое планирование; • экономическое прогнозирование; • бизнес-планирование;
3	Технологический этап	• технологические методы; • метод моделирования; • методы химического синтеза;
4	Установление показателей качества ЛП, норм и методов контроля	• аналитические методы химического анализа; • аналитические методы физического контроля;
5	Перенос технологий	• технологические методы; • моделирование процессов.

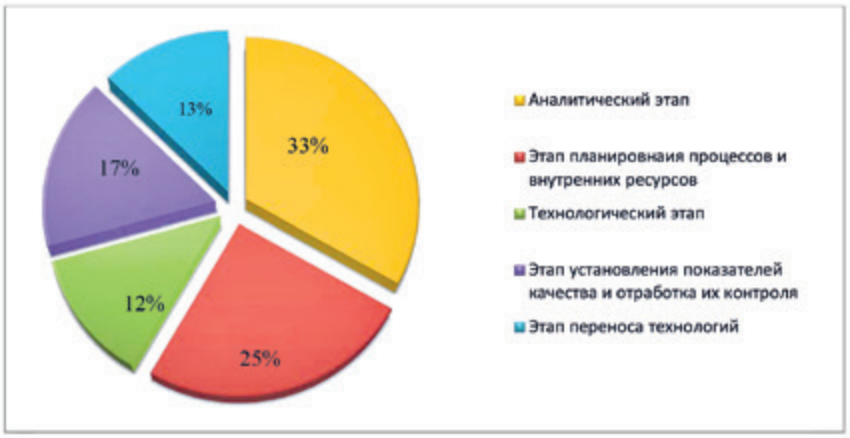


Рисунок 1. Распределение методологии в соответствии с этапами ФР

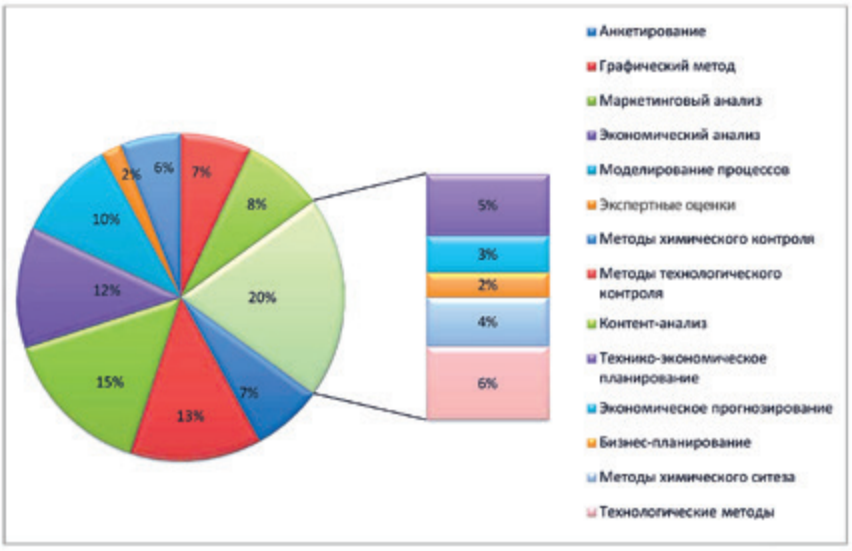


Рисунок 2. Методология изучения этапов процесса ФР ЛП

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Минздравсоцразвития России от 23 ноября 2011г. № 1413н «Об утверждении Методических рекомендаций по содержанию и оформлению необходимых документов, из которых формируется регистрационное досье на ЛП для медицинского применения в целях его государственной регистрации».
2. Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».
3. Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики».
4. Приказ Минздрава России от 21.09.2016 № 725н «Об утверждении административного регламента Министерства здравоохранения Российской Федерации по предоставлению государственной услуги по государственной регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения».
5. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
6. Н.Б. Демина. Фармацевтическая разработка: обзор оборудования для лабораторной разработки и наработки опытных партий твердых лекарственных форм // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 14(1). С. 38–48.
7. А.Ф. Хохлов, Б.В. Бровченко, А.А. Смирнов. Разработка и регистрация комбинированного лекарственного препарата для лечения ВИЧ-инфекции на основе нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) – фосфазида и ламивудина // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 14(1). С. 48–62.
8. Н.В. Пятигорская, А.Д. Чикин, Э.А. Сапожникова, Н.С. Ивашечкова. Руководства процессно-аналитической технологии (PAT) – основа для современных фармацевтических исследований, производства и гарантии качества, история возникновения // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 4(3). С. 48–54.
9. С.Н. Быковский, И.А. Василенко, Н.Б. Демина. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. И.Е. Шохина, О.В. Новожилова, А.П. Мешковского, О.Р. Спицкого. – М.: Изд-во Перо, 2015. 472 с.
10. А.В. Александров, Н.В. Дьшька, В.А. Жулинский, Н.В. Карпенко. Авторский перевод гармонизированного трехстороннего руководства ICH Q8 «Фармацевтическая разработка». – К.: Виалек, 2008. 44 с.
11. Т.И. Акафьева, М.А. Землянова. Анализ фармацевтического рынка российской федерации // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. 2013. № 1. С. 63–65.
12. И.К. Петрухина, В.А. Куркин. Оценка перспектив разработки и выпуска импортозамещающих лекарственных препаратов в рамках реализации проектов кластерной политики // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. № 5(4). Т. 16. С. 1531–1533.
13. Е.А. Рослякова. Экономический анализ состояния и развития мировой фармацевтической отрасли в условиях процесса глобализации // Журнал Вестник Омского университета. Серия Экономика. 2015. № 1. С. 42–47.
14. И.В. Спичак, О.Г. Панкратова. Анализ стратегических возможностей развития регионального фармацевтического рынка лекарственных средств для лечения отита // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2009. № 12(67). Т. 8. С. 60–66.
15. Н.А. Андреева, О.Г. Ивченко, Т.И. Кабакова. Маркетинговый анализ рынка лекарственных препаратов седативного действия // Фундаментальные исследования. Раздел: Фармацевтические науки. 2011. № 10 (часть 3). С. 604–607.
16. А.Е. Белова. Маркетинговые исследования рынка лекарственных средств. – Новосибирск. 2006. URL: http://cprsob.ru. (дата обращения 10.03.2017).
17. Т.И. Нужнова, Я.В. Грибова. Система маркетинговых исследований лекарственных препаратов. Основные маркетинговые стратегии. – Казань. URL: http://mfvt.ru (дата обращения 15.03.2017).
18. А.А. Лин, Б.И. Соколов, А.С. Орлов. Фармацевтический рынок: сегмент клинических исследований лекарственных препаратов // Проблемы современной экономики. 2015. № 1(53). С. 288–293.
19. И.К. Петрухина, В.А. Куркин, Т.К. Рязанова. Исследование номенклатуры

офтальмологических лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке российской федерации // Фундаментальные исследования. 2014. № 9(6). С. 1264–1268.

20. А.А. Котвицкая, О.И. Красуля. Маркетинговый анализ рынка препаратов, которые применяются для лечения инфаркта миокарда. Национальный фармацевтический университет Украины // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2013. № 4(147). Вып. 21. С. 208–213.

21. И.Н. Совершенный, Н.Б. Дремова Современные концепции развития ассортимента снотворных средств на российском и региональном рынках // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2011. № 22(117). Т. 16(2). С. 147–154.

22. П.В. Лопатин, Н.Б. Лопатина. Методические подходы к сравнительной оценке конкурентоспособности лекарственных средств на разных этапах их разработки и продвижения на рынок // Российский биотерапевтический журнал. 2004. № 2. Т. 3. С. 71–72.

23. А.С. Шаблакова, А.Ю. Петров. Маркетинговая оценка позиционирования противовирусных средств // Фундаментальные исследования. – Екатеринбург. 2012. С. 204–206.

24. О.В. Базаркина, А.Н. Ибрагимова. Маркетинговый подход к изучению потребителей антацидных и противоязвенных лекарственных препаратов // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2008. № 4. С. 25–29.

25. Л.Н. Геллер, М.П. Лапшина, В.В. Тыжигирова. Позиционирование комбинированных противогриппозных лекарственных препаратов на региональном фармацевтическом рынке // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2012. № 3. Т. 110. С. 92–93.

26. Е.О. Тальц, Ю.С. Вербицкая. Вывод дженерических препаратов на фармацевтический рынок. Universum: Экономика и юриспруденция. 2015. № 7(18). С. 6.

27. С.А. Скатков. Эффективность и безопасность лекарств или чему служит биофармация // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 1(2). С. 14–19.

28. С.Н. Гуреева. Фармацевтическая разработка и внедрение в промышленное производство инновационных твердых лекарственных форм // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2014. № 24(195). Т. 28. С .39–43.

29. М.А. Барышникова, О.Л. Орлова, З.С. Шпрах. Разработка новой лекарственной формы галавита в виде сублингвальных таблеток // Российский биотерапевтический журнал. 2006. № 1. Т. 5. С. 86–90.

30. Р.А. Абрамович, О.А. Ваганова, Е.А. Суворова, Т.Н. Самсонова. Разработка новой лекарственной формы с преднизолоном суппозитории ректальные // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2004. № 4. С. 188–202.

31. С.В. Первушкин, В.А. Куркин, М.О. Тархова. Исследования по созданию нового лекарственного средства суппозиториев с биомассой *Spirulina platensis* // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. № 5(2). Т. 16. С. 1008–1012.

32. Ю.В. Власенко. Проектно-ориентированный подход к разработке готовых лекарственных средств на примере дженерикового многокомпонентного препарата, содержащего амоксициллин и клавулановую кислоту // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 14(2). С. 52–53.

33. Т.А. Скотникова, Л.А. Неминущая, Н.К. Еремец. Проектный подход в создании инновационных биотехнологических препаратов // Вестник Казанского технологического университета. 2012. № 4. Т. 15. С. 82–86.

34. А.В. Яницкая, И.Ю. Митрофанова, Д.В. Бутенко. Новый методологический подход поиска и скрининга новых лекарственных растений на базе информационных технологий // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2012. № 4(44). С. 97–100.

35. К.В. Песков. Математическое моделирование при разработке лекарств // Вестник Росздравнадзора. 2013. № 1. С. 57–60.

36. Е.Т. Жилякова, Е.Ю. Тимошенко. Разработка состава и технологии нового офтальмологического лекарственного средства на основе мирамистина // Вестник новых медицинских технологий. 2007. № 4. Т. XIV. С. 143–144.

37. И.А. Салахов, С.Ю. Гармонов, Р.Н. Исмаилова. Контроль качества лекарственного препарата Антигриппина методом градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии // Вестник Казанского технологического университета. 2009. № 4. С. 50–57.

38. В.А. Ивлев, А.С. Прокопьев, Г.А. Калабин. Количественная спектроскопия ЯМР в идентификации и контроле качества лекарственных препаратов и растительных биологически активных композиций // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. 2015. № 1. С. 5–14.

39. А.А. Зинченко, О.О. Новиков, Е.Т. Жилякова. Контроль качества инфузионных лекарственных препаратов. Спектрофотометрическая методика обнаружения и количественного определения сероуглерода // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2015. № 16(213). Т. 31. С. 230–235.

40. Т.Е. Елизарова, М.А. Морозова, Т.В. Плетенева. Спектрометрия в ближней инфракрасной области как метод контроля качества лекарственных средств // Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке». 2010. № 10. Т. 12. С. 492–493.

41. П.М. Карлов, Л.Е. Сипливая. Анализ фторхинолонов в субстанциях, лекарственных формах и биожидкостях // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2009. № 1. С. 143–148.

42. Р.А. Абрамович, Е.С. Чернецова. Масс-спектрометрия DART: быстрый скрининг таблетированных лекарственных препаратов на наличие действующего вещества // Вестник Росздравнадзора. 2010. № 2. С. 51–53.

43. Г.Б. Голубицкий. Анализ многокомпонентного лекарственного препарата от простуды методом градиентной ВЭЖХ // Кубанский научный медицинский вестник. 2009. № 3. С. 26–29.

44. В.В. Гончарук, А.В. Сыроешкин, А.Н. Смирнов. Новые лазерные методы определения подлинности и контроля качества лекарственных средств // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2006. № 2. С. 14–18.

45. K.K. Midha, G. McKay. Bioequivalence; its history, practice, and future // AAPS J. 2009. № 11(4). P. 664–670.

46. D. Carpenter, D. Tobbel. Bioequivalence: the regulatory career of pharmaceutical concept // Bull Hist Med. 2011. № 85(1). P. 93–131.

47. Steady Growth in Drug and Device Markets for Pain Management. Market Research Report. BCC Research LLC. 2015.

48. M.C. Rogge, D.R. Taft. Preclinical Drug Development- Taylor and Francis Group, LLC. 2005. P. 597.

49. Guidance for Industry: Development and Use of Risk Minimization Action Plans. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2005.

50. Guidance for Industry: Computerized Systems Used in Clinical Investigations. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. – Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2007.

51. M. Choi, H. Choi. Foresight for science and technology priority setting in Korea // Foresight and STT Governance. 2015. V. 9. P. 54–67.

52. S.L. Chen, J. Yan, F.S. Wang. Two topical calcineurin inhibitors for the treatment of atopic dermatitis in pediatric patients: a meta-analysis of randomized clinical trials / Педиатрическая фармакология. 2011. № 1. Т. 8. С. 144–156.

NEW!

Мобильное устройство для эффективной очистки стаканов после тестирования растворения

DVC-24

EXCLUSIVE DISTRIBUTION

Устройство очистки стаканов для растворения:

- Уникальная запатентованная система очистки паром
- 20 s — Выход на рабочий режим менее чем за 7 минут и всего 20 секунд на очистку одного стакана
- Универсальный адаптер для стаканов любых производителей
- OQ-валидация
- OQ-валидация



Закажите живую демонстрацию прибора в Вашей лаборатории по телефону +7 499 110 90 60

ООО "ЭРВЕКА"
Представительство ERWEKA GmbH в России
E-mail: sales@erweka-russia.ru
Tel.: +7 499 110 90 60

115114 Москва, ул. Летниковская 16 - 103

ERWEKA
www.erweka.com

УДК 615.453.6

ТАБЛЕТКИ. НОРМАТИВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ XIII ИЗДАНИЯ

Н.В. Исаева[1], А.И. Тулайкин[1]*, Е.В. Шешегова[1]

Резюме. Проведен сравнительный анализ фармакопейных требований для лекарственной формы «таблетки» в связи с введением в действие Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания. Обзор изменений необходим при пересмотре (переиздании) фармакопейных статей и нормативной документации для лекарственных препаратов в форме таблеток.

Ключевые слова: таблетки, Фармакопея, контроль качества, нормативная документация, требования к качеству, фармакопейные требования.

TABLETS. REGULATORY REQUIREMENTS OF THE STATE PHARMACOPOEIA XIII EDITION

N.V. Isaeva[1], A.I. Tulaykin[1]*, E.V. Sheshegova[1]

Abstract. Comparative analysis of pharmacopoeial requirements for dosage forms tablets has been made due to the introduction of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition. An overview of changed requirements can be useful for revision (reissue) of monographs and normative documentation for tablets.

Keywords: tablets, Pharmacopoeia, quality control, normative documentation, quality requirements, pharmacopoeial requirements.

1 – ООО «Медицинский научно-производственный комплекс «БИОТИКИ», 115404, Россия, г. Москва, ул. 6-я Радиальная, 24, стр. 14

1 – LLC «Medical Scientific and Production Complex «BIOTIKI», 24/14, 6th Radial'naya str., Moscow, 115404, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: alexandr._t@mail.ru
Тел.: 8 (495) 327 49 43

ВВЕДЕНИЕ

Фармакопея представляет собой свод общих фармакопейных статей на методы анализа лекарственных средств, общие требования к лекарственным формам и методам их испытаний и фармакопейных статей – стандартов качества конкретных лекарственных средств.

Работы по созданию отечественной Фармакопеи начались в России с середины XVIII века. В 1765 году вышла первая фармакопея в России. Она была издана на латинском языке и касалась только качества лекарственных средств, используемых в военных госпиталях.

Первое официальное издание фармакопеи на русском языке вышло в 1866 году. С тех пор работа по обновлению, дополнению, совершенствованию и переизданию продолжается вплоть до настоящего времени.

До 2016 года на территории России действующими являлись Государственная фармакопея СССР X издания, Государственная фармакопея СССР XI издания (выпуски 1 и 2) [1, 2] и Государственная фармакопея Российской Федерации XII издания (том 1) [3] .

ГФ СССР X издания вышла в 1968 году и была наиболее полной, включала общие фармакопейные статьи, фармакопейные статьи на фармацевтические субстанции и лекарственные препараты различного происхождения, лекарственное растительное сырье.

Выпуски 1 и 2 ГФ СССР XI издания (ГФ XI) вступили в действие в 1986 и 1989 году соответственно и включали общие фармакопейные статьи и фармакопейные статьи на отдельные виды лекарственного растительного сырья.

В 2007 году был издан 1-й том Государственной фармакопеи Российской Федерации XII издания (ГФ XII), включавший общие фармакопейные статьи на отдельные методы анализа и фармакопейные статьи на фармацевтические субстанции синтетического происхождения.

Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издания (ГФ XIII) [4] введена в действие с 1 января 2016 года. Одной из ее основных задач была унификация требований к качеству лекарственных средств, находящихся в обращении на территории Российской Федерации с учетом гармонизации с требованиями аналогичных монографий ведущих зарубежных фармакопей.

Нормативно-правовой базой послужил приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 октября 2015 г. № 771 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей» [5], а также приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21 ноября 2014 г. № 768 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей» [6] и приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 октября 2015 г. № 770 «О внесении изменений в приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21 ноября 2014 г. № 768 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей» [7].

В приказе № 771 установлены сроки приведения нормативной документации в соответствие с фармакопейными статьями и общими фармакопейными статьями ГФ XIII. Нормативная документация на ранее зарегистрированные лекарственные препараты для медицинского применения и лекарственные препараты, которые представлены на государственную регистрацию до введения в действие общих фармакопейных статей, утвержденных настоящим приказом, подлежит приведению в соответствие с общими фармакопейными статьями до 1 января 2019 года. А нормативная документация на лекарственные препараты, для которых в ГФ XIII имеются фармакопейные статьи, должна быть приведена в соответствие до 1 января 2018 года.

Требования Фармакопеи обязательны к исполнению для всех организаций в России, занимающихся производством, изготовлением, хранением и применением лекарственных средств. ГФ XIII является инструментом для обеспечения и поддержания качества лекарственных средств посредством предоставления нормативных требований и стандартизированных процедур анализа, предназначенных для последующей оценки качества действующих и вспомогательных веществ, лекарственных форм, фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов.

Текст ГФ РФ XIII представлен в трех томах. В новом издании Фармакопеи впервые вводятся 99 общих фармакопейных статей (ОФС), в том числе 30 ОФС – на методы анализа, 5 ОФС – на лекарственные формы, 12 ОФС – на методы определения фармацевтико-технологических показателей, ряд новых ОФС для групп биотехнологических лекарственных препаратов и лекарственного растительного сырья. В состав ГФ XIII вошли 20 новых фармакопейных статей.

Внесены многочисленные изменения и дополнения в ранее утвержденные ОФС и фармакопейные статьи.

Среди достаточно большого количества лекарственных форм одной из наиболее популярных и распространенных являются таблетки. В тексте статьи более подробно рассмотрим фармакопейные требования для данной лекарственной формы.

ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА «ТАБЛЕТКИ»

В ГФ XIII впервые вошла ОФС.1.4.1.0001.15 «Лекарственные формы». В ней рассматривается перечень основных лекарственных форм, приводятся общие требования к их производству, показателям и методам оценки качества. Согласно данной ОФС независимо от лекарственной формы к обязательным для оценки качества показателям относятся «Описание», «Подлинность», «Количественное определение», «Микробиологическая чистота» (для всех нестерильных лекарственных форм).

Следует также отметить, что, согласно ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» (ГФ XIII) отдельно указаны требования для биологических и биотехнологических препаратов (вакцины, бактериофаги, пробиотики) в лекарственной форме «таблетки»; изменены требования к лекарственным препаратам для детей. В частности, имеются рекомендации по введению более жестких норм на препараты для детей (в отличие от ГФ XII, ОФС.42-0067-07, где более жесткие нормы являются обязательными); уточнено нормирование микробиологических показателей в зависимости от возрастной группы. В отдельную группу с более строгими нормами выделены препараты пробиотиков для детей.

Непосредственные требования к лекарственной форме «таблетки» приводятся в ОФС.1.4.1.0015.15 «Таблетки», которая была введена взамен ГФ X, ст. 654, и ГФ XI , вып. 2 (статья «Таблетки).

ОФС приводит возможные варианты таблеток, их классификацию, общие особенности технологии, испытания, показатели качества, подлежащие контролю при производстве и выпуске в обращение лекарственного препарата.

В основу классификации таблеток положены технологические подходы (наличие оболочки, способ получения) и фармацевтические особенности (путь введения, способ применения, скорость и характер высвобождения действующего вещества) [4, 8].

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТАБЛЕТОК

С момента выхода фармакопей предыдущих изданий технология производства таблеток совершенствовалась и менялась, что нашло отражение в соответствующем разделе ОФС.1.4.1.0015.15. Так, статья «Таблетки» ГФ XI указывает на способ производства данной лекарственной формы – прессование и наращивание (для таблеток, покрытых оболочкой). ГФ XIII, кроме наиболее распространенного метода прессования (прямого прессования или с применением влажного или сухого гранулирования), также приводит методы формования и лиофилизации, отдельно вы-

деляется стадия нанесения оболочки, которая, помимо ранее упомянутого способа наращивания, может быть осуществлена путем прессования и пленочного покрытия.

Вспомогательные вещества, применяемые при производстве таблеток, разделены по группам назначения – разбавители, разрыхлители (дезинтегранты), связующие вещества, вещества, способствующие скольжению. Сохранены требования к содержанию полисорбата-80 (твина80), стеариновой кислоты, кальция или магния стеарата – оно не должно превышать 1% от массы таблетки, содержание талька – не более 3%, аэросила – не более 10%. Однако пределы их содержания даны в виде рекомендаций в отличие от ГФ XI, где данные ограничения являлись обязательными, за исключением отдельных обоснованных и указанных в частных статьях случаев.

Раздел дополнен классификацией по группам и характеристиками вспомогательных веществ, применяемых для нанесения оболочек и получения покрытий.

ФАРМАКОПЕЙНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА

По сравнению с требованиями ГФ XI и ГФ XII [1–3, 9] с выходом ГФ XIII [4] в нормативных требованиях к контролю качества таблеток произошли некоторые изменения. Далее рассмотрим основные из них.

Описание. В отличие от ГФ XI нанесение риски на таблетки диаметром 9 мм и более является лишь рекомендацией, а не требуется в обязательном порядке.

Однородность массы. По данному показателю произошли изменения. Ранее, согласно ГФ XI, контроль осуществлялся по показателю «Средняя масса таблеток».

Согласно ОФС «Лекарственные формы» (ГФ XIII) дозированные лекарственные формы, в том числе в однодозовой индивидуальной упаковке, должны выдерживать испытание однородности массы для единицы дозированной лекарственной формы. Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм». При наличии испытания на однородность дозирования контроль однородности массы не требуется. Согласно ОФС нормы по данному показателю изменились.

Сравнительные данные допустимых отклонений в массе отдельных таблеток согласно ГФ XI и ГФ XIII представлены в таблице 1.

То есть при сопоставимых нормах отклонений была изменена градация по массе таблеток.

Прочность на истирание. ОФС.1.4.2.0004.15 «Истираемость таблеток» введена взамен статьи ГФ XI, вып. 2 («Определение прочности таблеток на истирание»). Определение проводят в соответствии с требованием ОФС в рамках контроля технологического процесса производства таблеток. Наряду с ранее применявшейся единственной методикой, использующей прибор в виде барабана диаметром 200 мм с 12 лопастями, в ГФ XIII введены 2 методики и 2 варианта прибора для проведения испытаний: в виде барабана с 12 лопастями (как ранее) и в виде барабана диаметром 287 мм с одной изогнутой лопастью (аналогичного описанному в ведущих зарубежных фармакопеях).

Согласно ГФ XI расчет значения прочности таблеток на истирание в процентах вычисляется по формуле:

$$П = 100 – ((P_{нач} – P_{кон}) / P_{нач}) \times 100,$$

где $P_{нач}$ и $P_{кон}$ – масса таблеток до и после испытания в граммах. Прочность на истирание должна быть не менее 97%.

По требованиям ГФ XIII истираемость выражают потерей в массе, вычисленной в процентах от исход-

Таблица 1.

Допустимые отклонения в массе отдельных таблеток

Дозированная лекарственная форма		Масса таблетки		Норма	
ГФ XI	ГФ XIII	ГФ XI	ГФ XIII	ГФ XI	ГФ XIII
Таблетки	Таблетки без оболочки и таблетки, покрытые пленочной оболочкой	Менее 0,1 г	80 мг и менее	Для 18 из 20 таблеток ±10%; для 2 таблеток ±20%	Для 18 из 20 таблеток ±10%; для 2 таблеток ±20%
		Более 0,1 г и менее 0,3 г	Более 80 мг, но менее 250 мг	Для 18 из 20 таблеток ±7,5%; для 2 таблеток ±15%	Для 18 из 20 таблеток ±7,5%; для 2 таблеток ±15%
		0,3 г и более	250 мг и более	Для 18 из 20 таблеток ±5%; для 2 таблеток ±10%	Для 18 из 20 таблеток ±5%; для 2 таблеток ±10%
		Для всех случаев	Для всех случаев	Для 18 из 20 таблеток ±15%; для 2 таблеток ±30%	Для 18 из 20 таблеток ±15%; для 2 таблеток ±30%
Покрытые таблетки, полученные методом наращивания	Таблетки с оболочкой, полученной методом дражирования	Менее 0,1 г	80 мг и менее	Для 18 из 20 таблеток ±10%; для 2 таблеток ±20%	Для 18 из 20 таблеток ±10%; для 2 таблеток ±20%

ной массы испытуемых таблеток, которая не должна превышать 3% или 1% в зависимости от применяемого прибора. Возможно проведение дополнительных испытаний, если результаты вызывают сомнения (имеются единичные трещины или сколы, или потеря в массе незначительно превышает нормированное значение). В этом случае испытание повторяют еще дважды. Потеря в массе в каждом из дополнительных испытаний или средняя потеря в массе, вычисленная по результатам трех испытаний, не должна превышать нормированное значение.

В качестве рекомендации допускается регулировка оси в случае, если форма или размер таблеток затрудняют их перемещение внутри барабана.

Данный показатель не является обязательным для включения в спецификацию нормативной документации, но должен быть учтен при внутрипроизводственном контроле.

Прочность таблеток на раздавливание. В числе прочих испытаний в ОФС «Таблетки» данный показатель не указан, т.е. не является обязательным для включения в фармакопейную статью или нормативную документацию. Однако ГФ XIII содержит ОФС.1.4.2.0011.15 «Прочность таблеток на раздавливание» (статья вводится впервые), где данный показатель отнесен к показателям, которые контролируются при производстве.

Определение и нормирование механической прочности необходимо как в условиях промышленного производства, так и для обеспечения потребительских свойств. Испытание позволяет определить устойчивость таблеток к давлению при определенных условиях путем измерения силы, необходимой для разрушения таблеток. Приведенные значения минимальной допустимой прочности в зависимости от диаметра таблеток носят рекомендательный характер.

Распадаемость. Испытание проводится согласно ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул», введенной взамен ст. ГФ XI, вып. 2.

Дополнительные особенности проведения данного испытания для различных видов таблеток отдельно оговорены в ОФС «Таблетки». В частности, изменены требования к распадаемости таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой. Время устойчивости таблеток в кислой среде не должно быть менее 1 ч и более 3 ч (ранее лимитировался только нижний предел – не должны распадаться в течение 1 ч). Таблетки не должны распадаться и обнаруживать признаки растрескивания и размягчения. Для второго (щелочного) этапа испытаний изменена среда на фосфатный буферный раствор с pH 6,8 (ранее использовался раствор натрия гидрокарбоната с pH от 7,5 до 8,0). Норма осталась прежней: таблетки должны распадаться в течение 1 ч, если иное не указано в нормативной документации.

Для таблеток диспергируемых и таблеток растворимых нормируется время распадаемости – в течение 3 мин. В качестве жидкой среды используют воду с температурой от 15 до 25 °С.

Указана специализированная методика определения распадаемости для таблеток, полученных способом лиофилизации. Время распадаемости не должно превышать 3 мин, если не указано иначе в фармакопейной статье или нормативной документации.

Для шипучих таблеток также приводится своя специализированная методика. Таблетки должны распадаться или растворяться в течение 5 мин.

Распадаемость таблеток для применения в полости рта (таблетки подъязычные, защечные, для рассасывания) проводят согласно ОФС «Распадаемость таблеток и капсул», время распадаемости приводят в фармакопейной статье или нормативной документации. Рекомендуется дополнительно указывать время, в течение которого таблетка не должна распадаться.

Таблетки вагинальные, за исключением таблеток пролонгированного действия, испытывают в соответствии с ОФС «Распадаемость суппозиториев и вагинальных таблеток».

Растворение. Испытание проводят для подтверждения постоянства свойств лекарственной формы и условий производственного процесса одним из способов, описанных в ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» (взамен ст. ГФ XI, вып. 2, ОФС.42-0003-04).

В контроле качества таблеток по данному показателю произошли существенные изменения в сравнении с требованиями ст. ГФ XI. ОФС.1.4.2.0014.15 предусматривает возможность использования различных типов аппаратов, выбор которых зависит от физико-химических свойств твердой дозированной лекарственной формы: «Вращающаяся корзинка», «Лопастная мешалка», «Проточная ячейка» и другие, описанные в зарубежных фармакопеях [4, 10].

Для таблеток, покрытых оболочкой, в состав которой входит желатин, указана возможность проведения повторного испытания по показателю «Растворение» в среде растворения с добавлением пепсина или панкреатина (если они не отвечают требованиям испытания «Растворение» с использованием воды или стандартной среды с определенным pH).

pH среды растворения ограничено значением 7,8, если иное не обосновано на стадии разработки. Добавление ферментов, ПАВ также должно быть обосновано. Объем среды не должен быть менее 500 мл (обычно 900 мл, если не указано иначе).

Также добавлено требование предварительного деаэрирования среды растворения. Необходимость деаэрирования должна быть подтверждена экспериментально. Если деаэрирование не влияет на процесс высвобождения действующего вещества в среду, это должно быть доказано экспериментально, а отсутствие данной необходимости должно быть указано в нормативной документации.

По ГФ XI предусматривалась только одна точка отбора проб, в которой количество растворенного лекарственного вещества должно быть не менее 75%, если нет других указаний в частных статьях.

Согласно ГФ XIII, ОФС «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм», в зависимости от скорости высвобождения действующих веществ все твердые дозированные лекарственные формы подразделены на три группы. Таблетки и таблетки, покрытые оболочкой, время растворения которых не превышает 5 мин, отнесены к 1-й группе, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой – ко 2-й группе, таблетки с пролонгированным высвобождением – к 3-й группе.

Для 1-й группы предусмотрен отбор проб через 45 мин (если нет иных указаний в НД). Для 2-й группы должны быть указаны два отдельных нормируемых интервала для кислотной стадии и для щелочной стадии. Для таблеток с пролонгированным высвобождением (3-я группа) требуется указание не менее трех временных интервалов.

После взятия аликвоты необходимо возместить объем среды тем же растворителем либо учитывать убыли при расчетах содержания. Второй вариант возможен, если предварительно доказано, что пополнение среды растворения не является обязательным.

Добавлена возможность проведения испытания с использованием нескольких единиц лекарственной формы на каждый сосуд для растворения, если нет возможности определения количества действующего вещества из одной единицы.

Для многокомпонентных лекарственных форм разрешено проводить испытание по наименее растворимому действующему веществу.

Для таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой (2 группа), допустимы две альтернативные методики проведения испытания с указанием ссылки на выбранную методику в нормативной документации.

Допускается проведение повторных испытаний при получении результатов, не соответствующих установленным значениям. ОФС предлагает дифференцированный подход к интерпретации результатов согласно приведенным таблицам и в зависимости от групп твердых дозированных лекарственных форм.

Дисперсность. Этот новый показатель введен для диспергируемых таблеток. Методика проведения испытания и нормы приведены в соответствующем подразделе ОФС «Таблетки». При испытании должна образовываться однородная суспензия, проходящая сквозь сито с номинальным размером отверстий 710 мкм.

Потеря в массе при высушивании или Вода. Показатель введен для тех случаев, когда содержание воды может влиять на свойства и стабильность препарата. В частности, для таблеток, полученных способом лиофилизации, данное испытание является обязательным.

Остаточные органические растворители. Требование контролировать остаточные органические растворители было указано в ГФ XII. ГФ XIII включает аналогичную ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители».

Контроль по данному показателю необходим при использовании в технологических процессах производства и очистки органических растворителей или в случае возможности их образования в процессе производства. Отсутствие данного показателя в нормативной документации должно быть обосновано.

Согласно ОФС «Таблетки» нормирование органического растворителя указывается в мкг/таблетку, исходя из предельно допустимой суточной дозы растворителя и максимальной суточной дозы препарата.

Наиболее часто встречающиеся органические растворители разделены на 3 класса токсичности. При наличии растворителей 1 и 2 классов токсичности они должны быть идентифицированы и определены количественно (наиболее часто используется метод газовой хроматографии). Если суммарное содержание органических растворителей 3 группы не превышает 0,5%, то возможно использование альтернативного для данного случая показателя «Потеря в массе при высушивании».

В ГФ XIII, помимо органических растворителей 1–3 класса токсичности, добавлены 10 растворителей с недостаточной обоснованностью токсичности, в случае использования которых производитель обязан обосновывать их остаточное содержание.

Определение вспомогательных веществ. В таблетках должно проводиться определение вспомогательных веществ, содержание которых нормируется в фармакопейных статьях или нормативной документации, например талька, аэросила, кальция и магния стеарата. Определение проводят по приведенной в ОФС «Таблетки» или указанной в нормативной документации обоснованной методике.

Однородность дозирования. Ранее по ГФ XI «испытание однородности дозирования» являлось обязательным для таблеток без оболочки с содержанием 0,05 г и менее лекарственного вещества, а также для таблеток, покрытых оболочкой, с содержанием лекарственного вещества 0,01 г и менее. Определялось содержание лекарственного вещества в каждой из 10 таблеток. Отклонение его содержания в таблетке оценивалось в процентах от среднего содержания. Требованиями статьи «Таблетки» допускалось отклонение не более чем на ±15% от среднего содержания, только 2 таблетки могли иметь отклонение более чем ±15%, и ни в одной таблетке отклонение не должно было превышать ±25%.

Согласно ГФ XIII любые таблетки должны выдерживать требования ОФС.1.4.0008.15 «Однородность дозирования», если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации. Исключением являются поливитаминные лекарственные препараты, лекарственные препараты, содержащие микроэлементы, содержащие активные компоненты растительного или животного происхождения, и другие препараты при наличии соответствующего обоснования.

Испытание на однородность дозирования применимо к дозированным лекарственным формам, содержащим как одно, так и несколько действующих веществ, и может быть выполнено двумя способами.

- Способ 1. Количественное определение содержания действующего вещества по отдельности в каждой отобранной для испытания единице препарата.
- Способ 2. Точное определение массы нетто каждой отобранной для испытания единицы препарата.

Способ 1 применим для любых дозированных форм. Способ 2 менее трудоемок, но его можно применять, если соблюдаются следующие условия:

- содержание действующего вещества в препарате – 25 мг и более;
- массовая доля действующего вещества – 25% и более;
- равномерное распределение действующего вещества по массе испытуемого препарата;
- использование навесок усредненной пробы при количественном определении действующего вещества.

Для таблеток, покрытых оболочкой методом дражирования или прессования, возможен только способ 1.

В отобранных 10 единицах препарата определяют содержание действующего вещества на каждую единицу по способу 1 или 2. Далее по описанной в ОФС.1.4.0008.15 методике вычисляют показатель приемлемости и проводят интерпретацию результатов.

Количественное определение. Анализируют навеску, отобранную от порошка не менее 20 растертых таблеток, по методике, приведенной в фармакопейной статье или нормативной документации. Если измельчение влечет за собой разложение действующего вещества или образование неоднородно измельченного порошка, испытания можно проводить в целой таблетке, при этом рекомендуется проводить определение не менее чем в 10 таблетках.

Допускается возможность принимать за результат количественного определения среднее значение, полученное в испытании на однородность дозирования.

Упаковка и маркировка. Общие требования изложены в ОФС.1.4.1.001.15 «Лекарственные формы». Наносимая информация должна соответствовать требованиям Федерального закона от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [4, 9, 11].

ГФ XIII вводит дополнительное требование к маркировке: на упаковке растворимых, шипучих и диспергируемых таблеток должна быть предупредительная надпись о необходимости предварительного растворения таблеток перед применением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с введением в действие с 1 января 2016 года Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания пересмотрен и изменен ряд требований, относящихся к контролю качества лекарственных препаратов с учетом современных достижений в области фармакопейного анализа и тенденцией к сближению с требованиями ведущих зарубежных фармакопей.

Проведенный обзор изменений фармакопейных требований для одной из наиболее распространенных лекарственных форм – таблетки – позволяет более конструктивно и детально подойти к пересмотру фармакопейных статей и нормативной документации для зарегистрированных на отечественном рынке лекарственных препаратов, который должен быть завершен до 1 января 2019 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. Вып. 1. – М.: Медицина, 1987.
2. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. Вып. 2. – М.: Медицина, 1990.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. Ч. 1. – М. 2007.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1-3. – М. 2015.
5. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 октября 2015 г. № 771 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей».
6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21 ноября 2014 г. № 768 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей»
7. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 29 октября 2015 г. № 770 «О внесении изменений в приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 21 ноября 2014 г. № 768 «Об утверждении общих фармакопейных статей и фармакопейных статей».
8. Е.Л. Ковалева. Стандартизация фармацевтических субстанций и препаратов в лекарственной форме «таблетки». – М.: Гриф и К, 2012. 288 с.
9. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том II. – М.: Гриф и К, 2013. 280 с.
10. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / Под ред. С.Н. Быковского, И.А. Василенко, М.И. Харченко и др. – М.: Перо, 2014. 656 с.
11. Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Статья приведена в авторской редакции

УДК 615.1

ФАРМАЦИЯ ДРЕВНЕГО ЕГИПТА

К.С. Гузев[1]*

Резюме. В работе представлен обзор литературы по истории нахождения папируса Эберса и его дальнейшего изучения. Раскрыто его содержание: перечислены заболевания, которые были известны древним врачам, представлен перечень лекарственных средств, используемый египетскими врачами, а также указаны технологические приёмы их приготовления. На основе представленных данных сделан вывод, что именно в Египте зародилась «база лекарственных средств», которая в дальнейшем была использована врачами Древней Греции, Древнего Рима и затем эскулапами Европы.

Ключевые слова: папирус Эберса, исследование папируса, лекарственные средства Древнего Египта, технологические приёмы изготовления лекарств.

THE PHARMACY OF ANCIENT EGYPT

K.S. Guzev[1]*

Abstract. The paper presents literature data on the history of the finding of Ebers' papyrus and its further study. Its contents are disclosed: the diseases that were known to ancient doctors are listed, the list of medicines used by Egyptian doctors is presented, and technological methods for their preparation are indicated. On the basis of the data presented, it was concluded that it was in Egypt that the «Base of Medicines» was born, which was later used by the doctors of Ancient Greece, Ancient Rome and later by the Aesculapius of Europe.

Keywords: Ebers Papyrus, study of papyrus, medicines of Ancient Egypt, technological methods of making medicines.

1 – ЗАО «Ретиноиды», 111123, Россия, г. Москва, ул. Плеханова, 2/46, стр. 5

1 – JSC «Retinoids», 2/45, bld. 5, Plekhanova str., Moscow, 111123, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: guzev3@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Медицина Древнего Египта представляет большой интерес, но в отечественной литературе, посвящённой истории медицины, эта тема освещена слабо. Авторы учебников по многим медицинским дисциплинам (хирургия, терапия, гинекология, диетика, фармакология, фармация и др.) упоминают о роли врачей Древнего Египта в развитии этих специальностей, но констатация их вклада в науку о здоровье человека очень краткая и чаще всего подчерпнута у предшественников. Наиболее полно медицина Древнего Египта описана в монографии С. Ковнера «Очерки истории медицины» [1], а сведения о фармацевтических знаниях врачей Египта можно найти в учебнике И.И. Левинштейна «История фармации и организация фармацевтического дела» [2].

Считается, что вся медицинская информация, относящаяся к Древнему Египту, собрана в папирусах, названных либо по местам их хранения, либо по имени нашедших их учёных. В настоящее время известно около 10 папирусных свитков с медицинскими текстами. Для провизоров особую ценность представляет самый большой по объёму папирус, носящий имя немецкого ученого-египтолога, представившего его в Европе, – Георга-Морица Эберса.

Георг-Мориц Эберс *(1837–1898) – известный немецкий учёный и романист. Сын берлинского банкира и голландки. Начальное образование получил в пансионе Фребеля (г. Веймар). В Геттингенском университете занимался юриспруденцией, но уже тогда заинтересовался историко-филологическими науками. Во время болезни, приковавшей его к постели на три года, ещё больше склонился к истории и археологии. После выздоровления поступил в Берлинский университет, где окончательно посвятил себя египтологии. Ознакомившись с египетскими собраниями в Европе, он открывает курс египетского языка и древностей в Йене, а после путешествий в Египет, Нубию и Аравию получает кафедру в Лейпциге, где организует музей египетских древностей. Во время второго путешествия в Египет (1782–1873) ему* ***посчастливилось найти*** *(курсив – авт.) древнеегипетскую рукопись по медицине, которая получила его имя (папирус Эберса) и стала украшением Лейпцигского университетского музея. Изучению этого папируса Эберс посвятил множество научных работ. Работая в университете, Эберс воспитал много учеников и последователей. Он говорил: «Моя наибольшая радость – это то, что они переросли меня». С 1876 года новая болезнь лишила Эберса возможности передвигаться и отдалила его от научных исследований. В 1864 году Эберс начинает свою писательскую деятельность. За 16 лет литературного творчества им написаны 12 романов из различных периодов истории Древнего Египта (этот цикл охватывает период со времён царствования* ***Рамсеса II*** *– середина XIV века до н.э. – до первых лет установления над Египтом арабского господства в середине VII века после Рождества Христова), а также несколько романов о европейской истории XVI века. Эти литературные произведения были популярны в Европе и сразу же были переведены на русский язык. Однако самым известным произведением Эберса был, конечно, медицинский папирус, расшифровке, публикации и популяризации которого он отдал большую часть своей творческой жизни [3].*

Этот папирус был найден при раскопках возле города Фивы, вывезен из Египта в 1872 г. и в настоящее время находится в музее Лейпцигского университета. Он представляет собой свиток, состоящий из 110 страниц по 22 строки каждая, имеет название: «Книга приготовления лекарств для всех частей тела», и был написан в XVII столетии до н.э., то есть примерно 3600 лет назад. Содержит около 900 рецептов лечения болезней. Из лекарств в папирусе широко представлены растительные средства, препараты животного происхождения, гораздо беднее выглядит информация о минеральных средствах. Фармацевтическая техника, судя по описанию, состояла из ряда простых приёмов первичной обработки веществ (варка, настаивание, отжимание, процеживание, измельчение, просеивание и т.п.). Из лекарственных форм в папирусе упоминаются мази, пластыри, примочки, припарки, отвары, пилюли, различные благовония, очистительные клизмы, ветрогонные порошки. Особое внимание уделялось препаратам для очищения организма: рвотным, слабительным, мочегонным, потогонным средствам [2, 4].

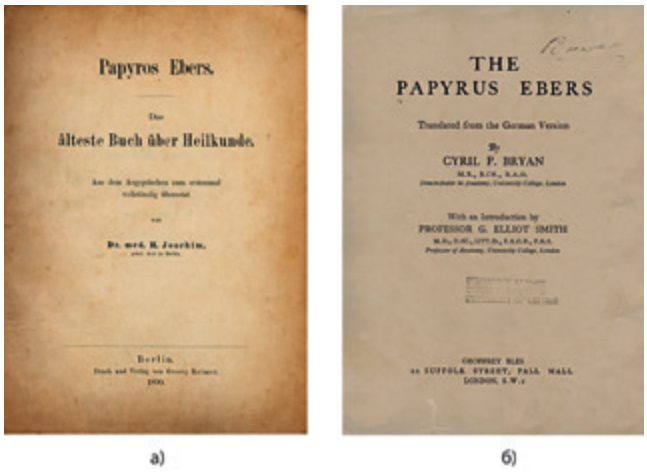
Этой информации, на наш взгляд, недостаточно для понимания роли данного папируса в развитии фармации, в связи с чем в нашей работе была поставлена цель найти как можно больше новых сведений об этом артефакте и его роли в зарождении фармацевтической науки.



Рисунок 1. Kass Janos. История святых, 1962 (Budapest)

Основным источником информации о папирусе Эберса стали монография Генриха Иоахима «Папирус Эберса. Старейшая книга по медицине» – первый перевод, получивший положительную оценку большинства египтологов, опубликованный в 1890 г. в берлинском издательстве Георга Реймера (Georg Reimer) [5], и монография Сирила П. Брайна «Папирус Эберса» – перевод с немецкого вышеназванной монографии, вышедший в Лондонском издательстве Geoffrey Bles в 1930 году [6]. Необходимо отметить, что книга П. Брайна не является подстрочным переводом монографии Г. Иоахима на английский язык. Этот труд представляет собой результат глубокого анализа немецкого первоисточника, данный в переработанном и систематизированном виде, что облегчает понимание древнеегипетского текста.

В предисловии к монографии С.П. Брайна, написанном профессором Лондонского университета Эллиотом Смитом, и в тексте самой книги нами обнаружено множество интересных фактов, ранее неизвестных отечественному исследователю, которые мы представляем ниже.



а) б)

Рисунок 2. Копии титульных листов монографий, использованных при написании работы

НЕКОТОРЫЕ СВЕДЕНИЯ О ПАПИРУСЕ

Медицинские папирусы, найденные в Египте ранее папируса Эберса, представляют собой разрозненные клочки папирусной бумаги, часто разорванные во многих местах и плохо читаемые по причине их плохой сохранности. Папирус, обнаруженный Эберсом, состоит из отдельных листов, сохранён до мельчайших деталей, легко читается от первой до последней строки. Многие исследователи считают этот папирус самой древней книгой в мире.

Владельцы папируса при попытках сделать перевод этой рукописи столкнулись с серьёзными трудностями, связанными с квалификацией переводчика. Он должен был знать египетский язык, быть врачом, знакомым как с современными познаниями в анатомии, физиологии и терапии, так и с методами лечения болезней, практиковавшимися у древних народов, иметь представление как о давних, так и о современных болезнях, встречающихся в Египте, и способах их лечения. И ещё он должен был быть информирован о веществах, перечисленных в папирусе и являющихся составными компонентами лекарственных средств.

Поэтому несколько последовавших друг за другом переводов текста папируса были признаны явно неудачными.

История приобретения папируса Эберсом не совсем обычна. Ниже приведены несколько цитат из книги П. Брайна с подробным описанием этой истории. По мнению английского исследователя Египта, было это так: «Зимой 1872 года немецкий египтолог, Георг-Морис Эберс, стал владельцем папируса, который по традиции был назван его именем. Во время раскопок в окрестностях города Фивы к нему подошёл богатый египтянин, который сообщил, что совершил поездку из Луксора специально для встречи с ним. Однако когда египетский гость преподнёс Эберсу практически бесполезный папирус и современную статую Осириса, Эберс дипломатично сообщил своему посетителю, что он был готов заплатить хорошую цену за что-нибудь более ценное. На следующий день вчерашний посетитель вновь появился и вручил Эберсу металлический тубус. Внутри находился завёрнутый в старые ткани от мумии папирус, от вида которого приятно пахнуло египетской древностью. В металлическом цилиндре содержался огромный рулон папирусных страниц. Они были в отличной сохранности, написаны как чёрными, так и красными чернилами. Папирус выделялся чётким и ярким иератическим египетским шрифтом, как будто он был написан только вчера. Однако календарь на обороте первой страницы указывал дату, соответствующую примерно 1500 году до н.э. Радость Эберса была омрачена некоторой неопределённостью. Египтянин, владелец папируса, не имел представления о стоимости своего имущества и назначил очень высокую цену. Это было выше цены, на которую рассчитывал Эберс, и на некоторое время судьба драгоценной рукописи была в подвешенном состоянии. Тем не менее своевременное появление богатого соотечественника, господина Гюнтера, устранило финансовые трудности Эберса, и через несколько месяцев он возвратился в Германию, чтобы пополнить своим сокровищем библиотеку Лейпцигского университета» [5]. Из этого текста следует, что Эберс не находил папирус во время раскопок – он вообще в Египте ничего особо интересного и значимого не нашёл – а купил его у местного жителя. Его заслуга состоит в том, что он очень быстро понял важность этой находки, нашёл необходимое количество денег, приобрёл его и передал в дар университетскому музею древностей.

Распространение папируса по миру произошло очень быстро. Менее чем за три года Эберс не только перёвел его на немецкий язык, но представил миру в виде факсимиле в двух томах, а его компаньон, доктор Стерн, дополнил эту работу латинским словарём. В предисловии к своей монографии Эберс пишет: «Если я смог бы помочь этим трудом стимулировать изучение истории медицины в медицинских кругах, моё намерение было бы полностью достигнуто» [6]. Этот поступок Эберса был высоко оценён египтологами всего мира. Благодаря этому изданию многие исследователи получили возможность изучать первоисточник, а не его первые, не совсем удачные переводы.

Определение возраста папируса являлось одной из самых сложных задач для Эберса. На оборотной стороне первой страницы имеется календарь, свидетельствующий, что папирус Эберса был написан около 1500 г. до н.э., но даже внутри самого папируса есть множество свидетельств того, что он был скопирован из серии книг, написанных много столетий назад. Так, один отрывок датируется царями I династии (около 3400 г. до н.э.), а в другом отрывке упоминается царица из VI династии. Для установления истинной даты папируса Эберс консультировался с большим количеством специалистов по истории Египта, но в итоге возобладала дата, обозначенная на самом папирусе.

Все исследователи отмечают, что этот папирус необычен. Мало того, что он прекрасно сохранился, но и его оформление было нетрадиционно – такое не встречалось ни в одном из известных папирусов. На протяжении всей рукописи заголовки различных глав, названия болезней, назначение лечения, вес и дозировки препаратов написаны ярко-красным цветом, причём остальной цвет папируса – чёрный (рисунок 3).



Рисунок 3. Станица папируса Эберса

Папирус Эберса не является книгой в традиционном смысле этого слова. По мнению исследователей, это набор выдержек, собранных по крайней мере из сорока различных источников. Он состоит из большого количества рецептов для лечения ряда заболеваний, названий препаратов, способов их приготовления и применения. В некоторых разделах имеются описания симптомов болезней, далее приводится постановка диагноза. Отдельно описаны работа сердца и сосудов, способы хирургического лечения ран, особое внимание уделено лечению гнойных ран. Кроме того, в текст папируса вкраплены элементы заклинаний

и заговоров. Проведя анализ факсимильного варианта папируса и его немецкого варианта, П. Брайн делает важный вывод, который до настоящего времени никто не смог опровергнуть: «Он (*папирус*) превосходит по важности все другие медицинские папирусы и в богатстве его содержания, и в его полноте, и совершенстве. Это самый большой, самый красиво написанный и лучше всего сохранившийся из всех медицинских папирусов» [6].

В основном, папирус Эберса посвящён лекарственному лечению заболеваний. Кроме того, в нём описано около двух десятков случаев хирургического вмешательства. «Патологические состояния варьируются от ужаливания осы до укуса крокодила, от тривиальной боли до самой отвратительной болезни». По данным С.П. Брайна, в папирусе упоминается около 80 патологических состояний (болезней) человека, и, хотя это не относится к фармации, мы приводим перечень этих заболеваний (таблица 1).

Как видно из данных, представленных в таблице 1, среди патологий, известных египетским врачам, присутствуют болезни всех систем организма.

Отдельные главы папируса посвящены косметологии: описаны средства для устранения морщин, удаления родинок, украшения тела, для изменения цвета кожи, волос и бровей [6].

ФАРМАКОПЕЯ ДРЕВНЕГО ЕГИПТА

Как было отмечено выше, папирус Эберса посвящён лечению заболеваний с помощью лекарств. В нём представлены лекарственные средства, известные и применяемые врачами Древнего Египта. В своей монографии П. Брайн призывает серьёзно отнестись к тексту папируса, так как в нём «представлен ряд лекарств, которые фигурируют в английской Фармакопее и сегодня». В папирусе имеются описания способов приготовления и применения этих лекарств. Именно поэтому папирус Эберса рассматривается нами как фармакопея Древнего Египта, то есть свод правил и законов, по которым должны назначаться, готовиться и применяться лекарственные средства.

Если быть точным, то в папирусе описаны 811 рецептов лекарственных средств. Многие из них состоят из 5–13 компонентов, а один рецепт включает 37 ингредиентов.

Анализ перечня используемых растений, минеральных составляющих и средств, получаемых с помощью животных или из их внутренних органов (таблица 2), позволил установить, что список применяемых растений состоит из 50 наименований, включающих травы, кустарники, деревья. Использовали траву, корни, листья, кору, плоды, семена как от свежих растений, так и в виде высушенного сырья. Из растений получали смолы, масла, соки, стружку (опилки) для приготовления теста и впоследствии хлеба. Отдельно надо сказать о таком компоненете, как дрожжи. Применялись дрожжи винные, хлебные, пивные – для сладкого, горького и крепкого пива, а также дрожжи от опиумного напитка и дрожжи для специальной ферментации.

Список используемых животных состоит из 41 наименования. В него входят представители различных классов: млекопитающие, птицы, рыбы и насекомые. Среди животных встречаются довольно экзотические виды – гиппопотам, дикобраз, крокодил, страус, черепаха. Домашние животные представлены в полном составе – от коровы до кошки и от утки до голубя. Использовались волосы (шерсть), вульва, глаза, желчь, жир (масло), зубы, кожа, копыта, кости, костный мозг, кровь, крылья, мозг, молоко, моча, пальцы (когти), перья, печень, плоть, рога, селезёнка, сперма, твёрдый жир, уши, фаллос, хвост, экскременты, яйца. Обширен

Таблица 1.

Заболевания, упомянутые в папирусе Эберса

Болезни человека, которые лечили врачи Древнего Едипта			
Абсцессы	Глисты	Мочекаменная болезнь	Ринит
Аменорея	Глухота	Накопление мочи и	Сердечная боль и слабость
Атерома	Гнойнички и нагноения	воспрепятствование её истечению	Сердцебиение
Бели	Головная боль	Налёт в гортани	Слепота
Беспорядочная работа сердца	Головокружение	Нарушения менструального цикла	Стафилома
Бессилие	Грануляция раны	Нематоды	Стриктура
Блефарит	Диарея	Неровности зубов	Трихиаз
Болезни молочных желёз	Дизентерия	Облысение	Увеличенная простата
Болезни печени	Диспепсия	Ожоги	Укус крокодила
Болезни языка	Железистые припухлости.	Опухоли и воспаления брюшины	Укусы осы и тарантула
Воспаление	Жировики	Опухоли кожи	Уплотнение на веке
Воспаление ануса	Заболевания женских половых	Опухоли нервов и сосудов	Флюсы и абсцессы
Воспаление радужной оболочки	органов	Опухоли доброкачественные и	Хемоз
глаза	Запор	злокачественные	Цистит
Выворот века	Импетиго	Офтальмоплегия	Частое мочеиспускание
Выделения из уха	Катар	Пингвекула	Чесотка
Вызывание абортов и лактации	Катаракта	Полиурия	Экзема
Выпадение утробы	Колика	Птеригий	Энтропия
Гангрена	Кровоизлияние	Рак	Язвы
Гвинейский червь	Круглые черви	Раны	
Геморрой	Лейкома		
Гидрофтальм	Мелена		
Глазные заболевания	Мигрень		

Таблица 2.

Перечень лекарственных растений, минеральных веществ и средств, получаемых с помощью животных или из их внутренних органов, которые использовали для приготовления лекарств врачи Древнего Египта

Лекарственные растения	Животные	Минеральные вещества
Акантус, дерево (стружка, ягоды, орехи, смола, шипы)	Баран	Алебастр (гипс)
Алоэ (сабур) (зерно, смола, сок)	Свинья	Гематит
Арабское дерево (порошок)	Вол	Глина Мейсона
Арбуз	Газель	Гранит
Бальзам	Гиппопотам	Железо из Аполонополиса
Бобы сушёные	Головастик	Индиго
Бузина (ягоды)	Голубь	Каламин
Виноград	Гусь	Камень из Мемфиса
Гранат	Дикобраз	Камень-нож черный
Женский рид	Жук	Камень с места встречи Вод
Ива (листья, стружка дерева)	Змея	Камень с места разлуки Вод
Инжир	Коза	Камень из Шор
Кедр (смола, стружка)	Корова	Камень-нож
Клещевина (масло касторовое)	Кот	Клей из статуи
Кориандр (плоды)	Краб	Клей из стены
Крокус (южный, из Хиллса, из дельты)	Крокодил	Клей из гноя ?
Кукуруза	Ласточка	Красная щёлочь
Кукуруза красная	Лев	Кусочки высушенной нефти (? битум)
Латук дикий	Летучая мышь	Лазурит
Лён (стебель, выжимка, семя, льняная вода)	Лягушка	Медная ржавчина (оксид меди)
Лотос (хлеб, смола, кусочки, древесина)	Моль	Медная стружка
Лук (свежий, зелёный, из оазиса, для еды, внутренность лука, сок)	Муха	Медно-ярь-медянка
	Мышь	Медный купорос
Мак (коробочки, семя, зерно, стебли)	Олень	Медь
Мирра (сушёная, сладкая, масло из мирры)	Орёл-стервятник	Медь-уголь
Можжевельник (ягоды, кашица)	Оса	Минеральная соль
Мята горная (трава, цветы)	Перелётная птица	Морская соль
Настурция	Пчела	Натр (щёлочь)
Огурец (плод, цветы)	Рыба-меч	Нефть из Ефрата (нефти)
Олива (оливковое масло)	Саранча	Поваренная соль
Пальма (волокна, сок, плод)	Скорпион	Пыль внутри статуи
Платан (смола, молочко, щепки, тесто)	Собака	Сажа
Пшеница (зелёная и высушенная, солома, зерно, мука)	Страус	Свежая свинцовая земля
Рид из Азии	Тарантул	Свежая соль
Салат	Телёнок	Свинец
Смоковница	Угорь	Свинцовый купорос
Солома измельчённая	Утка	Селитра (с Юга, из Верхнего Египта)
Сосна (шишки, скипидар)	Цепень	Сера
Тмин, семена	Черепаха	Слизь водяная
Тутовое дерево	Электрический угорь	Соль с Севера
Фасоль	Ящерица	Соскобы со статуи
Фенхель		Старая книга, приготовленная в масле
Финик (свежий, зелёный, дикий, сок, спелый, с мужской или женской пальмы)		Сурьма
		Щёлочная вода
Хлеб (тесто, хлеб для еды, ароматный хлеб, бродильный хлеб, хлеб из лотоса, панировочные сухари, пироги)		Щёлочь очищенная
Циперус папирус (с севера, полевой, луговой, болотный, побеги, трава, шипы)		
Чёрное дерево Вуд (стружка)		
Чеснок		
Шафран (семя, цветы)		
Ячмень		

перечень насекомых (8 наименований). В него входят безобидные моль и муха, ядовитые скорпион и тарантул, прожорливая саранча и полезная пчела. Среди средств минерального происхождения (45 позиций) применялись металлы (медь, свинец, сурьма), их оксиды и соли, полудрагоценные камни, глины, морская и поваренная соль. Особо следует упомянуть нефть из Ефрата и её высушенную часть – битум. Ранее нам не удавалось обнаружить факт такого раннего её использования [6].

Удалось выявить некоторые предпочтения врачей Древнего Египта. Так, безоговорочным победителем по упоминанию в папирусе является мёд – дикий, сотовый и варёный; в качестве одного из компонентов лекарств он упоминается 132 раза. Пчелиный воск встречается 37 раз. Из растений чаще других в папирусе называются лук (81 раз), можжевельник (39 раз), тмин и инжир (по 37 раз), циперус (36 раз), смола акантуса и зерно сорго (34 раза), а также чеснок (21 раз). Продукты, получаемые из растений – растительное масло и ладан, – упоминаются в папирусе 87 и 86 раз соответственно. Довольно часто в папирусе встречаются рекомендации по применению свиного сала и животного жира (без указания животного) – 33 и 32 раза соответственно. Среди минералов явное предпочтение отдано морской соли. Она упоминается в рецептах 54 раза. Следующими по количеству упоминаний в текс-

те папируса стали зелёная глина (51 раз), сода (40 раз), свнцовый сурик (31 раз) и ярь-медянка (26 раз).

Интересно отметить, что в качестве растворителей для лекарств широко использовали воду (88 упоминаний), пиво (58 упоминаний), молоко без указания животного (46 упоминаний) и вино (30 упоминаний).

Рекомендовано было использовать простую воду, воду из колодца, родниковую, солёную, минеральную, льняную, щелочную, воду из пруда и дождевую.

Пиво было одним из любимых средств у врачей Древнего Египта. Они использовали простое и сложное (многокомпонентное) пиво, сладкое, горькое, крепкое, холодное, подогретое. Кроме того, использовали пену от пива и осадок от этого напитка. Что касается молока, то египетские врачи применяли женское, коровье и ослиное молоко, при этом различали молоко свежее, кислое или испорченное.

Технологические приёмы, конечно, были очень простыми. Мы не перечисляем их, так как они приведены в начале статьи. По этой же причине не повторяем и применявшиеся лекарственные формы. Однако не подлежит сомнению тот факт, что сами лекарства надо было готовить, причём иногда в течение довольно длительного времени. Подготавливать надо было и некоторые вещества, которые в дальнейшем применялись в качестве простых компонентов для лекарств. К ним можно отнести варёный мёд, воск, рыбий жир, растительное масло (оливковое, касторовое), чистую щёлочь, сабур, опий, смолы деревьев и кустарников, ягодные и фруктовые соки. Заготавливали травы, корни, семена, цветы, плоды, ягоды, древесину. Специально выращивали пшеницу, сорго, кукурузу, ячмень, фасоль, лён, лук, чеснок, виноград, финики.

В процессе знакомства с текстом были обнаружены некоторые интересные рекомендации. Например, многие лекарства рекомендовано принимать со сладким пивом – корригентом вкуса. Измельчённые порошки часто смешивали с тестом, катали из него 2–3 шарика и принимали их либо одновременно, либо день за днём, то есть в этом случае мы видим прототип дозированной формы. Иногда подобный шарик помещали в задний проход, что, с нашей точки зрения, является не чем иным, как будущим суппозиторием или по крайней мере его подобием. Было обнаружено указание на приготовление таблетки. Горькие или неприятные на вкус лекарства предварительно помещали в стручок (прототип капсулы). В качестве основы для мазей применяли мёд или жир, причём гнойные раны чаще лечили мазями с мёдом, представляющим собой гидрофильную основу с большим осмотическим эффектом, а для ускорения заживления очищенных ран использовали мази с большим содержанием жира. Для приготовления пластыря брали смолу таких деревьев, как кедр, сосна, платан. Не совсем понятно, как врачи Древнего Египта поступали с животными: где их брали и как препарировали органы.

Медицина в Древнем Египте была храмовой, религия являлась её неотъемлемой частью, и поэтому в тексте папируса встречаются заклинания. Этим, наверно, можно объяснить частое повторение цифры четыре: «настаивать 4 дня, варить 4 дня, принимать 4 дня». Вероятно, это как-то связано с числами, священными для врачей Древнего Египта: четыре стихии (огонь, воздух, земля и вода), четыре стороны света, четыре центра космологического учения (Гелиополис, Мемфис, Фивы и Гермополис), четыре столба неба, четыре канопы, в которые помещались органы тела после смерти. Другого объяснения этому мы пока не нашли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённый анализ текста папируса Эберса свидетельствует, что зачатки фармации как науки присутствовали в Египте 3500 лет назад. Уже в то время были известны полезные свойства большого числа лекарственных растений, металлов, их оксидов и солей, драгоценных и полудрагоценных камней. Особую группу лекарств составляли части тела домашних или диких животных. Необходимые компоненты заготавливались заранее, хранились и при необходимости использовались. Лекарства готовились в соответствии с написанными рецептами, с соблюдением дозировки и технологической последовательности. Некоторые препараты, употребляемые врачами Древнего Египта, являлись прототипами современных лекарственных форм. Более того, можно предположить наличие зачатков промышленности по производству наиболее полезных компонентов для этих лекарств. Всё вышеперечисленное даёт нам основание утверждать, что, поскольку папирус Эберса представляет собой не только сборник рецептов по лечению различных заболеваний, но и свод рекомендаций по приготовлению лекарств по этим рецептам с указанием доз и способов применения, этому артефакту по праву может быть присвоено звание Первой фармакопеи.

Глядя на текст папируса из сегодняшнего дня, начинаешь осознавать, что именно в Египте зародилась «база лекарственных средств», которая в дальнейшем была использована врачами Древней Греции, Древнего Рима и затем эскулапами Европы. Эта база используется и нами.

ЛИТЕРАТУРА

1. С.Г. Ковнер. Очерки истории медицины. Вып. третий. От Платона до Галена включительно. – Киев. 1888. 436 с.
2. И.И. Левинштейн. История фармации и организация фармацевтического дела. – М.: Медицина, 1939. 223 с.
3. Ф.А. Брокгауз, И.А. Ефрон. Энциклопедический словарь / Под ред. проф. Андреевского. Т. XL. – СПб. 1904. С. 111–112.
4. М.П. Мультановский. История медицины. – М.: Государственное издательство медицинской литературы, 1961. 347 с.
5. H. Joachim. Papyros Ebers. Das alteste Buch uber Heilkunde. – Berlin: Druck und Verlag von Georg Reimer, 1890. 215 p.
6. C.P. Bryan. The Papirus Ebers. Translated from the German Version Geoffrey Bles. – London. 1930. 167 p.

МАТЕРИАЛЫ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ СТУДЕНТОВ СТАРШИХ КУРСОВ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО ДЕПАРТАМЕНТА ИНСТИТУТА ФАРМАЦИИ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ НА ТЕМУ «DRUG – ЛЕКАРСТВО ИЛИ НАРКОТИК? СЛОЖНОСТИ ПЕРЕВОДА»



Зависимость от психоактивных веществ (ПАВ) является огромной медико-социальной и экономической проблемой для нашей страны. По оценке различных ведомств в России, число лиц, употребляющих ПАВ с разной степенью периодичности, варьируется от 1,5 до 2,2 млн человек.

Во всем мире, и в России в том числе, наблюдается изменение структуры наркопотребления. Снижается доля лиц, употребляющих «классические» наркотики, такие как опиаты и кокаин. В то же время происходит рост применения новых синтетических ПАВ, включающих разнообразные психостимуляторы (метилендиоксипировалерон, 4-метилметкатинон), депрессанты (метилметаквалон, премазепам), психоделики и так называемые эмпатогены, или энтактогены.

В последние годы особую популярность среди новых ПАВ получили синтетические каннабиноиды (СК), употребляемые в виде курительных смесей. По данным Европейской системы раннего оповещения (EU EWS), за 2008–2013 гг. в мире отмечался рост употребления наркотиков и ПАВ в целом, и особенно СК, доля которых среди прочих ПАВ к 2013 г. составила более трети. Особую актуальность проблеме придает тот факт, что до 75% потребителей этих соединений составляют лица моложе 30 лет. В России наиболее активными потребителями курительных смесей сегодня является молодежь в возрасте от 16 до 25 лет.

Употребление новых видов синтетических наркотических веществ и ПАВ имеет тяжелые последствия вследствие передозировок, нередко приводящих к летальному исходу.

С целью обратить внимание студентов на серьезную социальную и медицинскую проблему массового распространения новых ПАВ, наркомании и токсикомании в целом, предотвратить употребление и распространение ПАВ, повысить информированность молодежи в указанных вопросах 11 апреля 2017 г. на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) была проведена научная конференция студентов старших курсов департамента образования Института фармации и трансляционной медицины на тему «Drug – лекарство или наркотик? Сложности перевода». Грань между понятиями лекарство и наркотик иногда достаточно тонкая и зыбкая. Многие лекарственные средства, которые создавались для более эффективной безопасной терапии, впоследствии проявляли свойства наркотиков, вызывали тяжелые последствия и начинали применяться с немедицинскими целями.

Большую роль в вопросах правильного использования лекарств, контроля за безопасностью их применения играют специалисты в области фармации. Поэтому особо актуально обсуждение темы лекарств и наркотиков среди людей, чья будущая профессиональная деятельность связана напрямую с созданием, распространением, анализом, применением лекарств, некоторые из которых могут употребляться с немедицинскими рекреационными целями.

Материалы конференции в кратком изложении организаторы предоставили для публикации на страницах ВАКовского научно-производственного рецензируемого журнала «Разработка и регистарция лекарственных средств».

ЗНАЧИМЫЕ СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ РЫНКА СИНТЕТИЧЕСКИХ КАННАБИНОИДОВ В РОССИИ

А.С. Степанян, Ю.А. Тихонова, В.И. Гегечкори

Потребление синтетических каннабиноидов (СК) и отравления ими являются на сегодняшней день серьезной медицинской и социальной проблемой в связи с широким их распространением среди наиболее трудоспособной части населения, развитием психотических состояний, создающих угрозу жизни потребителей. По данным Европейской системы раннего оповещения (EU EWS), за 2008–2013 гг. в мире отмечался рост употребления наркотиков и психоактивных веществ (ПАВ) в целом, и особенно СК, доля которых среди прочих ПАВ к 2013 г. составила более трети. Зарегистрированный в России рост отравлений наркотическими веществами и ПАВ, происходящий в основном за счет увеличения доли отравлений СК, отражает общемировую тенденцию в этой области.

Скорость и масштабы синтеза новых СК поражают. Если в 2009 г. было зарегистрировано 9, в 2007 г. – 15, в 2012 г. – 73, то к марту 2014 г. уже насчитывалось 107 новых химических веществ. На этот, последний период пришелся рост числа острых отравлений. По данным Роспотребнадзора, количество случаев отравлений курительными смесями среди населения возросло в 2,7 раза – с 2061 случая в 2011 г. до 7052 случаев за 2014 г.

В 2015 г. по приблизительным подсчетам выручка от оборота синтетических наркотиков составила 60 млрд руб. Причем высокая популярность таких препаратов во многом вызвана проводимой интернет-магазинами агрессивной рекламной политикой и отсутствием реальных механизмов юридического контроля за их распространением. За период 5 лет не только в России, но и во всем мире отмечен резкий рост популярности курительных смесей. СК производятся преимущественно в Китае и Индии, в странах, где существует дешевый органический синтез. За последние семь лет объём изъятий подобной «синтетики» в России увеличился в 130 раз – со 165 кг до 22 т. Это свидетельствует, с одной стороны, о массированной контрабанде «синтетики» из-за границы, а с другой стороны – об отлаженном за рубежом высокоскоростном процессе генерации все новых химических формул. В США их низкая стоимость и высокая степень доступности способствовали тому, что в 2012 году СК заняли второе место по частоте использования старшеклассниками, уступив лишь натуральной марихуане.

В Российской Федерации объем социально-экономического ущерба от наркомании достигает в совокупности 2,5% валового внутреннего продукта и составляет около 1,5 трлн руб. Государство затрачивает на медицинское обслуживание наркоманов значительные средства, отвлекая тем самым часть средств от решения других проблем здравоохранения. Содержание 1 больного на койке в НИИ наркологии составляет около 900 руб./день, в год выходит 330 тыс. руб. Суммарный ущерб, наносимый 1 наркоманом в течение 1 года, по данным Академии МВД РФ, достигает 60000 $ (с учетом квартирных краж, краж из автомобилей, мошенничества, сбыта наркотиков), а также добавляются судебные издержки и содержание в местах лишения свободы (ещё плюс 5000 $).

Анализ социальных характеристик потребителей СК показал, что это преимущественно молодые люди и подростки мужского пола (женщин менее 10%). 80% из них – лица в возрасте 23–27 лет. В целом они имеют невысокий уровень образования: 37,5% – неполное среднее образование, 52,5% – среднее, среднетехническое или среднеспециальное образование, 10% – неоконченное высшее или высшее. Официальное место работы было лишь у 15%. Они плохо информированы: большая часть пациентов считает, что СК безвредны, не вызывают привыкание. 25% обследованных не состояли в браке и не имели детей. В гражданском браке состояли 40%, разведены 35%. 20% были лишены родительских прав в отношении своих несовершеннолетних детей.

Среди пострадавших выявлен высокий процент совместного употребления СК с каннабисом (84%), алкоголем (92%), табаком (66%), галлюциногенами (37%), героином (7%), опиоидами (34%), MDMA (29%) и бензодиазепинами (23%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю.В. Зобнин, Е.М. Стадлер. Острые отравления синтетическими каннабиноидами («Спайсами») // Сибирский медицинский журнал. 2014. № 8. С. 130–134.
2. С.В. Шестакова, Н.В. Брянцева. Проблемы законодательства, регулирующего создание и распространение производных наркотических средств и психотропных веществ // Успехи в химии и химической технологии. Т. 18. 2014. № 7. С. 50–52.
3. А.Е. Каратеев. Запретный плод: каннабиноды в ревматологической практике // Научно-практическая ревматология. 2010. № 2. С. 72–29.
4. Perspectives on drugs. Synthetic cannabinoids in Europe / The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. 31.05.2016.
5. Synthetic cannabinoids and 'Spice' drug profile / The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. URL: http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cannabinoids (дата обращения 10.06.2017).
6. Синтетический каннабиноид тестируют на раковых больных // MEDdaily. URL: http://meddaily.ru/article/01oct2012/dexxa (дата обращения 10.06.2017).
7. Cesamet™ (nabilone). URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/018677s011lbl.pdf (дата обращения 10.06.2017).

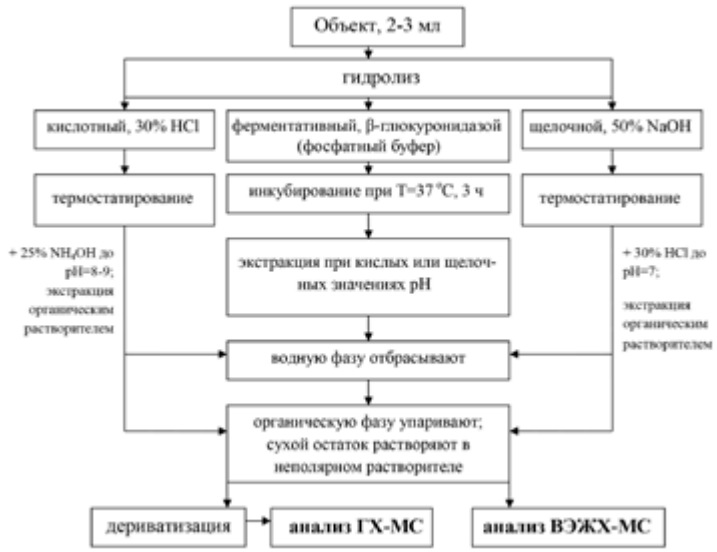
ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИНТЕТИЧЕСКИХ КАННАБИНОИДОВ

Т.Ф. Батыршин, А.Е. Петухов, Г.М. Родионова

Установление факта употребления синтетических каннабиноидов (СК) представляет собой сложную аналитическую задачу в связи с разнообразием и быстрым изменением ассортимента дизайнерских наркотиков, а также активным метаболизмом самих СК в организме. Это обуславливает необходимость глубокого изучения структуры метаболитов, которые дольше задерживаются в организме человека, общих путей их образования с целью использования их как маркеров употребления СК. Кроме того, анализ метаболитов позволяет обнаруживать не только известные, но и вновь синтезированные аналоги СК.

Основные объекты исследования в химико-токсикологическом анализе (ХТА) на СК – моча, кровь, слюна и волосы. Их последовательный анализ может предоставить полный спектр необходимых данных: от точного состава смеси, структуры компонентов до времени и частоты употребления СК.

На сегодняшний день практически не существует предварительных иммунных методов обнаружения СК. Тесты, выпускаемые некоторыми производителями, идентифицируют только первых представителей СК – JWH018, JWH073, которые практически исчезли из нелегального оборота и проявляют очень низкую специфичность в отношении более современных веществ этой группы.



Основными маркерами СК являются N-алкилкарбоксилированные, моногидроксилированные, гидроксииндольные и карбоксильные метаболиты, которые выводятся с мочой в виде глюкуронидов. Пробоподготовка биологических объектов к анализу на СК включает следующие этапы: гидролиз (кислотный, щелочной или ферментативный) конъюгированных метаболитов; экстракцию; дериватизацию в случае проведения газовой хроматографии. Общая схема анализа приведена с боку.

На сегодняшний день единственным методом предварительного анализа СК является тонкослойная хроматография. Используют системы: гексан – диэтиловый эфир; толуол – диэтиламин; этилацетат – хлористый метилен – метанол и аммиак (18,5:18:3:1). Для визуализации применяют флуоресценцию в УФ-свете и реагенты: раствор прочного синего ББ; йодплатината калия, реактивы Марки и Мекке.

В качестве методов, подтверждающих наличие СК в биологических объектах, используют метод газовой или высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (в том числе и тандемной). Хроматография обеспечивает разделение токсикантов и сопутствующих веществ, а масс-спектрометрия позволяет наиболее селективно, с высокой чувствительностью детектировать, структурно идентифицировать и количественно определять токсикологически значимые вещества. Конечным выводом масс-спектрального анализа является либо обнаружение заранее известных маркеров СК, либо занесение в базу новых данных в случае обнаружения ранее неизвестной структуры.

Процедура обнаружения СК рекомендована и утверждена МЗ РФ [1, 2].

В заключение следует отметить, что, поскольку в обход законодательства продолжают синтезироваться все новые виды СК, данную тему нельзя назвать исчерпанной и в дальнейшем может возникнуть необходимость в разработке принципиально новых методов химико-токсикологического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Обнаружение метаболитов синтетических каннабомиметиков в моче, волосах и сыворотке крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием: информационное письмо. – М. 2014. URL: http://www.nncn.ru/objects/nncn01/1415786886.pdf (дата обращения 27.03.2017).
2. Обнаружение синтетических каннабомиметиков, наркотических, психоактивных веществ и их метаболитов в моче, волосах и ногтях методами жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием: информационное письмо. – М. 2014. URL: http://narkotiki.ru/objects/narkotiki02/1415786831.pdf (дата обращения 27.03.2017).
3. С.А. Савчук, М.А. Гофенберг, Н.М. Никитина, А.В. Надеждин, Е.Ю. Тетенова. Определение маркеров синтетических каннабимиметиков PB-22, PB-22F, AB-PINACA, AB-FUBINACA в волосах и моче методом ГХ-МС // Наркология. 2013. № 11. С. 66–73.

ЗАКОНОДАТЕЛЬНАЯ БАЗА, ОГРАНИЧИВАЮЩАЯ ПРИМЕНЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ КАННАБИНОИДОВ

С.Р. Нарышкин, А.Е. Петухов, В.Н. Кузина

В настоящее время в РФ оборот синтетических каннабиноидов (СК), так же как и других наркотических средств и психотропных веществ (НСиПВ), ограничен. Вместе с тем распространение новых психоактивных веществ имеет место в связи с желанием криминальных структур продавать свой товар и желанием «потребителей» такой товар приобретать.

Основными документами, регулирующими оборот СК в РФ, являются те же, что для оборота других НСиПВ, – Федеральный закон № 3-ФЗ «О наркотических средствах и психотропных веществах» от 8.01.1998 и постановление Правительства РФ № 681 «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации» от 30.06.1998 г. с более поздними дополнениями. Однако существуют и свои особенности.

Ранее в перечне НСиПВ находились наркосодержащие растения, которые в дальнейшем были выделены в отдельный список (ПП № 934 от 27.11.2010 «Об утверждении перечня растений, содержащих наркотические средства или психотропные вещества либо их прекурсоры и подлежащих контролю в Российской Федерации, крупного и особо крупного размеров культивирования растений, содержащих наркотические средства или психотропные вещества либо их прекурсоры, для целей статьи 231 Уголовного кодекса Российской Федерации, а также об изменении и признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации по вопросу оборота растений, содержащих наркотические средства или психотропные вещества либо их прекурсоры»).

Первоначально спайсы позиционировались как курительные смеси растительного происхождения, поэтому первый запрет коснулся растений. В апреле 2009 г. Роспотребнадзор запретил оборот курительных смесей, содержащих в составе голубой лотос (*Nymphea caerulea*), розу гавайскую (*Argyreia nervosa*), шалфей предсказателей (*Salvia divinorum*). Поскольку в РФ ответственность за НСиПВ наступает в зависимости от количества, для перечисленных растений законодательно был установлен средний размер – от 10 до 99 растений, а крупный – от 100.

В Российской Федерации ответственность за НСиПВ устанавливается статьями уголовного кодекса: ст. 228 (п. 1–4), 229, 230 (п. 1–2), 231, 232, 233, 234 (п. 1), а также статьями кодекса об административных правонарушениях (КоАП): 6.8; 6.9; 6.10, 6.13, 6.16. Наказуемы «незаконный оборот НСиПВ или их аналогов и незаконные приобретение, хранение, перевозка растений, содержащих наркотические средства или психотропные вещества, либо их частей, содержащих наркотические средства или психотропные вещества»; потребление без назначения врача их или новых, потенциально опасных психоактивных веществ; уклонение от прохождения диагностики, профилактики и лечения наркомании и медицинской и социальной реабилитации; пропаганда НСиПВ; вовлечение несовершеннолетнего в употребление; нарушение правил оборота НСиПВ, хранения, учета, реализации, перевозки, приобретения, использования или уничтожения растений, содержащих НСиПВ и/или их прекурсоры. Однако законом контролируются не только вещества включённые в списки. В ФЗ № 3 установлен термин «аналоги НСиПВ». Аналоги – вещества синтетического или естественного происхождения, не включенные в перечень, химическая структура и свойства которых сходны с химической структурой и свойствами НСиПВ, психоактивное действие которых они воспроизводят.

В 2009 г. было установлено, что действующим компонентом смесей являются синтетические аналоги тетрагидроканнабинола, что послужило началом кампании по их запрету. Так, первоначально выявленные синтетические каннабиноиды были занесены в список I. Однако синтез и появление на рынке новых СК в последние годы привели к необходимости пересмотреть политику их контроля, что и нашло отражение в № 7-ФЗ от 03.02.2015, известном как «закон о спайсах». Данный документ запустил механизм формирования реестра новых психоактивных веществ, в который будут заноситься формулы НСиПВ для их надлежащего контроля.

ЛИТЕРАТУРА

1. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие / Под ред. проф. Н.И.Калетиной. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008.
2. ТСХ-скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией: учебное пособие / Г.В.Раменская [и др.] – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010.
3. Официальный интернет-портал правовой информации. URL: http://pravo.gov.ru (дата обращения 09.04.2017).
4. Википедия. URL: https://ru.wikipedia.org (дата обращения 09.04.2017).
5. Консультант плюс. URL: http://www.consultant.ru/ (дата обращения 09.04.2017).

II ЭТАП СИНТЕТИЧЕСКИХ НАРКОТИКОВ – «ЭПОХА ЛЮБВИ»

М.Н. Порядина, М.В. Белова, Н.П. Садчикова

Послевоенная социально-экономическая ситуация вызвала к жизни новые психоактивные вещества (ПАВ), действие которых обеспечивало получение новых ярких ощущений, впечатлений, «расширение сознания», эмоциональную открытость. В 1960–70-е годы было создано большое число новых синтетических ПАВ – психоделиков на основе амфетамина, лизергиновой кислоты, аналогов фенциклидина. Данный этап характеризуется отсутствием четких юридических принципов, позволяющих регулировать их появление.

ЛСД – d-диэтиламид лизергиновой кислоты – аналог серотонина, агонист 5-НТ-рецепторов [16], синтезирован в 1938 г. из алкалоидов спорыньи при поиске лекарств-аналептиков. С начала 1950-х, когда начали выпуск лекарственного препарата Delysid, по всему миру велись эксперименты с целью изучения сознания и применения ПАВ для лечения различных расстройств и заболеваний психики. Изучался вопрос использования ЛСД в качестве анальгетика при хронических болях, и был обнаружен длительный (более недели) сильный анальгезирующий эффект [6].

Употребление ЛСД в качестве наркотика началось в 1960-х годах, а к 1966 году около 4 млн американцев пробовали его. По Америке прокатилась волна увлечения ПАВ и ЛСД, которая сильно повлияла на формирование контркультуры 60-70-х. Вышедшее из-под контроля использование ЛСД в молодёжной среде приобрело слишком большой размах, что вызвало политический скандал и привело к полному запрету ЛСД для любых целей, как медицинских, так и немедицинских. В Российской Федерации ЛСД, как и другие производные лизергиновой кислоты, запрещены.

N,N-диметилтриптамин (DMT) был синтезирован в 1931 г., а позднее обнаружен как компонент корня мимозы (*Mimosa tenuiflora*)

Психотропные свойства DMT объясняются схожестью его структуры с серотонином – важным нейромедиатором головного мозга млекопитающих. DMT в небольших количествах вырабатывается человеческим организмом в процессе нормального метаболизма [4]. DMT – психоделик, способный вызывать интенсивные визуальные и слуховые галлюцинации, изменять восприятие времени и испытывать переживания в отличных от привычной реальностях [5, 6].

В большинстве стран DMT классифицируется законом как нелегальное средство и находится под запретом. В России он внесен в список I [1].

Фенциклидин (PCP) синтезирован при поиске средств для анестезии. Вместе с кетамином составляет группу диссоциативных анестетических галлюциногенов; действует на глутаминергические рецепторы [1]. С 1957 г. в США выпускался в виде инъекционного анестетика под названием «Сернил». В отличие от опиатов не давал угнетения дыхания и сердечно-сосудистой системы. Однако достаточно быстро обнаружили негативные последствия его применения – постоперационные галлюцинации, возбуждение, ментальные расстройства, депрессивные состояния. Вследствие этого использование в медицинской практике было ограничено (применялся в ветеринарии под названием «Сернилан» до 1979 г.) и впоследствии совсем запрещено [7].

Синтез PCP относительно прост, он может осуществляться подпольными лабораториями, использующими в качестве исходных доступные химические вещества. Большая часть препарата в США поступает именно из них. В 1967 г. отмечен пик популярности PCP на нелегальном рынке, с конца 1970-х – различных его аналогов [2]. Основной способ потребления – курение (в смеси с марихуаной, табаком, мятой). В таблетках смешивается с другими наркотиками. Зарегистрировано более 30 смесей в нелегальном обороте в РФ [1, 7].

В РФ фенциклидин и его аналоги входят как наркотические средства в список I.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.В. Веселовская, А.Е. Коваленко. Наркотики. Пособие. М.: Триада-Х, 2000. С. 151–154; 163–164.
2. P.G. Stafford, B.H. Golightly. LSD – The Problem-Solving Psychedelic. Chapter I. The LSD Crisis. URL: http://www.druglibrary.org/schaffer/lsd/staf8.htm (дата обращения 08.04.2017).
3. E. Kast. Attenuation of anticipation: a therapeutic use of lysergic acid diethylamide // Psychiat. Quart. 1967. № 41(4). P. 646–657.
4. S.A. Barker, J.A. Monti, S.T. Christian. N,N-Dimethyltryptamine: An endogenous hallucinogen // International Review of Neurobiology. 1981. V. 22. PP. 83–110.
5. J. Bigwood, J. Ott. DMT // Head Magazine. 1977.
6. R.J. Strassman. DMT: The Spirit Molecule. – Rochester, VT: Park Street Press, 2001. P. 39-40, 53. URL: http://organiclab.narod.ru/books/DMT-The-spirit-molecule.pdf (дата обращения 08.04.2017).
7. Comparison of Sernyl with Other Drugs. Simulation of Schizophrenic Performance with Sernyl, LSD-25, and Amobarbital (Amytal) Sodium; I. Attention, Motor Function, and Proprioception // AMA Arch Gen Psychiatry. 1959. V. 1(6). P. 651-656. URL: http://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/article-abstract/487710) (дата обращения 08.04.2017).

СИНТЕТИЧЕСКИЕ КАННАБИНОИДЫ – ПОПУЛЯРНЫЕ СОВРЕМЕННЫЕ ПСИХОАКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ

О.В. Салтыкова, Г.М. Родионова, О.Ю. Щепочкина

Различают две классификации СК: фармакологическую и химическую.

Согласно фармакологической классификации выделяют *каннабомиметики – агонисты* каннабиноидных рецепторов СВ, проявляющие каннабиноидную активность, и *антогонисты* СВ, которые способны связываться со специфическими СВ-рецепторами, не создавая каннабиноидных эффектов и препятствуя связи других соединений с ними. С химической точки зрения СК представляют собой сложные полифункциональные органические соединения с гетероциклическими структурами. Химическая классификация каннабиноидов начала формироваться в 2000-х г. и включала в себя 6 основных групп: классические, неклассические, гибридные, аминоалкилиндолы, эйкозаноиды и прочие.

Классические (дибензопираны) имеют структуру, подобную Δ9-тетрагидроканнабинолу (ТГК), к ним относятся также СК – HU-210 и лекарственное средство набилон. Практически все известные на сегодня СК являются неклассическими – они имеют различную химическую структуру: циклогексилфенолы (CP47497), нафтоилиндолы (JWH018), индолилкетоны (AM2201), фенилацетилиндолы (JWH204), нафтилметилиндолы (JWH175), нафтоилпирролы (JWH370) и другие. Среди более современных – индазол-3-карбоксамиды (AB-FUBINACA, ADB-CHMINACA), индолкарбоксамиды (ADBICA-F, MMB-2201) и индолилкарбоксилаты (FUB-PB-22, PB-22F). Кроме этих, выявлены СК, являющиеся производными циклопропилиндола, адамантилиндазол-карбоксамида, хинолининдолкарбоксилата. Это препараты «нового» поколения.

Завоевание новыми видами СК нелегального рынка наркотических и психоактивных соединений, исследование их аффинитета к СВ-рецепторам привело к расширению и объединению химической и фармакологической классификации. Указание аффинитета соединения к СВ-рецепторам дает информацию о его психоактивном потенциале и токсичности.

Константа комплекса «субстрат – рецептор» Ki показывает степень сродства вещества к каннабиноидным рецепторам CB_1. Чем меньше значение этой величины, тем сильнее взаимодействие с рецептором. Например, значение Ki для ТГК, основного действующего вещества натуральной конопли, равно 10,2 нМ, а для современного наркотического средства ADB-CHMINACA – 0,289 нМ. Значит, последнее в 35 раз сильнее природного соединения. Для синтетического JWH-387 константа составляет 43 нМ, по аффинитету к CB_1-рецепторам он слабее природного аналога в 4 раза. Если значение Ki больше 100, то воздействие вещества на каннабиноидный рецептор неощутимо. Значение Ki необходимо учитывать при внесении СК в списки наркотических средств и психотропных веществ, оборот которых регламентируется в Российской Федерации, а также при определении возможности их применения с медицинскими целями.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.В. Митин. Исследование курительных ароматических смесей // Судебная экспертиза. 2010. № 1. С. 30–39.
2. Постановление Правительства Российской Федерации № 681 от 30 июня 1998 г. «Об утверждении перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации» (ред. 03.03.2012 г.).
3. А.Б. Мелентьев, С.С. Катаев, О.Н. Дворская. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах. – М. 2016. 195 с.

МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ КАННАБИНОИДОВ

А. Тенякова, М.В. Белова, З.В. Чумакова

Внимание к проблеме употребления курительных смесей в нашей стране возросло после массовых отравлений осенью 2014 г. В общей сложности за медицинской помощью обратились более 2000 человек, употребивших курительные смеси (спайсы), свыше тысячи были госпитализированы, более 40 человек погибли [1]. Наиболее пострадавшими регионами оказались Ханты-Мансийский автономный округ, Кировская область, Краснодарский край и республика Башкортостан [4]. Причиной послужило появление нового на тот момент вещества с неизвестным механизмом действия.

Токсические проявления при приеме СК обусловлены сложностью дозирования в связи с разной активностью, неоднородностью распределения в формах применения и кустарным производством. При нарушении технологии синтеза возможно образование примесей более ядовитых, чем сам наркотик. Есть мнение, что при биотрансформации СК в организме образуются психоактивные и токсичные метаболиты – агонисты CB_1-рецепторов. Этот факт также поддерживает токсичность СК.

Выявление единой клинической картины отравления затруднено разнообразием активных действующих веществ, индивидуальной реакцией организма, а также отсутствием точной дозировки при употреблении СК [4]. Клиническая картина отравлений СК имеет стадийность.

Вскоре после приема наблюдаются: психомоторное и сильное эмоциональное возбуждение, чувство тревоги, страха удушья, смерти, нарушение восприятия, галлюцинации, дезориентация, неадекватность поведения, потеря контакта с окружающим миром, контроля собственной личности, нарушение сознания, вплоть до сопора и комы, тахикардия до 140–150 уд./мин, гипертензия, тошнота, рвота, нарушение дыхания из-за западения языка и аспирации, в ряде случаев – тремор, судороги, широкий зрачок. **Позднее регистрируют:** оглушение, вялость, заторможенность, сонливость с периодическими приступами возбуждения и галлюцинаций, пониженное артериальное давление, брадикардию до 50 уд./мин, примерно в 20% случаев сохраняются возбуждение, беспокойство, немотивированная агрессия; речь смазанная, замедленная, нечеткая, в ряде случаев ускоренная, но неразборчивая, бледность кожных покровов, нарушение чувствительности кожи в различных местах, нарушение работы цилиарной мышцы, вследствие чего происходит двоение и нечеткое зрение, астения.

На фоне лечения проявления интоксикации исчезают в течение первых суток. В зависимости от тяжести исходного состояния астения может наблюдаться еще 12–48 ч. У части больных сохраняются психотические нарушения: немотивированные страхи, аффективно-бредовые расстройства, суицидальная настроенность, которые в ряде случаев (при длительном приеме СК) продолжаются до 14 суток [2–4].

Лечение включает детоксикационную и симптоматическую терапию, специфические антидоты к СК на сегодня не предложены. Оно направлено на быстрейшее удаление токсиканта из организма (инфузии и форсированный диурез), купирование возникающих психосоматических нарушений и поддержание витальных функций. При психомоторном возбуждении внутривенно вводят реланиум. Для предотвращения повреждения структур мозга проводят ноотропную и витаминотерапию.

Из-за нетипичности клинических проявлений симптомы отравления СК путают с психическими и сердечными заболеваниями, вследствие чего медицинская помощь оказывается в неспециализированном стационаре и не направлена на детоксикацию. При отсутствии адекватного лечения возможен затяжной характер течения психоза, а также нарушения функции других органов и систем: повышается частота сердечных сокращений и артериальное давление, что значительно увеличивает риск развития инфарктов и инсультов. Выявлена связь между острой почечной недостаточностью и приемом спайсов. Даже кратковременное употребление СК может инициировать преходящие психотические эпизоды, служить предрасполагающим фактором развития шизофрении и других психозов как у людей без психиатрической патологии, так и у психиатрических пациентов в состоянии ремиссии [2].

Привыкание и синдром отмены. Вопреки распространенному мнению, СК вызывает привыкание. При систематическом приеме формируются синдромы толерантности, психической зависимости, абстиненции. Признаки синдрома отмены: отсутствие аппетита или потеря в весе, нарушения сна, раздражительность, гнев, агрессия, эмоциональная лабильность, слезливость, снижение настроения, потливость. Реже – астения, тахикардия, гипертензия, диспепсические явления. Длительность синдрома отмены – от 2 до 4 недель.

Воздействие курительных смесей со временем способно привести к тяжелой инвалидности, навсегда изменить личность человека, превратив его не только в наркозависимого, но и в психически больного, а также довести до нелепой смерти.

ЛИТЕРАТУРА

1. О.А. Бойко, С.Л. Панов. Социально-психологические аспекты потребления спайсов // Психопедагогика в правоохранительных органах. 2016. № 1(64). С. 41–43.
2. Н.В. Каклюгин. Как сходит с ума Россия // Психическое здоровье. 2014. № 5. С. 84–106.
3. А.А. Овчинников, О.Н. Патрикеева. Синтетические каннабиноиды: психотропные эффекты, побочные действия, риски употребления // Медицина и образование в Сибири. 2014. № 3.
4. Ю.Н. Остапенко, М.В. Белова, А.Е. Клюев, И.А. Тюрин, Т.А. Стрельникова. Острые отравления психоактивными веществами из группы каннабимиметиков. Клиническая картина, диагностика, лечение // Токсикология. Т. 16. 2015. С. 176–186.

ДИЗАЙНЕРСКИЕ НАРКОТИКИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

П.Г. Швед, Г.М. Родионова, В.И. Прокофьева

С конца 1990-х синтез и оборот дизайнерских наркотиков приобретали небывалые масштабы, чему способствовало стремительное развитие нейрофизиологии, нейрофармакологии, молекулярной биологии. Открытие специфических рецепторов ряда психоактивных веществ, эндогенных агонистов этих рецепторов, а также прогресс в области компьютерных технологий и органического синтеза позволил моделировать и целенаправленно создавать все новые субстанции, специфично воздействующие на определенные рецепторы и обладающие заданной активностью.

Знаковой фигурой этого периода является А. Шульгин, ученый-химик, который синтезировал, испытал на себе и популяризировал большое количество соединений – производных триптаминов, фенэтиламинов (включая МДМА и мескалин) и лизергиновой кислоты (ЛСД) [1]. Метилендиоксипроизводные амфетамина (МДОА) оказывают на человека настолько специфическое воздействие, что их выделяют в особый класс – *энтактогены*. Основные представители этого класса – МДМА (3,4-метилендиоксиметамфетамин), МДЕА (N-этил МДА, 3,4-метилендиоксиэтиламфетамин) и МБДБ [N-метил-1-(3,4-метилендиоксифенил)-2-бутанамин] – наиболее распространены на нелегальном рынке торговли наркотиками. Они вызывают легкую эйфорию, обострение эмоционального восприятия, дают чувство близости, при этом не сопровождаются стимулирующим и галлюциногенным действием [2]. Наиболее тяжелыми побочными эффектами являются колебания кровяного давления, нейропатии, нарушение зрения, судороги. При длительном употреблении развивается толерантность, отрицательные эффекты усиливаются. Происходят необратимые тяжелые нарушения серотонергической системы, длительные депрессии, панические состояния, параноидные реакции. Смерть наступает вследствие обезвоживания, острой сердечной недостаточности и остановки сердца, отказа почек, а также гипертермии (до 42 °С), чему способствует окружающая обстановка дискотек и вечеринок, сопутствующая приему МДОА. При аутопсии установлены также значительные изменения печени, почек и мозга у лиц, употреблявших МДОА. После спада основных эффектов развиваются сонливость, спутанность сознания, нарушение координации и способности концентрироваться, что может стать косвенной причиной смерти, например, при дорожно-транспортных происшествиях [2].

Огромную роль в распространения новых дизайнерских наркотиков сыграл Интернет: посредством его стало происходить распространение информации о психоактивных веществах (ПАВ), их синтезе и приобретении. Почти весь наркотрафик фактически «ушел» в Интернет, исчез физический контакт между звеньями преступной цепочки [3].

С глобализацией наркотиков появляется термин «вещества для исследований», введённый в оборот наркодилерами, поскольку их реализация не попадает под действие законодательства об аналогах наркотических препаратов. Многие ПАВ, реализуемые как «вещества для исследований», имели химическое структурное сходство с псилоцибином и мескалином [3]. Невозможность точной дозировки этих веществ, подбор самим потребителем эффективной дозы эмпирическим путем вызывали негативные эффекты, вплоть до летального исхода. Случаи смерти от передозировки новыми ПАВ, как правило, имели резонанс в СМИ, что привело в конечном итоге к запрету большинства дизайнерских наркотиков.

В последние годы появляется множество новых дизайнерских наркотиков, включающих психостимуляторы (*метилендиоксипировалерон, α-пирролидиногексанофенон, 4-метилметкатинон*), психоделики (*2,5-диметокси-4-бромофенэтиламин, 2,5-диметокси-4-этилфенэтиламин, 2,5-диметокси-4-пропилтиофенэтиламин* и др.), депрессанты (*метилметаквалон, премазепам*) и энтактогены. Большую популярность набирают новые дизайнерские наркотики, так называемые соли для ванн. В их состав чаще всего входят мощнейшие психостимуляторы группы замещенных амфетаминов и катинонов: метилендиоксипировалерон, метилон и мефедрон. Их приём приводит к развитию психических заболеваний (шизофрении, психозам, паранойе), стремительному ухудшению здоровья, повреждению структур мозга. В отличие от натуральных стимуляторов (кокаина и его аналогов) синтетические ПАВ имеют большое количество примесей, которые депонируются в костной ткани, становясь причиной болей. Вред многократно усиливается при одновременном употреблении алкоголя и курении [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Орлова. Перманентный трип Александра Шульгина. 2014. URL: http://www.cablook.com/mixlook/permanentnyj-trip-aleksandra-shulgina/ (дата обращения 07.04.2017).
2. Н.В. Веселовская, А.Е. Коваленко. Наркотики. Свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм. – М.: Триада-Х, 2000. С. 161–163.
3. И. Нигматуллин, А. Лучников. Новая эра наркобизнеса: «дурь» через интернет от группировщиков с планшетами. 2015. URL: https://www.business-gazeta.ru/article/140016 (дата обращения 08.04.2017).
4. Наркосоли для ванн – вред и влияние на организм. 2016. URL: http://net-zavisim.ru/narkomaniya/narko-soli-dlya-vann.html (дата обращения 14.03.2017).

МЕТАДОН И МЕТАДОНОВАЯ ПРОГРАММА

Э.Э. Шурова, М.В. Белова, В.В. Смирнов

Метадон – синтетический препарат, отличающийся по химической структуре от морфина. Связываясь с опиоидными рецепторами, оказывает на организм морфиноподобное действие. Существует в двух изомерных формах. Левовращающий изомер примерно в 4 раза более сильный анальгетик, чем морфин. Смертельные случаи отравления наблюдались при приеме 50 мг метадона.

Синтезирован в Германии в 1937 году. В 1942 г. начался промышленный выпуск препарата, который использовался как анальгетик в эксперименте, а с конца 1940-х, после полноценных клинических испытаний, – в медицине [1]. Важным его отличием стала эффективность при пероральном употреблении.

В начале 1960-х метадон был предложен для лечения героинизма. Поначалу оно давало впечатляющие результаты. Однако к середине 1970-х годов резко возросло число смертельных исходов, которое превысило число героиновых смертей. Но только в 1978 г. Парламентская ассамблея Совета Европы обратилась к руководству всех стран с просьбой о запрете любой формы сбыта метадона [2]. Хотя метадон до сих пор запрещен в некоторых странах Европы, в связи с эпидемией ВИЧ-инфекции его применяют в качестве средства от наркозависимости – почти везде как подконтрольную, легальную и полноценную замену героина [2].

Метадоновая программа – это часть европейской стратегии снижения вреда «инъекционной» наркомании с целью профилактики распространения ВИЧ-инфекции. Суть программы заключается в том, что лицу с диагностированной наркозависимостью предлагается строго индивидуально подобранная доза метадона, которая не вызывает наркотическое опьянение, но позволяет снять симптомы отмены. Наркоман, находясь под действием метадона, остается в здравом уме и трезвом сознании, может осуществлять различные виды работ, находиться в семье, воспитывать детей. На сегодняшний день метадоновая программа официально одобрена ВОЗ, настоятельно рекомендуется Управлением ООН по наркотикам и преступности и считается наиболее перспективной для решения проблем с оборотом наркотиков во всем мире [3]. По данным ежегодных отчетов Европейского мониторингового центра по наркотикам и наркотической зависимости, заместительная терапия является наиболее распространенным методом оказания помощи. С 1993 г. число таких пациентов в странах Евросоюза выросло более чем в 7 раз и составляет более 500 тыс. Наибольший прирост количества пациентов поддерживающей терапии отмечен в Чехии – 42%, Финляндии, Польше, Эстонии, Швеции, Норвегии, Венгрии и Австрии – около 10% [3].

Несмотря на положительные стороны этой методики, следует отметить и негативные. Метадон оказался еще более сильным наркотиком, с более продолжительным действием. Прекращение употребления метадона приводит к развитию синдрома отмены, острый период которого длится на протяжении месяца. Зависимость от него плохо поддается лечению. Более того, стараясь восполнить эффект, наркоман начинает совместно с метадоном или вместо употреблять алкоголь и другие синтетические психоактивные вещества.

Метадоновая программа применялась во многих странах (США, Австралии, Китае, Швеции, Германии, Франции, Нидерландах), но не решила проблему наркомании, при этом смертность увеличилась до 60%. В США от передозировки метадона погибло больше людей, чем от передозировки героина. По последним данным, до 80% употребляющих метадон употребляют и героин, то есть формируется полинаркомания.

Российская Федерация наряду с Германией, Швейцарией и Францией выступает против введения метадоновой терапии, хотя перспектива ее введения в России обсуждается вполне официально и всерьез. В РФ метадон внесен в список 1 перечня наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, подлежащих контролю в Российской Федерации и запрещенных к обороту, не может использоваться в лечебной практике.

Таким образом, метадон – это не способ решения проблемы наркопотребления. Заместительная терапия никогда не станет полноценной альтернативой лечению от тяжелой наркомании, а позволит лишь социализировать наркомана в обществе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.В. Веселовская, А.Е. Коваленко. Наркотики. Свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм. – М.: Триада-Х, 2000.
2. Метадон. URL: http://ru.t0r4.eu/phpBB/page.php?p=22 (дата обращения 04.04.2017).
3. Метадоновая терапия как способ избавления от героиновой зависимости // Gidmed. URL: http://gidmed.com/narkologiya/narkomaniya/metadonovaja-terapija.html (дата обращения 01.04.2017).

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ – ОСНОВНОЙ ИНСТРУМЕНТ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Д.А. Лазутина, М.В. Белова

Разработка лекарств – это дорогой и рискованный процесс. До начала XX в. арсенал лекарственных средств пополнялся главным образом случайными открытиями растительных биологически активных веществ. Ограниченность сырьевой базы, выявление побочных эффектов привели к необходимости поиска новых лекарственных веществ (ЛВ) синтетического происхождения с наименьшим побочным действием.

В настоящее время каждое потенциальное ЛВ проходит 3 стадии изучения: фармацевтическую, фармакокинетическую и фармакодинамическую.

На фармацевтической стадии устанавливают наличие полезного действия ЛВ (острая токсичность, субхроническая токсичность). На второй стадии, фармакокинетической, изучают судьбу ЛВ в организме. На третьей, фармакодинамической, изучаются проблемы распознавания ЛВ (или его метаболитов) мишенями и их последующего взаимодействия [7].

Молекулярное моделирование (ММ) работает на всех стадиях разработки лекарственных средств. Оно стало важнейшим методом при дизайне новых ЛВ на первых этапах конструирования молекул, оптимальным образом связывающихся с заданными биологическими мишенями (как правило, белковой природы) и обладающих определенным комплексом свойств [1]. Обычно модификация структур существующих ЛВ путем введения другого радикала или химического элемента и т.п. позволяет увеличить активность и избирательность действия ЛВ, снизить токсичность.

Целенаправленный синтез ЛВ означает поиск веществ с заранее заданными фармакологическими свойствами. Он становится удачным, когда удается найти такую структуру, которая по размеру, форме, пространственному положению, электронно-протонным свойствам и ряду других физико-химических показателей будет соответствовать живой структуре, подлежащей регулированию. Важнейшим этапом является моделирование связи новой молекулы с рецептором-мишенью. ММ дает возможность определения биологического потенциала молекулы путем компьютерного анализа, в результате которого ученый получает рекомендации о целесообразности или нецелесообразности испытаний данного вещества на тот или иной вид активности. Такой скрининг экономит время, материалы и силы при аналоговом поиске ЛВ [7].

Примером использования этого принципа стал синтез налорфина – антагониста морфина, который используют как специфический антидот при отравлении опиатами. В 1975 г. было установлено, что в мозге млекопитающих содержатся эндогенные пентапептиды – энкефалины, которые являются агонистами опиоидных биорецепторов. ММ аналогов морфина показало, что для проявления действия они должны иметь топографическое сходство с морфином. Налорфин отличается от морфина лишь заместителями при атоме азота. Его получают полусинтетически – деметилированием морфина 10-бромцианом с последующим введением аллильной группы [2–4].

Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) имеет неплоскую структуру, является гибкой цвиттер-ионной молекулой, которая может существовать в разных конформациях [1, 5]. Изучение путем ММ связи структуры с физиологической активностью некоторых аналогов ГАМК, имеющих жесткую структуру (мусцимол, 4-аминотетроловая и 4-аминокротоновая кислоты), позволило смоделировать и впоследствии синтезировать высокоактивные препараты «Баклофен» и «Прегабалин» с ГАМК-подобным механизмом фармакологического действия [6].

Каннабиноиды. В 1988 г. были открыты каннабиноидные рецепторы CB_1, расположенные преимущественно в центральной нервной системе, а также в симпатических ганглиях, надпочечниках, иммунокомпетентных клетках, сосудах микроциркуляции и в других органах. В 1993 году были обнаружены рецепторы CB_2, которые локализуются в лимфоидной ткани и макрофагах, участвуют в регуляции иммунной системы. Возможно, существуют и другие подтипы каннабиноидных рецепторов.

В 1992 г. R. Mechoulam показал, что головной мозг вырабатывает жирную кислоту, способную связываться с рецепторами CB_1 и имитировать все известные эффекты марихуаны. В отличие от лигандов других G-протеин-связанных рецепторов эндогенные каннабиноиды являются эйкозаноидами. Наиболее важные среди них – арахидонилэтаноламид, обладающий аффинитетом преимущественно к CB_1-рецепторам, и 2-арахидонилглицерин. Начавшиеся многочисленные исследования показали, что эндоканнабиноиды участвуют в ретроградной передаче нервных сигналов, прежде неизвестном способе взаимодействия нервных клеток в головном мозге. Эндоканнабиноиды выходят из синтезировавшей их клетки и взаимодействуют с рецепторами, расположенными на соседних клетках, а передав сигнал, довольно быстро утилизируются, то есть являются местными медиаторами, подобными простагландинам.

С учетом уникальных свойств эндогенной каннабиоидной системы начались работы по синтезу аналогов растительных и эндогенных каннабиноидов. В 1998 году группой профессора Дж. Хаффмана при исследовании структурно-функциональных аналогов нестероидных противовоспалительных средств был синтезирован JWH-018. В экспериментах на животных выяснилось, что по силе воздействия на каннабиноидные рецепторы мозга (CB_1 и CB_2) JWH-018 превосходит ТГК примерно в пять раз. Это обеспечило ему более сильный и продолжительный психотропный эффект по сравнению с ТГК. К настоящему времени синтезировано несколько десятков каннабомиметиков, некоторые из которых пытаются использовать как лекарственные вещества, однако их применение в медицине ограничено наличием побочных эффектов, в первую очередь психотропных свойств.

Основными направлениями исследования при создании новых СК (агонистов, антагонистов и обратных агонистов) являются:

- получение высокоаффинных лигандов CB_2-рецепторов, которые представляются перспективными веществами с точки зрения лечения нейродегенеративных, иммунных, онкологических и некоторых других заболеваний;
- антагонисты рецепторов CB_1 рассматриваются как потенциальные средства лечения химических зависимостей (никотиновой, опиатной, кокаиновой, алкогольной, каннабиоидной и др.) и ожирения;
- агенты, родственные к каннабиноидным рецепторам, считаются незаменимыми при изучении эндоканнабиноидных нейромедиаторных систем.

Кардинальным направлением последующих исследований стало разделение потенциальных терапевтических эффектов агонистов каннабиноидных рецепторов и их побочного действия.

Отмечено, что ряд препаратов, такие как, например, производные 1,4-бензохиноны, обладают противораковым действием. Эти вещества не связываются с CB_1-рецептором и механизм их действия пока неясен.

Набилон (синтетический аналог ТГК) используется для лечения тошноты после химиотерапии у раковых больных. Правовращающий изомер каннабидиола рассматривается для лечения эпилепсии и как противовоспалительное средство.

Принципы ММ используются, к сожалению, также в создании новых наркотиков, которые можно назвать дизайнерскими.

ЛИТЕРАТУРА

1. В.В. Поройков. Компьютерное предсказание биологической активности веществ: пределы возможного // Химия в России. 1999. № 2. С. 8–12.
2. И.Л. Кнунянц. Химическая энциклопедия. – М.: Советская энциклопедия, 1988. 364 с.
3. Кукес В. Г., Стародубцева А. К. Фармакология и фармакотерапия. – М.: ГЭОТАР – МЕД, 2004.
4. В.Г. Беликов. Фармацевтическая химия. – М.: Высшая школа, 1985. 262 с.
5. А.Т. Солдотенков, Н.М. Колядина, И.В. Шендрик. Основы органической химии лекарственных веществ. – М.: МИН, 2003. 274 с.
6. Р.Н. Аляутдин. Фармакология. Учебник для вузов. – М. 2004. 322 с.
7. В.В. Поройков, Д.А. Филимонов. Компьютерный прогноз биологической активности химических соединений как основа для поиска и оптимизации базовых структур новых лекарств / Азотистые гетероциклы и алкалоиды. – М.: Иридиум-пресс, 2001. Т. 1. С. 483–499.



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

büchiglasuster · SKALAR · BUCHI · SYSTAG · ESCO · METTLER TOLEDO · NATOLI
SCHMIZO · INTEGRA · GERSTEL · Agilent Technologies · CHRIST · Julabo · BINDER
Miele PROFESSIONAL · Nabertherm · CISA · INFORS HT · MERCK · IKA · sigma
sotax · pharmatron · SEJONG · Whatman · Metrohm · ThermoFisher SCIENTIFIC · THALESNANO

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

АНАЛИЗ ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ В ФАРМАЦЕВТИКЕ МЕТОДОМ ИСП-ОЭС

Материал предоставлен компанией Agilent Technologies



Agilent 5110 ICP-OES

РАССМОТРЕНИЕ НОВЫХ МЕТОДОВ ICH И USP, РАЗРАБОТАННЫХ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

Фармацевтическая промышленность должна перейти на новые методы определения элементных примесей

Контроль над содержанием примесей, включая элементные (неорганические) загрязнители, всегда имел особо важное значение в разработке и производстве фармацевтической продукции. Однако предыдущий метод Фармакопеи США (USP) для определения следовых количеств металлов в соответствии с USP <231> (анализ на допустимое содержание тяжелых металлов) хотя и широко используется, но не дает адекватной информации о потенциальной токсичности этих загрязнителей. Метод USP <231> не был специфическим или количественным, имел ограниченный объем и часто давал плохие результаты для летучих аналитов, которые терялись на стадии высокотемпературного озоления.

Чтобы устранить эти недостатки, Международная конференция по гармонизации требований к регистрации лекарственных средств для человека (ICH) и Фармакопея США (USP) разработали новые унифицированные методы, основанные на показателях эффективности: ICH Q3D, USP <232> («Пределы») и USP <233> («Процедуры») – для определения содержания элементных примесей в фармацевтических продуктах и сырье. Связанный с этим метод USP <2232> касается диетических добавок.

Стандарты ICH Q3D и USP <232> определяют целевые аналиты и предельно допустимые суточные дозы (ДСД) на основе токсикологических данных, а не возможностей метода, и требуют количественного определения отдельных концентраций металлов вместо использовавшегося ранее теста на осаждение сульфида в соответствии с USP <231>.

24 целевых аналита, перечисленных в ICH Q3D и USP <232>, содержат элементы «большой четверки» класса 1: мышьяк (As), кадмий (Cd), ртуть (Hg) и свинец (Pb) держат под контролем на самых низких уровнях, их содержание должно оцениваться во всех лекарственных средствах. Другие регулируемые нормативами элементы также должны содержаться в лекарственных средствах в ограниченной концентрации. Нужно измерять данные элементы, если есть вероятность их попадания в медикаменты в процессе приготовления (например, вместе с сырьевыми материалами, металлами-катализаторами, Pt, Pd и т.д.) или в результате производственных процессов.

Эталонные аналитические методики, которые рекомендуются к применению новыми нормативными указаниями, – это методы ИСП-МС и ИСП-ОЭС, которые пришли на смену колориметрическому тесту, использовавшемуся ранее.

Как ИСП-ОЭС, так и ИСП-МС может определять все регулируемые элементарные примеси на уровнях J, необходимых для прямого анализа пероральных лекарственных препаратов. Значение J представляет максимально допустимый уровень для каждого элемента и рассчитывается из целевого предела ДСД в тестовом образце, от-

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

корректированного для разбавления образца во время подготовки; то есть значение J – концентрация раствора анализируемого образца, эквивалентная ДСД.

ИСП-ОЭС обладает преимуществами в плане чувствительности при наличии высоких матричных нагрузок, простоты эксплуатации и высокой пропускной способности.

ИЗМЕРЕНИЕ «ТРУДНЫХ» ОБРАЗЦОВ

Agilent 5110 ICP-OES является идеальным прибором для фармацевтических лабораторий, делающим акцент на материалы для пероральных лекарственных средств и фармацевтические продукты, требующие небольшого разбавления образца или не требующие его совсем. Его вертикальная горелка позволяет анализировать самые разные типы образцов, в том числе с общим содержанием растворенных твердых веществ около 25%. Вертикальная горелка обеспечивает долгосрочную аналитическую стабильность даже на самых трудно анализируемых образцах и может легко обрабатывать различные матрицы образцов, например такие, как водные и органические растворители.

На рисунке 1 показаны возможности разрешения и чувствительности модели 5110 ICP-OES в отношении органической матрицы для фармацевтического анализа – образца масла, растворенного в растворителе. Образец разбавляли 10 раз и аспирировали непосредственно в прибор. Прибор может легко измерить целевой предел по USP (значение J), который составляет 50 мкг/л для Cd при этом разбавлении.

БЫСТРОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ТОЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Детектор Vista Chip II в модели 5110 ICP-OES имеет очень широкое покрытие по длине волны и высокую тактовую частоту. Он способен определять все длины волн в диапазоне от 167 нм до 785 нм за одно измерение. Это легко позволяет выбирать длины волн, которые свободны от помех, а высокая скорость обработки аналитических данных уменьшает время анализа.

Такая возможность позволяет использовать несколько длин волн в качестве однозначного подтверждения точности концентрации элемента. Это делается путем проверки расчетной концентрации от длины волн первичной эмиссии до расчетной концентрации на длинах волн альтернативного излучения для одного и того же элемента. В таблице 1 отображены результаты проверки «в методе» концентрации Cd. То есть одновременно были трижды измерены длины двух отдельных волн, возбуждаемых эмиссией Cd. Данный способ дает специалисту уверенность в достоверности результатов, на которые не влияли помехи.

Модель 5110 ICP-OES позволяет работать и с методом поправки на фон с автоматической аппроксимацией, и с методом FACT (скоростной автоматической аппроксимацией кривых), представляющим алгоритм спектральной деконволюции, использующийся для коррекции спектрального перекрытия.

Таблица 1.

Измеренная концентрация Cd (35 ppb) в образце масла при двух разных длинах волн эмиссии. Взаимосвязанные результаты дают подтверждение результатов анализа Cd «в методе», позволяя экономить время

Измерение	Измеренная концентрация (мкг/л) Cd при 214,439 нм	Измеренная концентрация (мкг/л) Cd при 226,502 нм
1	37,4	35,4
2	39,3	34,5
3	36,1	34,8

Специалист-аналитик может использовать по умолчанию уникальную поправку на фон с автоматической аппроксимацией, которая является алгоритмом, автоматически выбирающим лучшие фоновые точки. Данный метод коррекции фона уменьшает время разработки метода и снижает уровень его сложности для лаборанта. На рисунке 1 также показана пунктирная линия под спектром, которая отображает автоматическое размещение поправки на фон с автоматической аппроксимацией.

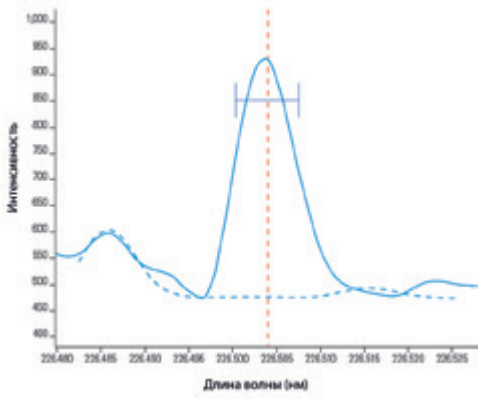


Рисунок 1. Сигнал эмиссии от 35 мкг/л Cd при 226,502 нм в образце масла, растворенного в керосине. Спектр Cd имеет четкое разрешение, несмотря на присутствие в образце 21 элемента

Метод FACT, применяющийся для вычитания спектральных перекрытий, можно разработать достаточно быстро. FACT – простой, но мощный инструмент, который не требует специальных настроек программного обеспечения или изменений в конфигурациях оптики, для того чтобы вычесть спектральные помехи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Agilent 5110 ICP-OES выводит ИСП-ОЭС-анализ на совершенно новый уровень. Он предназначен для быстрого анализа образцов, использует меньшее количество газа, производительность остается высокой даже на самых трудно измеряемых образцах. Ряд устройств и программное обеспечение облегчают анализ на содержание элементных примесей в лекарственных средствах. При использовании детектора Vista Chip II с программным обеспечением ICP Expert процесс анализа получается простым и быстрым. Его можно воспроизводить от лаборанта к лаборанту, от лаборатории к лаборатории.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДИКИ USP/ICH И ICP-MS

АВТОРЫ

Р.С. Дхуриа,
В. Джаин,
Г. Кападнис,
С. Виас,

Центр повышения квалификации,
Agilent Technologies,
г. Манесар, Индия

ВВЕДЕНИЕ

Присутствие примесей в фармацевтических ингредиентах вызывает беспокойство не только потому, что некоторые загрязняющие вещества по своей сути являются токсичными, но также и потому, что они могут неблагоприятно влиять на стабильность лекарственного средства и срок годности или вызывать нежелательные побочные эффекты. В результате должно контролироваться и отслеживаться содержание органических и неорганических (элементных) примесей в сырьевых материалах, включая воду (используемую для производства лекарственных средств), промежуточных продуктах, активных фармацевтических ингредиентах (API), эксципиенты (стабилизаторы, наполнители, связующие вещества, красите-



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ли, ароматизаторы, вещества-оболочки) и в конечной лекарственной форме. Также необходимо отслеживать примеси, появляющиеся в процессе производства, такие как остатки катализаторов и контаминантов, попадающие в препараты из производственного технологического оборудования. Кроме того, следует оценивать возможность загрязнения фармацевтических продуктов во время упаковки и укупорки (CCS).

Метод оценки неорганических примесей в фармацевтических продуктах USP для согласования с руководящими принципами Q3D ICH (Международная конференция по гармонизации требований к регистрации лекарственных средств для человека) описан в общих главах <232> («Элементные примеси: Пределы») и <233> («Элементные примеси: Процедуры»), где определяются пределы и процедуры, применяемые для измерения элементных примесей, содержащихся в лекарственных препаратах [1, 2].

Анализ элементных примесей играет важную роль в любой фармацевтической разработке и в производстве. Сейчас фармацевтические организации обязаны подтверждать соответствие продукции указанным уровням содержания элементных примесей, которые регламентируются главой <232> и ICH Q3D [3]. В таблице 1 отображены пределы допустимых суточных доз (ДСД) в соответствии с методами USP/ICH для списка из 24 элементов, которые могут входить в состав пероральных лекарственных средств.

Для анализа содержания элементных примесей в фармацевтических материалах глава USP <233> предлагает четыре разных 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. Используйте метод микроволновой пробоподготовки. Нерастворимые в воде пробы должны быть помещены в кислоту, колба должна быть закрыта.

Все методы подготовки образцов имеют свои уникальные сферы применения и возможности, но использование органических растворителей, таких как диметилсульфоксид (ДМСО), приобретает все большую популярность из-за простоты использования, требования меньшего количества ингредиентов в образце и высокой пропускной способности при подготовке образцов по сравнению с микроволновым расщеплением образца в закрытом сосуде. Анализ, проводимый на Agilent 7800 ICP-MS с использованием разработанного и оптимизированного метода, показал отличную способность обрабатывать органический растворитель с точными и прецизионными результатами. Это надежное решение, которое прекрасно подходит для анализа содержания элементных примесей в фармацевтических ингредиентах.

Таблица 1.

Допустимая суточная доза (ДСД) для пероральных составов

Элемент	Фармакопея США/ Класс	ДСД, пероральные лек. ср-ва (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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Инструментарий для проведения исследований

Прибор Agilent 7800 ICP-MS был оснащен распылителем Micromist, кварцевой распылительной камерой с элементами охлаждения Пельтье, горелкой (инжектор 1,5 мм), платиновыми конусами, перистальтическими трубками для 3-мостового насоса. В качестве дополнительного газа была добавлена смесь аргона с кислородом, чтобы предотвратить осаждение углерода на конусы.

Отбор образцов осуществлялся с помощью автоматического пробоотборника Agilent SPS 4, а внутренние стандарты были добавлены в режиме онлайн через перистальтический насос, предназначенный для доставки проб.

Система ввода образца модели 7800 включает в себя низкопульсационный, высокоточный перистальтический насос с 10 роликами, малоточный распылитель с высоким КПД и распылительную камеру, охлаждаемую элементами Пельтье, с регулируемым

температурным диапазоном от –5 °C до +20 °C. Эта двухступенчатая распылительная камера Скотта имеет возможность работать как с водными, так и с органическими растворителями. В этом исследовании образцы растворяли в ДМСО, температура плавления которого составляла 19 °C. Следовательно, распылительную камеру устанавливали на 17 °C, чтобы предотвратить затвердевание образца во время распыления. Коллизионно-реакционная ячейка 4 поколения ORS4 в модели Agilent 7800 обеспечивает быстрое переключение на режим с газом и в сочетании с проверенным высокопроизводительным гиперболическим квадруполем и синхронным двухрежимным дискретным динодным 10-разрядным детектором последнего поколения с линейным динамическим диапазоном.

Программное обеспечение Agilent ICP-MS MassHunter легко настраивается и работает с предустановленными методами, позволяющими легко соблюдать нормативные требования, указанные в главах USP/ICH. Используемые в приборах рабочие условия перечислены в таблице 2.

Таблица 2.

Рабочие условия для ИСП-МС 7800

Параметр	Настройка
Режим плазмы	Общее назначение
RF-мощность (Вт)	1550
Поток газа-носителя (л/мин)	0,99
Глубина образца (мм)	8,0
Темп. распылит. камеры (°C)	17
Скорость подачи газа через ячейку (мл/мин)	4
Дискриминация энергии (V)	3
Вспомогательный газ (%)	10

Подготовка образцов и стандартов

Калибровочные стандарты были подготовлены с использованием разбавленных в ДМСО (диметилсульфоксид) стандартов, прослеживаемых до эталонов NIST. 100 мг каждого образца активного фармацевтического ингредиента (API) аккуратно взвешивали и помещали в 50 мл пробирки Falcon с 5 мл ДМСО. Затем пробирки обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин для полного растворения образца и доводили до 50 мл ДМСО. Образцы были приготовлены вместе с растворами без добавок. Одновременно готовили пробы с добавками. Внутренний стандарт был добавлен онлайн. На рисунке 1 показана блок-схема подготовки и анализа проб.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Калибровка

Анализы по методике USP/ICH в классе 1 (Cd, Pb, As и Hg) и классе 2B (Co, V и Ni) должны быть включены в оценку риска для всех лекарственных средств. Графики калибровки для As, Hg, Cd и Pb, измеренные в DMSO на Agilent 7800, показаны на рисунке 2.

В таблице 3 перечислены целевые элементы USP/ICH вместе с их калибровочными коэффициентами (значение R) и пределами обнаружения (DL). Система демонстрирует хорошую чувствительность в ДМСО с пределами обнаружения на низких уровнях ppt (нг/л) для всех элементов.

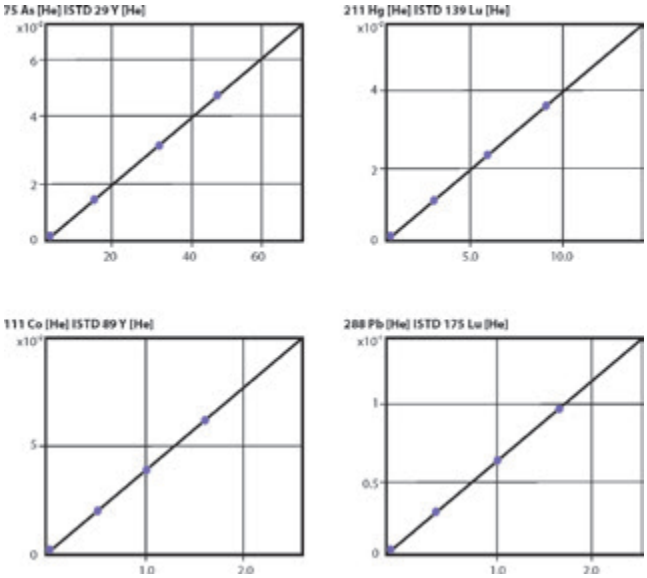


Рисунок 2. **Графики линейности калибровки для As, Hg, Cd и Pb**



Рисунок 1. **Схема для подготовки и анализа образцов с использованием Agilent 7800 ICP-MS**

Таблица 3.

Коэффициенты корреляции и пределы обнаружения элементов в растворе ДМСО

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 общей главе USP <233>, пригодность системы устанавливается путем проведения серии тестов на точность, стабильность и коэффициент извлечения. Тест производительности дрейфа включает в себя сравнение результатов, полученных от стандартизированного раствора 1 (1,5 J) до и после анализа растворов образцов.

Критерии пригодности для дрейфа – не более чем (NMT) 20% для каждого целевого элемента [2]. В таблице 4 показаны результаты испытания пригодности системы, проводившегося для модели 7800, при этом процент дрейфа находится в пределах критериев пригодности. Время между двумя измерениями образца во время анализа составило примерно 4 ч.

Исследования точности при значении 100% J

В исследуемые активные фармацевтические ингредиенты были внесены добавки перед стадией подготовки образца при концентрациях 100% J для каждого целевого элемента в соответствии с требованием главы USP <233>. Нормы отклонений для коэффициента извлечения составляют 70–150% для среднего числа репликатов при каждой концентрации [1]. В таблице 5 приведены результаты исследования точности 7800 ICP-MC при значении 100% J. Полученные результаты демонстрируют превосходную точность и прецизионность (% ОСО), все результаты находятся в пределах приемлемого диапазона извлечения.

Таблица 4.

Результаты пригодности системы при 1,5 J для каждого целевого элемента

Элемент	Значение J (мкг/л)	Стандартизированный раствор 1 (1.5 J) до анализа (n=6)	Стандартизированный раствор 1 (1.5 J) после анализа (n=6)	% дрейфа
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

Промежуточная прецизионность

Промежуточная прецизионность (устойчивость) определяется выполнением анализа сходимости результатов еще раз либо в другой день, с другим прибором, либо с другим аналитиком, либо с комбинацией вышеперечисленного. Критерии приемлемости для относительного стандартного отклонения должны составлять не более 25% для каждого целевого элемента [2]. Для каждой АФИ-пробы шесть повторов были добавлены в целевую концентрацию, а анализ проводился в два отдельных дня. Таблица 6 показывает результаты промежуточной прецизионности, полученные на модели 7800 для всех 3 образцов АФИ.

Таблица 5.

Точность результатов анализа степени извлечения при 100% J для каждого целевого элемента

Элемент	Значение J (мкг/л)	АФИ-1 % Коэфф. извлечения (n=6)	Относительное стандартное отклонение (ОСО), %	АФИ-2 % Коэфф. извлечения (n=6)	Относительное стандартное отклонение (ОСО), %	АФИ-3 % Коэфф. извлечения (n=6)	Относительное стандартное отклонение (ОСО), %
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

Этот оптимизированный метод получения органического растворителя показывает низкие уровни регулируемых элементов во всех трех образцах АФИ. В процессе анализа не наблюдалось матричных эффектов (подавление или дрейф). Методика подготовки и анализа фармацевтических образцов в ДМСО соответствует требованиям ICH Q3D и USP <232> и <233>, и это простой в использовании метод для фармацевтических лабораторий, желающих обновить свою методологию и инструментарий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Agilent 7800 ICP-MS наряду с методом получения органического растворителя оказался идеальным решением для определения содержания элементных примесей в фармацевтических ингредиентах, согласно главам ICH Q3D и USP <232> и <233>. Модель 7800 показала отличные результаты в отношении чувствительности, стабильности, устойчивости и пределов обнаружения для всех требуемых элементов. Основное преимущество метода заключается в том, что он позволяет не пользоваться трудоемкой методикой кислотного расщепления. Это дает возможность повысить пропускную способность образцов и улучшить производительность.

Таблица 6.

Результаты промежуточной 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

ЛИТЕРАТУРА

1. USP Chapter <232> Elemental Impurities- Limits // Pharmacopeial Forum. 2016. V. 42(2).
2. USP Chapter <233>. Elemental Impurities- Procedures / USP 38–NF 33, Second Supplement.
3. ICH Guideline Q3D on Elemental Impurities, EMA/CHMP/ICH/353369/2013, July 2016.

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

СОБЛЮДЕНИЕ ИНСТРУКЦИЙ ПО НОРМАТИВНОМУ СООТВЕТСТВИЮ С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ AGILENT ICP-MS MASSHUNTER И OPENLAB SERVER

Материал предоставлен компанией Agilent Technologies



Agilent Technologies

ВВЕДЕНИЕ

Фармакопея США (USP) и Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для человека (ICH) разработали новые стандарты для анализа неорганических (элементных) примесей в фармацевтических продуктах и ингредиентах: общие главы USP <232> («Элементные примеси: Пределы») и <233> («Элементные примеси: Процедуры») и ICH-Q3D были завершены в феврале 2017 года и должны вступить в действие с 1 января 2018 года. В этой серии инструкций указаны максимально допустимые суточные дозы для 24 элементов, перечисленных в таблице 1.

ICP-OES и ICP-MS являются эталонными инструментальными методами анализа элементных примесей. ICP-MS – это более подходящий метод анализа лекарственных препаратов и материалов, предназначенных для парентерального или ингаляционного введения, ввиду более низких пределов обнаружения, необходимых для таких образцов.

Помимо фундаментальных исследований и открытия новых лекарственных средств, все этапы разработки фармацевтических продуктов, от доклинической оценки до контроля качества продукции, подчиняются рекомендациям GxP. К ним относятся положения об электронном управлении данными, как они определены в 21 CFR Part 11, европейским эквивалентом (Приложением 11 ЕС), PIC/S GMPs, китайским и бразильским GMP. Цель этих нормативных требований – обеспечить безопасность, целостность и прослеживаемость электронных

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

документов, включая информацию о методах, данные, аналитические отчеты и другие записи (например, ежедневная проверка рабочих характеристик), связанных с работой аналитического оборудования.

Таблица 1.

Нормативы USP <232> и ICH Q3D и разрешенные пределы допустимых суточных доз (ДСД), предназначенных для перорального применения. ДСД для парентеральных и ингаляционных лекарственных средств значительно ниже

Класс Фармакопеи США	Элемент	ДСД, пероральные лек. ср-ва (мкг/день)
Класс 1	Cd	5
	Pb	5
	As (неорг.)	15
	Hg (неорг.)	30
Класс 2A	Co	50
	V	100
	Ni	200
	Tl	8
	Au	100
	Pd	100
	Ir	100
	Os	100
Класс 2B	Rh	100
	Ru	100
	Se	150
	Ag	150
	Pt	100
Класс 3	Li	550
	Sb	1200
	Ba	1400
	Mo	3000
	Cu	3000
	Sn	6000
	Cr	11000

КРАТКИЙ ОБЗОР НОРМАТИВНОГО СООТВЕТСТВИЯ

Соответствие нормативным требованиям является ключевым аспектом работы аналитической лаборатории во многих отраслях, особенно в фармацевтическом производстве. Имеется 4 компонента нормативного соответствия, связанного с аналитическими инструментами:

1. Квалификация проекта (DQ), контроль качества продукции, управление жизненным циклом и документация, квалификация установки и функционирования (IQ/OQ) для аналитических приборов и программного обеспечения.
2. Контроль доступа пользователей к рабочей станции для управления прибором и обработки данных (ограниченный доступ после регистрации пользователя с защитой паролем).
3. Безопасность, целостность и прослеживаемость электронных документов (безопасное хранение, управление версиями файлов, журнал регистрации событий, электронные подписи и архивирование/извлечение).
4. Контроль над работой системы, проверка рабочих характеристик (PQ), физический доступ к лабораторному и другому, связанному с ним оборудованию, стандартные рабочие процедуры, обучение и ведение документации (записей).

Первый из этих компонентов должен быть продемонстрирован с помощью отчетов о качестве производства и сертификата валидации оборудования от производителя прибора. В случае программного обеспечения это означает, что поставщик ПО должен иметь возможность предоставить декларацию о валидации продукта, чтобы подтвердить, что программное обеспечение поддерживает требования пользователя, предъявляемые в рамках нормативов 21 CFR 58 (надлежащая лабораторная практика), 21 CFR 210 (надлежащая производственная практика для лекарственных средств) или 21 CFR 211 (текущая надлежащая производственная практика производства готовых лекарственных препаратов).

После того как аналитическое оборудование доставлено в лабораторию, необходимо провести дополнительные квалификационные проверки, чтобы гарантировать, что продукция функционирует в соответствии с определением производителя. Эти процедуры IQ/OQ должны распространяться и на оборудование, и на все программное обеспечение, необходимое для его работы, что обычно выполняется производителем. Дальнейшие проверки пригодности к работе и производительности обычно выполняются с использованием методов и проб, которые будут анализироваться в обычном режиме, чтобы подтвердить, что производительность системы соответствует аналитическим требованиям.

Четвертый компонент требует, чтобы руководитель лаборатории и системный администратор создали соответствующие средства контроля доступа к лаборатории и обеспечили создание документации в рамках стандартных рабочих процедур (SOP) и проверку требований к пригодности системы (SST).

Остальные компоненты – доступ к системе и управление электронными записями – обычно обрабатываются программными пакетами, которые управляют доступом пользователей к рабочей станции и обеспечивают корректную работу интегрированной системы обработки данных, а также других электронных записей, созданных в ходе аналитической деятельности лаборатории.

OPENLAB SERVER

OpenLAB Server – это сетевое решение для хранения электронных записей, касающихся данных анализа элементных примесей, полученных с помощью системы ICP-MS MassHunter от Agilent Technologies. ICP-MS MassHunter – это ПО, которое управляет приборами Agilent 7800, 7900 и 8900 ICP-MS с тройным квадруполем.

Кроме хранения данных, полученных с ИСП-МС, OpenLAB Server хранит данные с приборов, управляемых программой OpenLAB CDS. Это могут быть приборы LC и GC производства компании Agilent Technologies и сторонних изготовителей, а также системы Agilent GC/MS и LC/MS с одним квадруполем. OpenLAB Server может управлять данными, собранными примерно со 100 приборов.

В сочетании с общим планом соблюдения лабораториями нормативных требований система ICP-MS MassHunter плюс OpenLAB Server обеспечивает все технические средства контроля, необходимые для соответствия требованиям, указанным в правиле 21 CFR, часть 11, и приложении 11.

OpenLAB Server является частью топового в своей области применения пакета программных продуктов, предназначенных для интеграции и управления научной информацией на протяжении всего ее жизненного цикла в рамках одной лаборатории или крупного предприятия. OpenLAB Server обеспечивает идеальное решение для соответствия требованиям для средних и расширяющихся лабораторий. Компания Agilent Technologies также предлагает решения ИСП-МС, которые подходят для одного установленного в маленькой лаборатории прибора (SDA) и для организации глобального корпоративного уровня (OpenLAB ECM).

КРАТКИЙ ОБЗОР СИСТЕМЫ

Компоненты, необходимые для совместимости с инструментами Agilent ICP-MS и OpenLab Server, включают: программу ICP-MS MassHunter, модуль управления доступом пользователя MassHunter User Access Control (UAC) и OpenLAB Server.

На рисунке 1 показано, как эти компоненты интегрируются для обеспечения полного, законченного решения.

OpenLAB Server интегрируется с ПО ICP-MS MassHunter и UAC. Все данные и отчеты хранятся во время проведения анализа в защищенном репозитории данных, это делается автоматически, без вмешательства пользователя. Любая управляемая системой запись, сгенерированная программой ICP-MS MassHunter в виде отчетов, методов, серий, файлов данных и pdf-отчетов, может автоматически храниться на сервере OpenLAB.

Доступ к OpenLAB Server, кроме функции электронной подписи, осуществляется через пользовательский интерфейс приложения MassHunter. Это позволяет легко просматривать и загружать данные для утверждения или повторной обработки. Все исходные данные, результаты, методы и отчеты хранятся вместе, тем самым обеспечивается простой доступ к информации при проведении аудита на протяжении всего периода хранения данных.

КОНТРОЛИРУЕМЫЙ ДОСТУП И ЖУРНАЛ РЕГИСТРАЦИИ СОБЫТИЙ

Ключевым аспектом управления электронными записями является контроль над теми, кто имеет доступ к прикладному программному обеспечению и какие действия им разрешено выполнять. В случае с

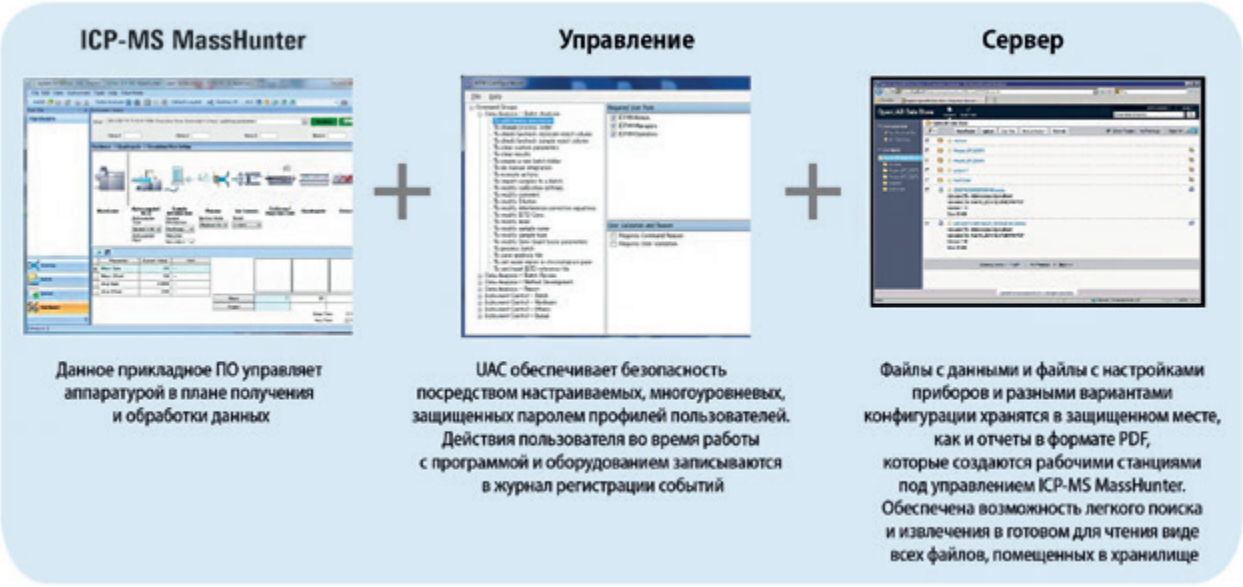


Рисунок 1. Компоненты для работы в условиях совместимости с ICP-MS MassHunter, User Access Control и OpenLAB Server

ICP-MS MassHunter от Agilent Technologies этот элемент управления обеспечивается модулем User Access Control module (управление доступом пользователей).

Пользователи должны войти с уникальным именем пользователя и паролем. Laboratory Administrator настраивает многоуровневые права доступа пользователей и параметры журнала регистрации событий, задающие функции, которые могут выполнять пользователи. Карта журнала регистрации событий (ATM) гарантирует, что каждому пользователю назначена роль, допускающая только те действия, которые им разрешены в соответствии с должностными обязанностями и уровнем квалификации. Каждое действие также может быть настроено так, чтобы требовать проверки пользователя по паролю и/или причине, и все действия фиксируются в журнале регистрации событий. Стандартные настройки ATM, подходящие для типичной лабораторной среды, предопределены.

Как показано на рисунке 2, управление доступом пользователей к рабочей станции ICP-MS MassHunter и запись контрольных журналов приложений и рабочих станций выполняется с помощью MassHunter UAC. Пользователи подключаются к рабочей станции ICP-MS MassHunter и управляют программой ICP-MS MassHunter точно так же, как отдельной системой в пределах своего уровня прав доступа пользователей.

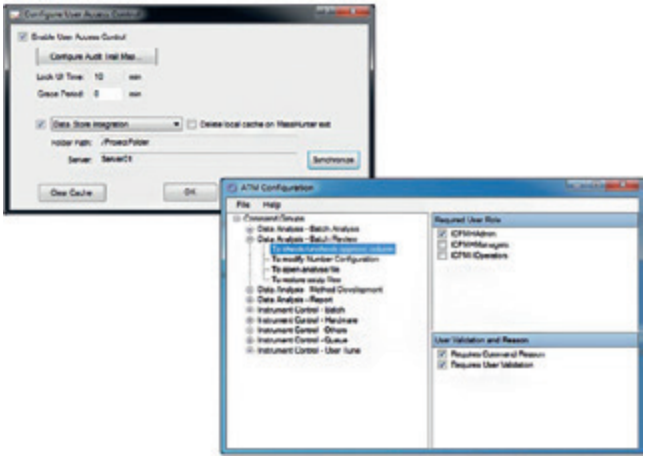


Рисунок 2. Управление доступом пользователей к рабочей станции ICP-MS MassHunter и запись журналов событий приложений и рабочих станций осуществляется с помощью программного обеспечения контроля доступа пользователя (UAC) MassHunter

ПОИСК И ИЗВЛЕЧЕНИЕ ДАННЫХ

Данные, загруженные на OpenLAB Server, надежно хранятся на подходящем сервере с архитектурой RAID 1 или RAID 5. Данные, хранящиеся на сервере OpenLAB Server, легко найти и получить с помощью поиска по ключевым словам (рисунок 3). Записи, загруженные в OpenLAB Server, автоматически индексируются, поэтому можно легко найти отдельные записи или результаты. Как показано в таблице 2, элементы запроса, такие как имя лаборанта, дата получения образца и имя инструмента, могут использоваться для поиска и получения отдельных результатов пробы или всех записей для всей серии. Настройка и администрирование базы данных осуществляется через панель управления OpenLAB.

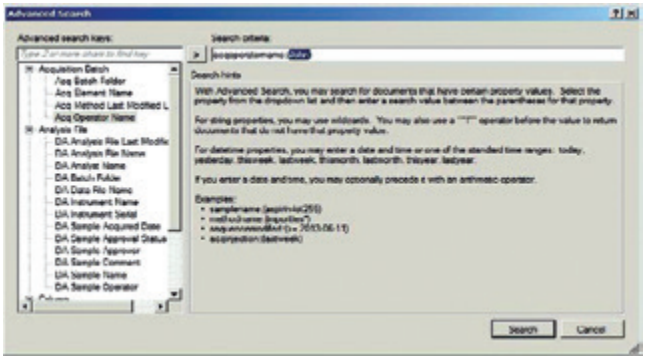


Рисунок 3. Поиск файлов OpenLAB Server с использованием функции расширенного поиска

Таблица 2.

Ключи запросов, используемые OpenLAB Server

Общие ключи	Ключи ICP-MS MassHunter
File name	Analyst Name
upload date	Analysis File Name
Sign by	Analysis File Last Modified Date
Sign date	Batch Folder
And more	Data File Name
	Sample Acquired Date
	Sample Approval Status
	Sample Approver
	Sample Comment
	Sample Name
	Instrument Name
	Instrument Serial
	Sample Operator
	Acquisition Batch Folder
	Acquisition Method Last Modified Date
	Acquisition Element Name
	Acquisition Operator Name

Следующие таблицы содержат описание, каким образом система ICP-MS MassHunter с UAC и OpenLAB Server позволяет лабораториям соблюдать требования, изложенные в правиле 21 CFR, часть 11, приложении 11 EC и других соответствующих правилах и рекомендациях.

СИСТЕМНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ

Agilent OpenLAB Server – это серверная система, которая может обслуживать одновременно до 100 подключенных к системе устройств. Поддерживаются устройства/приборы, работающие с Agilent ICP-MS MassHunter или Agilent OpenLAB CDS. Рекомендуемые спецификации сервера для двух систем ICP-MS показаны в таблице ниже. OpenLAB Server требует наличие базы данных заднего плана и поддерживает PostgreSQL или Microsoft SQL Server 2012 SP2.

Рекомендуемая конфигурация системы для ПО OpenLAB Server, имеющая односерверную конфигурацию

Аппаратное оборудование	Система среднего размера	Система большого размера
	(от 3 до 30 логических инструментов*)	(от 31 до 100 логических инструментов*)
Процессор	2 × Intel Xeon E5 v2	2 × Intel Xeon E5 v3
	2,5 ГГц, 4-ядерный	3,0 ГГц, 4-ядерный
Минимальный объем ОЗУ	24 Гб	48 Гб
Диск (ОС и ПО)	2 × (300 GB 15 K rpm RAID 1)	2 × (600 GB 15 K rpm RAID 1)
Диск (хранение данных)**	3 × (500 GB 7,2 K rpm RAID 5)	5 x (1 TB 7,2 K rpm RAID 5)
Сеть	1 Гб	1 Гб
Программное обеспечение		
Операционная система для OpenLAB Server		
Сервер OpenLAB Server:	Windows Server 2012 R2 Standard или Enterprise Edition	
Клиент OpenLAB Server:	Windows 7 SP1 (64-bit) Professional или Enterprise Edition	
	Windows 10 SP1 (64-bit) Professional или Enterprise Edition	
	Windows Server 2012 R2 Standard или Enterprise Edition	
	MS SQL Server 2014 SP2	
Базы данных		
Agilent OpenLAB Server управляет информацией с помощью базы данных. База данных устанавливается и настраивается вручную или автоматически во время процесса установки.		
Поддерживаемое ПО базы данных:	SQL Server 2012 Standard или Enterprise (64-bit) SP2	
	PostgreSQL Server 9.3	
	Oracle 12c R1	

Примечание: *Прибор ICP-MS считается двумя логическими инструментами.

**Рекомендация о дисковом пространстве основана на оценочных требованиях с расчетом на четырехлетнюю эксплуатацию. Требования к фактическому объему дискового пространства должны учитываться лабораторией, если планируется использование предустановленных шаблонов.

СОБЛЮДЕНИЕ НОРМАТИВНЫХ ТРЕБОВАНИЙ ПРАВИЛА 21 CFR ЧАСТЬ 11 С ПОМОЩЬЮ ПО AGILENT ICP-MS MASSHUNTER И OPENLAB SERVER

Часть 11 или другие	Требования	Да/Нет	Если да, то как именно удовлетворено требование или, если нет, какова рекомендация для пользователей
1. Валидация			
Часть 11 11.10(a) и все остальные правила	1.1. Служит ли валидация системы гарантией обеспечения точности, надежности, стабильности работы и способности распознавать недействительные или измененные записи?	Да	Компания Agilent Technologies провела широкомасштабную проверку работоспособности и эффективности своих систем, включая ICP-MS MassHunter и OpenLAB Server, во время которой проводились испытания, разработанные специально для оценки точности, надежности и стабильности функционирования. OpenLAB Server поддерживает смену редакций файлов по мере их изменения. Также каждое отдельное изменение и все изменения в целом, внесенные в систему, записываются в журналы регистрации событий. Компания Agilent Technologies рекомендует использовать этапы «Квалификация установки» и «Квалификация функционирования» (IQ/OQ), чтобы квалифицировать систему на рабочем месте.
Приложение 11. Принцип B; Бразилия, GMP 577	1.2. Является ли инфраструктура квалифицированной?	Нет данных	Обязанности пользователя.

Продолжение таблицы

Часть 11 или другие	Требования	Да/Нет	Если да, то как именно удовлетворено требование или, если нет, какова рекомендация для пользователей
2. Точные копии и надежное сохранение и извлечение записей			
Часть 11.10(b)	2.1. Может ли система создавать точные и полные копии записей как в читаемой, так и в электронной форме, пригодной для просмотра, копирования и проверки со стороны FDA?	Да	Необработанные данные, метаданные и данные с результатами анализов, создаваемые с помощью программы ICP-MS MassHunter, хранятся и управляются в OpenLAB Server. Набор результатов, содержащий всю эту информацию, может быть в любое время загружен с целью проверки на жесткий диск клиентского ПК в виде копии исходных данных. Программное обеспечение ICP-MS MassHunter требуется для чтения документов и записей, сохраненных в электронном формате. Отчеты ICP-MS MassHunter (например, отчеты о настройке и отчеты о сборе данных), представляющие собой электронную форму для записи в электронном виде, могут храниться в виде защищенных PDF-файлов, которые могут быть распечатаны или доступны для просмотра с помощью программы просмотра без помощи исходного приложения, установленного на клиентской машине. Эти отчеты могут включать в себя все данные и журналы регистрации событий.
Приложение 11.8.1; Бразилия, GMP 583	2.2. Можно ли получить качественные печатные копии хранимых электронным способом электронных записей?	Да	Подробный ответ на вопрос о напечатанных для традиционного способа чтения электронных записях приведен выше, пункт 11.10 (b).
Бразилия, GMP 585.2	2.3. Имеются ли средства контроля для обеспечения надлежащего выполнения процесса резервного копирования, извлечения и обслуживания данных?	Да	ICP-MS MassHunter в сочетании с программным компонентом User Access Control и OpenLAB Server дает возможность архивировать и извлекать электронные записи. Обязанность пользователя заключается в соблюдении служебных требований, установленных в организации в отношении электронных записей.
Часть 11.10(c): Китай, GMP 163	2.4. Защищена ли система записи таким образом, что в течение периода хранения обеспечивается их точное извлечение из хранилища в готовом для чтения виде?	Да	Когда ПО, предназначенное для соблюдения нормативного соответствия, активируется, все регулируемые записи, которые подлежат периодической обработке, автоматически сохраняются в безопасной базе данных OpenLAB Server. Данные, находящиеся под контролем OpenLAB Server, хранятся на защищенном сервере. Независимо от физического расположения данных, он остается доступным для поиска. Все пользователи, имеющие соответствующие полномочия, имеют доступ к этому серверу.
Приложение 11.17	2.5. Проверяются ли данные, находящиеся в архиве на хранении, на предмет доступности, удобочитаемости и целостности?	Нет данных	Обязанности пользователя.
Приложение 11.17	2.6. Если в систему вносятся соответствующие изменения (например, компьютерное оборудование или программы), есть ли возможность извлекать проверенные данные?	Да	Обновленная версия программного обеспечения проверяется на предмет стабильности и надежности работы до официального релиза. После установки новой или обновленной версии повторная валидация системы может быть предложена в качестве услуги, предоставляемой Agilent Technologies.
Приложение 11.7.1; Бразилия, GMP 584	2.7. Защищены ли данные от ущерба физическими и электронными средствами?	Да	OpenLAB Server обеспечивает безопасность электронных записей в виде защиты от случайного или злонамеренного повреждения, а удаленное хранилище (на сервере OpenLAB) гарантирует в некотором смысле и физическую защиту. Физическая защита сервера (и ПК, находящегося в лаборатории), заархивированных данных и процессов архивирования – это зона ответственности организации-пользователя.
Clinical Computer Guide F2 – Руководство по клинической обработке данных. Вопросы и ответы FDA	2.8. Осуществляются ли меры контроля, позволяющие восстановить электронную исходную/необработанную документацию для того, чтобы у FDA была возможность просмотра (клинического) исследования и результатов лабораторных испытаний?	Да	Функциональные возможности контроля версий электронных записей и информация об изменении, содержащаяся в файлах журналов регистрации событий, позволяют восстановить информацию, содержащуюся в электронной записи, в ее исходном виде.

Продолжение таблицы

Часть 11 или другие	Требования	Да/Нет	Если да, то как именно удовлетворено требование или, если нет, какова рекомендация для пользователей
Clinical Computer Guide F2 – Руководство по клинической обработке данных. Вопросы и ответы FDA	2.9. Дает ли информация, предоставляемая в FDA, полное описание и объяснение того, как были получены и каким образом управлялись исходные/необработанные данные и как электронные записи использовались для сбора данных?	Нет данных	Обязанности пользователя.
Приложение 11.7.1; Китай, GMP 163; Бразилия, GMP 585; Часть 211, 68 b	2.10. Позволяет ли система регулярно делать резервные копии всех соответствующих данных?	Да	Предоставляются инструменты для выполнения регулярного резервного копирования, но за внедрение и работу системы резервного копирования данных (помимо удаленного хранения электронных записей в системе OpenLAB Server) несет ответственность организация пользователя. В таком случае управление данными (например, график резервного копирования) – это тоже сфера ответственности организации-пользователя.
Приложение 11.7.2; Китай, GMP 163; Бразилия, GMP 585; Часть 211, 68 b	2.11. Проверяется ли во время валидации или при текущих проверках возможность оборудования обеспечивать целостность и точность данных, а также способность восстанавливать данные, которые подверглись резервному копированию?	Нет данных	Обязанности пользователя.
Clinical Computer Guide E – Руководство по клинической обработке данных E	2.12. На месте ли все процедуры и средства контроля, которые предназначены для того, чтобы не допустить изменения, просмотра, отправки запросов или выдачи данных через внешние приложения, которые не входят в систему защиты данной рабочей станции?	Да	Данные не будут отображаться и не будет возможности редактирования на лабораторном ПК, пока пользователь не пройдет проверку защитного программного компонента системы. Средство просмотра данных OpenLAB Server также защищено с помощью интерактивной процедуры входа в систему OpenLAB.
Clinical Computer Guide F – Руководство по клинической обработке данных F	2.13. Существуют ли средства контроля, нацеленные на предотвращение, обнаружение и смягчение последствий от действия компьютерных вирусов, червей или другого потенциально вредоносного программного кода для аналитических данных и программного обеспечения?	Да	Компания Agilent Technologies внедряет средства управления, предназначенные для предотвращения проникновения вредоносного кода в подконтрольные системы клиента посредством любого программного обеспечения, которое клиент приобретает у Agilent Technologies. Обеспечение физической защиты компьютерной системы от вредоносного ПО (например, невозможность прямого подключения к интернету и подключения зараженных съемных устройств хранения) лежит на организации-пользователе.
3. Авторизированный доступ к системам, функциям и данным			
Часть 11.10(d); Китай, GMP 183; Бразилия, GMP 579; ICH Q7.5.43	3.1. Ограничен ли доступ к системе авторизованным лицам?	Да	Все права доступа к файлам и программным средствам контролируются полномочиями и ролями, назначенными отдельным пользователем или группами пользователей. Системный администратор назначает соответствующий уровень доступа авторизованным пользователям или группам. Каждый пользователь идентифицируется с помощью уникальной комбинации идентификаторов пользователей и паролей. Получение доступа к ICP-MS MassHunter с OpenLAB Server требует ввода этих уникальных идентификационных компонентов: идентификатора пользователя и пароля.
Несколько предупреждающих писем	3.2. Каждый ли пользователь четко идентифицирован, например по идентификатору пользователя и паролю?	Да	Система использует комбинацию идентификаторов пользователей и паролей, уникальную для каждого пользователя, ее можно использовать и для электронной подписи. Идентификаторы пользователей должны быть уникальными и не должны повторно использоваться или переназначаться другому лицу. Это обязанность организации, которая внедряет и управляет системой.
Clinical Computer Guide 4 – Руководство по клинической обработке данных 4	3.3. Существуют ли средства управления для сохранения кумулятивной (непрерывной) записи, которая указывает в любой момент времени имена уполномоченного персонала, их заголовки и описание их прав доступа?	Да	Служба управления учетными записями Windows User Account Management имеет такую функцию и содержит эту информацию. Ведение такой записи и обеспечение поддержки будет обязанностью организации-пользователя.

Продолжение таблицы

Часть 11 или другие	Требования	Да/Нет	Если да, то как именно удовлетворено требование или, если нет, какова рекомендация для пользователей
4. Электронный журнал регистрации событий			
Часть 11.10(e); Китай, GMP 163	4.1. Существует ли защищенный, сгенерированный компьютером журнал событий с временными метками, чтобы в нем фиксировалась дата и время записей, а также действия оператора по созданию, изменению или удалению электронных записей?	Да	Все действия, связанные с созданием, удалением или изменением электронных записей, регистрируются в защищенном, создаваемом компьютером журнале регистрации событий с обязательной временной меткой. В журнале событий перечислены все изменения, дата и время изменения, идентификатор пользователя и по возможности причина изменения. Записи в журналах регистрации событий не могут быть отключены, изменены или удалены любым из пользователей. Компонент UAC программы ICP-MS MassHunter автоматически генерирует журналы событий с временными отметками, которые прикрепляются к электронным записям для создания полной и точной истории операций по сбору и анализу данных. OpenLAB Server защищает журналы регистрации событий MassHunter; кроме того, он тоже сам создает подобные журналы, в которых записывается информация о любых обновлениях, касающихся серий ИСП-МС.
FDA 21 CFF 58.130 e; Clinical Computer Guide 2 – Руководство по клинической обработке данных 2; Clinical Source Data 3 – Источник клинических данных 3	4.2. Регистрируется ли в журнале информация, кто сделал все изменения, когда и почему?	Да	Записи журнала содержат имя пользователя, дату, время и причину, связанную с подписанием (если в настройках карты журнала регистрации событий определено, что нужна причина для действия, которое приведет к появлению записи в журнале регистрации событий).
Приложение 11, 8.2	4.3. Умеет ли система генерировать распечатки, указывающие, была ли изменена какая-либо из электронных записей с момента появления первоначальной записи?	Да	Информация об изменении доступна для настроек метода. Об изменениях можно судить, сравнивая предыдущие и новые значения, которые записываются в журнале регистрации событий. Метки модификации не поддерживаются непосредственно в отчетах MassHunter, которые передаются на OpenLAB Server, но программное обеспечение Agilent OpenLAB может помочь заказчикам удовлетворить это требование посредством условного форматирования в отчетах.
FDA GMP Part 211.194 8b	4.4. Содержит ли журнал регистрации событий какие-либо модификации установленного метода, применяемого при тестировании?	Да	Любое изменение метода, будь то установленный метод или нет, записывается в журнал регистрации событий.
FDA GMP Part 211.194 8b	4.5. Указываются ли в таких записях причины изменения?	Да	Причина любого изменения метода записывается, если для этого действия на карте журнала регистрации событий выбирается пункт «причина».
Предупреждающее письмо FDA	4.6. Настроена ли функция журнала событий на состояние, когда она всегда «включена» и не может быть отключена пользователями системы?	Да	Функция журнала регистрации событий может быть отключена (или изменены привилегии) пользователем с соответствующими правами администратора.
Приложение 11, 9	4.7. Доступен ли журнал событий в общедоступной форме, удобной для регулярных проверок?	Да	Журнал регистрации событий можно просмотреть в табличном формате, который легко воспринимается и читается.
Неявно требуется в Приложении 11, предупреждающих письмах (и часто запрашивается клиентами)	4.8. Можно ли сконфигурировать процесс отслеживания в журнале так, чтобы регистрировать только более значимые действия, подходящие для реалистичного и содержательного анализа информации, содержащейся в журнале регистрации событий?	Да	Содержание журнала не настраивается непосредственно пользователем, но действия, записанные в контрольном журнале, определяются на карте журнала (ATM), что позволяет лаборатории пользователя выбирать действия, требующие пароля пользователя и причины.

Продолжение таблицы

Часть 11 или другие	Требования	Да/Нет	Если да, то как именно удовлетворено требование или, если нет, какова рекомендация для пользователей
Часть 11.10(e)	4.9. Сохраняется ли ранее записанная информация без изменений при внесении изменении в записи?	Да	Строгий контроль безопасности, управление и контроль над данными, создаваемыми системой ICP-MS MassHunter, достигается посредством автоматического хранения набора результатов исследований или одиночных анализов в Server OpenLAB, после того как данные были получены, автоматически переработаны или претерпели любые другие интерактивные изменения. Все записи в контрольных журналах ICP-MS MassHunter и OpenLAB Server не редактируются и не подлежат редактированию. Даже удаление записей из OpenLAB Server авторизованным пользователем не оказывает влияние на существующие записи в журнале регистрации событий.
Часть 11.10(e)	4.10. Сохраняется ли журнал регистрации событий, по крайней мере, до тех пор, пока востребованы электронные записи, которые имею к нему привязку?	Да	Вся информация вместе с журналом событий хранится в системном репозитории. Срок хранения журнала совпадает с периодом хранения электронных записей, которые имеют отношения к событиям, зарегистрированным в журнале. Журналы регистрации событий неразрывно связаны с записью. События, имеющие отношения к системе, такие как вход и выход, также неразрывно связаны с системой.
Часть 11.10(e)	4.11. Доступен ли журнал регистрации событий для просмотра и копирования проверяющим специалистом из FDA?	Да	Журналы регистрации событий можно просматривать с помощью программы ICP-MS MassHunter или пользовательского интерфейса OpenLAB Server. Журналы событий и выбранные в них записи можно копировать в подходящий для печати формат.
Приложение 11, 8.1	4.12. Возможно ли получение четких печатных копий хранимых электронных записей (например, журнала регистрации событий?)	Да	Электронно отсортированные записи, включая записи аудита, могут быть напечатаны напрямую или скопированы и сконвертированы в формат для печати
5. Проверка эксплуатации и состояния устройства			
Часть 11.10(f)	5.1. Существуют ли проверки и средства в операционной системе для принудительного восстановления последовательности шагов и событий, если это понадобится?	Да	Когда требуется согласовать последовательность событий, проверка системы обеспечивает ее соблюдение. Например, метод нельзя будет применить к данным до тех пор, пока система не проверит завершенность метода. Пользователи будут получать сообщения об ошибке, если шаги выполняются вне последовательности.
Часть 11.10(g); Часть 211, 68 b	5.2. Имеются ли проверки полномочий для обеспечения того, чтобы только уполномоченные лица могли использовать систему, электронным образом подписывать запись, получать доступ к устройству ввода или вывода операционной системы или компьютера, изменять запись или выполнять текущую операцию?	Да	Пользователи не могут получить доступ к системе для получения, обработки или просмотра данных без действительного имени пользователя и пароля. После входа в систему доступ пользователя к файлам и функциям программного обеспечения (включая, но не ограничиваясь подписью файла, вводом значений или изменением записи) определяется назначенными полномочиями.
Приложение 11, 12.4	5.3. Может ли система записывать идентификационные данные операторов, которые вводят, изменяют, подтверждают или удаляют данные, включая дату и время?	Да	ICP-MS MassHunter UAC и OpenLAB Server записывают эту информацию для действий, выполняемых в прикладном программном обеспечении. Для действий системы (например, изменения даты/времени) журнал системных событий Windows регистрирует информацию.
Часть 11.10(11.10 (h)	5.4. Позволяет ли система использовать проверки устройств для определения в зависимости от обстоятельств, правильно ли функционирует источник ввода данных или правильна ли рабочая инструкция?	Да	Идентификация устройства источника данных в форме серийного номера прибора автоматически передается с прибора ИСП-МС в программу ICP-MS MassHunter. Серийный номер может отображаться в програме и записывается в файл данных. Кроме того, имя исходного компьютера записывается для файлов, загружаемых в OpenLAB Server из программы ICP-MS MassHunter. До передачи данных квитирование или «рукопожатие» подтверждает установление правильной связи между прибором ИСП-МС и хост-компьютером приложения.

Продолжение таблицы

Часть 11 или другие	Требования	Да/Нет	Если да, то как именно удовлетворено требование или, если нет, какова рекомендация для пользователей
Часть 11.10(i); Китай, GMP 18; Бразилия, 571	5.5. Существуют ли документально подтвержденные факты, что лица, разрабатывающие, обслуживающие или использующие электронные системы записи / электронной подписи, имеют образование, подготовку и опыт для выполнения поставленных перед ними задач?	Да	Политика компании Agilent Technologies запрещает раскрывать информацию о профессиональной подготовке персонала. Проверки могут подтвердить наличие программы обучения. Материалы могут стать подтверждением того, что «персонал компании Agilent Technologies прошел профессиональную подготовку ...». Записи об образовании и предыдущем опыте работы сотрудников Agilent Technologies проверяются и хранятся в документах отдела кадров. Конечным пользователям программного обеспечения ICP-MS MassHunter с OpenLAB Server также необходимо иметь записи об образовании, обучении и/или опыте работы с системой в местоположении клиента. Компания Agilent Technologies проводит базовое ознакомление пользователей с системой во время установки ПО.
Часть 11.10(j)	5.6. Существует ли служебная инструкция, по которой лица должны нести ответственность за определенные действия, связанные с их электронными подписями, чтобы определить фальсификацию записи и подписи?	Нет данных	Обязанности пользователя.
Подразумеваемое требование части 11 11.10 (j)	5.7. Проходили ли сотрудники обучение этой процедуре?	Нет данных	Обязанности пользователя.
Часть 11.10(k); Китай, GMP 161	5.8. Имеются ли соответствующие средства контроля над системной документацией, а именно адекватные средства контроля над распространением, доступом и использованием документации для работы и обслуживания системы?	Нет данных	Обязанности пользователя.
Часть 11.10(i)	5.9. Существуют ли процедуры контроля версий и изменений для оформления журнала событий, который вносит записи о разработке и модификации системной документации с отметкой времени?	Да	Процессы Agilent Technologies по качеству и жизненному циклу продукта включают в себя официальные письменные процедуры пересмотра и контроля изменений для системной документации. Все контролируемые изменения документа имеют временные отметки и вносятся в журнал регистрации событий.
6. Целостность данных, точность отображения даты и времени			
Приложение 11.5	6.1. Содержатся ли в компьютеризированных системах, которые обмениваются данными в электронном виде с другими системами, соответствующие встроенные проверки правильности и безопасности ввода и обработки данных?	Да	Система Agilent ICP-MS MassHunter OpenLAB Server не обменивается данными в электронном виде с другими системами, кроме соединений, подключаемых к сетям или удаленным дискам, реализованным организацией-пользователем. Обмен данными в среде MassHunter OpenLAB включает соответствующие проверки правильности и безопасности ввода.
Приложение 11-6; Бразилия, GMP 580; ICHQ7-5.45	6.2. Существует ли дополнительная проверка точности данных? (Эта проверка может выполняться вторым оператором или проверенными электронными средствами.)	Да	Точность данных обычно подтверждается с помощью соответствующих проверок контроля качества, определенных организацией-пользователем. Могут быть использованы дополнительные проверки, такие как отчет о подтверждающих результатах для изотопов квалификатора. Дальнейшие проверки – это, например, проверка вторым оператором. Ответственность за нее несет организация-пользователь
Clinical Computer Guide D.3 – Руководство по клинической обработке данных	6.3. Установлены ли элементы управления, чтобы гарантировать правильность отображения даты и системного времени?	Да	Дата и время проверяются при настройке системы и ее квалификации. Организация-пользователь несет ответственность за правильность отображаемой даты и времени на системных часах ПК.

Продолжение таблицы

Часть 11 или другие	Требования	Да/Нет	Если да, то как именно удовлетворено требование или, если нет, какова рекомендация для пользователей
Clinical Computer Guide D.3 – Руководство по клинической обработке данных D.3	6.4. Может ли изменить дату или время только уполномоченный персонал, и получит ли такой персонал уведомление, если обнаружено некорректное отображение системой даты или времени?	Да	Настройки даты и времени рабочей станции (ПК) ICP-MS MassHunter и OpenLAB Server доступны только пользователям с соответствующими logon-полномочиями для входа в систему. Внешний мониторинг системной даты/времени не выполняется, поэтому за подтверждение правильных настроек даты и времени будет отвечать организация-пользователь.
Clinical Computer Guide D.3 – Руководство по клинической обработке данных D.3	6.5. Используются ли временные отметки с четким обозначением использующегося часового пояса для систем, которые охватывают разные часовые пояса?	Да	Временные метки в нормальных отчетах MassHunter показывают местное время, но контрольный журнал регистрирует как местное время, так и UTC, поэтому истинное время определяется сопоставлением меток и учетом часовых поясов, в которых находятся системы.
7. Управление для открытых систем (применимо только в отношении открытых систем)			
Часть 11.3	7.1. Существуют ли процедуры и средства контроля, предназначенные для обеспечения аутентичности, целостности и при необходимости конфиденциальности электронных записей с момента их создания до момента их получения?	Нет данных	Эта система не предназначена для функционирования в качестве открытой системы.
Часть 11.3	7.2. Существуют ли дополнительные меры, такие как шифрование документов и использование надлежащих стандартов цифровой подписи, для обеспечения в силу некоторых обстоятельств аутентичности, целостности и конфиденциальности?	Нет данных	Эта система не предназначена для функционирования в качестве открытой системы.
8. Электронные подписи – сигнатура электронной подписи и подпись / связывание записи			
Приложение 11.14; ICH Q7.6.18	8.1. Когда используются электронные подписи, имеют ли они такую же силу, что и письменные подписи, в рамках отдельной компании? Они постоянно связаны с записью, к которой имеют отношение? Содержат ли они время и дату применения?	Да	Использование электронных подписей внутри компании и последствия их использования – это ответственность организации-пользователя. Электронные подписи бессрочно связаны с относящимися к ним записями и содержат дату/время (и причину, если требуется), когда они были применены.
Часть 11.50(a)	8.2. Содержат ли подписанные электронные записи информацию, в которой четко указаны: • расшифровка подписи ставящего ее лица; • дата и время, когда подпись была выполнена; • значение (например, просмотр, утверждение, обязательства или авторство), связанные с подписью?	Да	Электронные записи содержат имя пользователя, дату, время и обоснование, связанное с подписанием.
Часть 11.50 (b)	8.3. Подчиняются ли элементы, указанные в пунктах (a)(1), (a)(2) и (a)(3) настоящего раздела, тем же средствам контроля, что и для электронных записей, и включены ли они в состав любой традиционно читаемой формы электронной записи (например, экран компьютера или распечатка)?	Да	Электронные подписи, применяемые в программном обеспечении ICP-MS MassHunter, подчиняются тем же элементам управления, что и электронные записи. Они включаются в отчеты, которые можно просмотреть на экране приложения и в печатном виде. Электронные подписи, применяемые к файлам MSP-MS MassHunter в OpenLAB Server, можно просмотреть на веб-странице сведений и в диалоговом окне свойств файла.
Часть 11.7	8.4. Привязаны ли электронные подписи и рукописные подписи к имеющим к ним отношение электронным записям, чтобы гарантировать, что подписи не могут быть вырезаны, скопированы или иным образом «перенесены» с целью подделки электронной записи обычными способами?	Да	Файлы ICP-MS MassHunter могут быть подписаны электронным способом в программном обеспечении ICP-MS MassHunter и в OpenLAB Server. Электронная подпись неразрывно связана с файлом. Система не распознает подписи (например, рукописные), которые применяются вне собственных плагинов электронной подписи.

Продолжение таблицы

Часть 11 или другие	Требования	Да/Нет	Если да, то как именно удовлетворено требование или, если нет, какова рекомендация для пользователей
Часть 11. Преамбула – раздел 124	8.5. Существует ли какая-либо специальная функция, которая автоматически отключала бы неактивного пользователя от системы, если на протяжении установленного непродолжительного периода времени он не делал записей или каких-либо других действий?	Да	Системную блокировку можно применить к ICP-MS MassHunter. Она требует повторного ввода действительных учетных данных пользователя для разблокировки системного компьютера.
9. Электронные подписи, общие требования, компоненты подписи и элементы управления			
Часть 11.100(a)	9.1. Является ли каждая электронная подпись уникальной для одного человека и не используется ли повторно или переназначается кому-либо еще?	Да	Система использует комбинацию идентификаторов пользователей и паролей, уникальную для каждого пользователя, ее можно использовать и для электронной подписи. Идентификаторы пользователей должны быть уникальными и не должны повторно использоваться или переназначаться другому лицу. Управление этим процессом является обязанностью организации, в которой внедряется и используется данная система.
Часть 11.100(b)	9.2. Проверяет ли организация личность человека до того, как она устанавливает, назначает, удостоверяет или иным образом санкционирует электронную подпись данного лица или какой-либо элемент такой электронной подписи?	Нет данных	Обязанности пользователя.
Часть 11.100(c)	9.3. Должны ли лица, использующие электронные подписи, до или в момент такого использования, предоставить агентству документальное подтверждение, что электронные подписи в их системе, используемые 20 августа 1997 года или после этой даты, являются юридически обязательным эквивалентом традиционных рукописных подписей?	Нет данных	Обязанности пользователя.
Часть 11.100(c)	9.4. Должны ли лица, которые используют электронные подписи, предоставлять по запросу агентства дополнительную сертификацию или свидетельство о том, что конкретная электронная подпись является юридически обязательным эквивалентом собственноручной подписи подписывающего лица?	Нет данных	Обязанности пользователя.
Часть 11.200(a)(1)	9.5. Используются ли в электронных подписях, которые не основаны на биометрических данных, как минимум два различных идентификационных компонента, такие как идентификационный код и пароль?	Да	Перед применением сигнатур в файлах электронной подписи требуются два разных идентификационных компонента: уникальный идентификатор пользователя и пароль.
Часть 11.200(a) (1) (i)	9.6. Когда человек ставит серию подписей в течение одного непрерывного периода контролируемого доступа к системе, требуется ли при самом первом подписании использовать все компоненты электронной подписи?	Да	Пользователям необходимо ставить электронные подписи под каждой отдельной записью. Для каждой электронной подписи пользователь должен ввести два различных идентификационных компонента: уникальный идентификатор пользователя и пароль.
Часть 11.200(a) (1) (i)	9.7. Когда человек выполняет серию подписей в течение одного непрерывного периода контролируемого доступа к системе, являются ли последующие подписания выполненными, если используется хотя бы один компонент электронной подписи, который должен исполняться и предназначен для использования только конкретным лицом?	Да	Пользователям необходимо ставить электронные подписи под каждой отдельной записью. Для каждой электронной подписи пользователь должен ввести два различных идентификационных компонента: уникальный идентификатор и пароль.

Продолжение таблицы

Часть 11 или другие	Требования	Да/Нет	Если да, то как именно удовлетворено требование или, если нет, какова рекомендация для пользователей
Часть 11.200(a) (1) (ii)	9.8. Когда человек выполняет одну или несколько подписей, но не во время одного сеанса, то есть непрерывного периода контролируемого доступа к системе, нужно ли с каждой электронной подписью использовать все ее компоненты?	Да	Пользователям необходимо ставить электронные подписи под каждой отдельной записью. Для каждой электронной подписи пользователь должен ввести два различных идентификационных компонента: уникальный идентификатор и пароль
Часть 11.200(a) (2)	9.9. Применяются ли меры контроля к электронным подписям, не основанным на биометрии, чтобы гарантировать, что подписи используются только их настоящими владельцами?	Да	Систему можно настроить таким образом, чтобы администратор сам мог назначить пользователю начальный пароль для новой учетной записи или вместо забытого пароля, но пользователь должен изменить этот пароль при первом входе в систему. Таким образом, комбинация имени пользователя и пароля известна только одному лицу. Система также не позволяет двум пользователям иметь одну и ту же комбинацию идентификаторов пользователя и паролей. Организация несет ответственность за то, чтобы идентификаторы пользователей и пароли использовались только подлинными владельцами и не передавались другим людям для совместного использования.
Часть 11.200(a) (3)	9.10. Администрируются ли электронные подписи, и есть ли какие-то меры гарантии того, что попытка использования электронной подписи каким-либо лицом кроме ее подлинного владельца, требует сотрудничества двух или более лиц?	Да	Идентификаторы пользователей и пароли остаются уникальными для пользователей. Системный администратор знает идентификаторы пользователей только при настройке пользователей. При первом входе в систему каждый пользователь должен определить свой уникальный пароль, который будет известен только ему. Таким образом, попытка использования электронной подписи отдельного лица другими людьми требует активных действий с целью получения возможности совместного использования паролей.
Часть 11.200(b)	9.11. Используются ли биометрические данные в электронной подписи, чтобы ею не мог воспользоваться кто-то еще, кроме настоящего владельца?	Нет данных	Электронные подписи, используемые с ICP-MS MassHunter и OpenLAB Server, не основаны на биометрии.
10. Элементы управления идентификационными кодами и паролями			
Часть 11.300(a)	10.1. Используются ли элементы управления для сохранения уникальности каждой комбинации кода идентификации и пароля, так что у двух человек никогда не будет одинаковой комбинации идентификационного кода и пароля?	Да	Управление идентификацией выполняется в менеджере учетных записей пользователей Windows и панели управления OpenLAB, что не позволяет двум отдельным пользователям иметь одну и ту же комбинацию идентификаторов пользователя и паролей.
Часть 11.300(b)	10.2. Существуют ли меры контроля, гарантирующие, что служба выдачи кода идентификации и паролей работает правильно, то есть эти важные атрибуты периодически проверяются, отзываются или пересматриваются (например, в связи с такими событиями, как устаревание пароля)?	Да	Используя аутентификацию домена Windows, параметры обновления пароля можно настроить в настройке политики паролей Windows. Администратор вправе определить периодичность, с которой пароли будут пересматриваться автоматически. Пользователям запрещается использовать пароли повторно.
Часть 11.300(c)	10.3. Существуют ли процедуры, позволяющие электронным образом деавторизовать утерянные, украденные, отсутствующие или другие потенциально взломанные токены, карты и другие устройства, которые содержат или генерируют идентификационный код или информацию о пароле, а также выдавать временные или постоянные замены с использованием подходящих строгих средств контроля?	Нет данных	Обязанности пользователя.

Окончание таблицы

Часть 11 или другие	Требования	Да/Нет	Если да, то как именно удовлетворено требование или, если нет, какова рекомендация для пользователей
Часть 11.300(d)	10.4. Имеются ли средства защиты транзакций для предотвращения несанкционированного использования паролей и/или идентификационных кодов, а также функциональные возможности у компонента безопасности и защиты системы моментально обнаруживать и тут же сообщать о любых попытках несанкционированного использования паролей и/или идентификаторов в отдел безопасности или, если требуется, руководству организации?	Да	Политику безопасности Windows можно настроить таким образом, чтобы определенное количество попыток несанкционированного доступа блокировало пользовательскую учетную запись и отправило электронное уведомление системному администратору. В системном журнале регистрации событий Windows регистрирует общие события, такие как попытки входа в систему, установленную на компьютере, а также изменения приложений или информации пользователей, в качестве центрального хранилища всех сведений о безопасности служит журнал событий Windows Event log. Сюда входят идентификатор системы и компьютера, а также имя оператора и идентификация приложения, позволяющая мгновенно проверить потенциальную утечку безопасности.
Часть 11.300(e)	10.5. Существуют ли средства для самого первого и периодического тестирования устройств, например токенов или карточек, которые содержат или генерируют идентификационный код или информацию о пароле, чтобы гарантировать, что они функционируют должным образом и не были изменены несанкционированным образом?	Нет данных	Обязанности пользователя.
11. Усовершенствование системы и поддержка			
Приложение 11 4.5; Бразилия, GMP 577; GAMP	11.1. Разработано ли программное обеспечение или система в соответствии с подходящей системой управления качеством?	Да	Agilent Technologies поддерживает и может предоставить документы, доказывающие, что программное обеспечение ICP-MS MassHunter и OpenLAB Server разработано в соответствии с требованиями системы управления качеством, которые определены в документе Agilent LSCA Product Lifecycle Revision D.05 и ISO9001-2008, а также описаны в испытания, которые выполняются во время проведения проверок и квалификационных процедур.
Бразилия, GMP 589	11.2. Существует ли официальное соглашение в случае, если поставщик программного обеспечения нанимает субподрядчиков для разработки программного обеспечения и технического обслуживания? Есть ли в договоре пункт об обязанностях подрядчика?	Нет данных	Программное обеспечение Agilent ICP-MS MassHunter не разрабатывается и не поддерживается по договору о субподряде.
ICHQ10, 2.7 c	11.3. Для сторонней (разработка и поддержка) деятельности существует ли письменное соглашение между контрактодателем и акцептором договора?	Нет данных	Программное обеспечение Agilent ICP-MS MassHunter не разрабатывается и не поддерживается по договору о субподряде.
ICHQ10, 2.7 c	11.4. Определены ли обязанности и коммуникационные процессы для заинтересованных сторон (подрядчиков), деятельность которых имеет отношение к вопросам качества?	Нет данных	Программное обеспечение Agilent ICP-MS MassHunter не разрабатывается и не поддерживается по договору о субподряде.

Примечание: Описания взяты из правила 21 CFR часть 11. URL: www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=11 (дата обращения 20.06.2017).



КОМПЛЕКСНЫЕ СИСТЕМЫ С ВЫСОКОЙ СТЕПЕНЬЮ ЗАЩИТЫ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ ОТ FPS FOOD AND PHARMA SYSTEMS

Материал предоставлен компанией FPS

Компания FPS Food and Pharma Systems является лидером в области производства оборудования для фармацевтической и химической промышленности, разрабатывая решения для работы со стерильными и высокоактивными субстанциями.

FPS гарантирует высокое качество как оборудования, так и сопутствующих услуг: инжиниринга, производства, тестирования, валидации, сервисного обслуживания. Производимое оборудование выполнено в соответствии с требованиями GMP, а система менеджмента качества сертифицирована в соответствии с ISO9001.

Изоляторы FPS разработаны специально под потребности конечного пользователя и в строгом соответствии с требованиями регулирующих органов. Высокозащищенные комплексные системы FPS предназначены для выполнения процессов,



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

требующих абсолютной герметичности как с точки зрения загрязнения конечного продукта, так и с точки зрения защиты оператора от опасного воздействия. Следование концепции «Quality by Design» означает, что пожелания заказчиков учитываются уже на этапе проектирования оборудования и реализуются при его производстве.

Все возрастающие требования, предъявляемые к контролю размеров частиц при производстве АФИ, приводят к появлению инновационного оборудования и решений для измельчения частиц. FPS производит широкий перечень систем для измельчения различных материалов и получения частиц любого размера: ниже 30 мкм – спиральные мельницы Spiral Jet Mill, для PSD от 30 до 100 мкм используются петлевые мельницы типа QMill или штифтовые типа «pin mill».

Оборудование компании FPS применяется как для выполнения научных исследований, так и для получения небольших партий готового продукта и пилотного производства. Размер и конфигурация всей линейки производимого оборудования могут быть подобраны в зависимости от масштаба производства. Оборудование может быть в разном исполнении в зависимости от потребностей, например взрывобезопасное исполнение, приборы для использования при низких температурах или системы с высокой степенью защиты.

Собственный R&D-отдел и испытательный центр компании позволяет постоянно совершенствовать производимое оборудование. В испытательном центре проводится тестирование производимого оборудования, также он может использоваться заказчиками для проверки токсичности и выполнения других исследований. Наша цель – быть как можно ближе к пользователям нашего оборудования и совместно с Вами находить решение для тех задач, с которыми Вы сталкиваетесь в повседневной работе.

Компания FPS осуществила поставку высокозащищенных комплексных систем на фармацевтический завод в Бангалоре.

Система состоит из изолятора ANFD с системой сброса, вакуумной конвейерной системы (VTS) и струйной мельницы PROMILL-8, интегрированной в изолятор.

«Мы предложили заказчику фильтр-влагоотделитель с отводом конденсата в комбинации с вакуумным транспортером и оборудованием для измельчения и микронизации высокоактивных фармацевтических ингредиентов (HPAPI). Данный комплекс выполнен на заказ. В нем реализованы решения и технологии, которые использовались в аналогичных, поставлявшихся ранее установках», – говорит руководитель отдела продаж FPS.

Изолятор, в который интегрирована сушилка с нутч-фильтром (ANFD), комплектуется разгрузочным



лотком, используемым для подачи продукта, требующего повторной переработки, и для переноса продукта в микронизационную установку; конической мельницей для просеивания продукта перед микронизацией и портом для быстрой транспортировки материалов (RTP) к пункту ввода/вывода.

По вакуумному транспортеру (VTS) продукт передается из изолятора ANFD в буферную емкость, установленную поверх системы микронизации. По такой схеме осуществляется транспортировка всей партии продукта.

Емкость оснащена активным разделительным клапаном типа «бабочка». Он служит для безопасного подсоединения бункеров, когда невозможно использовать транспортер вследствие низкой сыпучести материала. Транспортировка бункеров осуществляется с помощью специальной подъемной колонны.

Установленная внутри изолятора система микронизации PROMILL-8 комплектуется весовым дозатором для загрузки продукта в струйную мельницу и сепарационным циклонным фильтром для отделения газа от продукта после микронизации. Системы уплотнения и выходная камера позволяют регулировать выгрузку продукта внутри барабанов, контролируя вес и обеспечивая безопасную выгрузку из системы.

Такое техническое решение гарантируют высокую степень защиты оператора и продукта, позволяя работать в условиях повышенной безопасности. При этом наивысшая производительность процесса микронизации достигается за счет использования типовой конструкции струйной мельницы FPS.

Клиенты компании FPS получают всестороннюю поддержку, начиная с момента проектирования и потом, после ввода оборудования в эксплуатацию. Специалисты компании проводят обучающие мероприятия, во время которых делятся знаниями о производимом обоурдовании, рассказывают о перспективах дальнейшего совершенствования производства АФИ.

РОЛЬ ФАКТОРОВ СРЕДЫ В ПРОЦЕССАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК. НОВЫЕ АППАРАТНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КОНТРОЛЯ И УПРАВЛЕНИЯ ПРОЦЕССОМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Материал предоставлен компанией Nova biomedical

АННОТАЦИЯ

В настоящей статье рассмотрены вопросы влияния факторов среды на процессы культивирования клеток, приведен краткий обзор современных аппаратных решений для контроля параметров питательной среды. Показано, что использование биотехнологических анализаторов позволяет более информативно изучать процессы культивирования микроорганизмов (клеток млекопитающих и др).

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшей целью технолога при проектировании и эксплуатации ферментационного отделения любого биотехнологического производства является обеспечение максимально благоприятных условий для роста культуры, увеличения выхода целевого продукта. Это касается как поддержания заданной температуры процесса, уровня pH, так и состава и свойств питательной среды. Состав питательных сред должен в наибольшей мере соответствовать потребностям штамма-продуцента. В непрерывнодействующих процессах культивирования задача технолога сводится в конечном итоге к постоянному поддержанию необходимых концентраций питательных веществ (и кислорода) в ходе промышленной эксплуатации ферментера и дозированному введению кислоты/щелочи для pH-статирования. Более сложные проблемы возникают при производстве метаболитов, когда в ходе периодического процесса культивирования состав среды, окружающей клетки штамма-продуцента, должен изменяться в зависимости от фазы роста культуры, ее состояния и уровня активности. Именно это обстоятельство затрудняет перевод такого рода производств на непрерывный режим эксплуатации, да и при периодическом режиме требует от обслуживающего персонала постоянного контроля и управления процессом.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Для решения этих задач современные промышленные биотехнологии предлагают ряд надежных экспресс-методов количественного изучения свойств живых клеток как продуцента целевого продукта, а также концентрации питательных веществ и метаболитов. В последние годы разрабатываются и внедряются новые аппаратные решения для всестороннего экспресс-контроля культуры и питательной серды. Относительно новым классом подобных приборов являются биотехнологические анализаторы, с помощью которых можно получать данные о концентрации питательных веществ и метаболитов в культуральной среде в режиме онлайн. Принцип работы таких анализаторов основан на биосенсорных технологиях, использование которых позволяет получать точные и воспроизводимые результаты в течение 1–2 мин.



Анализатор Bioprfile FLEX

ОБЗОР ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ И ИХ РОЛИ В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В таблице 1 приведены факторы культуральной среды, которые определяют рост и биосинтетическую активность продуцентов. Рассмотрим данные факторы и методы управления ими более подробно.

Состав и концентрация питательных веществ определяют метаболизм клеток-продуцентов. В зависимости от типа процесса в качестве таких веществ могут выступать глюкоза, сахароза, лактоза, ксилоза, крахмал, целлюлоза, этанол и др. Состав питательных веществ определяется на этапе составления композиции питательной среды, а концентрация может поддерживаться или меняться в ходе ферментации в зависимости от способа.

Таблица 1.

Основные факторы среды, определяющие рост и биосинтетическую активность продуцентов

Фактор	Роль при культивировании	Методы управления фактором
Состав и концентрация питательных веществ	Обеспечивает метаболизм	Составление оптимальной композиции; подпитка во время ферментации; непрерывность процесса; многостадийность с учетом потребностей продуцента по фазам развития и др.
Концентрация продуктов и ингибиторов	Замедляет биохимические реакции	Осаждение продукта по мере накопления; ферментация с диализом; ферментация под разрежением с испарением летучего продукта и др.
pH	Оптимизирует скорости биохимических реакций	Регулирование путем добавления кислоты или щелочи
Температура	Оптимизирует скорости биохимических реакций	Охлаждение или подогрев культуральной жидкости путем подачи воды/пара в рубашку ферментера или температуры подаваемых субстратов
Осмотическое давление или активность воды	Определяет границы жизни (составляет 0,6–0,998)	Составление сред с оптимальной концентрацией питательных веществ или влажностью твердой среды; поддержание на постоянном уровне во время ферментации путем разбавления водой или добавлением отдельных компонентов
Содержание растворенного кислорода	Для аэробов обеспечивает аэробный метаболизм; является акцептором H^+; ингибирует развитие анаэробов	Для аэробных процессов регулируют интенсивностью аэрации или добавлением к газовой смеси кислорода. Анаэробные процессы реализуют в бескислородной среде
Содержание диоксида углерода	Источник углерода для автотрофов; некоторые гетеротрофы нуждаются, а некоторые замедляют метаболизм в присутствии CO_2	Продувание в фотосинтезирующих процессах ферментации газовой средой, обогащенной CO_2; выделению CO_2 из жидкой фазы способствует перемешивание
Перемешивание среды	Равномерное распределение питательных веществ и биомассы по всему пространству среды	Организуют макро- и микроперемешивание при помощи механических мешалок, барботажных, циркуляционных и других систем
Вязкость среды	Определяет диффузию питательных веществ и перемешивание клеток продуцента	Регулирование компонентами питания, характером и концентрацией биомассы, наличием некоторых полимерных продуктов. Вязкость влияет на перемешивание и аэрацию; требуются специальные технические средства



Биотехнологический анализатор Bioprfile CDV состава культуральной жидкости

При периодическом способе культивирования в ферментер загружают сразу весь объем питательной среды и вносят посевной материал. Выращивание микроорганизмов проводят в оптимальных условиях в течение определенного времени, после чего процесс останавливают, сливают содержимое ферментера и выделяют целевой продукт. Этап роста культуры включает лаг-фазу, экспоненциальную фазу, фазу замедления роста, стационарную фазу и фазу отмирания.

Широко применяют периодическое культивирование с подпиткой. Существует также объемно-доливочное культивирование, когда часть объема из биореактора время от времени изымается при добавлении эквивалентного объема среды (полунепрерывное культивирование).

При непрерывном способе питательная среда непрерывно подается в ферментер (биореактор), в котором создают оптимальные условия для роста микроорганизмов, а из ферментера (биореактора) также непрерывно отбирают культуральную жидкость вместе с микроорганизмами. В непрерывных процессах биообъект поддерживается в экспоненциальной фазе роста. При этом существует равновесие между приростом биомассы за счет деления клеток и их убылью в результате разбавления свежей средой.

Продукты метаболизма (например, лактат или аммиак) и ингибиторы замедляют биохимические реакции, а следовательно, и сам процесс ферментации. Такие вещества следует выводить из среды ферментации. Для этой цели разработанные различные инструментальные решения, например ротационный фильтр. (Ротационный фильтр основан на технологии просеивания при вращении. Он может быть интегрирован непосредственно в сосуд биореактора или использоваться как внешняя проточная система. В первом случае преимущество состоит в компактности системы.)

Путем изменения значений *pH и температуры* регулируют скорость биохимических реакций. Кислотность питательной среды особое значение имеет для биохимических реакций, протекающих в клетках-продуцентах. Концентрация в растворе ионов водорода оказывает влияние на физико-химические свойства и биологическую активность белков и нуклеиновых кислот, поэтому для оптимального протекания культивирования поддержание кислотно-основного гомеостаза является задачей исключительной важности. В ферментере постоянное значение pH поддерживается путем дозирования щелочи/кислоты. В зависимости от природы продуцента оптимальный диапазон значений pH может меняться. Например, при культивировании большинства патогенных бактерий оптимальна слабощелочная среда (pH 7,2–7,4). Исключение составляют холерный вибрион – его оптимум находится в щелочной зоне (pH 8,5–9,0), – и возбудитель туберкулеза, нуждающийся в слабокислой реакции (pH 6,2–6,8).

Задача *термостатирования*, то есть поддержания постоянной температуры процесса в диапазоне 2–3 градусов, аппаратурно решается с помощью термостатирующих рубашек (водяных, воздушных и др.). Например, оптимальная температура культивирования клеток млекопитающих составляет +36...+37 градусов, насекомых +20...+25 градусов.

Осмотическое давление является важнейшим физиологическим параметром, в ходе культивирования оно поддерживается с помощью разбавления или добавления новых порций среды. Величина осмотического давления питательных сред в основном зависит от концентрации NaCl, оптимальное значение при +38 градусах составляет 7,6 атм.

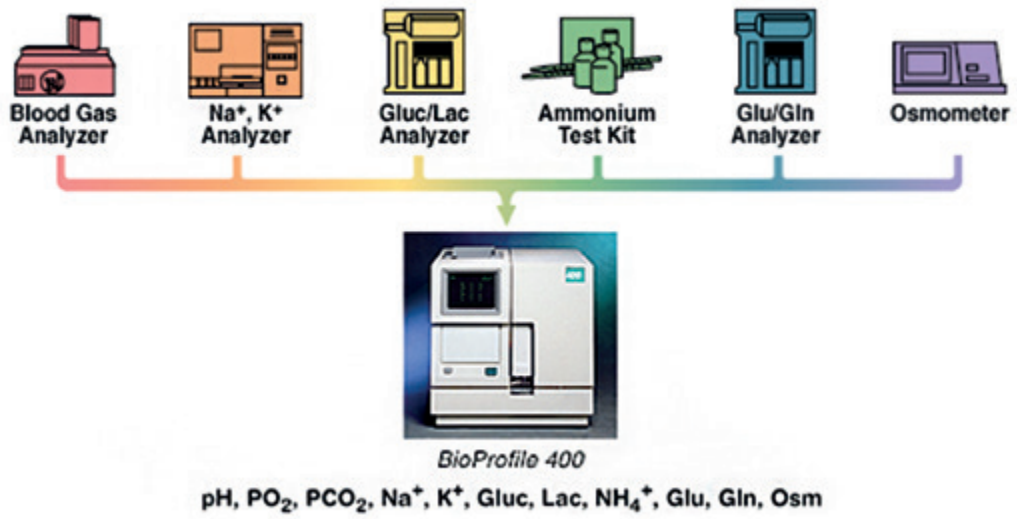


Анализатор физиологических параметров культуры Bioprfile Basic 400

Таблица 2.

Основные факторы среды, определяющие рост и биосинтетическую активность продуцентов, аппаратурные способы контроля и управления ими

Фактор	Роль при культивировании	Аппаратурные методы управления фактором
Состав и концентрация питательных веществ	Обеспечивает метаболизм	Измерение концентрации с помощью анализаторов Bioprofile или рутинных способов. Автоматическое управление подпиткой при интеграции контроллера ферментера и анализатора Bioprofile.
Концентрация продуктов и ингибиторов	Замедляет биохимические реакции	Измерение концентрации продуктов метаболизма с помощью анализаторов Bioprofile и их выведение из среды ферментирования с помощью роторного фильтра (например).
pH	Оптимизирует скорости биохимических реакций	Измерение уровня pH с помощью pH-датчиков, встроенных в контроллер ферментера. Автоматическая подача кислоты и щелочи.
Температура	Оптимизирует скорости биохимических реакций	Измерение температуры с помощью встроенных в ферментер температурных датчиков, изменение температуры водяной рубашки (например).
Осмотическое давление или активность воды	Определяет границы жизни (составляет 0,6-0,998)	Измерение осмотического давления среды с помощью автоматического осмометра или с помощью анализатора Bioprofile FLEX. Автоматическое разбавление среды в случае интегрирования контроллера ферментера и анализатора Bioprofile FLEX.
Содержание растворенного кислорода	Для аэробов обеспечивает аэробный метаболизм; является акцептором H^+; ингибирует развитие анаэробов	Измерение кислорода встроенным в ферментер датчиком кислорода, аэрация культуральной среды.
Содержание диоксида углерода	Источник углерода для автотрофов; некоторые гетеротрофы нуждаются, а некоторые замедляют метаболизм в присутствии CO_2	Измерение углекислого газа встроенным датчиком, продувание культуральной среды CO_2.
Перемешивание среды	Равномерное распределение питательных веществ и биомассы по всему пространству среды	С помощью мешалок ферментера различной конструкции.
Вязкость среды	Определяет диффузию питательных веществ и перемешивание клеток продуцента	Разбавление культуральной среды, регулировка работы мешалки, аэрация.



Схемаческая структура Bioprfile 400

Технологическое оформление биотехнологических процессов в сильной степени определяется отношением микроорганизма-продуцента к *кислороду*. Культуры бывают как *аэробные, так и анаэробные*. В первом случае кислород обеспечивает метаболизм. Анаэробная ферментация может проводиться в условиях полной защиты культуральной среды от кислорода (если микроорганизмы являются облигатными анаэробами) или просто без подачи дополнительной кислородной смеси.

Углекислый газ служит источником углерода для автотрофов. Некоторые гетеротрофные микроорганизмы нуждаются в нем, а некоторые, наоборот, замедляют метаболизм в присутствии CO_2. Поэтому концентрация углекислого газа во многих случаях является важным параметром процесса ферментации.

Конструкция *мешалки ферментера*, а также скорость ее вращения регулирует процессы массопереноса, трансфера питательных веществ к продуцентам и отвода метаболитов.

ВОЗМОЖНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ ФЕРМЕНТЕРОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ И УПРАВЛЕНИЯ ФАКТОРАМИ СРЕДЫ. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ

Ферментер (биореактор) занимает ключевое место в аппаратурном оформлении биотехнологического процесса. Он представляет собой аппарат для глубинного выращивания (культивирования) микроорганизмов (или культур клеток) в питательной среде в условиях стерильности, интенсивного перемешивания, непрерывного продувания стерильным воздухом и постоянной температуры (или смесью газов).

Современные ферментационные аппараты позволяют контролировать и управлять процессом культивирования клеток и добиваться высоких результатов выходов целевого продукта. Однако даже самый современный ферментер не позволит технологу контролировать и управлять всеми факторами среды (см. таблицу 1). Во многих случаях технолог или оператор ферментационного отделения вынужден использовать рутинные методики для определения, например, концентрации метаболитов или питательных веществ. В качестве альтернативы рутинным методикам в последнее время широкое распространение получили биотехнологические анализаторы. Их работа основана на использовании биосенсоров, время выполнения анализа составляет 1–2 мин.

Данные о биотехнологическом процессе, полученные с помощью ферментера и биотехнологического анализатора, являются мощным инструментом для управления ферментацией в непрерывном и периодическом режимах. В таблице 2 обобщены аппаратные методы управления факторами среды при использовании ферментера в комплекте с анализатором. При этом в таблице использованы данные о характеристиках анализатора Bioprfile FLEX как самого современного и мощного биотехнологического анализатора на настоящий момент, который способен заменить несколько отдельных приборов или рутинных методик. Bioprofile FLEX позволяет оператору в экспресс-режиме измерять концентрации питательных веществ, метаболитов, осмотическое давление, а также физиологический статус продуцента. Кроме того анализатор может быть интегрирован в контроллер ферментера, а управление подпиткой автоматизировано.

В многочисленных опубликованных статьях описано успешное использование анализаторов Bioprofile или аналогов для решения задач составления оптимальных сред, оптимизации подпитки, увеличения выхода целевого продукта и др. Поэтому использование биотехнологических анализаторов на производствах и в лабораториях является стандартным и доказанно эффективным методом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При непрерывном и периодическом культивировании актуальна задача экспресс-контроля концентрации питательных веществ и метаболитов в культуральной среде, оценки физиологического состояния продуцента.
2. Современные ферментеры позволяют контролировать и управлять основными параметрами культуральной среды, но не решают задачу оперативного контроля концентрации питательных веществ и метаболитов, а также изучения физиологического статуса продуцента.
3. Использование технологом/оператором биотехнологического производства анализаторов Bioprofile FLEX или аналогов является эффективным и надежным экспресс-инструментом количественного изучения свойств продуцента, концентрации питательных веществ и метаболитов.

СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

DIAGNOSTICS MOLECULES & SYSTEMS THERAPY

МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «МОЛЕКУЛЫ И СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И АДРЕСНОЙ ТЕРАПИИ»

1-3 ноября 2017, Томск, Россия

Уважаемые коллеги!

Приглашаем Вас принять участие в Международной научно-практической конференции «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии», которая состоится 1-3 ноября 2017 в Сибирском государственном медицинском университете по адресу г. Томск, Московский тракт, 2 (Главный корпус СибГМУ). В рамках конференции запланировано проведение симпозиумов и стендовых сессий.

Симпозиумы:

- Перспективные молекулы-мишени для диагностики
- Тераностический потенциал микробиоты
- Биоактивные молекулы: синтез, структура, свойства, фармакологическая активность
- Системы адресной доставки
- Системы визуализации, диагностические устройства и биочипы
- Биосовместимые и биодеградируемые материалы

В рамках конференции пройдут мероприятия:

- совещание заведующих ЦНИЛ
- школа врачей клинической лабораторной диагностики
- школа клинической эпидемиологии для молодых ученых (на английском языке)
- конкурс молодых ученых (до 35 лет)

Участникам конференции, выступающим с устным докладом, предоставляется возможность опубликовать полнотекстовую научную статью (после рецензирования) в журнале Бюллетень Сибирской медицины (журнал индексируется в базах данных РИНЦ и WoS (ESCI)). Лучшие работы конкурса молодых ученых будут опубликованы в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств» (перечень ВАК).

Прием заявок на участие – тезисов устных и стендовых докладов на (английском и русском языках) – проводится на сайте конференции http://conf.ssmu.ru/msdt2017 до 15 июня.

Подтверждение о включении доклада в программу конференции до 1 июля.

Регистрация открыта на сайте конференции http://conf.ssmu.ru/msdt2017 до 15 августа.

Прием полнотекстовых статей – до 10 ноября.

По всем вопросам участия в работе конференции просим обращаться в оргкомитет:
по электронной почте: confmsdt@ssmu.ru
по телефону: +7 (3822) 901-101 доб. 1633, 1634

Всю информацию о конференции Вы можете найти на сайте Сибирского государственного медицинского университета http://conf.ssmu.ru/msdt2017

ЭФФЕКТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОГО ТИТРА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ПОДПИТЫВАЕМОМ ПРОЦЕССЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМ С ОДНОРАЗОВЫМ СМЕСИТЕЛЬНЫМ БАКОМ И КАЧАЮЩИМСЯ БИОРЕАКТОРОМ

Материал предоставлен компанией GE Healthcare Lifescience, Швеция

ВВЕДЕНИЕ

В инструкции по применению описывается возможность производства моноклональных антител в подпитываемом процессе с использованием систем с одноразовым смесительным баком Xcellerex™ XDR-200 и с качающимся биореактором ReadyToProcess WAVE™ 25. Наращивание клеток осуществлялось в культуре, находящейся в биореакторе с качающимся механизмом объемом 15 л, которую затем высеяли в биореактор с мешалкой объемом 200 л. Для сравнения производительности биореакторов ReadyToProcess WAVE 25 и XDR-200 7 л из 200 л культуры было помещено в параллельную систему ReadyToProcess WAVE 25, общий объем культуры в итоге составил 10 л. Выход моноклональных антител для параллельных процессов составил 5,0 и 4,9 г/л в реакторах XDR-200 и ReadyToProcess WAVE 25 соответственно. Профили метаболитов в культурах обоих биореакторов были очень схожи. Вместе биореакторные системы ReadyToProcess WAVE 25 и Xcellerex XDR представляют собой эффективное решение для организации надежного масштабируемого производства рекомбинантных белков в одноразовом формате. Кроме того, будучи универсальным прибором, система ReadyToProcess WAVE 25 может быть использована как в качестве посевного ферментера, так и для разработки технологических процессов.





ReadyToProcess WAVE 25

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Система XDR-200 входит в состав платформы Xcellerex, включающей биореакторы объемом от 10 до 2000 л. Это оборудование совмещает в себе преимущества одноразовой технологии и применения смесительного бака. Пользователь этой модульной системы получает полностью готовый к использованию биореактор, соответствующий всем требованиям стандарта GMP, предъявляемым к условиям производства.

Конструкция биореакторной системы ReadyToProcess WAVE 25 с качающимся механизмом обеспечивает быстроту установки и удобство использования, а также надежность и точность рабочего процесса для объема до 25 л. Система подходит для технологических разработок, исследовательской работы, применения в системах посевных ферментеров и для производства в небольших объемах.

В данной инструкции по применению демонстрируется использование реактора ReadyToProcess WAVE 25 в качестве посевного ферментера и сравнивается производительность систем XDR-200 и ReadyToProcess WAVE 25 при получении моноклональных антител с использованием клеточной линии яйцеклеток китайского хомячка (Chinese hamster ovary, CHO) CHO DG44, культивируемой в среде ActiCHO™. Порядок проведения эксперимента показан на рисунке 1.



Рисунок 1. Клетки извлекали из криоконсервации с использованием стандартных методов. Расширение исходной ячейки проводили в шейкер-колбах перед дальнейшим распространением в ReadyToProcess WAVE 25 до конечного объема посевного материала 15 л. Инокулят был переведен в систему XDR-200 для производства MAB. Часть из XDR-200 культуры переносили в ReadyToProcess WAVE 25 для параллельного производства MAB в спутниковой культуре биореактора

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЗАМОРОЖЕННЫХ КЛЕТОК И НАРАЩИВАНИЕ ИНОКУЛЯТА

Клетки CHO DG44 (по лицензии Cellca GmbH, Laupheim, Germany) были восстановлены из криоконсервации по стандартному протоколу и пересевались раз в три-четыре дня. Для наращивания инокулята использовалась система ReadyToProcess WAVE 25 с рабочими параметрами, указанными в таблице 1. Биореакторная система работала в два этапа: сперва при малых объемах (2,6 л), а затем через три дня объем довели до 15 л добавлением свежей среды.

Таблица 1.

Рабочие параметры и условия наращивания инокулята в биореакторе ReadyToProcess WAVE 25

Среда	ActiCHO P с 6 ммоль L-глутамина
Культуральная камера	Биоконтейнер Cellbag™ 50 л
Качание Этап загрузки малого объема	20 об/мин, угол качания 6°
Этап загрузки полного объема	20 об/мин, угол качания 8°
Расход газа	0,3 л/мин
Концентрация посевных клеток	$0{,}3\times10^6$ жизнеспособных клеток/мл
Заданное значение pH Этап загрузки малого объема	Без контроля pH (исходный уровень CO_2 7,5% в свободном пространстве над продуктом)
Этап загрузки полного объема	контроль pH при 7,0 по CO_2
Заданный уровень растворенного кислорода	40%
Рабочий объем	2,6 л в первые 3 дня во встряхиваемых колбах, 15 л до достижения конечной концентрации клеток в реакторе ReadyToProcess WAVE 25
Конечная концентрация клеток при переносе	$(3{,}5–4{,}5)\times10^6$ жизнеспособных клеток/мл
Критерии жизнеспособности при переносе	>95%

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК НА ЭТАПЕ ПРОИЗВОДСТВА

Все 15 л посевной культуры были асептически перемещены из реактора ReadyToProcess WAVE 25 в систему XDR-200 при помощи перистальтического насоса (Watson-Marlow, серия 600). После загрузки среды и внесения посевного материала общим объемом 145 л 7 л посеянной культуры перенесли назад в систему ReadyToProcess WAVE 25, запущенную параллельно основному биореактору для производства моноклональных антител. Рабочие параметры и условия для производственных биореакторов указаны в таблице 2.

Таблица 2.

Рабочие параметры и условия биореакторов на этапе производства

	XDR-200	ReadyToProcess WAVE 25
Среда	ActiCHO P с 6 ммоль L-глутамина	ActiCHO P с 6 ммоль L-глутамина
Культуральная камера	Стандартный контейнер: Разработка	Биоконтейнер Cellbag 20 л с датчиками растворенного кислорода и pH
Начальная концентрация жизнеспособных клеток	(0,35–0,45)×10^6 жизнеспособных клеток/мл	(0,35–0,45)×10^6 жизнеспособных клеток/мл
Объем инокулята	15 л	7,0 л переносится из XDR-200
Номинальный объем среды	130 л	Недоступно
Изначальный рабочий объем	145 л 138 л после переноса во вспомогательный биореактор	7,0 л
Скорость качалки / лопастной мешалки	150 об/мин	20–30 об/мин, угол качания 8°, колебание 30%
Заданное значение pH	7,1	7,1
Настройки PID* pH	P: 0,5 I: 1,0 D: 0	Заводские настройки (автоматически рассчитываются системой)
Основа для контроля pH	7,5% $NaHCO_3$ (масса/объем)	7,5% $NaHCO_3$ (масса/объем)
Заданное значение растворенного кислорода	40%	40%
Настройки PID* растворенного кислорода	P: 0,254 I: 4,083 D: 0	Заводские настройки (автоматически рассчитываются системой)
Подача воздуха	2 л/мин в свободном пространстве над продуктом Выпуск газа с контролируемым уровнем растворенного кислорода через барботер 1 мм Выход контроллера: 0–20%: 1–5 л/мин (барботажный воздух) 20–100 %: 5 л/мин (барботажный воздух)	По мере необходимости (зависит от управления уровнем растворенного кислорода и pH) общий расход газа 0,2 л/мин
Поступление кислорода	По мере необходимости (зависит от PID уровня растворенного кислорода) через барботер 20 мкм Выход контроллера: 0–20%: 0 л/мин 20–100 %: 0–5 л/мин (барботажный воздух)	По мере необходимости (зависит от PID уровня растворенного кислорода), максимум 50%, общий расход газа 0,2 л/мин
Пеногаситель	Медицинский пеногаситель C (Sigma-Aldrich) (добавляется при необходимости)	Медицинский пеногаситель C (Sigma-Aldrich) [2] (добавляется при необходимости)
Подпитки	подпитки ActiCHO Feed-A подпитки ActiCHO Feed-B глюкоза 400 г/л	подпитки ActiCHO Feed-A подпитки ActiCHO Feed-B глюкоза 400 г/л
Начало подпитывания	День 2	День 2
Суточные объемы подпитки	подпитки ActiCHO Feed-A: 5,915 л подпитки ActiCHO Feed-B: 0,592 л Глюкоза: по мере необходимости, в плановом количестве 6 г/л, за исключением среды ActiCHO Feed-A	подпитки ActiCHO Feed-A: 0,295 л подпитки ActiCHO Feed-B: 0,0295 л Глюкоза: по мере необходимости, в плановом количестве 6 г/л, за исключением среды ActiCHO Feed-A
Критерии сбора	по истечении 13 дней и/или при жизнеспособности культуры <60%	по истечении 13 дней и/или при жизнеспособности культуры <60%

Примечание: *Пропорционально-интегрально-дифференциальное регулирование.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Использованные аналитические методы указаны в таблице 3.

Таблица 3.

Аналитические методы

Измеряемый параметр	Вид анализа	Вид образца
Концентрация и жизнеспособность клеток	Анализатор Bioprofile FLEX™ (Nova Biomedical Corp.)	Суспензия клеток
Глюкоза	Анализатор Bioprofile FLEX	Суспензия клеток
Лактат	Анализатор Bioprofile FLEX	Суспензия клеток
Аммоний	Анализатор Bioprofile FLEX	Суспензия клеток
Глутамин	Анализатор Bioprofile FLEX	Суспензия клеток
Глутамат	Анализатор Bioprofile FLEX	Суспензия клеток
Осмолярность	Анализатор Bioprofile FLEX	Суспензия клеток
Концентрация продукта	Биоанализатор CEDEX™ (Roche)	Осветленный супернатант клеточной культуры

НАРАЩИВАНИЕ КЛЕТОК ДЛЯ ИНОКУЛЯТА

После восстановления и наращивания клеточной линии CHO DG44 во встряхиваемых колбах культура была перенесена в биоконтейнер Cellbag 50 л системы ReadyToProcess WAVE 25. В биореактор подали воздушную смесь с содержанием CO_2 7,5% и произвели посев с плотностью клеток $0{,}3\times10^6$ клеток/мл общим объемом 2,56 л. По истечении примерно 72 часов объем культуры увеличили до 15 л путем добавления среды при помощи насоса ReadyToProcess Pump 25, применив функцию реактора ReadyToProcess WAVE 25 «Добавление подпитки». Насыщение газом и контроль уровня pH начали при заданном значении 7,0 (без контроля основы). Рост и жизнеспособность клеток показаны на рисунке 2. Результаты измерений в режиме реального времени веса, уровня растворенного кислорода и pH в биореакторе продемонстрированы на рисунках 3 и 4. Еще через 48 часов полный объем инокулята был перенесен в биореактор XDR-200 при концентрации жизнеспособных клеток $3{,}25\times10^6$ клеток/мл.

КУЛЬТУРА В БИОРЕАКТОРЕ XDR-200

За день до посева в биореактор XDR-200 загрузили 130 л среды и привели в равновесное состояние при температуре 37 °C и pH 7,1. В биореактор засеяли полный объем посевной культуры из реактора ReadyToProcess WAVE 25 (15 л), окончательный уровень плотности клеток составил $0{,}38\times10^6$ клеток/мл. После

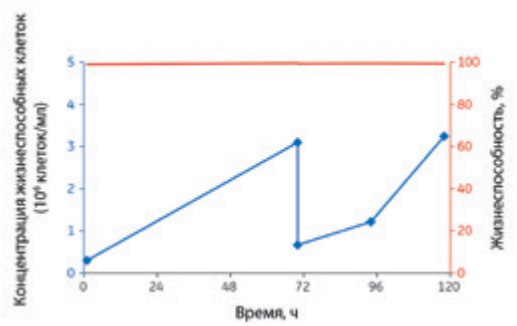


Рисунок 2. Рост и жизнеспособность инокулята в системе ReadyToProcess WAVE 25. Объем культуры был увеличен с 2,56 л до 15 л через 72 ч

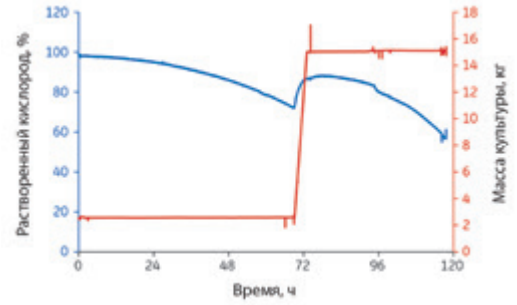


Рисунок 3. Текущие показатели объема инокулята и растворенного кислорода в биореакторе ReadyToProcess WAVE 25

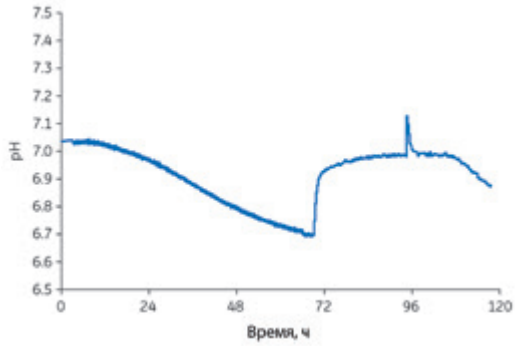


Рисунок 4. Текущие показатели pH инокулята в биореакторе ReadyToProcess WAVE 25. Примерно через 96 часов была произведена автономная калибровочная регулировка. Она показала, что действительный уровень pH до этого времени был приблизительно на 0,1 выше, чем зафиксированный

засева объем в биореакторе XDR-200 составил 145 л, что дало примерно 10-кратное увеличение объема инокулята.

После приведения системы в равновесие 7 л культуры было перенесено из культуры биореактора XDR-200 в культуру вспомогательного биореактора ReadyToProcess WAVE 25. Объем культуры в биореакторе XDR-200 при этом составил 138 л. Окончательные объемы на момент сбора после ежедневных добавок подпитки составили примерно 200 л в реакторе XDR-200 и 10 л в ReadyToProcess WAVE 25.

Как видно по таблице 3 и рисунку 5, обе культуры продемонстрировали очень схожие графики роста с тремя отчетливыми фазами роста: начальная фаза активного роста в первые 72 часа, за которой следует фаза замедленного роста, и примерно через 144 часа – плато и стационарная фаза с последующим снижением жизнеспособности до самого момента сбора. Культуры были собраны при уровне жизнеспособности 65,3–73,0%. Обе культуры продемонстрировали схожий уровень продуктивности (рисунок 6 и таблица 3).

Таблица 3.

Результаты, полученные из биореакторных производственных культур моноклональных антител

Культура	Максимальное количество жизнеспособных клеток (10^6 клеток/мл)	Жизнеспособность сбора (%)	Концентрация собранного продукта (г/л)	Накопление клеточно-специфического продукта (пг/клетка/день)
XDR-200	23,7	65,3	5,0	27
Вспомогательный биореактор ReadyToProcess WAVE 25	22,7	73,0	4,9	28

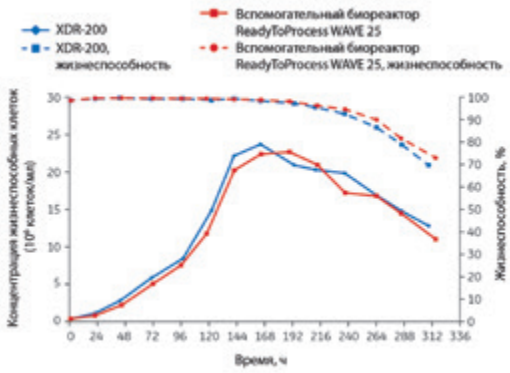


Рисунок 5. Концентрация жизнеспособных клеток и жизнеспособность параллельных производственных культур. Обе культуры показали схожие графики роста и жизнеспособности. Образцы были отобраны непосредственно перед подпиткой

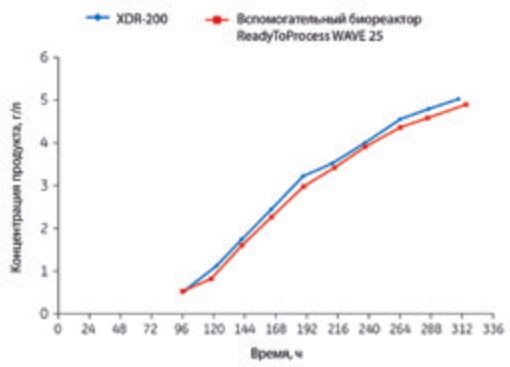


Рисунок 6. Концентрация моноклональных антител в двух параллельных производственных культурах. Образцы были отобраны непосредственно перед подпиткой

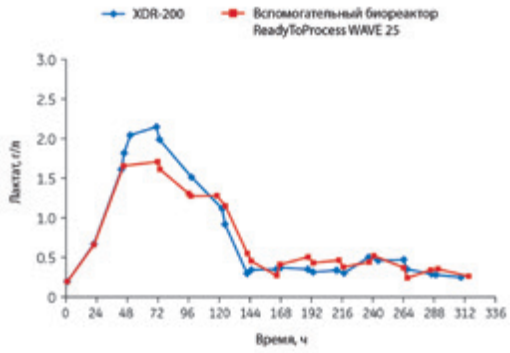


Рисунок 7. Концентрация лактата в двух параллельных производственных культурах. Образцы были отобраны непосредственно перед подпиткой и после нее

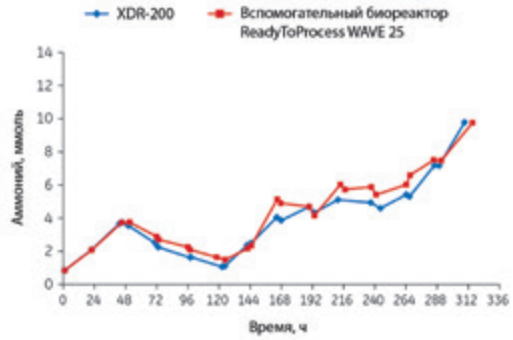


Рисунок 8. Концентрация аммония в двух параллельных производственных культурах. Образцы были отобраны непосредственно перед подпиткой и после нее

Обе культуры продемонстрировали первоначальное быстрое повышение концентрации лактата во время экспоненциальной фазы роста с последующим снижением в фазе замедленного роста. После достижения максимальной концентрации клеток и до момента сбора (рисунок 7) наблюдались постоянные низкие остаточные концентрации.

Также у обеих культур оказались схожи графики концентрации аммония (рисунок 8). После начального быстрого увеличения в первые 48 ч концентрации неуклонно снижались приблизительно до 120-го часа с начала культивирования, после чего показатели концентрации аммония вновь шли вверх до момента сбора. Разные значения выработки и потребления аммония в различные моменты времени в процессе культивирования могут быть связаны с активностью глутаминсинтетазы и меняющейся скоростью метаболизма глутамина и других аминокислот на протяжении клеточного цикла. К примеру, мы видим явное изменение метаболизма через трое суток, когда скорость выработки лактата снизилась, а глутамина – повысилась.

Этот момент наступает, когда клетки переходят от быстрого роста, сопровождающегося высоким уровнем гликолиза и большим потреблением глутамина, к замедленному росту и выделению большего количества энергии в цикле Кребса. Поскольку глутамин синтезируется из глутамата и аммония с помощью фермента глутаминсинтетазы, эти три соединения тесно связаны между собой, что также отражено на рисунках 9 и 10. Глутамат поступал в подпитках, в то время как глутамин можно было получить только в основной среде.

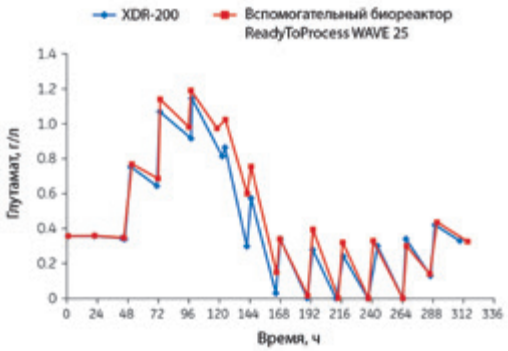


Рисунок 9. Концентрация глутамата в двух параллельных производственных культурах. Образцы были отобраны непосредственно перед подпиткой и после нее

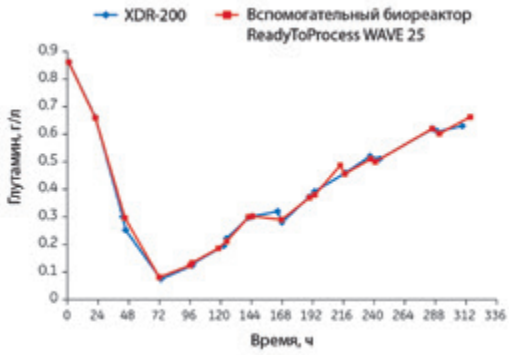


Рисунок 10. Концентрация глутамина в двух параллельных производственных культурах

Осмолярность замерялась до и после каждого добавления подпитки. Осмолярность повышалась после каждого добавления подпитки по большей части в связи с повышением концентрации аминокислот (рисунок 11). По мере расхода аминокислот осмолярность падала. Однако поскольку вместе с добавлениями подпитки и основы в культуру поступали соли, осмолярность в процессе культивирования постепенно возрастала. Помимо этого, повышению осмолярности также способствовали неизрасходованные питательные вещества.

Графики парциального давления углекислого газа (pCO_2) в культурах показаны на рисунке 12. В то время как на ранней стадии культивирования выделялся лактат, парциальное давление CO_2 снижалось для поддержания уровня pH и, напротив, повышалось, когда концентрации лактата снижались и были добавлены основные компоненты в подпитках и основе.

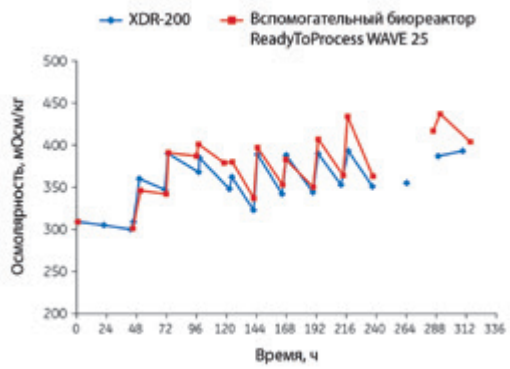


Рисунок 11. Осмолярность в двух параллельных производственных культурах. Образцы были отобраны непосредственно перед подпиткой и после нее

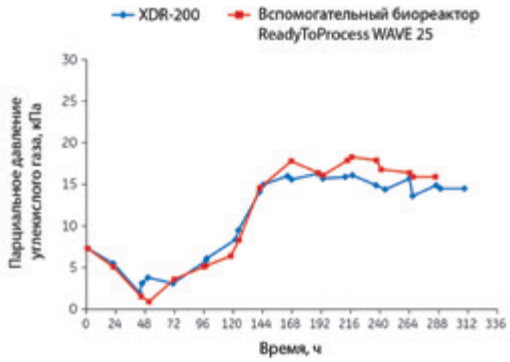


Рисунок 12. Парциальное давление углекислого газа в двух параллельных производственных культурах

Результаты исследования показывают, что система ReadyToProcess WAVE 25 может использоваться как для культивирования посевов, так и в целях разработки технологических процессов. Результаты выращивания культур в системах ReadyToProcess WAVE 25 и XDR-200 оказались сравнимыми. Культуры обоих биореакторов показали схожий уровень роста и жизнеспособности, содержания метаболитов и производительности моноклональных антител с выходом продукции в количестве 5,0 и 4,9 г/л для XDR-200 и ReadyToProcess WAVE 25 соответственно. Несмотря на отличающуюся геометрию емкости, система ReadyToProcess WAVE 25 продемонстрировала репрезентативное отображение процесса, который в больших масштабах протекал в системе XDR-200. В заключение можно сказать, что сочетание биореакторных систем ReadyToProcess WAVE 25 и Xcellerex представляет собой надежное, масштабируемое решение для производства рекомбинантных белков в объемах до 2000 л.

МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ ПРИ ИНСТИТУТЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ ПРИМЕНЯЕТ ТОЧНЫЕ ИЗМЕРИТЕЛЬНЫЕ ПРИБОРЫ ДЛЯ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материал предоставлен компанией OHAUS

Институт экспериментальной медицины, основанный в 1952 году как отделение Венгерской академии наук, считается центром неврологических исследований в Венгрии. Институт осуществляет широкое сотрудничество с фармацевтическими компаниями в столице Венгрии, Будапеште, и за рубежом. Данное сотрудничество помогает понять, как результаты исследований института могут быть применимы для разработки новых лекарств и стратегий медикаментозного лечения. Кроме того, институт выполняет функциональные, молекулярные, анатомические, электрофизиологические и фармакологические тесты лекарств для многих фармацевтических компаний.

Институт состоит из пяти исследовательских отделов, в которые входят тринадцать исследовательских групп и лабора-



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

торий. В 2003 году в институте открылось новое профильное подразделение – Медицинский центр генной инженерии (МЦГИ). В его состав вошли группы генной инженерии животных и виварий. В этом центре, оборудованном по последнему слову техники, исследователи работают с генетически модифицированными мышами. Сотрудники изучают различные болезни, чтобы разработать новые методы их лечения.

Обязательной частью ежедневной работы специалистов МЦГИ с подопытными животными является взвешивание, которое выявляет даже незначительные отклонения. Увеличение или уменьшение веса животного позволяет судить об эффективности тестируемой генной модификации или лекарственной терапии. Для точных и эффективных результатов взвешивания в МЦГИ используются весы модели OHAUS Explorer.

ТОЧНОСТЬ ИЗМЕРЕНИЯ – ОСНОВА УСПЕШНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Ученые МЦГИ чипируют всех подопытных животных, чтобы внимательно следить за состоянием здоровья каждого из них. Прежде чем взвесить животное на весах OHAUS Explorer, исследователи считывают его номер с вживленного чипа. С помощью функции прямой передачи данных, которой оснащены весы Explorer, результаты взвешивания передаются непосредственно во внутреннюю информационную систему МЦГИ для обработки.

«Функция прямой передачи данных идеальна для наших лабораторий, – говорит Ференц Эрдели, руководитель исследовательских лабораторий МЦГИ. – Для нас важно, чтобы вес каждого животного был точно измерен и зарегистрирован. Функция прямой передачи данных быстро сохраняет эту информацию в нашей системе. Бесконтактные датчики на весах Explorer позволяют передавать данные, не прикасаясь к весам. Это повышает скорость и эффективность взвешивания».

Весы с бесконтактными датчиками более долговечны и способствуют концентрации внимания исследователей на основной работе. Точность и воспроизводимость результатов взвешивания играют решающую роль, поскольку именно по весу животного определяется эффективность тестируемой генной модификации или лекарственной терапии.





На дисплей Explorer выводятся инструкции по регулировке весов по уровню, по эксплуатации и быстрой установке. Оператор видит, какой регулятор нужно повернуть, чтобы установить весы горизонтально. Точность установки по уровню контролируется с помощью яркого индикатора на передней панели. Благодаря этому исследователи не тратят время на освоение оборудования или его установку.

ТОЧНЫЕ ВЕСЫ С ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМИ ВОЗМОЖНОСТЯМИ ПОВЫШАЮТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Весы OHAUS Explorer позволяют исследователям Медицинского центра генной инженерии ежедневно контролировать вес подопытных животных. Это необходимо для оценки эффективности результатов генных модификаций и стратегий лечения. Простое программное обеспечение и быстрая установка весов повышают производительность лаборатории.

«Мы очень довольны весами OHAUS Explorer. Их дополнительные возможности повышают эффективность нашей работы, – говорит Ференц Эрдели. – Мы уже давно используем весы OHAUS в Институте экспериментальной медицины и следим за выпуском новых моделей, так как очень довольны результатами».

ЭФФЕКТИВНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ И КАЛИБРОВКА ПИПЕТОК В ЛАБОРАТОРИИ

При калибровке и проведении стандартных тестов рабочих характеристик пипеток в лаборатории необходимо сохранять единообразие процедуры при минимальных затратах времени и средств. Набор для калибровки пипеток OHAUS позволяет получать точные результаты и существенно снижает интенсивность испарения по сравнению с обычным стаканом. Набор можно легко установить на полумикровесы Explorer® для проверки калибровки дозирования пипеток.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ ЧАСТИЦ КАК МЕТОД АНАЛИЗА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Материал предоставлен компанией Anton Paar

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие наноразмерные структуры стали играть ведущую роль в передовых разработках в области фармацевтики. Терапевтические препараты, такие как антитела, гормоны, ферменты и т. д., показали высокую эффективность, а дальнейшее развитие и исследование в этой области представляет собой одно из ключевых направлений лекарственной индустрии. Важнейшим параметром для подобных структур является размер частиц, который помогает не только охарактеризовать частицу, но и оценить ее свойства и биологическую активность. Кроме того, размер частиц является параметром качества для лекарственных препаратов. При определенных условиях в препаратах могут возникать нежелательные частицы. Это может происходить из-за взаимодействия с упаковкой или нарушений на производстве. Такие нежелательные частицы, особенно во внутривенных препаратах могут приводить к очень тяжелым последствиям – тромбам, сердечным приступам и эмболии. Измерение размеров частиц на этапе контроля качества позволяет исключить подобные случаи.

Существуют различные методы определения размера частиц.

- Динамическое рассеяние света.
- Электронная микроскопия (сканирующая и просвечивающая).
- Лазерная дифракция.
- Седиментационный метод.
- Ситовой метод.
- Счетчики Культера.

Все они различаются физическими принципами, лежащими в основе метода, и диапазоном измеряемых частиц. Для со-

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

временных фармацевтических задач очень привлекательным является метод динамического рассеяния света. Данный метод позволяет определять размеры в диапазоне от 0,3 нм до 10 микрон.

Методы рассеяния света обладают принципиальными преимуществами перед другими методами измерения размеров частиц

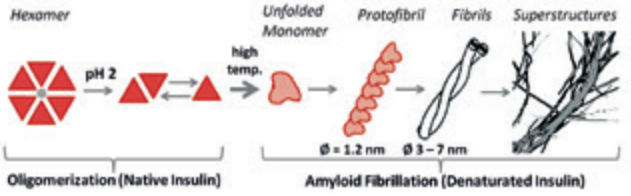
- Возможность анализа без изменения структуры образца и специальной пробоподготовки.
- Большая статистическая надежность.
- Экспресс-метод.
- Отличное соотношение параметров разрешение / стоимость анализатора.
- Высокая автоматизация процесса, низкая потребность в обслуживающем персонале.

Спектроскопия динамического рассеяния света позволяет производить измерение размеров частиц при рекордно малых концентрациях – до ppt, при этом минимальный объем пробы составляет всего несколько микролитров. Соответствующая предельная чувствительность составляет несколько десятых миллиграмма для некоторых типов образцов.

Суть метода состоит в анализе изменения интенсивности рассеянного на образце света. Молекулы исследуемого вещества находятся в хаотичном броуновском движении. Вследствие этого интенсивность не постоянна, а представляет собой динамически меняющуюся картину, которая описывается с помощью автокорреляционных функций. С другой стороны, автокорреляционную функцию можно представить экспоненциально, где обратное время корреляции зависит от коэффициента диффузии. Коэффициент диффузии, в свою очередь, позволяет найти гидродинамический радиус частиц, используя уравнение Стокса – Эйнштейна. Гидродинамический радиус является конечной величиной, характеризующей размер частиц.

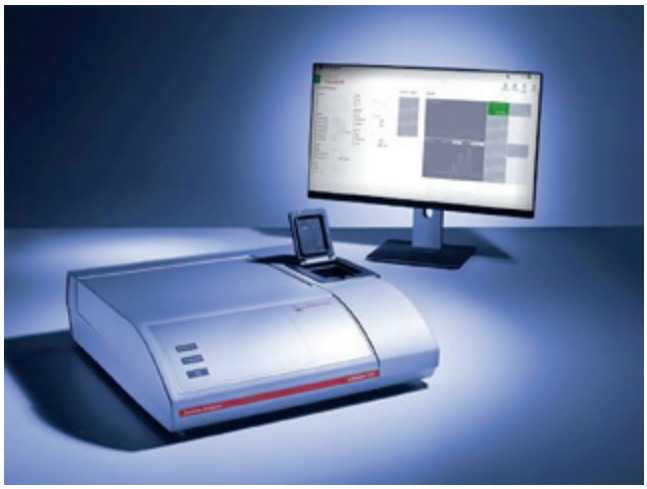
ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной статье мы рассмотрим процесс агрегации инсулина и покажем, что с помощью измерения размера частиц можно довольно точно исследовать этот феномен. Инсулин – это пептидный гормон, использующийся при лечении сахарного диабета. Он секретируется как мономер, но может соединяться и в димеры при низком pH. В нейтральной кислотной среде эти димеры формируют гексамер, который представляет собой наиболее стабильную форму белка. Однако инсулиновые рецепторы реагируют только на мономерную форму. Поэтому препараты с мономерно-димерной формой действуют быстро, но короткий промежуток времени. Для длительного эффекта используются стабилизированные цинком гексамерные препараты, которые некоторое время диссоциируют до усваиваемой формы.



Кроме того, при определенных условиях и температуре инсулин может денатурировать и формировать нити, которые собираются в крупные фибриллы. Фибриляция в отличие от огломерациии, которая была описана выше, это необратимый процесс, ведущий к потере биологической активности белка. Соответственно, в зависимости от наблюдаемого размера частиц можно говорить о конкретной стадии процесса. Наблюдение маленьких частиц порядка 1-5 нм говорит нам о различных структурных формах белка. Увеличение размеров указывает на образование фибрилл.

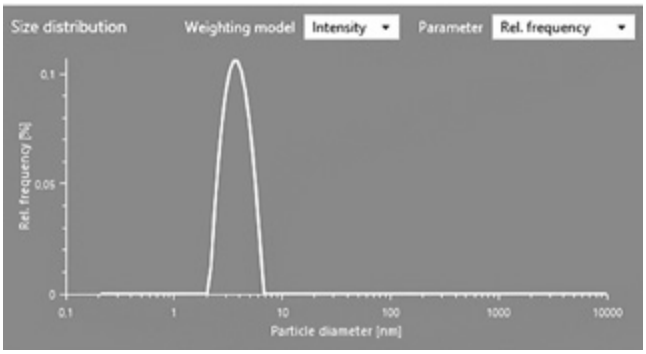
Измерения проводились на анализаторе частиц Litesizer 500 компании Anton Paar, который позволяет измерять размер частиц, молекулярную массу и дзета-потенциал диспергированных образцов.



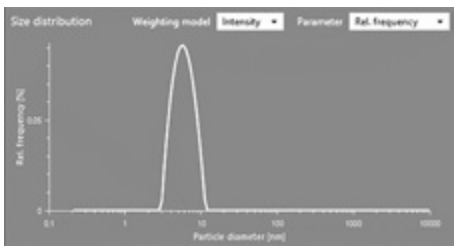
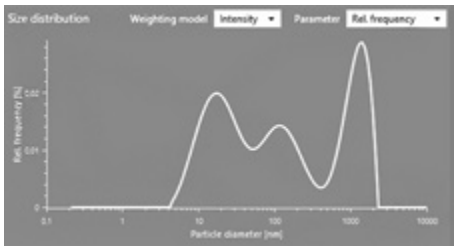
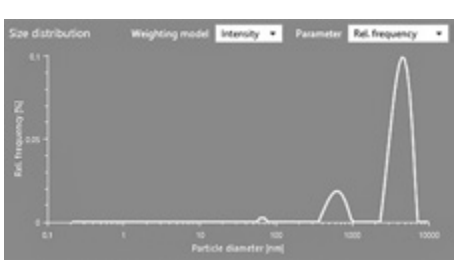
ИЗМЕРЕНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Инсулин был растворен в стерильном буферном растворе NaCl (0,9%, PH 2,0), измерения размера частиц проводились при 25 °C 3 раза. После чего для исследования температурной эволюции белка раствор инкубировали при 80 °C в течение 5 часов. Измерения проводились каждый час при 25 °C .

При первичном измерении наблюдалось мономодальное распределение, и для размера частиц мы получили величину 3,9 нм ± 0,03 нм.



Для образцов с более длительным инкубированием видно, что основной пик смещается и появляются пики, которые соответствуют суперструктурам. Агрегация проходит в течение первых двух часов, когда первичный пик доминирует, а после третьего часа наблюдается резкое увеличение размеров наблюдаемых частиц. После 4 и 5 часа маленькие частицы (одиночные фибрилы) почти полностью исчезают, формируя суперструктуры, имеющие размер больше 4 микрон.

Динамика изменения я инсулина	
Первичное измерение	
После 3 часов	
После 5 часов	

Litesizer 500 позволяет в автоматическом режиме измерять пропускание образца. Для исследуемых нами образцов прозрачность резко снижалась после 4 часов, что являлось дополнительным фактором, подтверждающим образование крупных агломератов.

Время, час	Коэффициент пропускания %
0	89
1	89
2	88
3	88
4	41
6	45

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной статье мы показали, что рассеяние света является быстрым, точным и надежным методом количественного мониторинга состояния сложных белковых соединений (в нашем случае инсулина) в растворе. Был измерен с высокой точностью размер частиц и исследована эволюция углеродной структуры во времени при нагревании.

Проведенные исследования еще раз подтверждают, что метод динамического рассеяния света является крайне точным и надежным инструментом при контроле качества и исследовательской разработке новых лекарственных препаратов.

Anton Paar

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

ОБЕСПЕЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ВОЗДУХА НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЯХ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

АВТОР

Е.Н. Кобзев,

ООО «НПФ Поток Интер»

ВВЕДЕНИЕ

Воздух является важной производственной средой фармацевтических предприятий.

С одной стороны, воздух – это среда, позволяющая микроорганизмам, частицам и другим загрязнителям быстро распространяться и проникать в самые труднодоступные места через малейшие щели и технологические отверстия. Поэтому аэрозольный путь распространения микроорганизмов является одним из самых опасных и трудноконтролируемых. С этой точки зрения воздух – источник загрязнения.

С другой стороны, воздух – это среда, позволяющая снизить и поддерживать на низком, контролируемом уровне концентрацию микроорганизмов и загрязнителей в помещении. В этом плане без чистой воздушной среды невозможно создать чистые зоны в производственных помещениях.

Грань между этими двумя состояниями воздуха достаточно тонкая и определяется прежде всего концентрацией микроорганизмов и загрязнителей в воздухе.

В современном понимании воздух является динамичной средой, концентрация микроорганизмов и загрязнителей в которой определяется балансом факторов, повышающих концентрацию загрязнителей (источники загрязнений) и факторов, снижающих их концентрацию.

К источникам загрязнений относят:

– Персонал (микроорганизмы и частицы попадают в воздух в процессе дыхания и при аэрозолировании с поверхности кожи персонала).

– «Внешний» воздух (недостаточно очищенный воздух может поступать в помещения по системе приточно-вытяжной вентиляции).

– «Внутренний» воздух (при несоблюдении некоторых требований загрязнённый воздух может попадать из смежных помещений через двери, трещины в панелях, шлюзы и т.д.)

– Поверхности (аэрозолирование микроорганизмов и частиц с поверхности пола, стен, оборудования, одежды и т.д.).

– Сырьё/продукт (аэрозолирование порошкообразных и жидких субстанций в ходе технологического процесса).

Для снижения концентрации загрязнителей в воздухе используют комплексные подходы:

- Превентивные меры (недопущение появления в чистой зоне источников загрязнений, а если это невозможно, то снижение мощности подобных источников).
- Изолирующие технологии (объект или процесс изолируют от окружающей среды, например в герметичном боксе, при этом отсутствует свободный переток воздуха из смежных помещений в изолятор и в обратном направлении).

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

- Метод перепада давления (в более чистой зоне за счёт регулирования приточно-вытяжной вентиляции создают повышенное (на 10–15 Па) давление по сравнению со смежными помещениями, что препятствует свободному перетоку воздуха из более грязных смежных помещений).
- Метод разбавления (концентрация микроорганизмов и частиц в воздухе снижается за счёт подачи в помещение более чистого воздуха и смешивания его с воздухом помещения).
- Метод вытесняющего потока (за счёт однонаправленного потока чистого воздуха, который вытесняет загрязнённый воздух, создаётся локальная чистая зона).

Последние три метода из списка можно отнести к активным методам снижения концентрации загрязнителей в воздухе, поскольку они используют подачу в помещение очищенного воздуха. Соответственно, качество воздуха в помещении, где применяются данные методы, будет определяться именно чистотой подаваемого воздуха. Однако требования к чистоте подаваемого воздуха в нормативной документации отсутствуют. Поэтому приходится ориентироваться на требования к воздуху в помещении (таблица 1).

Таблица 1.

Классификация помещений производства лекарственных средств ОСТ 42-510-98 [1]

Класс чистоты помещений или зон	Максимально допустимое количество частиц в 1 м³ воздуха размером, мкм				Макс. допустимое кол. жизнеспособных микроорганизмов в 1 м³ воздуха
	≥ 0,5	≥ 5	≥ 0,5	≥ 5	
	Оснащенное состояние		Функционирующее состояние		
A	3500	0	3500	0	Менее 1
B	3500	0	350000	2000	10
C	350000	2000	3500000	20000	100
D	500000	20000	Не определено		200–500

Поскольку в ходе работ воздух в помещении будет контаминироваться микроорганизмами и частицами из имеющихся в нём источников, подавать в помещение необходимо значительно более чистый воздух.

Необходимо отметить, что описанные выше подходы для обеспечения контролируемого уровня концентрации загрязнителей в воздухе были в своё время разработаны и апробированы в области микромеханики и микроэлектроники. После некоторой адаптации этот комплекс решений стал широко использоваться в фармацевтической промышленности. В частности, практически неизменными остались общие подходы – понимание проблемы, необходимость выявления и оценки рисков, необходимость контроля и снижения концентрации загрязнителей.

В фармацевтической промышленности используются близкие по сути и содержанию нормативные документы, а также технические решения (фильтрация воздуха высокоэффективными фильтрами – HEPA-фильтрами). В то же время, как видно из таблицы 1, в ходе адаптации подходов по очистке воздуха в нормативные документы для фармацевтической промышленности была добавлена группа специфичных загрязнителей – микроорганизмы.

Но вместе с комплексом решений фармацевтике достались и недостатки этих решений: необходимость учёта концентрации частиц в ходе контроля качества воздуха, а также недостатки технологии фильтрации с использованием HEPA-фильтров.

Необходимость учёта концентрации частиц в воздухе особо чистых зон предприятий микромеханики и микроэлектроники связана с тем, что даже единичные частицы могут значительно повлиять на качество производимой продукции. В фармацевтической промышленности ситуация несколько другая: контроль концентрации микроорганизмов в воздухе гораздо важнее, чем контроль концентрации частиц (которые, по сути, стерильны). Конечно, частицы могут содержать аллергены, пирогены и токсины, но концентрация этих групп загрязнителей не нормируется современной нормативной базой и не требует контроля. Конечно, контроль концентрации частиц можно осуществлять в режиме реального времени в отличие от контроля концентрации микроорганизмов, но корреляции между частицами и микроорганизмами практически никогда не бывает, поэтому знание концентрации частиц никак не помогает в понимании обсеменённости воздуха.

Оценка концентрации микроорганизмов в воздухе и внедрение в практику методов её измерения – относительно новый тренд, который начали внедрять с 90-х годов. В европейских нормативных актах, касающихся медицины, до сих пор встречаются и те и другие подходы: в немецких стандартах рекомендуется оценивать концентрацию частиц в особо чистых помещениях медучреждений, в шведских – концентрацию микроорганизмов.

Что касается недостатков HEPA-технологии, то, поскольку метод высокоэффективной фильтрации воздуха используется уже десятки лет, его недостатки широко известны:

- HEPA-технология направлена не на уничтожение микроорганизмов, а только на ограничение их поступления в помещение. HEPA-фильтры только задерживают частицы и микроорганизмы в порах фильтрующего материала и накапливают их в процессе эксплуатации. В результате количество микроорганизмов растет, и они быстро становятся источником повышенной микробиологической опасности.
- HEPA-фильтры имеют значительное сопротивление (от 200 Па), что приводит к необходимости использования мощных вентиляторов и, как

следствие, влечёт значительные затраты электроэнергии в ходе эксплуатации.

- Важным недостатком HEPA-технологии является необходимость частой замены фильтров и технического обслуживания элементов установок.
- HEPA-фильтры должны обеспечивать эффективность фильтрации до 99,99% и более, но в реальных условиях эффективность может значительно снижаться под воздействием различных факторов (влажности воздуха, свойств аэрозольных частиц, герметичности уплотнений и пр.). Эффективность HEPA-фильтров может уменьшиться после остановки систем вентиляции, при этом повторное включение системы вентиляции может привести к залповым выбросам микроорганизмов.

Необходимо понимать, что приточно-вытяжная вентиляция на фармацевтических предприятиях является как важной составляющей системы функционирования чистых помещений, так и одной из самых дорогостоящих в эксплуатации систем. И это связано не только с необходимостью частой смены фильтров.

Для поддержания низкой концентрации частиц и микроорганизмов в чистых помещениях требуется использовать огромные количества воздуха. Для поддержания рекомендуемой скорости движения однонаправленного (ламинарного) потока воздуха (0,36–0,54 м/с ГОСТ Р 52249-2009 [2]) даже в небольшом помещении требуется несколько тысяч $м^3$/ч очищенного воздуха. Совокупный расход воздуха с учётом производственных помещений (класса чистоты A-D), а также воздушных шлюзов и вспомогательных помещений может составлять сотни тысяч $м^3$/ч и выше даже на самых небольших предприятиях. Для обеспечения таких расходов требуется, как уже упоминалось выше, использование мощных вентиляторов и значительный расход электроэнергии. Кроме того, в ходе эксплуатации HEPA-фильтры постепенно забиваются, их сопротивление растёт, поэтому для поддержания необходимой скорости движения воздуха в помещении необходима система автоматического плавного увеличения производительности вентиляторов (для компенсации растущего сопротивления), что ещё больше увеличивает расходы электроэнергии.

Кроме того, значительные средства уходят на предварительную подготовку воздуха перед окончательной высокоэффективной очисткой: воздух необходимо предварительно подвергнуть грубой и тонкой очистке (от основной массы пыли и частиц), нагреть/охладить, осушить/увлажнить (в зависимости от сезона и особенностей технологического процесса). «Отработанный» воздух, как правило, затем выбрасывается «в трубу», хотя экономически более целесообразно было бы использовать системы рекуперации и рециркуляции. На наш взгляд, грамотно спроектированные рециркуляционные контуры позволят значительно снизить расход на эксплуатацию системы вентиляции: ведь воздух «на выходе» из чистого помещения по качеству близок к тому воздуху, который подаётся на фильтры окончательной высокоэффективной очистки.

Таким образом, в ходе эксплуатации систем очистки воздуха на основе технологии фильтрации необходимо обращать внимание на описанные выше особенности HEPA-фильтров.

Однако технологии не стоят на месте – современные тенденции развития технологии очистки воздуха в медицине, биотехнологии и пищевой промышленности направлены в сторону предотвращения накопления на фильтрах биомассы жизнеспособных микроорганизмов. Это прежде всего технологии на основе различных видов так называемой активной фильтрации [3], когда задержанные HEPA-фильтром микроорганизмы инактивируются (убиваются) воздействием физических (ультрафиолетовое излучение) или химических (озон, «холодная плазма», фотокатализ) факторов. Однако, несмотря на все достоинства, технологии активной фильтрации имеют большинство недостатков, унаследованных от классической HEPA-технологии.

Пожалуй, единственной современной технологией очистки и обеззараживания воздуха, не использующей HEPA-фильтры и соответственно их недостатки, является технология «Поток», действие которой основано на использовании постоянных электрических полей чередующейся полярности. Данный метод является уникальным и не имеет мировых аналогов.

На первом этапе в зоне инактивации осуществляется комбинированное многократное воздействие на микроорганизмы постоянными электрическими полями. Это приводит к необратимому повреждению структур микробных клеток. На втором этапе в зоне фильтрации происходит улавливание частичек разрушенных микроорганизмов на высокопористых наноэлектродах.

Таким образом, исключается накопление живых микроорганизмов на фильтрующей части и обеспечивается более высокая и надежная микробиологическая чистота и безопасность обработанного воздуха.

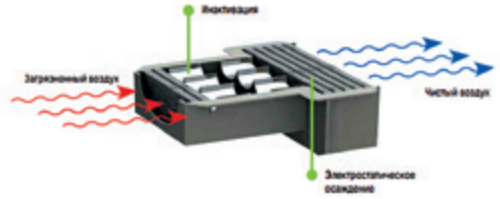


Рисунок 1. Принцип работы технологии «Поток»

Технология позволяет уничтожать любые микроорганизмы, находящиеся в воздушной среде, с эффективностью 99,995%. Вряд ли можно найти более надежное подтверждение ее действенности, чем то, что именно данная технология была выбрана для использования в космосе: сначала на орбитальной космической станции «Мир», а затем и на Международной космической станции (в российском и американском сегментах).

Наряду с высоким уровнем биобезопасности данный метод позволяет упростить техническое обслуживание систем обеззараживания и существенно сократить эксплуатационные расходы. Оборудование не требует расходных материалов во время эксплуатации и специальной утилизации по завершении срока эксплуатации.

Оборудованием оснащены более 2500 помещений медицинских учреждений (Главный военный клинический госпиталь им. Бурденко, Городская клиническая больница им. С.П. Боткина, Городская клиническая больница № 1 им. Н.И. Пирогова и др.). С 1998 года на предприятии «ДиаКлон», специализирующемся на разработке, производстве и реализации стерильных медицинских изделий и инструментария одноразового применения для гинекологии и хирургии, используются установки «Поток» для обеспечения санитарно-гигиенических условий при производстве изделий медицинского назначения.

Успешно проведены микробиологические исследования установок «Поток» в авторитетных российских и зарубежных институтах: Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Россия), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (Россия), ЦНИИ туберкулеза РАМН (Россия), Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Россия), Институт Пастера (Франция), Гранадский университет (Испания), Гарвардская школа общественного здравоохранения (США) и др.

Из последних исследований особого внимания заслуживает успешное испытание установок «Поток» в помещениях НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, где, по словам профессора, заместителя директора по научной



Рисунок 2. Результаты клинико-эпидемиологических исследований в Главном военном клиническом госпитале им. Н.Н. Бурденко



Рисунок 3. Результаты клинико-эпидемиологических исследований в ГКБ им. С.П. Боткина и ГКБ №1 им. Н.И. Пирогова

и лечебной части Г.Л. Менткевича, «дети перестали умирать».

В апреле 2017 года Университет прикладных наук Восточной Баварии (Ostbayerische Technische Hochschule Amberg-Weiden) проводил исследование эффективности оборудования в операционных России и Германии. При моделировании 2-часовой операции с операционной бригадой из семи человек установки обеззараживания воздуха «Поток» позволили поддерживать бактериальную обсемененность воздуха в ходе всей операции на уровне 5 КОЕ/м^3, что соответствует требованиям европейских нормативов и в 100 раз ниже российских требований. Тем самым еще раз подтверждено соответствие технологии «Поток» ГОСТ 52539-2006. «Чистота воздуха в лечебных учреждениях» [4] и СанПиН 2.3.2630-10 [5]. Также доказано, что технология «Поток» соответствует шведскому стандарту SIS-TS 39: 2015 [6]), руководству GMP EC [7] и может использоваться вместо HEPA-технологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. ОСТ 42-510-98. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) / Минздрав РФ.
2. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств.
3. А.В. Наголкин, Е.В. Володина, В.Г. Акимкин, А.П. Борисоглебская, А.С. Сафатов, Современный подход к обеззараживанию воздуха – метод инактивации микроорганизмов // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика 6 (79) 2014. С. 68–73.
4. ГОСТ Р 52539-2006. Чистота воздуха в лечебных учреждениях. Общие требования.
5. СанПиН 2.1.3.2630-10. Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность.
6. Standard Swedish standard SIS-TS 39: 2015.
7. Правила производства лекарственных средств GMP европейского сообщества (GMP EC).

МЕТОДЫ И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РАДИОФАРМАЦЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

АВТОР

Я.А. Обручникова,

ООО «Фармконтракт»,
менеджер по продукту, к.х.н.

ВВЕДЕНИЕ

Ядерная медицина – современное направление медицины, использующее радионуклиды и свойство атомных ядер подвергаться радиоактивному распаду для диагностики и терапии различных заболеваний.

Вещества, в состав которых с диагностической или терапевтической целью введен радионуклид, называют радионуклидными фармацевтическими препаратами (РФП). Одной из основных стадий производства РФП является контроль их качества, осуществляемый в соответствии с принципами надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice, GMP) и нормативными документами [1–5]. Нормативным документом, регулирующим качество продукции в РФ, является Государственная фармакопея РФ.

Все РФП можно подразделить на две группы: препараты для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), как правило нарабатывающиеся непосредственно на месте последующего использования, и препараты для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), представляющие собой РФП-наборы на основе лиофилизатов и, например, генераторного элюата, изготавливаемых из стерильных сертифицированных компонентов [6, 7]. Для ПЭТ-препаратов применяются позитрон-излучающие изотопы (^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{18}F и др.), а для ОФЭКТ – гамма-эммитеры (^{99m}Tc, ^{111}In, ^{123}I, ^{188}Re и др.) [8].

Контроль качества включает в себя отбор проб, проведение испытаний и проверок на соответствие требованиям спецификаций, документальное оформление и выдачу разрешений на выпуск. Для получения достоверных результатов контроля качества методики анализа должны быть валидированы, а оборудование квалифицировано.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПЭТ- И ОФЭКТ-ПРЕПАРАТОВ

При производстве РФП применяют различные методы контроля: физические (определение радионуклидной чистоты, объемной и удельной активности), химические (установление радиохимической и химической чистоты) и биологические (определение pH, осмоляльности, стерильности, апирогенности).

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Контроль качества ПЭТ-препаратов осуществляется с помощью всех вышеперечисленных видов анализа. Для РФП-наборов достаточно проверки радиохимической чистоты с помощью тонкослойной хроматографии и измерения активности.

Для обеспечения контроля качества РФП аналитическая лаборатория в ПЭТ-отделениях должна быть оснащена следующими приборами:

- Газовый хроматограф.
- Высокоэффективный жидкостной хроматограф (ВЭЖХ) с проточным детектором радиоактивности.
- Сканер для тонкослойной радиохроматографии.
- Многоканальный гамма-спектрометр.
- Калибратор активности радионуклидов (дозкалибратор).
- Прибор для определения бактериальных эндотоксинов.
- Осмометр.
- pH-метр.

Химическая чистота препарата определяется наличием в нем посторонних, немеченых химических веществ, например органических продуктов разложения основного вещества, примесей тяжелых металлов и т.д. Для контроля химической чистоты, в частности для определения содержания остаточных растворителей в препарате, необходимо проводить газохроматографический анализ. Пример оптимального прибора приведен на рисунке 1. При введении образца с помощью автосамплера в отличие от ручного введения на хроматограмме не выявляются ошибочные пики.



Рисунок 1. Газовый хроматограф Agilent 6850 Series II с автосамплером производства Agilent Technologies, США

Реальная хроматограмма, полученная в ходе контроля качества 18F-фтордезоксиглюкозы (18F-ФДГ) с использованием газового хроматографа Agilent 6850, представлена на рисунке 2. Химически чистым считается препарат, концентрация основного компонента в котором превышает 99%.

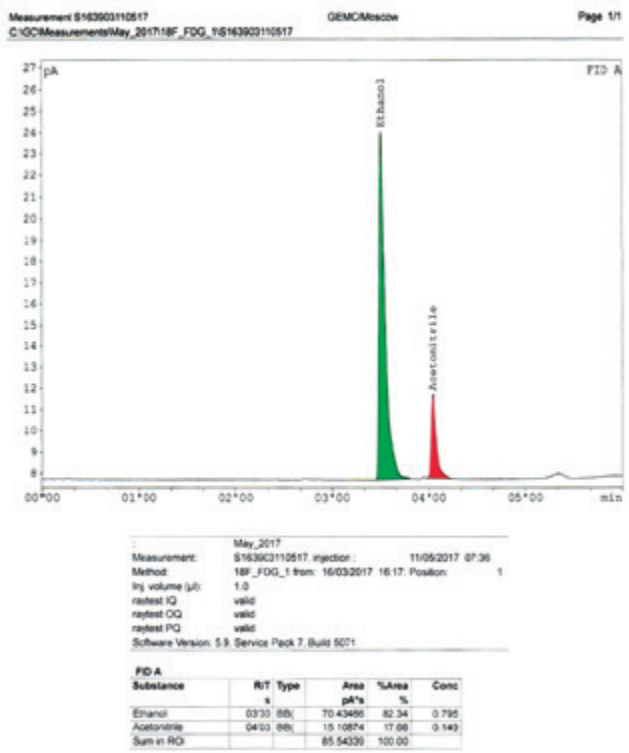


Рисунок 2. Отчёт, генерируемый программным обеспечением GINA Star производства Elysia-raytest, Германия, для газовых хроматографов, на примере анализа качества препарата 18F-ФДГ

Радиохимическая чистота – доля радионуклида, находящегося в РФП в необходимой химической форме. Контроль количества радиохимических примесей необходим ввиду того, что их распределение в организме пациента отличается от распределения диагностического РФП и приводит к увеличению фона. Для проверки радиохимической чистоты необходимо использование ВЭЖХ-системы, а также сканера для тонкослойной радиохроматографии (ТСХ) [9].

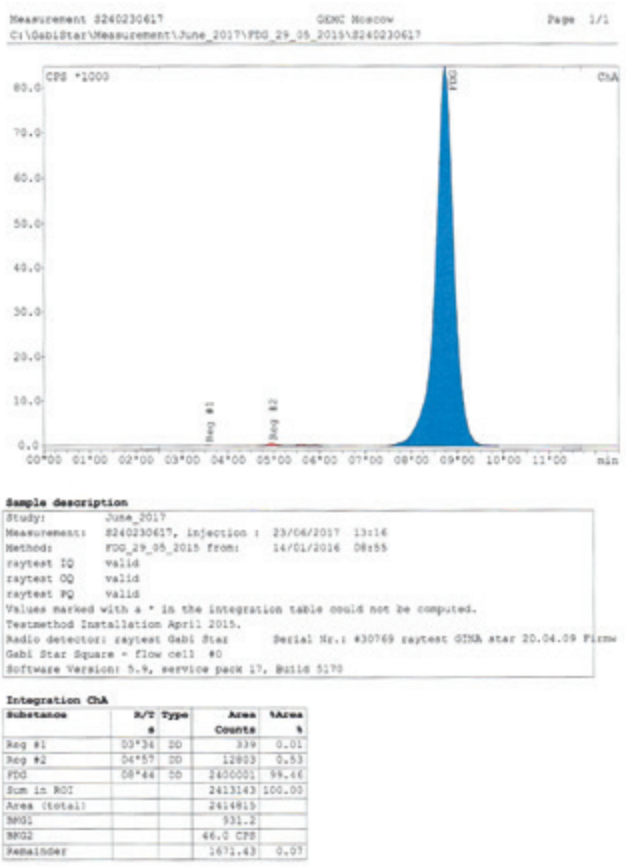
ВЭЖХ является «золотым стандартом» среди методов контроля качества РФП. Его характеризует высокая точность, относительно небольшое время анализа и возможность полной автоматизации за счет использования дистанционно управляемого оборудования [10].

ВЭЖХ-хроматограф должен быть оснащен определенным аналитическим детектором в зависимости от типа исследуемого РФП и проточным детектором радиоактивности (рисунок 3). Так, например, для 18F-ФДГ необходим рефрактометрический или амперометрический детектор, для 18F-холина – кондуктометрический, для 18F-ДОПА – диодно-матричный и т.д.

Результаты регистрации излучения проточным детектором GABI Star, полученные в ходе контроля качества 18F-ФДГ с использованием ВЭЖХ-хроматографа Agilent 1260 Series II, представлены на рисунке 4. Как правило, радиохимическая чистота препарата должна быть не менее 95%. По площади пиков хроматограммы



Рисунок 3. **ВЭЖХ-хроматограф Agilent 1260 Series II производства Agilent Technologies, США (слева), и проточный детектор радиоактивности GABI Star производства Elysia-raytest GmbH, Германия (справа)**



Measurement S240230617 GEMC Moscow Page 1/1
C:\GabiStar\Measurement\June_2017\FDG_29_05_2015\S240230617

Sample description

Study:	June_2017
Measurement:	S240230617, injection : 23/06/2017 13:16
Method:	FDG_29_05_2015 from: 14/01/2016 08:55
raytest IQ	valid
raytest OQ	valid
raytest PQ	valid

Values marked with a * in the integration table could not be computed.
Testmethod Installation April 2015.
Radio detector: raytest Gabi Star Serial Nr.: #30769 raytest GINA star 20.04.09 Firmw
Gabi Star Square - flow cell #0
Software Version: 5.9, service pack 17, Build 5170

Integration ChA

Substance	R/T s	Type	Area Counts	%Area %
Reg #1	03*36	DD	339	0.01
Reg #2	04*57	DD	12803	0.53
FDG	08*44	DD	2400051	99.46
Sum in ROI			2413143	100.00
Area (total)			2414815	
BKG1			931.2	
BKG2			46.0 CPS	
Remainder			1671.43	0.07

Рисунок 4. **Отчёт, генерируемый программным обеспечением GINA Star производства Elysia-raytest, Германия, для ВЭЖХ-хроматографов с проточным детектором радиоактивности GABI Star, на примере анализа качества препарата 18F-ФДГ**

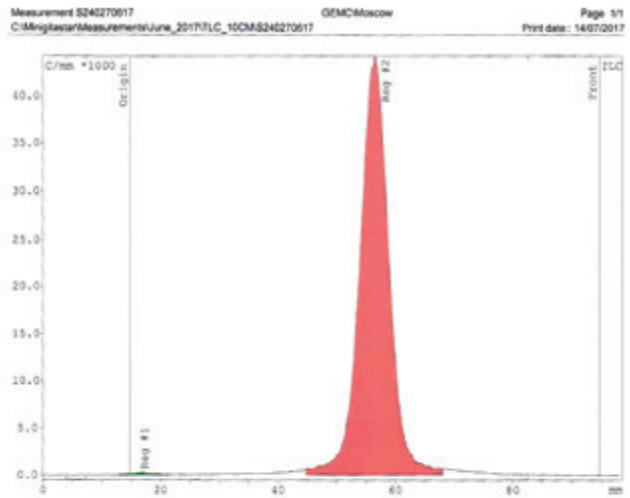
можно определеить концентрации веществ с использованием калибровочных кривых. Каждый остаточный растворитель идентифицируется по времени задержки и по концентрации.

ТСХ-сканер радиохроматограмм (рисунок 5) должен обладать достаточной чувствительностью и пространственным разрешением для поставленных целей по разделению и количественному определению.



Рисунок 5. **Сканер для тонкослойной радиохроматографии miniGITA Star производства Elysia-raytest GmbH, Германия**

На рисунке 6 представлена радиохроматограмма полученного препарата 18ФФДГ, в соответствии с которой радиохимическая чистота препарата составляет 99,62%.



Measurement S240270617 GEMC Moscow Page 1/1
C:\Mingitastar\Measurements\June_2017\TLC_10CM\S240270617 Print date: 14/07/2017

Sample description

Study:	June_2017		
Measurement:	S240270617, started:		27/06/2017 07:38
Method:	TLC_10CM from:	28/12/2015 09:34	
Origin:	15 mm	Front:	95 mm
Meas. time:	0:05:01	Resolution:	0.33 mm
High voltage:	675.0 V		

Testmethode from installation 13.04.2015
Software Version: 5.9, service pack 5, Build 5124

Integration TLC

Substance	R/F	%Total %	Type	Area Counts	%Area %
Reg #1	0.025	0.38	DD(	984.6	0.38
Reg #2	0.523	97.76	DD(	256486.7	99.62
Sum in ROI				257471.3	100.00
Total area				262371.6	
Area (total) RF				259934.9	
BKG1				18.79	
BKG2				136.64	
Remainder (Tot)				4900.35	1.87

Рисунок 6. **Отчёт, генерируемый программным обеспечением GINA Star для ТСХ-сканера miniGITA Star производства Elysia-raytest, Германия, на примере анализа качества препарата 18F-ФДГ**

Каждому радионуклиду и ядерному изомеру присущи свои индивидуальные характеристики, такие как период полураспада $\tau_{1/2}$ и спектры излучений. Форму и количественные характеристики каждого спектра,

а также значение периода полураспада $\tau_{1/2}$ используют для идентификации радионуклида. Радионуклидная чистота – доля общей активности препарата, обусловленная необходимым радионуклидом, в общей активности пробы. Нецелевые изотопы возникают из-за протекания побочных ядерных реакций в мишени и наличия примесей в ней.

Гамма-спектрометр используют для идентификации радионуклидов по энергии и интенсивности гамма-квантов и рентгеновских лучей. На рисунке 7 приведен 1024-канальный гамма-спектрометр MUCHA Nova со сцинтиляционным детектором, выполненным из кристалла йодида натрия, активированного таллием NaI(Tl) – гидроскопичного вещества с огромным световыходом.



Рисунок 7. Многоканальный гамма-спектрометр MUCHA Nova производства Elysia-raytest GmbH, Германия

Рисунок 8 отображает спектр изотопа фтора-18, полученный с помощью приведенного выше гамма-спектрометра. Радионуклидная чистота качественного препарата превышает 99%.

Для идентификации радионуклида за счет определения периода его полураспада и измерения активности препарата необходим дозкалибратор (рисунок 9).

Для проверки биологической и физиологической совместимости необходимо определять осмоляльность препарата, количество бактериальных эндотоксинов и pH. Возможные приборы для решения этих задач представлены на рисунках 10, 11 и 12 соответственно.

Осмометр необходим для определения осмоляльности препарата. Вводимый РФП должен быть изотоничным плазме крови.

Проведение ЛАЛ-теста (LAL – limulus amebocyte lysate) необходимо для определения содержания бактериальных эндотоксинов. Для этого анализа необходимы специальные ЛАЛ-реактивы, представляющие собой водные экстракты (лизатом) амебоциты, содержащие все компоненты, необходимые для реакции с эндотоксинами. Если в результате реакции происходит образование твердого геля или помутнение смеси, это свидетельствует о присутствии эндотоксина в образце. В прибор, приведенный на рисунке 11, встроен спектрофотометр, проводящий измерения при длине волны 395 нм.

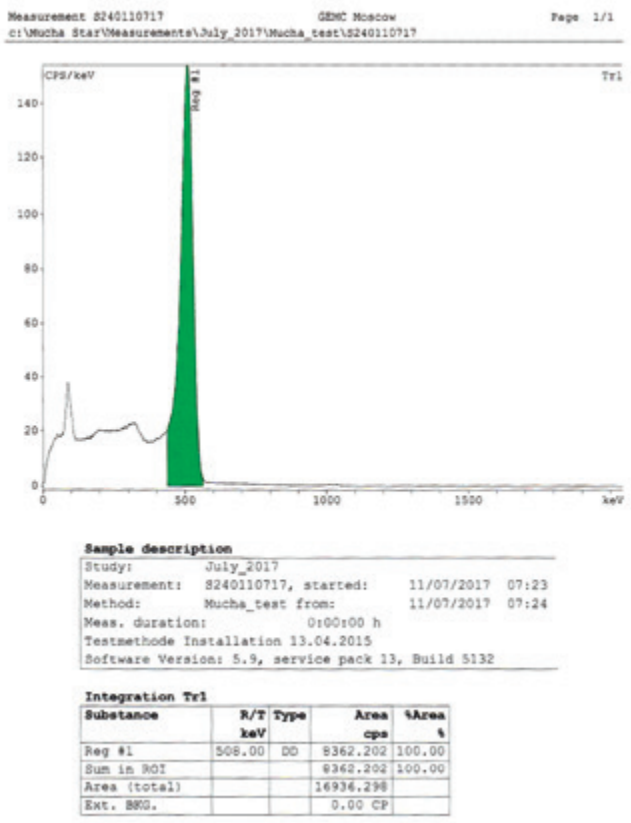


Рисунок 8. Отчёт, генерируемый программным обеспечением GINA Star для гамма-спектрометра MUCHA Star производства Elysia-raytest, Германия, на примере анализа качества препарата 18F-ФДГ



Рисунок 9. Дозкалибратор ISOMED 2010 производства MED Nuklear-Medizintechnik Dresden, Германия



Рисунок 10. **Криоскопический осмометр K7400S производства Knauer, Германия**



Рисунок 11. **Прибор для определения бактериальных эндотоксинов Endosafe PTS-nexgen производства Charles River Endosafe, США**



Рисунок 12. **pH-метр S220 производства Mettler Toledo, Швейцария**

Приемлемый диапазон значений pH раствора для 18F-ФДГ составляет 4,5–8,5.

Среди необходимых биологических надо отметить контроль стерильности РФП путем проверки целостности стерилизующего мембранного фильтра с диаметром пор 0,22 мкм после окончания процесса фильтрации готового продукта.

Некоторые методики химического анализа РФП являются более продолжительными, чем время жизни входящего в его состав радионуклида. Допускается проводить эти испытания после выпуска продукции или на серию препарата, синтезированную за определенное время.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для обеспечения безопасного производства радиофармацевтических средств организации должны следовать требованиям нормативных документов. Выпуск готового лекарственного препарата напрямую зависит от результатов аналитического контроля. Контролю подвергается не только конечный продукт, но и исходные реактивы и компоненты, параметры оборудования, а также качество воздуха.

Для обеспечения контроля качества готовых радиофармпрепаратов необходимы соответствующие методики и комплекс аналитического оборудования для проверки химической, радиохимической, радионуклидной чистоты, а также биологических параметров.

Хроматограммы и спектры, полученные при контроле качества препарата 18F-ФДГ, предоставлены Европейским медицинским центром г. Москва.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ Минпромторга РФ от 14 июня 2013 г. № 916 «Об утверждении правил надлежащей производственной практики».
2. Государственная фармакопея Российской Федерации, XII изд., часть 1. – М.: НЦЭСМП, 2008. 704 с.
3. European Pharmacopoeia 8.2 (2014). P. 3975–3959.
4. Monographs: Radiopharmaceutical preparation, Fludeoxyglucose [18F] injection // British Pharmacopoeia 2000. – London: British Pharmacopoeia Commission, 2000.
5. Fludeoxyglucose F 18 injection // The United States Pharmacopoeia, 25th ed, and The National Formulary, 20th ed. – Rockvile, MD: United States Pharmacopeia Convention Inc; 2002. PP. 752–753.
6. А.В. Хмелев. Позитронная эмиссионная томография: физико-технические аспекты. – М.: Тровант, 2016. 336 с.
7. G.B. Saha. Basics of PET Imaging, Physics, Chemistry and Regulations. 2-nd ed. – New York: Springer Publishing, 2010. P. 241.
8. Д.В. Сомов и др. Особенности стандартизации радиофармацевтических препаратов // Фармация. 2012. № 3. С. 49–52.
9. Cyclotron produced radionuclides: guidance on facility design and production of [18F]Fluorodeoxyglucose (FDG). International atomic energy agency. 2012. P. 172.
10. Ю. Бёккер. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. – Litres, 2017.

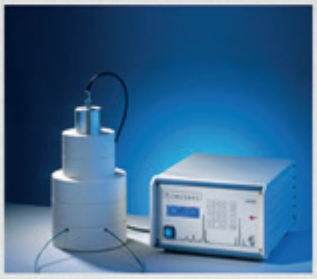
raytest

АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ **Elysia-Raytest** ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ

Бельгийская компания Elysia–Raytest представляет для лабораторий контроля качества радиофармпрепаратов ПЭТ–центров варианты решения таких исследовательских задач, как проверка радиохимической и радионуклидной чистоты РФП:

Детектор гамма-радиоактивности GABI Star, интегрируемый в ВЭЖХ-систему, для проверки радиохимической чистоты





- 2 канала одновременного счёта с 2-мя задаваемыми порогами энергии
- считает количество радиационных событий в энергетическом канале в выбранном интервале времени
- детектирует до 600 000 импульсов в секунду

ПО GINA Star контролирует систему ВЭЖХ в целом, что позволяет проводить контроль качества РФП в соотвествии с требованиями GMP и GLP

Проточный ВЭЖХ-детектор бета-радиоактивности RAMONA Star для проверки радиохимической чистоты

- детектирование низко- и высокоэнергетического бета-, гамма- и черенковского излучения
- фотоэлектронные умножители с фотокатодом 2”-ого диаметра гарантируют высокую чувствительность и низкий уровень фона







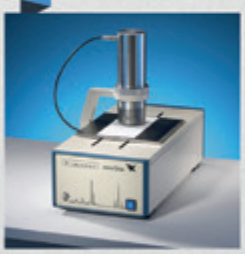




RAMONA Star может быть укомплектована различными ячейками:

- ***трубчатой*** для определения бета-минус нуклидов (3H с наибольшей чувствительностью) и регистрации черенковского излучения. Для прокачки жидкого сцинтиллятора RAMONA Star дополнительно оснащается насосом
- ***ячейка с внутренним твердым сцинтиллятором*** для детектирования низкоэнергетических бета-излучателей (14C)
- ***ячейки с внешними твердыми сцинтилляторами*** для высокоэнергетических бета и гамма-эмиттеров

Сканер для тонкослойной хроматографии miniGITA Star для подтверждения радиохимической чистоты



miniGITA Star - сканирующее устройство, в котором столик для образцов перемещается относительно детектора радиоактивности:

- автоматическая коррекция на радиоактивный распад изотопа за период сканирования
- повторяющаяся непрерывная регистрация радиоактивного сигнала вдоль одного следа от линии старта до линии фронта и в обратном направлении

Многоканальный гамма-спектрометр MUCHA Star для проверки радионуклидной чистоты радиофармпрепаратов



- определение присутствия нуклидов в пробах, взятых из окружающей среды: воды, отходов или продуктах питания
- автоматическая калибровка по энергии с помощью калибровочного источника ^{137}Cs

ГК «Фармконтракт» - эксклюзивный дистрибьютор бельгийской компании Elysia-Raytest

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

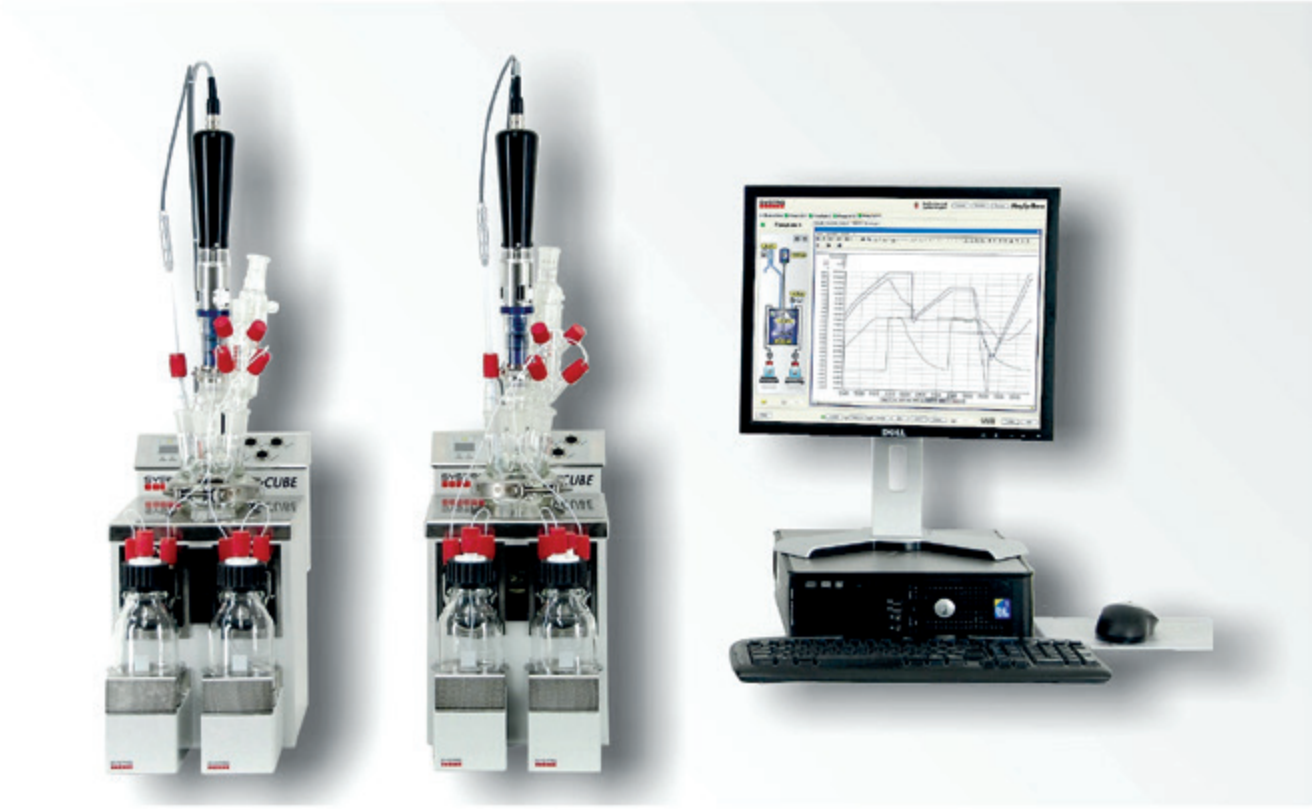
info@phct-group.com

ЭФФЕКТИВНАЯ РАЗРАБОТКА ПРОЦЕССА СИНТЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИМЕРА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАСТАБИЛЬНОЙ ЗОНЫ

Материал предоставлен компанией SYSTAG

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день невозможно представить себе проведение процессов исследования и разработки без таких ключевых понятий, как «планирование качества» (QbD), «планирование экспериментов» (DoE) или «диапазоны установленных параметров» (EPR). Эффективный процесс разработки синтеза в сочетании с полной регистрацией и отслеживанием данных приобретает все большее значение в повседневной работе лаборатории. Компания SYSTAG предлагает концептуальные и прикладные решения с целью автоматизации лабораторий для оптимизации процессов, которые обеспечивают полное соответствие комплексным требованиям.



ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

МЕТАСТАБИЛЬНАЯ ЗОНА

На сегодняшний день эффективное проведение процессов исследований и разработок является важным этапом как для разработчиков так для и производителей АФИ (API). Новые продукты / операции как можно быстрее должны быть готовы для внедрения на рынки. Отделы разработок ограничены в ресурсах, а весь доступный персонал, как правило, полностью занят исполнением текущих обязанностей. Зачастую для разработки серьезного процесса выделяется ограниченное количество времени или финансирование безопасности разработки процесса является урезанным. В то же время на сотрудников ложится значительная работа на ранних стадиях разработки процессов и учета данных. Это приводит к росту числа процессов, не отработанных в полной мере на этапе R&D, что, в свою очередь, ведёт к увеличению количества проблем при внедрении технологий на производстве. Например, увеличивается время простоя и возникает необходимость применения дорогостоящих и времязатратных мер по устранению всех возникших проблем.

Для успешного противодействия данному явлению необходимо использовать концептуальные системы автоматизации лабораторных процессов, которые обеспечивают максимальную эффективность работы химиков на ранних стадиях разработок. С одной стороны, такие решения позволяют упростить проведение рутинных процессов, таких как дозирование реагентов, температурный контроль, оптимизация перемешивания, которые выполняются автоматическим лабораторным реактором без участия исследователя. В то же время сложные связи параметров процесса фиксируются на самых ранних стадиях разработки благодаря последовательной записи и графической/табличной визуализации данных. Все это позволяет обеспечить экономию кадровых ресурсов, которые, в свою очередь, могут быть использованы для выполнения более важных исследовательских задач.



Рисунок 1. FlexyCUBE – система для параллельного синтеза

На рисунке ниже продемонстрировано использование системы FlexyCUBE для разработки параллельных процессов на примере определения метастабильной зоны (MSZ) смеси растворителей продукта.

ЦЕЛЬ

Основной целью использования данных систем является успешное повышение эффективности проведения R&D при разработке технологии, а также в операциях EPR. Для определения и интерпретации метастабильных зон смеси растворителей и продукта необходимы воспроизводимые, единичные, независимые, зарегистрированные серии испытаний.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАСТАБИЛЬНОЙ ЗОНЫ (MSZ) СМЕСИ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ПРОДУКТА

При протекании процессов кристаллизации знание метастабильных зон является чрезвычайно важным для успешной отработки и масштабирования процесса. Если метастабильная зона находится в диапазоне высоких концентраций продукта, то увеличивается вероятность возникновения спонтанной кристаллизации, что приводит к потерям продукта.

Для подбора оптимального режима необходимо проведение серий циклов нагрева и охлаждения в разных температурных диапазонах при различных концентрациях. Прецизионность циклических иссле-



Рисунок 2. Интерфейс пользователя

дований диапазонов температур наряду с точностью дозирования продукта и растворителей играют решающую роль в получении объективных данных.

Обеспечение прецизионности концентраций и высокоточного температурного контроля в параллельных реакторах Systag совмещено с непрерывным контролем точки растворимости и кристаллизации, которая определяется при помощи онлайн-методов анализа (измерение мутности, измерение размеров образующихся частиц кристаллизата). Таким образом, снимается необходимость постоянного отбора проб, что приводит к упрощению процедуры и повышению эффективности.

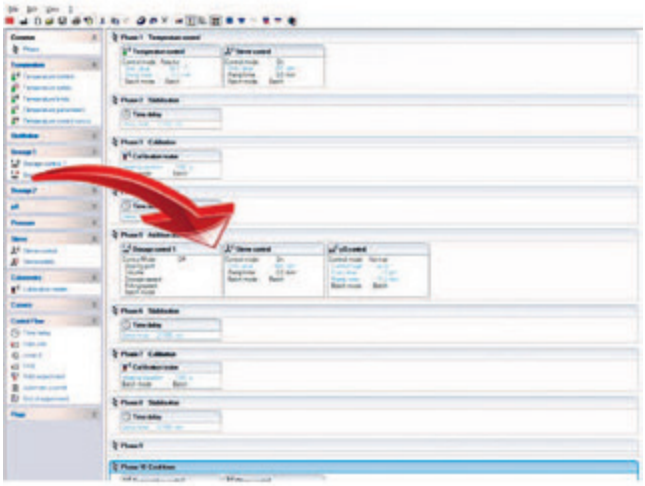


Рисунок 3. **Редактор рецептур Drag&Drop (перетаскивание сохранённой последовательности в редактируемую программу)**

Благодаря интегрированной, интуитивно понятной системе редактирования рецептур (программу можно менять вводом значений с ПК, перетаскивая заданную последовательность дозирования в создаваемую рецептуру) пользователь легко может создавать запрограммированные процедуры для многократных исследований при определенных температурных профилях. Заданные программы дозирования позволяют автоматизировать контроль управления процессами и осуществлять полную воспроизводимость концентрации растворов при изменении профилей нагрева/охлаждения даже в отсутствие лабораторного персонала. Измерения мутности помогают определить точку начала кристаллизации в зависимости от концентрации продукта и текущей температуры продукта.

На основании полученных данных формируются два графика, которые описывают метастабильную зону смеси растворителей продукта. На графике (рисунок 4) отчетливо наблюдается то, что граница метастабильной зоны легко достигается в процессе дистилляции путем изменения концентрации.

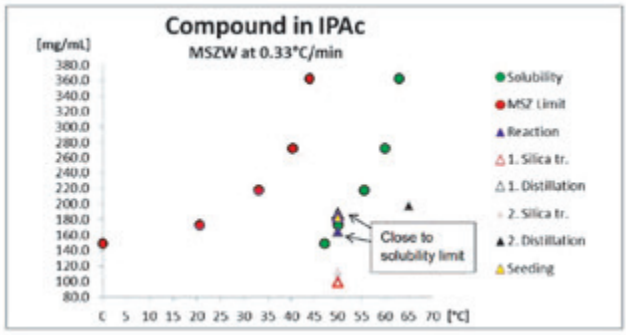


Рисунок 4. **Оригинальная процедура**

В рассматриваемом примере скорректированной процедуры (рисунок 5) видно, что при появлении риска возникновения спонтанной кристаллизации при понижении концентрации была выполнена корректировка.

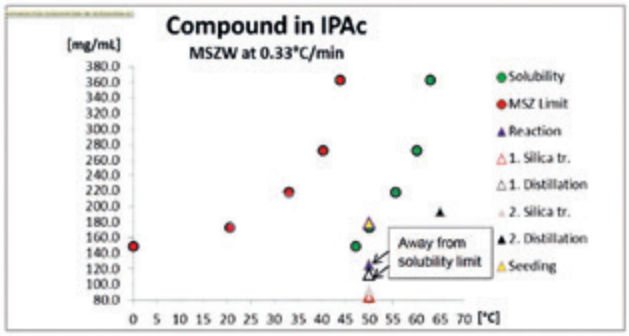


Рисунок 5. **Оптимизированная процедура**

ОБОРУДОВАНИЕ

Для определения метастабильной зоны использовалась система FlexyCUBE с двумя реакторами (объем реакционного сосуда 250 мл). Система параллельных реакторов может быть расширена до 6 аппаратов различных объемов (70, 100, 250, 400 мл). Реактор надёжен и прост в эксплуатации, конструкция позволяет быстро произвести очистку для проведения последующих процессов.

Каждый реактор оснащен двумя устройствами гравиметрического дозирования. Устройство дозирования может быть запрограммировано с привязкой к температуре процесса. Две линии дозирования позволяют использовать систему для решения различных задач, в том числе при дозировании суспензий и предварительно термостатированных растворов. Каскадная конструкция в этих случаях позволяет дозировать жидкости из одного реактора в другой. Система может быть дополнена модулем контроля pH с возможностью подачи одного или двух буферных растворов.

Эффективное перемешивание раствора достигается благодаря использованию мешалки с приводом, позволяющей устанавливать сменные валы и перемешивающие элементы. Уплотнение вала обеспечивает полную герметичность, что позволяет проводить процессы под вакуумом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение исследований метастабильной зоны при помощи 2 реакторов FlexyCUBE объемом 250 мл и 400 мл было удобным и эффективным. Используемый датчик мутности (Solvias/Trb8300) позволяет осуществлять сбор данных в онлайн-режиме. При этом полученные данные отображаются на том же графике, что и значения температуры и концентрации, значительно упрощая их анализ и интерпретацию. Потребовалось проведение трёх испытаний для получения требуемых данных (приблизительное время проведения каждого испытания составляло около 24 ч). Создание рецептур при помощи ПО FlexySys при этом потребовало не более 30 мин. При создании обеспечивалась очень хорошая воспроизводимость результатов. Концептуальное решение для автоматизации лабораторных задач с интегрированной системой безопасности и индивидуальным управлением аварийными сигналами позволяло круглосуточно работать в автономном режиме без надзора со стороны оператора.

При проведении обычного испытания без использования системы FlexyCUBE выполнение данной операции было бы значительно более затратной процедурой, а анализ и оценка данных были бы во много раз более сложными. В дополнение к этому необходимо было бы постоянное присутствие персонала лаборатории для выполнения ручной дозировки и регистрации данных. Распознавание корреляции между температурой, концентрацией и мутностью без последовательной автоматизации лабораторий и сбора данных также было бы ограничено. Получение эквивалентных и значимых результатов без использования системы FlexyCUBE потребовало бы в два раза больше времени (конкретно для данного примера). Кроме того, оценка данных на основе автоматически сформированных отчётов обеспечила простоту и высокую скорость выполнения данной задачи.

Комбинирование систем лабораторной автоматизации и онлайн-систем аналитики демонстрирует явные преимущества и значительно повышает эффективность работы лаборатории, особенно когда речь идет о трудоемких задачах, без учета фактора безопасности. С автоматическими реакторами, такими как FlexyCUBE, параллельные эксперименты могут быть воспроизведены с высокой точностью за счёт отсутствия «человеческого фактора». Применение данного решения гарантированно приводит к улучшению результатов исследований и позволяет экономить время, что, в свою очередь, минимизирует финансовые затраты.

Рабочие станции для осуществления параллельного синтеза при проведении исследований и разработок FlexyCUBE

Компания SYSTAG разрабатывает системы для проведения химических исследований, разработки и оптимизации процессов, а также их последующего масштабирования. Компания предлагает системы FlexyCUBE и FlexyPAT, которые помогают значительно упростить проведение исследований и обеспечить эффективную оптимизацию производства продуктов тонкого синтеза и активных фармацевтических ингредиентов (API) в ходе процесса химического синтеза. Модульные и интегрированные системы для автоматизации используются для небольших объемов (миллилитры) и мелкосерийного производства. Рабочая станция FlexyCUBE (объёмы реакторов 0,5–10 л) позволяет эффективно отрабатывать процессы в условиях R&D, а также производить быструю наработку опытных партий продукта высокого качества и проводить углубленный анализ рисков на будущем производстве. Компания SYSTAG использует стандартизированные решения для снижения уровня затрат, начиная со стадий ранней разработки для обеспечения высокого уровеня воспроизводимости, а также предоставления информативного анализа при помощи интегрированной функции регистрации данных.



SYSTAG
automatically better

РАЗРАБОТКА ПРОЦЕССА ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СИНТЕЗА И ЕГО МАСШТАБИРОВАНИЕ

Материал предоставлен компанией SYSTAG





ВВЕДЕНИЕ

В данной статье рассматривается пример масштабирования процесса в условиях фармацевтического производства с сохранением химико-технологических показателей и воспроизводимости результатов. Масштабирование процесса проводилось в объёмах от 70 мл до 25 л.

Вопросы масштабирования являются насущной проблемой для лабораторий и производств в различных отраслях. Как известно, при увеличении объёмов загрузки зачастую ухудшается воспроизводимость результатов, а также параметры химико-технологического процесса.

Возможность применения интегрированных систем автоматизации как для небольших лабораторных реакторов, так и для наработки опытных партий продукта, используя единую платформу, позволяет существенно облегчить процесс масштабирования.

Платформа FlexyConcept от SYSTAG позволяет осуществлять контроль за всеми ключевыми показателями процесса. При этом все данные могут быть отображены в графической или табличной форме. Сравнение показателей на диаграммах позволяет наблюдать и анализировать изменения в протекании реакции, происходящие при переходе от малых объёмов к большим, и приводить результаты в соответствие, варьируя показатели процесса.

FLEXYCONCEPT ОТ SYSTAG

Представленная комплектация даёт пользователю возможность управлять одновременно тремя различными реакторными системами (FlexyCUBE 70 мл, FlexyPAT 2 л и ChemReactor 25л) на одном и том же ПК при помощи ПО FlexySys.

Управление процессом осуществляется с ПК оператора в режиме реального времени или по заранее заданной программе. SCADA-система FlexySys отличается простотой эксплуатации за счёт наглядности (HMI-интерфейс) и не требует длительного обучения, что даёт возможность эксплуатировать её как профессиональным химикам-технологам, так и исследователям в лаборатории.

Ещё одним важным преимуществом систем автоматизации SYSTAG является максимальный уровень безопасности, обеспечиваемый многоуровневой и продуманной системой установки аварийных значений параметров.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Благодаря возможности проводить исследования, разработку технологии и масштабирование процессов в рамках единой платформы химик может реализовать весь цикл синтеза и масштабирования процесса за максимально короткое время.

Наличие единой базы данных с результатами исследований позволяет проводить детальный анализ влияния масштабирования на ход процесса, используя лишь один ПК без дополнительных пересчётов и применения дополнительного ПО.

Всё это позволяет в кратчайшие сроки с максимальным удобством перенести отдельные этапы или целые методики из лаборатории на производство.

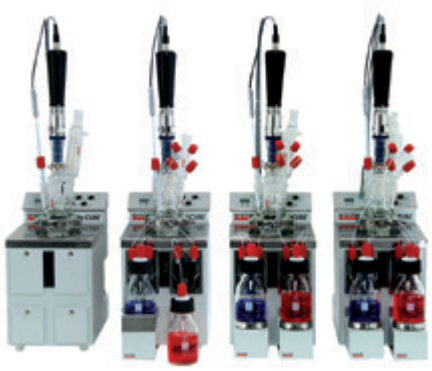


Рисунок 1. **FlexyCUBE – система для параллельного синтеза**



Рисунок 2. **Интерфейс пользователя**

ОТРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА

FLEXYCUBE-2

Реакторная система из 2 (максимум 6) реакторов

Технические характеристики:

- Размер: 70 мл и 250 мл.
- Материал: стекло или нержавеющая сталь.
- Диапазон температур: –80…+280 °C.

Автоматизация:

- 2 параллельных канала загрузки жидкостей.
- Контроль скорости мешалки – 50–700 об/мин.
- Режим контроля температуры Труб. / Тр.м.
- Измерение и контроль pH.

Преимущества:

- Высокая эффективность исследовательской работы благодаря использованию двух и более реакторов.
- Воспроизводимость полученных результатов благодаря автоматической системе контроля параметров.



Рисунок 3. **Параллельная станция FlexyLab с 2 реакторами**

ХОД ЭКСПЕРИМЕНТА

Для исследования и разработки процесса применяются две системы FlexyCUBE (система для параллельного синтеза) с различными объемами реакторов, от 70 мл до 400 мл. Благодаря простоте работы и многофункциональности данные системы могут использоваться на самых ранних этапах разработки. Полностью автоматизированная система управления позволяет записывать данные, полученные даже при проведении небольших испытаний, которые в дальнейшем могут быть использованы для последующего масштабирования.

Система может быть использована для разработки дизайна эксперимента (DoE). Высокая воспроизводимость и автоматический сбор ключевых данных

позволяют получать масимально достоверные результаты экспериментов. Это в конечном итоге приводит к меньшему количеству экспериментов и, как следствие, к экономии времени и материальных ресурсов.

Интегрированные онлайн- и оффлайн-система анализа позволяют легко сравнивать различные эксперименты, проведенные в 70 мл реакторе, для подбора оптимальных условий и последующего масштабирования.

Максимальная точность дозирования обеспечивается применением гравиметрического дозирования (дозирование жидкостей по показаниям датчиков веса). Объем доз может быть запрограммирован или установлен в режиме реального времени с ПК. Точный контроль температуры в рубашке и реакционной массе позволяет оценивать влияние интенсивности обогрева на ход процесса. Система может быть опционально оснащена модулем измерения pH или системой контроля pH путем дозирования буферных растворов.



Рисунок 4. **Тенденция наложения**

МАСШТАБИРОВАНИЕ (ФАКТОР 20)

Для первого шага масштабирования применяется стеклянный реактор с тройной рубашкой FlexyPAT-1.

Технические характеристики реактора:

- Объем: 2000 мл.
- Материал: боросиликатное стекло.
- Диапазон температур: –60…+250 °C.

Функции автоматизации:

- 2 параллельных канала дозирования жидкостей.
- Контроль скорости мешалки – 10–200 об/мин.
- Режим контроля температуры Труб. / Тр.м.
- Измерение и контроль pH.
- Измерение/контроль давления и вакуума.
- Контролируемая подача инертного газа.



Рисунок 5. **Автоматизированный лабораторный реактор FlexyPAT**

ХОД ЭКСПЕРИМЕНТА

После оптимизации параметров эксперимента при помощи системы FlexyCUBE можно переходить к масштабированию процесса.

Помимо химии реакции, внимание должно быть сосредоточено на физических аспектах процесса.

При протекании таких процессов, как разделение фаз в ходе жидкостной экстракции или выпадение осадка кристаллизата, имеет смысл укомплектовать установку дополнительными системами онлайн-анализа, такими как FTIR или анализаторы размера частиц, что обеспечивает возможность получения необходимых данных.

При проведении стандартного испытания без использования системы FlexyPAT выполнение операции будет более трудоемким, а анализ полученных дан-

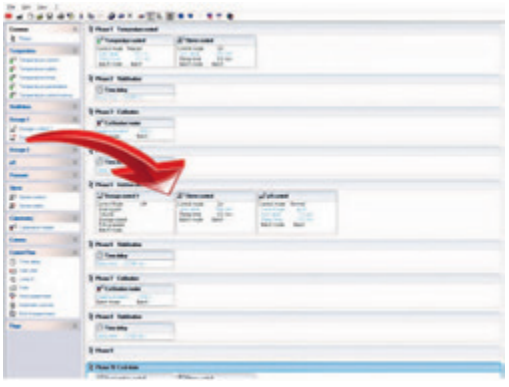


Рисунок 6. **Редактор рецептов (система перетаскивания)**

ных будет во много раз сложнее. Усилия персонала лаборатории будут сосредоточены на выполнении дозирования, отборе проб, наблюдении за ходом процесса, а также записи и обработке полученных данных. Распознавание корреляции между температурой, концентрацией, скоростью подачи продукта и значением pH без последовательной автоматизации лабораторий и сбора данных также требует значительных усилий.

KILO-LAB

АВТОМАТИЧЕСКИЙ РЕАКТОР BUCHI CHEMREACTOR

Технические характеристики:

- Общий объем: 25 л.
- Рабочий объем: 15 л.
- Диапазон Тр.м.: –100/+200 °C.
- Диапазон Труб: –200/+200 °C.
- Материал исполнения сосуда: хастеллой C22.
- Крышка, обвязка: боросиликатное стекло 3.3.
- Диапазон давления: –1/+0.5 бар.
- Взрывозащищенное исполнение.

Автоматизация:

- 2 параллельных канала загрузки продукта.
- Контроль скорости мешалки: макс. 200 об/мин.
- Режим контроля температуры Труб / Тр.м.
- Измерение и контроль pH.



Рисунок 7. **Реактор ChemReactor 25 л**

- Измерение и контроль давления, вакуума.
- Контроль подачи инертного газа.

ХОД ЭКСПЕРИМЕНТА

В нижнюю часть реактора встроены два независимых змеевика для обеспечения обогрева и охлаждения.

Такая схема позволяет производить быстрое охлаждение до низких температур с применением жидкого азота, а также обогрев с помощью циркуляционного термостата.

Управление полностью автоматизировано и не требует вмешательства оператора.

Система обеспечивает изменение температуры со скоростью до 10 K/мин.

Применение

- Дальнейшее масштабирование с фактором 10 для перехода к пилотному уровню для окончательной отработки технологии перед внедрением на производство.
- Система также может использоваться в качестве многофункциональной производственной установки для небольших объемов АФИ. Стеклянная дистилляционная обвязка позволяет производить обратную или прямую дистилляцию для удаления растворителя. После кристаллизации продукта в сосуде суспензия может быть перенесена в фильтр (производства Büchi) для выделения и промывки осадка продукта.

Преимущества

- Универсальная система управления, позволяющая перейти от лабораторного к пилотному производству.
- Универсальность для проведения различных процессов.
- Автоматический сбор и хранение данных.
- Полное соответствие требованиям cGMP/CFR 21, часть 11.

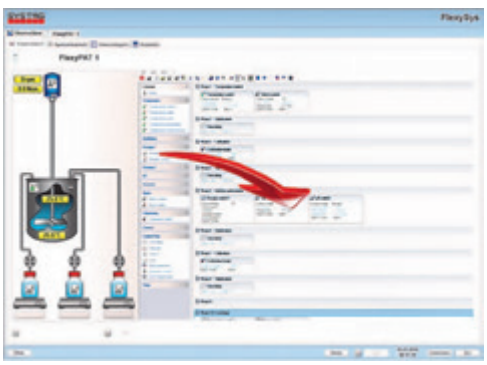


Рисунок 8. **Интерфейс пользователя**

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ В БЛИЖНЕМ ИК-ДИАПАЗОНЕ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

АВТОР

В. Шунтиков,

Руководитель направления
Metrohm АО «АВРОРА»

ВВЕДЕНИЕ

Основные полосы поглощения функциональных групп химических веществ расположены в средней области ИК-диапазона и имеют относительно высокую интенсивность. В то же время полосы поглощения гармоник и комбинации основных молекулярных колебаний находятся в ближней области ИК-диапазона (БИК). Эти полосы значительно слабее по интенсивности, а следовательно, позволяют проводить прямое измерение без какой-либо пробоподготовки, а также получать информацию о химических и физических свойствах образца. Наиболее сильное поглощение в БИК диапазоне имеют соединения с O-H-, C-H-, N-H- и S-H-связями.

БИК-спектроскопия является экспресс-методом, использующимся в фармацевтической промышленности начиная с 1960 г. [1], например для входного контроля сырья, контроля качества готовой продукции и онлайн-контроля производственных процессов. Данный метод является быстрым (<60 с), неразрушающим и не требующим пробоподготовки. Кроме того, он позволяет одновременно определять несколько параметров как химических, так и физических – количественно и качественно. Благодаря этому данный метод нашел свое применение как в лабораторном, так и промышленном онлайн-анализе [2].

Стоит отметить, что данный метод включен в фармакомпейные статьи многих стран мира (USP, Ph.Eur. и т.д.), в том числе и в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII изд. (ОФС.1.2.1.1.0001.15).

В настоящей статье описаны возможные применения данного метода на различных стадиях фармацевтических производственных процессов и контроля качества.

МЕТОД БИК-СПЕКТРОСКОПИИ

БИК-спектроскопия – это универсальный метод анализа, который используется для широкого спектра применений в процессе фармацевтического производства. Ниже будут рассмотрены некоторые примеры и преимущества метода, а также их соответствие нормативным требованиям.

Входной контроль сырья

Согласно положениям FDA CFR 211.84 и EU GMP 8, все входящие материалы должны быть протестированы с целью проверки идентичности и соответствия, в результате чего получается большое количество образцов. Компания Metrohm в том числе предлагает подходящие решения для входного контроля материалов независимо от того, анализируются они непосредственно на складе, в области взвешивания или в лаборатории контроля качества [3, 4].

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Инлайн-/онлайн-мониторинг производственных процессов

Как известно, с помощью инлайн-/онлайн-анализа можно не только повысить качество выпускаемой продукции, но и сократить издержки производства. Оптимизация производственных процессов, быстрое определение конечной точки реакции при синтезе фармацевтической субстанции – все это актуальные задачи любого производства. Кроме того, отдельные субстанции, участвующие в процессе, имеют высокую стоимость и любая ошибка при производстве влечет за собой большие издержки. Одно из преимуществ БИК-спектрометров – возможность интеграции напрямую в производственный процесс, в том числе контроль степени завершенности реакции в режиме реального времени напрямую в реакторе или на линии. Приборы могут быть интегрированы как в пилотные установки, так и в действующее производство. Одним из примеров применения служит определение остаточных содержаний растворителя и воды в порошках и гранулятах. Это наиболее актуально при анализе лиофилизированных продуктов, в которых данные показатели могут быть достоверно определены напрямую во время процесса производства [3, 5–7]

Кроме того, с использованием метода БИК-спектроскопии возможно проводить at-line- и онлайн-мониторинг промежуточных продуктов и процессов смешения и грануляции [6, 7, 9]. Таким образом, благодаря онлайн-мониторингу однородности смешения возможно оптимизировать время грануляции, определить однородность содержания твердых лекарственных форм (таблетки и капсулы) и такие характеристики, как твердость, стабильность и т.д. [10–14].

Контроль качества готовой продукции

Метод БИК применим и для анализа готовой продукции, например для определения содержания различных компонентов, включая активные фармацевтические вещества, в кремах, гелях, таблетках, капсулах и т.д. Возможности анализа достаточно обширны: это и анализ покрытия таблеток, а также отдельных компонентов во всем объеме таблетки. В данном случае используются приборы, работающие в режиме отражения и пропускания, например Metrohm NIRS XDS MasterLab. Указанный БИК-спектрометр позволяет получать точные и надежные результаты при анализе активных фармацевтических ингредиентов и наполнителей в таблетках (в том числе и в блистере) для обеспечения соответствия всем требованиям по чистоте, химическим и физическим свойствам [10–14].

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА

Для использования БИК-спектроскопии на фармацевтическом производстве программное обеспечение, инструменты и методы должны быть валидированы [1]. FDA, EMA и Фармакопея США (USP) дают

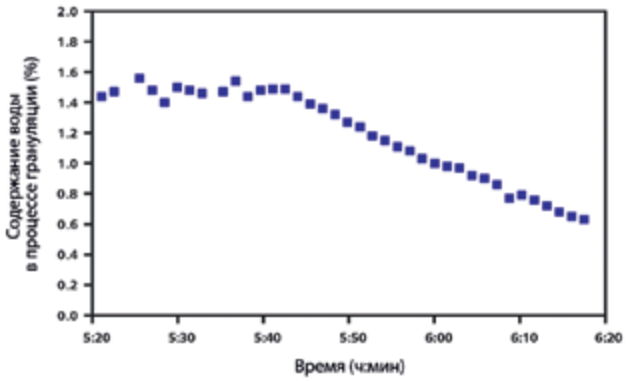


Рисунок 1. Мониторинг содержания воды в процессе грануляции

рекомендации по разработке, валидации, проверке БИК-спектрометров для обеспечения выполнения всех требований регулирующих органов. Хотя весь процесс валидации занимает длительное время и требует немалых усилий, но благодаря быстрому времени анализа и другим факторам данный срок окупается очень быстро. Кроме того, возможность мониторинга процесса в реальном времени позволяет получить высокий уровень отдачи от вложенных инвестиций.

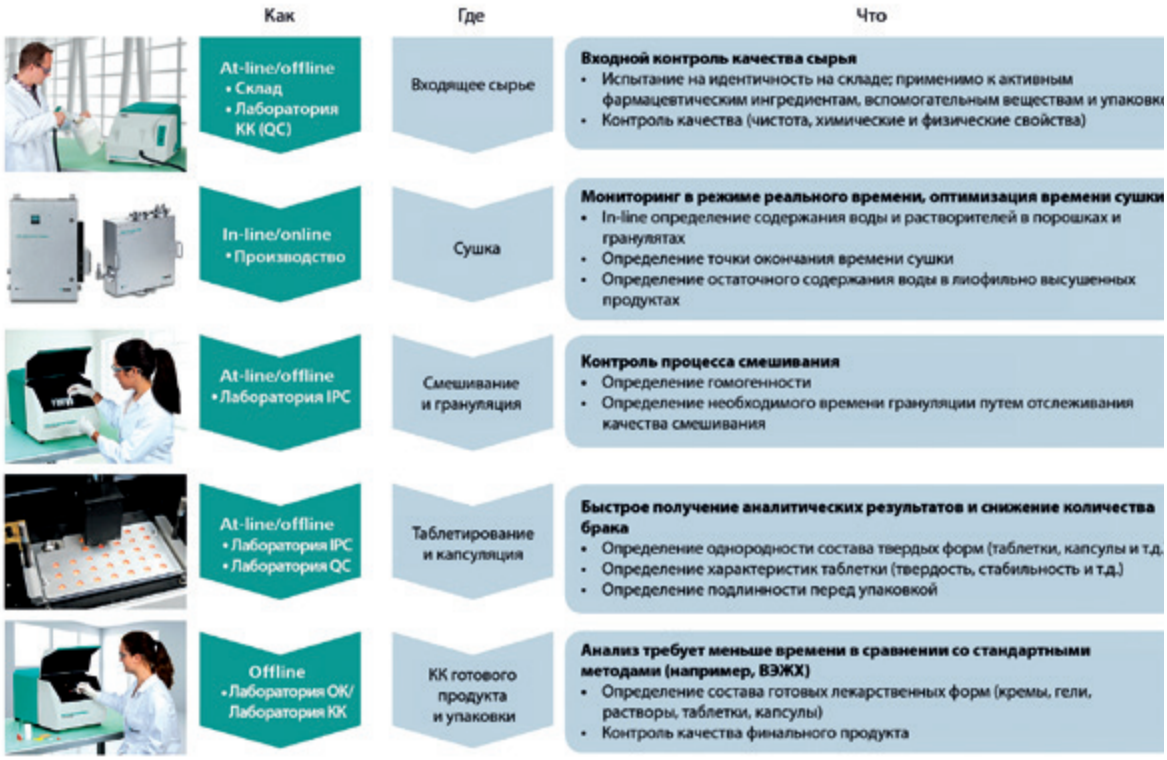
Программное обеспечение, соответствующее действующим нормам, таким как FDA 21 CFR Part 11 (электронные записи, электронные подписи) и/или EU Annex 11 EC (компьютеризированные системы), квалифицируется для использования в любой среде GMP/GLP.

В части «квалификации прибора» процесс валидации состоит из трех частей в соответствии с USP <1058> и GMP/GLP: Installation Qualification (IQ), Operational Qualification (OQ) и Performance Qualification (PQ).

IQ: Согласно USP<1119>, «требования IQ гарантируют, что оборудование и программное обеспечение установлено в соответствии с требованиями производителя и в безопасном месте» [15].

OQ: Согласно USP<1119>, «производительность прибора контролируется внешними сертифицированными стандартами для подтверждения того, что система удовлетворяет целевой спецификации. Цель OQ – обеспечение пригодности прибора для предполагаемого применения… Как и любой спектрофотометрический прибор, БИК-спектрометры должны быть квалифицированы как по длинам волн, так и по фотометрической шкале. Процедура включает и проверку шума светового потока как максимального значения, так и максимального и уменьшенного» [15].

PQ: Согласно USP <1119>, «для этих целей используются первоначальные спектры или группы спектров, включенные OQ. При таком анализе предполагается, что эталонные стандартные спектры, собранные на новом или недавно отремонтированном и правильно работающем приборе, представляют собой лучшие из



доступных. Сравнение спектров, полученных с течением времени, с идентичными эталонными стандартами позволяет оценить устойчивость измерительной системы БИК-спектрометра. Цель состоит в том, чтобы гарантировать, что во время текущего анализа не произойдет сдвиг длины волны и изменение чувствительности» [15]. Обычно PQ выполняет персонал лаборатории [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Являясь методом быстрого и неразрушающего контроля, БИК-спектроскопия находит свое применение практически на любой стадии фармацевтического производства. Стоит отметить, что одним из безусловных преимуществ метода БИК является возможность использования для мониторинга производственных процессов, включая процессы сушки, смешения и синтеза.

Дисперсные БИК-спектрометры Metrohm отличаются высоким качеством, минимальными эксплуатационными расходами и удобством использования. Кроме того, наличие в линейке как промышленных, так и лабораторных систем позволяет работать на одном программном обеспечении на всех этапах производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. E.W. Ciurczak and B. Igne. Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy // CRC Press, Boca Raton. 2015. V. 8. P. 4–6.
2. N. Broad, P. Graham, R. Hailey, A. Hardy, S. Holland, S. Hughes, D. Lee, K. Prebble, N. Salton and P. Warren. Guidelines for the Development and Validation of Near-Infrared Spectroscopic Methods in the Pharmaceutical Industry / Handbook of Vibrational Spectroscopy. – Chichester: John Wiley & Sons, 2002.
3. Применение метода БИК-спектроскопии для идентификации входного сырья и материалов / Metrohm Application Bulletin AB-410.
4. Идентификация сырья в фармацевтической промышленности / Metrohm Application Bulletin AB-410.
5. R. Mattes et al. Monitoring viable cell density in bioreactors using near-infrared spectroscpy // BioProcessing Journal. 2010. № 26(2). P. 18–21.
6. Near-infrared spectroscopy for monitoring a single-pot granulator / Application Note AN-NIR-016.
7. Мониторинг чистоты восстановленных растворителей методом БИК-спектроскопии / Metrohm Application Note AN-NIR-021.
8. Анализ остаточной влаги в лиофилизированной фармацевтической продукции / Metrohm Application Bulletin AB-358.
9. Исследование завершенности процессов смешения с использованием БИК-спектроскопии / Metrohm Application Note ANNIR- 014.
10. Неразрушающий анализ таблеток с помощью NIRS XDS RapidContent Analyzer / Metrohm Application Note AN-NIR-002.
11. Неразрушающий анализ таблеток с помощью NIRS RapidContent Analyzer / Metrohm Application Note AN-NIR-002.
12. Построение математической модели для БИК-спектрометров при анализе фармацевтических активных ингредиентов твердых лекарственных форм / Metrohm Application Note AN-NIR-017.
13. Анализ однородности содержимого таблеток методом БИК-спектроскопии / Metrohm Application Note AN-NIR-018.
14. Определение активных компонентов в твердых лекарственных формах / Metrohm Application Note AN-NIR-001.
15. <1119> Near-Infrared Spectroscopy, USP 39. 2016.

Методика проведения рутинной поверки дозирующего устройства

Почему необходимо проводить рутинную поверку?

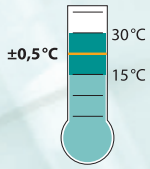
Для эффективной и корректной работы дозирующих устройств необходимо ежегодно проводить их калибровку. Помимо этого, в интервале между калибровками оборудования рекомендуется также производить рутинную поверку корректности работы дозирующих устройств, чтобы быть точно уверенными в достоверности получаемых данных. Мы разработали руководство для проведения данной процедуры.

Дозирующие устройства INTEGRA позволяют установить напоминание о необходимости проведения поверки.

1. Условия эксплуатации и материалы

Условия эксплуатации

Отсутствие сквозняков, постоянная температура между 15 °C и 30 °C, максимальное отклонение в период проведения измерений ±0,5 °C.

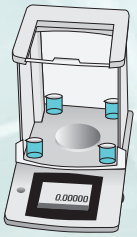


Материалы

Весы

Оборудованы специальным защитным стеклом от сквозняков и системой улавливания испарений

Дополнительные системы улавливания испарений: 4 контейнера, заполненных водой и расположенных в углах ветрозащитных стекол



Необходимое количество знаков определяется номинальным объемом вашей пипетки

Объем	*Количество знаков*
1 мкл ≤ V ≤ 10 мкл	*6 (0,001 мг)*
10 мкл < V ≤ 100 мкл	*5 (0,01 мг)*
< 100 мкл	*4 (0,1 мг)*

Контейнер для взвешивания

Предпочтительно использование металлического контейнера с целью минимизации накопления статического электричества

В качестве альтернативы можно использовать контейнер для центрифугирования объемом 1,5 мл

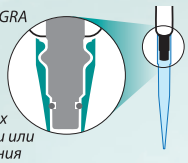
Жидкость для проведения тестирования

Дистиллированная вода

Наконечник

Для получения наилучших результатов используйте наконечники, рекомендованные производителем

Наконечники INTEGRA GripTip надежно крепятся к дозирующему устройству, что полностью исключает риск их потери, протечки или случайного спадания



2. Перед началом процедуры поверки



Поместите дозирующее устройство, наконечники и тестовую жидкость в помещение для проведения тестирования на 2 ч до начала процедуры с целью установления равновесия с условиями окружающей среды



Запишите дату, температуру и давление в помещении

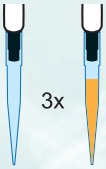
В случае, если помещение не оборудовано барометром, вы можете воспользоваться данными местной метеостанции.

При тестировании оборудования вы должны владеть техникой отбора проб. Просьба предварительно ознакомиться с руководством «Ручной отбор проб – методические рекомендации» («Handheld Pipetting – Best Practices») на официальном сайте INTEGRA

3. Проверка герметичности

Перед проведением гравиметрических измерений, пожалуйста, убедитесь, что дозирующее устройство герметично

1. Предварительно смочите наконечник(и) путем 3-х кратного отбора номинального объема
2. При отборе номинального объема необходимо использовать один и тот же наконечник(и)
3. После погружения наконечника(ов) в жидкость на 2 мм необходимо подержать дозирующее устройство вертикально в течение 30 с
4. В случае, если утечек жидкости не выявлено, можно продолжать процедуру валидации





Если уровень жидкости в пипетке уменьшается, это свидетельствует о наличии протечек

Пожалуйста, свяжитесь с производителем в данном случае

4. Гравиметрические измерения

Контейнер для взвешивания не должен быть сухим, с этой целью добавьте немного дистиллированной воды



Количество измерений

Проведите минимум по 4 измерения при 100% и 10% наполнении

Начните со 100%

В многоканальных пипетках необходимо провести валидацию первого и среднего каналов

Методика выполнения:

1. Взвесьте контейнер для измерения
2. Положите новый наконечник
3. Проведите процедуру смачивания контейнера (смотри раздел 3)
4. Слейте жидкость в контейнер для взвешивания Сливайте жидкость вдоль стенки контейнера для взвешивания
5. Занесите полученный результат в таблицу
6. Используя тот же самый наконечник, повторите шаги 4 и 5 минимум 4 раза. После съема данных скорректируйте массу контейнера для взвешивания
7. Удалите взвешенный наконечник и положите новый
8. Повторите шаги 1-7 для второго теста



Сливайте жидкость вдоль стенки контейнера

5. Анализ полученных данных

1. Переведите полученные данные (мг) в единицы объема (мкл), используя фактор Z

Данные для сравнения можно загрузить с официального сайта INTEGRA

$$V_i = m_i \times Z$$

V_i - объем в мкл
m_i - вес в мг
Z - Z-фактор

2. Рассчитайте средний объем одного исследуемого объема и одного канала

$$\overline{V} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^{n} V_i$$

$\overline{V}$ - средний объем
n - число взвешиваний

3. Рассчитайте точность (систематическую ошибку) в %:

$$e_s = \frac{100\,(\overline{V} - V_s)}{V_s}$$

e_s - систематическая ошибка в %
V_s - измеряемый объем

4. Посчитайте воспроизводимость (случайная ошибка) в %

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (V_i - \overline{V})^2}{n-1}} \qquad CV = 100\,\frac{s_r}{\overline{V}}$$

s_r - сходимость
CV - коэффициент отклонения %

Сравните рассчитанную точность и воспроизводимость со спецификацией производителя. Если полученные результаты не соответствуют указанным в спецификации, необходимо провести калибровку прибора. В противном случае можно продолжать пользоваться данным оборудованием в обычном режиме

Процедура калибровки электронных пипеток INTEGRA довольно проста. Достаточно задать целевой объем и объем, который обычно отбирается, и запустить процедуру калибровки

Pharmcontract group of companies
ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ
Тел.: +7 (495) 252-00-98 (центральный офис в Москве)
www.phct-group.com
8 (800) 333-69-11 (бесплатный звонок по России 24 часа)
E-mail: info@phct-group.com
INTEGRA
www.integra-biosciences.com

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ЭКСТРАКЦИЯ И КОНСЕРВИРОВАНИЕ

Материал предоставлен компанией Hielscher Ultrasonics

АННОТАЦИЯ

Дезинтеграция клеточных структур (лизис), проводимая с помощью ультразвука, используется для извлечения внутриклеточных соединений с целью инактивации микроорганизмов.

ВВЕДЕНИЕ

В микробиологии ультразвук в первую очередь связан с лизисом или расщеплением клеток [1].

При пропускании ультразвука высокой интенсивности через жидкие среды в них начинают происходить радикальные изменения: действие высокого давления или сжатия чередуется с действием низкого давления или разрежением. Данное воздействие на среды носит цикличный характер, а скорость чередования циклов имеет частотную зависимость. При низком давлении высокоинтенсивные ультразвуковые колебания создают в жидкости пузырьки вакуума, которые набирают объем, поглощая энергию. Как только дальнейшее поглощение энергии становится невозможным, пузырьки начинают разрушаться под действием высокого давления. Это называется кавитацией. После разрыва пузырьков на их месте наблюдается сильное повышение температуры (до 5000 К) и давления (до 2000 атмосфер). Также при взрыве кавитационного пузырька происходит выброс струи жидкости со скоростью до 280 м/с. Создается значительная сила трения, которая механически разрушает оболочки клеток. Их содержимое освобождается и может легко переноситься средой.

Но ультразвук может воздействовать на клетки не только разрушающим, но и конструктивным образом. Все зависит от параметров, с которыми производится ультразвуковая обработка.



РАСЩЕПЛЕНИЕ КЛЕТОК

При интенсивной ультразвуковой обработке клетки начинают расщепляться, а из оболочек или субклеточных органелл высвобождаются белки или ферменты. В обычном состоянии они находятся в нерастворимой оболочке. Для ее распада требуется действие растворителя. Чтобы извлечь белки и ферменты, нужно разрушить клеточную мембрану. Расщепление клеток – это непростой и очень деликатный процесс. Сложность его заключается в способности клеточной стенки выдерживать высокое внутреннее осмотическое давление. Не-

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

обходим полный контроль над процессом разрушения клеток, чтобы не допустить беспрепятственного высвобождения всех компонентов, содержащихся внутри клетки. А это могут быть нуклеиновые кислоты, клеточные дебрисы или продукты денатурации.

Ультразвуковой метод отлично подходит для расщепления клеток, так как оператор получает полный контроль над процессом. К тому же ультразвуковые волны обеспечивают более быстрое проникновение растворителя в клеточное содержимое и улучшают перенос массы. Ультразвуковое воздействие увеличивает проницаемость клеточной стенки, а следовательно, большее количество растворителя попадает в ткани. Данный метод также улучшает процесс переноса вещества. Во время кавитации разрушаются клеточные стенки и матричные компоненты легко высвобождаются из оболочек.

МАССООБМЕН

Ультразвук улучшает проницемость клеточных мембран [2], а также значительно снижает их селективность. При механическом воздействии ультразвуковых волн происходит диффузия растворителей в клеточных тканях. Поскольку ультразвук механически разрушает клеточную стенку (этому способствует кавитация и силы трения), содержимое клетки легко поступает в растворитель. Ультразвуковая кавитация уменьшает размер частиц, увеличивая тем самым площадь поверхности контакта между твердыми и жидкими фазами вещества.

ЭКСТРАГИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ И БЕЛКОВ

Ультразвук высокой интенсивности действия представляет собой уникальный и эффективный способ экстрагирования ферментов и белков, содержащихся в клетках и субклеточных частицах [3]. Он значительно улучшает извлечение органических соединений из растений и семян при использовании растворителя. По этой причине ультразвук более выгоден для экстрагирования биологически активных компонентов, образующихся в процессе переработки. В настоящее время они практически не используются и после экстракции остаются в качестве побочных продуктов. Кроме того, ультразвук помогает усилить эффекты, получаемые при ферментативной обработке. В связи с этим количество необходимого фермента может быть уменьшено или может быть увеличен выход соответствующих экстрагируемых соединений.

БЕЛКИ И ЛИПИДЫ

Очень часто ультразвук используется для улучшения экстракции липидов и белков из семян таких растений, как соевые бобы (например, для получения муки или обезжиренных соевых бобов) или другие масличные культуры. В этом случае разрушение клеточных стенок облегчает прессование (холодное или горячее) и тем самым уменьшает количество остаточного масла или жира в отходах прессования.

Влияние непрерывной ультразвуковой экстракции на выход белка, находящегося в дисперсной фазе, было продемонстрировано Моултоном (Moulton) и другими исследователями. Ультразвуковая обработка постепенно увеличивала выход дисперсного белка по мере того, как соотношение хлопьев и растворителя менялось от 1:10 до 1:30. Эксперимент показал, что с помощью ультразвука можно пептизировать соевый белок практически при любом объеме промышленного производства и что затраты энергии на обработку ультразвуком оказались самыми низкими при использовании более густых суспензий [4].

Ультразвук может применяться: при получении цитрусового масла из фруктов, при экстрагировании масла из горчицы, арахиса, рапса; при получении масла из травянистого сырья (эхинацеи), канолы, сои, кукурузы.

ВЫСВОБОЖДЕНИЕ АНТОЦИАНИНОВ И ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Ферменты-энзимы, такие как пектиназы, целлюлазы и гемицеллюлазы, широко используются при производстве соков. Они разрушают стенки клеток и способствуют более эффективному отхождению сока. Разрушение матрицы клеточной стенки также высвобождает различные компоненты, например фенольные соединения, которые также попадают в сок. Под действием ультразвука улучшается процесс экстракции. Это может привести к увеличению получаемого количества фенольных соединений, алкалоидов и сока, которые при других методах экстракции обычно остаются в отходах прессования.

Влияние ультразвуковой обработки на выделение в сок фенольных соединений и антоцианинов из матрицы винограда и ягод, в частности из черники (*Vaccinium myrtillus*) и черной смородины (*Ribes nigrum*), было исследовано финским научно-исследовательским институтом VTT Biotechnology (проект EC MAXFUN). После размораживания ягод, растирания в пюреобразную кашицу и ферментативной инкубации был использован ультразвуковой гомогенизатор UIP2000hd. Разрушение стенок клеток в результате ферментативной обработки (Pectinex B E-3L для черники и Biopectinase CCM для черной смородины) было усилено действием ультразвука.

«Использование ультразвуковых волн увеличивает концентрацию фенольных соединений в черничном соке более чем на 15%... Влияние ультразвука было бо-



Ультразвуковой гомогенизатор UIP2000hd

лее заметным в эксперименте с черной смородиной. Это одна из самых сложных (сложнее, чем черника) в плане получения сока ягод из-за высокого содержания пектина и неоднородного строения клеточных стенок... После ферментативной инкубации и ультразвуковой обработки концентрация фенольных соединений в соке увеличилась на 15–25%» [5].

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ИНАКТИВАЦИЯ

Можно применять обработку ультразвуком для подавления биологической активности ферментов и микроорганизмов, например в соках и соусах из фруктов и ягод. Использование ультразвука для консер-

вации будет иметь большую ценность для пищевой промышленности. На сегодняшний день самым распространенным методом сохранения продуктов попрежнему остается пастеризация. При пастеризации инактивация микроорганизмов или ферментов достигается кратковременным повышением температуры, что приводит к увеличению срока хранения (консервации). Однако для многих пищевых продуктов метод термической обработки часто имеет отрицательные последствия.

В частности, может ухудшиться качество продуктов из-за появления в результате нагревания и запуска химических реакций новых веществ, а также изменения структуры макромолекул и тканей растительного и животного происхождения. Термическая обработка может вызвать нежелательные изменения текстуры, вкуса, цвета, запаха и питательных качеств (витаминов и белков). В данном случае прекрасной альтернативой тепловой обработке выступает ультразвук, который оказывает на качество пищевых продуктов минимальное воздействие.

Тепло генерируется кавитацией и создаваемыми радикалами лишь локально, а активность ферментов устраняется ультразвуком [6]. При низких уровнях ультразвука метаболические и структурные изменения в клетках могут не вызывать их разрушения. Биологическое действие пероксидазы, которая встречается в большинстве сырых фруктов и овощей, часто приводит к развитию неактивных веществ и пигментов, которые окрашивают продукты в коричневый цвет. Активность этого фермента может быть существенно уменьшена за счет использования ультразвука. Терморезистентные ферменты, такие как липаза и протеаза, выдерживающие обработку ультравысокими температурами, могут снизить качество и срок годности термически обработанного молока и других молочных продуктов. Они также эффективно подавляются одновременным применением ультразвука, тепла и давления.

Ультразвук эффективно применяется для уничтожения микроорганизмов и вирусов, таких как кишечная палочка *E.coli, Salmonellae, Ascaris*, *Giargia*, *Cryptosporidium cysts, Poliovirus*.

Ультразвук может применяться для консервирования и сохранения джема, мармелада или различных топпингов, например для мороженого, фруктовых соков, соусов, мясных и молочных продуктов.

СОЧЕТАНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ И ТЕМПЕРАТУРНОЙ ОБРАБОТКИ

Более высокой эффективности при применении ультразвуковой обработки удается достичь за счет сочетания его с другими антимикробными методами, такими как:

- термозвуковая обработка (одновременное действие температуры и ультразвука);
- мануальная обработка (одновременное действие давления и ультразвука);
- манотермозвуковая обработка (одновременное действие давления, температуры и ультразвука).

Применение ультразвука вместе с температурным воздействием и/или давлением рекомендуется для уничтожения таких патогенов, как *Bacillus subtilis, Bacillus coagulans, Bacillus cereus, Bacillus sterothermophilus, Saccharomyces cerevisiae* и *Aeromonas hydrophila*.

СПОСОБЫ УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПРОЦЕССА

Наряду с ультразвуком есть и другие процессы, которые тоже не являются термическими. Это высокое гидростатическое давление, сжатый углекислый газ вместе с диоксидом углерода в сверхкритическом состоянии, а также электрическое поле с высокочастотными импульсами. Однако для этих процессов требуется создание особых условий, а ультразвук легко применять в рамках лаборатории или даже на настольном стенде. Воспроизвести полученные во время испытаний результаты можно впоследствии и в промышленных масштабах. Для достижения конкретных целей в процессе экстрагирования можно легко регулировать интенсивность ультразвуковой обработки и настраивать характеристики кавитации. Давление и амплитуду тоже можно варьировать в широком диапазоне, чтобы определить, например, наиболее оптимальные для экстрагирования параметры с точки зрения энергоэффективности.

E.COLI

Бактерию *E.coli* исследователи очень часто выбирают в качестве источника для получения рекомбинантных белков, которые широко используются в лабораторной практике с целью изучения биологических свойств. Метки очистки, такие как полигистидиновый хвост, бета-галактозидаза и связывающие мальтозу белки, обычно соединяют с рекомбинантными белками, чтобы впоследствии можно было отделить их от клеточных экстрактов с чистотой, достаточной для дальнейшего проведения исследований. Применение ультразвука позволяет максимально высвобождать белок, что имеет большое значение, в частности, в таких случаях, когда выход продукта получается низким и требуется сохранить структуру и активность рекомбинантного белка.

Изучением процессов разрушения клеток *E.coli* для извлечения общего белка, а также экстрагированием химозина занимались ученые Ким (Kim) и Зайас (Zayas).

ЭКСТРАКЦИЯ ШАФРАНА

На мировом рынке самой дорогой специей является шафран. Он ценится за свой пикантный горьковатый вкус и красивый желтый цвет. Эту приправу получают из цветков крокуса, а точнее из тычинок (рылец) шафрана посевного. Рыльца шафрана сначала высушивают, а потом используют как кулинарную специю или в качестве красителя. Интенсивный характерный вкус шафрана обусловлен, в частности, тремя соединениями: кроцином, глюкозидом пикрокроцином и сафраналем.

В своем исследовании ученые Кадходейе (Kadkhodaee) и Хеммати-Кахки (Hemmati-Kakhki) продемонстрировали преимущества ультразвуковой обработки [7]. С помощью данного метода им удалось извлечь значительно большее количество шафрана и при этом сократить время обработки растительного сырья. В результате эффект от применения ультразвуковой экстракции получился гораздо лучше по сравнению с общепринятой практикой экстрагирования шафрана с помощью холодной воды, которая предлагается ISO. Кадходейе и Хеммати-Кахки в ходе своих экспериментов использовали ультразвуковой аппарат Hi505 UP50H. Следует отметить, что наиболее впечатляющие результаты получились при применении импульсного ультразвука. Короткоимпульсная ультразвуковая обработка оказалась более эффективной, чем непрерывная.



Ультразвуковой гомогенизатор Hi505 UP50H

ОКИСЛЕНИЕ

Возможность контролировать интенсивность ультразвука при запуске процессов ферментации и биотрансформации наряду с более легким массообменом и получаемыми при этом биологическими эффектами способствует более успешному применению биотехнологий. Влияние управляемых ультразвуковых волн частотой 20 кГц на процесс окисления холестерина до холестенона изучал Р. Бар (R. Bar), используя дремлющие штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis* ATCC 25544 (ранее известных, как *Norardia erythropolis*).

$$\text{Холестерин} + O_2 = \text{4-холестен-3-он} + H_2O_2.$$

В данной формуле отображен типичный процесс превращения стеролов и стероидов в водонерастворимые твердые вещества. Но уникальность процесса состоит в том, что и на клетки, и на твердые вещества можно оказывать воздействие, применяя ультразвук [8]. Р. Бар облучал клетки ультразвуковой волной низкой интенсивности, что позволяло сохранять целостность клеток и поддерживать их метаболическую активность. В этих условиях наблюдалось повышение скоростей, с которыми проходила биотрансформация в микробиологических суспензиях холестерина концентрацией 1,0 и 2,5 г/л при облучении ультразвуком (с интенсивностью 0,2 Вт/см^2) по 5 с каждые 10 мин. Ультразвук не оказывал никакого эффекта на ферментативное окисление холестерина (2,5 г/л) холестериноксидазой.

Применение ультразвуковой кавитации для экстракции веществ и сохранения пищевых продуктов является эффективным и безопасным в с точки зрения экологии, а также экономичным способом обработки, так как не требует больших затрат времени и электроэнергии. Применение ульразвука для консервации и гомогенизации широко распространено при производстве фруктовых соков и пюре (например, из яблока, сливы, манго, апельсина, грейпфрута, винограда), а также овощных супов и соусов, таких как томатный соус или суп из спаржи.

ЛИТЕРАТУРА

1. H. Allinger. Ultrasonic disruption // American Laboratory, 1975. № 10. P. 75–85.
2. C.L. Mummery. The effect of ultrasound on fibroblasts *in vitro*. Ph.D. Thesis. – London. 1978.
3. S.M. Kim, J.F. Zayas. Processing parameter of chymosin extraction by ultrasound // J. Food Sci. 1989. № 54. 700 p.
4. K.J. Moulton, L.C. Wang. A Pilot-Plant Study of Continuous Ultrasonic Extraction of Soybean Protein // Journal of Food Science. 1982. V. 47, P. 28–36.
5. M. Mokkila, A. Mustranta, J. Buchert, K. Poutanen. Combining power ultrasound with enzymes in berry juice processing: 2nd Int. Conf. Biocatalysis of Food and Drinks, 19-22.9.2004, Stuttgart, Germany. 2004.
6. I.E. El'piner. Ultrasound: Physical, Chemical, and Biological Effects. – New York: Consultants Bureau. 1964. P. 53–78.
7. R. Kadkhodaee, A. Hemmati-Kakhki. Ultrasonic Extraction of Active Compounds from Saffron. URL: http://www.actahort.org/books/739/739_55.htm (дата обращения 15.07.2017).
8. R. Bar. Ultrasound Enhanced Bioprocesses // Biotechnology and Engineering. 1987. V. 32. P. 655–663.

NATOLI

Ведущий мировой производитель пресс инструмента Теперь в России

Celebrating
40 YEARS
OF TABLETING EXCELLENCE IN...

ШИРОКИЙ АССОРТИМЕНТ ПРЕСС ИНСТРУМЕНТА

стандартной формы, фигурный, многопозиционный, сборный со сменным штоком, для микротаблеток, в т.ч. для прессов IMA Comprima, Kilian, Fette, Korch, Bosch–Manesty, GEA и других

- Срок поставки по РФ от 6 недель
- Профессиональная консультация от ведущих специалистов
- Индивидуальный инжиниринг пресс инструмента
- Точность изготовления и износостойкость
- Низкие эксплуатационные затраты
- Комплектующие и узлы для обслуживания инструмента



! За дополнительной информацией обращайтесь к специалистам ГК Фармконтракт

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

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

www.phct–group.com

www.phct.ru

Pharmcontract® group of companies

Эксклюзивный представитель Natoli Engineering в России

ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОГО МЕТОДА ОБРАБОТКИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ И ХИМИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Материал предоставлен компанией Hielscher Ultrasonics

ВВЕДЕНИЕ

Такие процедуры, как смешивание, диспергирование, приготовление эмульсий и растворение уже стандартно осуществляются с применением ультразвука. Это те процессы, без которых вряд ли обойдется лаборатория или химическое/фармацевтическое производство. Мощные ультразвуковые колебания высокой частоты 20–26 кГц создают эффект кавитации, образуя турбулентные потоки в жидкости, что гарантирует превосходный результат смешения и гомогенизации.

Химические и фармацевтические процессы, такие как химический синтез и катализ, а также разработка состава промежуточных и конечных продуктов, невозможно без гомогенизации суспензий, дисперсных растворов и эмульсий. В том случае, когда речь идет о получении субмикронных и наночастиц, традиционно применяемые методы, такие как смесители с высоким усилием сдвига или барабанные мельницы, оказываются неэффективными ввиду неоднородности получаемых смесей, а также высоких энергозатрат. В ультразвуковых гомогенизаторах потребляемая энергия без лишних потерь передается непосредственно в среду, обеспечивая высокую энергоэффективность прибора.

Ультразвуковые гомогенизаторы применяются для диспергирования, размола (например, получения наночастиц), приготовления эмульсий, растворения, разрушения клеток / лизиса, экстракции (например, биологически активных добавок), дегазации, химических реакций, протекающих под действием ультразвука, кристаллизации / осаждения.



ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ГОМОГЕНИЗАТОРА VIALTWEETER

Ультразвуковой гомогенизатор VialTweeter производства компании Hielscher Ultrasonic с успехом применяется в разнообразных научных исследованиях для гомогенизации образцов, клеточного лизиса, фрагментации и деградации ДНК, экстракции белка, диспергирования клеточных скоплений, диспергирования бактерий (например, перед опсонизацией), подготовки образцов для повышения конверсии наночастиц, эмульгирования и для многих других целей.

Самые распространенные области применения VialTweeter: биохимия, цитология, протеомика, аналитические исследования, наночастицы и материалы (например, УНТ, графен).

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

УЛЬТРАЗВУКОВОЕ РАСТВОРЕНИЕ

Самой обычной задачей в процессе подготовки образца является растворение твердых веществ в жидкой среде. С VialTweeter подготовка образцов проходит быстро и эффективно. Все пробирки заполняются строго одинаковыми дозами твердых и жидких субстанций. Так как обработка и растворение ультразвуком происходит в закрытых пробирках, исключается любой риск загрязнения и потери образца.

ОСВОБОЖДЕНИЕ БЕЛКОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

Экстрагирование белков из клеток представляет собой рутинную работу в процессе биологических исследований. Например, она выполняется перед применением таких аналитических методов, как электрофорез (в том числе электрофорез в полиакриламидном геле), ИФА, масс-спектрометрия или вестерн-блоттинг. Пробирки, в которых находятся клетки, обрабатывают ультразвуком, который генерирует VialTweeter. Под действием ультразвука происходит разрушение клеточных мембран и высвобождение внутриклеточного материала – белков, органелл и т.п. Интенсивная и вместе с тем точно настраиваемая мощность ультразвука VialTweeter дает возможность выполнять высокоэффективную ультразвуковую обработку: достаточно интенсивную для того, чтобы разрушить мембрану и выпустить из клетки ее содержимое, но при этом бережную для того, чтобы предотвратить деградацию экстрагированных белков и т.д.

УЛЬТРАЗВУКОВОЕ ДИСПЕРГИРОВАНИЕ КЛЕТОК

Четкая дисперсия образцов клеток имеет большую важность, поскольку клеточные агломераты могут существенно влиять на поведение и результаты анализа. Размер и форма клеток особенно важны, когда клетки подготавливают для поглощения определенных веществ (например, во время опсонизации). На результаты огромное влияние оказывает неоднородность клеточной культуры, состоящей из агрегированных и одиночных клеток и частиц.

VialTweeter позволяет производить ультразвуковую обработку в бережном режиме, но при этом с достаточной интенсивностью, чтобы диспергировать скопления клеток. Возможность точного управления мощностью ультразвука, функция регулировки циклов ультразвуковых колебаний и автоматического отключения в заданное время и/или при заданной температуре позволяют выбирать оптимальные параметры ультразвука для каждого конкретного типа клетки.

Выполнение достоверного подсчета клеток в образцах часто становится настоящей проблемой. Для подсчета бактерий при количественном анализе образцы разбавляют и переносят на агаровые диски. После инкубации в течение ночи жизнеспособные бактерии образуют колонии, в идеале, по одной на одну бактерию (такие бактерии являются колониеобразующими единицами / КОЕ). Однако скопления бактерий считаются только одной колонией. Чтобы произвести правильный подсчет клеток большие скопления бактерий диспергируют посредством бережной обработки ультразвуком, для этого применяют VialTweeter.

ДЕГРАДАЦИЯ ДНК ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

VialTweeter – надежный инструмент для подготовки образцов перед использованием метода Western Blotting. Простоту и скорость выполнения данной процедуры можно продемонстрировать на примере *E. coli*. Клеточную массу *E. coli* предварительно подвергли окислительному стрессу с помощью пероксинитрита, центрифугировали и промыли, а затем лизировали методом комбинированной обработки NuPAGE [буфер (додецилсульфат натрия) + восстановитель] с применением ультразвука (VialTweeter). Для разрушения ДНК достаточно обработать образец ультразвуком в течение 15 с. Продолжительность одного цикла составляет 0,5 с при установке значения амплитуды на 100%. Для обработки всех образцов применяются одни и те же параметры ультразвука. Это важные условия для воспроизводимости и сопоставимости результатов анализа.

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ПОДГОТОВКА НАНОЧАСТИЦ

Наночастицы используются во многих научно-технических и прикладных областях. В зависимости от материала и отрасли применения их нужно готовить от очень малых до больших объемов. Ультразвук – это широко используемый метод, когда речь идет о синтезе, диспергировании и функционализации наноматериалов вне зависимости от производственного масштаба.

VialTweeter представляет собой идеальное устройство для приготовления небольших количеств образцов, содержащих наноматериалы. Для медицинских и фармацевтических целей модифицированные наночастицы должны быть получены в очень малых объемах. Кроме того, нужно избегать загрязнения и потери образцов, чтобы сохранить драгоценный материал (квантовые точки, флуоресцентные наночастицы, такие как биомаркер и т.д.). Ультразвуковой прибор VialTweeter – идеальное решение для непрямой, но в то же время интенсивной обработки микротрубочек и пробирок. VialTweeter прекрасно подходит для выполнения таких операций, как синтез, диспергирование и функционализация.

Techlabimport
ДИСТРИБЬЮТОР ОБОРУДОВАНИЯ



Дистрибьютор оборудования

для предприятий пищевой, перерабатывающей, косметической, фармацевтической отраслей





Самый широкий выбор технологического оборудования в любом ценовом сегменте



Максимально широкий ряд бюджетного аналитического оборудования



Подбор, поставка, запуск и сервисное обслуживание

Техлабимпорт

Качество, оперативность, надежность и гарантированное право выбора

http:// techlabimport.ru

+7 (499) 674-05-40
(центральный офис в Москве)

sales@techlabimport.ru
(24/7 служба приема заказов)



WORLD TRADE CENTER MOSCOW

16–17 октября 2017 г.
Москва,
Конгресс-центр ЦМТ

ФАРММЕДОБРАЩЕНИЕ 2017

XIX ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ В СФЕРЕ ОБРАЩЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

ФармМедОбращение 2017

Включено в План научно-практических мероприятий Министерства здравоохранения Российской Федерации на 2017 год (Приказ № 99 от 7 марта 2017 г.)

В ПРОГРАММЕ КОНФЕРЕНЦИИ

Пленарное заседание

Секционные заседания

- Качество лекарственных препаратов как одна из основных составляющих обеспечения прав граждан на качественную лекарственную помощь
- Маркировка лекарственных препаратов специальными идентификационными знаками. Прослеживаемость движения лекарственных препаратов от производителя до конечного потребителя
- Актуальные вопросы законодательства ЕАЭС в сфере фармаконадзора. Современные требования к обеспечению безопасного применения лекарственных средств
- Актуальные вопросы государственного контроля проведения клинических исследований лекарственных препаратов в Российской Федерации и ЕАЭС. Современные требования к организации и проведению клинических исследований
- Регулирование обращения биомедицинских клеточных продуктов. От теории к практике
- Российская фармацевтическая промышленность. Требования GMP
- Экспертиза и регистрация лекарственных средств
- Обращение медицинской продукции на пространстве ЕАЭС
- Экспортный потенциал лекарственных средств, выпускаемых отечественными производителями
- Совершенствование системы закупок медицинской продукции для государственных и муниципальных нужд. Регулирование цен на медицинские изделия
- Регистрация медицинских изделий на территории Российской Федерации и в рамках законодательства Евразийского экономического союза
- Контроль за обращением медицинских изделий в свете применения риск-ориентированного подхода
- Актуальные вопросы обращения медицинских изделий
- Современные требования действующего законодательства к контролю и обращению наркотических средств и психотропных веществ и их прекурсоров, культивированию наркосодержащих растений на территории Российской Федерации. Структура паллиативной помощи и порядок ее организации в Российской Федерации
- Реформа контрольной и надзорной деятельности в Российской Федерации. Актуальные вопросы контроля и надзора в сфере обращения лекарственных средств

В РАБОТЕ КОНФЕРЕНЦИИ ПРИМУТ УЧАСТИЕ

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

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

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

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

КАК НАЧАТЬ СОБСТВЕННОЕ ПРОИЗВОДСТВО КАПСУЛ/ТАБЛЕТОК

Материал предоставлен компанией Farmalabor

ИТАЛЬЯНСКОЕ СОВЕРШЕНСТВО, МЕЖДУНАРОДНОЕ ВИДЕНИЕ

Итальянская компания Farmalabor была основана в 2001 году командой фармацевтов и на сегодняшний день является одним из наиболее амбициозных игроков на фармацевтическом рынке, осуществляя поставки сырьевых материалов, упаковки, а также современного оборудования для фармацевтических компаний по всему миру.

Farmalabor является единственной компанией, которая занимается переупаковкой АФИ (API) и при этом полностью оснащена своими внутренними лабораториями для проведения химического и микробиологического анализа с применением различных фармацевтических техник. Лаборатория контроля качества работает согласно правилам надлежащей лабораторной практики (GLP) и полностью соответствует требованиям надлежащей производственной практики (GMP), а также стандартам ISO9001 и ISO14001, что, в свою очередь, позволяет обеспечивать соответствие производимых продуктов требованиям отрасли, в том числе благодаря высокому качеству используемого сырья.

Отдел обеспечения качества работает независимо от всех подразделений производства. Это позволяет обеспечить полное соответствие требованиями GMP, ISO9001 и ISO14001 во всех секторах производственной цепочки (закупка, контроль качества, производство, конечная продукция, продажи и сервисное обслуживание).



FARMALABOR TECH: ТЕХНОЛОГИИ, КОТОРЫЕ СОДЕЙСТВУЮТ РАЗВИТИЮ БИЗНЕСА

Farmalabor Tech – это подразделение компании, которое занимается производством и продажей составного лабораторного оборудования. Весь ассортимент продуктов компании Farmalabor Tech сертифицирован в соответствии с европейскими нормами. Это позволяет обеспечить высокий уровень безопасности и надежности при работе с оборудованием.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Компания Farmalabor Tech имеет свою команду инженеров, которые готовы предоставить весь необходимый спектр услуг для клиента: 3D-проектирование для полной установки и запуска составной лаборатории, поддержка для принятия оптимального решения касательно покупки необходимого продукта, а также предоставление послепродажной поддержки.

Например, для российской компании, которая нацелена на запуск производства БАДов, Farmalabor готова предоставить все необходимое оборудование для оптимизации процесса и улучшения качества готовой продукции.

Автоматический таблеточный пресс Fast Tab 3000

Таблеточный пресс FAST TAB 3000 полностью выполнен из нержавеющей стали и алюминия и соответствует требованиям пищевой и фармацевтической промышленности.

Благодаря своей компактной конструкции таблеточный пресс Fast Tab 3000 является оптимальным сочетанием производительности и компактных размеров, являясь лучшим решением при производстве небольших партий таблеток (с растительными экстрактами, БАДов, АФИ и т.д.). При помощи специальных аксессуаров для таблеточного пресса Fast Tab компании могут производить широкий диапазон различных таблеток, которые будут отличаться по форме, массе и показателю твердости в зависимости от конкретных коммерческих целей.

Ниже приведены основные характеристики таблеточного пресса:

- Максимальная производительность: 3400 таблеток в час;
- Габаритные размеры 35×50 × в 72 см;
- Масса: 90 кг;
- Усилие прессования: максимум 30 кН.

Специалисты Farmalabor Tech готовы предоставить услуги по исследованию потенциала рынка при смене производственного процесса.

Полуавтоматическая капсулонаполняющая машина Optimatic 300

Точно так же, как и таблеточный пресс Fast Tab, капсулонаполняющая машина выполнена из нержавеющей стали и алюминия.







Инженеры компании Farmalabor разработали данную машину таким образом, что она может быть установлена как в ограниченном пространстве, так и в больших помещениях. Благодаря этому она универсальна для применения большинством компаний.

Машина оснащена инновационной системой извлечения конвейера путем давления на боковые ручки, что, в свою очередь, позволяет проводить легкую и быструю очистку системы. Это помогает обеспечить высокую точность и скорость в процессе ориентации, позволяя правильно вводить пустые капсулы, которые могут быть закрыты непосредственно на загрузочной пластине машины. Конвейер оснащен системой, которая предотвращает налипание, благодаря чему обеспечивается максимальный уровень надежности работы машины.

Ниже приведены основные характеристики капсулонаполняющей машины:

- Количество капсул за одно действие: 300.
- Габаритные размеры: Основание 368x442 мм; высота 674 мм.
- Общая масса 65 кг.

Вне зависимости от производимого продукта (таблетки и/или капсулы) самым лучшим вариантом для упаковки продукции является блистерная машина, которая гарантирует не только соблюдение высокого качества продукта, но и удобство использования.

Полуавтоматическая блистерная машина Top Blister

Новая блистерная машина Top Blister, которая производится компанией Farmalabor Tech, была специально разработана для удовлетворения потребностей небольших компаний и лабораторий. Машина имеет компактную конструкцию и выполнена из нержавеющей стали и анодированного алюминия. Она оснащена сменными формами для запайки блистеров, которые можно легко менять в зависимости от типа продукта (капсула или таблетка).

Данная блистерная машина может проводить спаивание блистеров любого типа (презакрытых и частично запаянных), просто подбирая необходимую форму для запайки в зависимости от различных размеров. Машина Top Blister оснащена системой автоматического спаивания. Блистерная машина позволяет спаивать блистеры с высоким уровнем точности и на высокой скорости.

Ниже приведены основные характеристики блистерной машины:

- Габаритные размеры: 210x300 x в 300 мм.
- Масса нетто: 8 кг.

Идеальным способом завершения производственного цикла, ориентированного на блистерную форму, который может содержать как капсулы, так и таблетки, будет кастомизация упаковки блистера путем нанесения логотипа компании и наименования продукта на алюминиевую часть блистера.

FARMALABOR
Farmacisti Associati

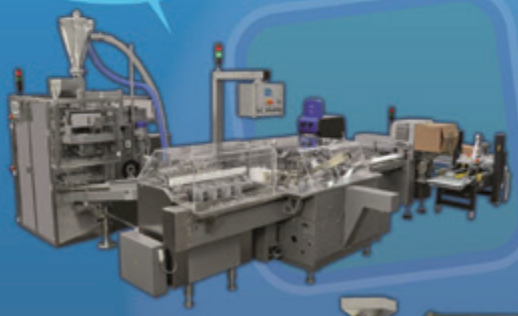


tecnomaco
Pharmaceutical machinery



Упаковочные машины и комплексные линии розлива

Упаковка в саше



Тубонаполнительные машины производительность до 5000 туб/час



Блистерные линии



Машина фасовки порошка малыми дозами



Счетно-фасовочные моноблоки для таблеток и капсул производительность 7200 фл/час



TECNOMACO –
МЫ ДЕЛАЕМ ТОЛЬКО САМОЕ ЛУЧШЕЕ!



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

БЕЛГОРОДСКАЯ ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ ПАЛАТА

БЕЛЭКСПОЦЕНТР

8 - 10 ноября 2017



XX межрегиональная специализированная выставка

МЕДИЦИНА
ФАРМАЦИЯ

В рамках выставки:
работа “Территории здоровья”, консультации специалистов

ВКК “БЕЛЭКСПОЦЕНТР”, г. Белгород, ул. Победы, 147 А
Т./ф.: (4722) 58-29-40, 58-29-65, 58-29-41
E-mail: belexpo@mail.ru, www.belexpocentr.ru

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ

К публикации принимаются законченные оригинальные работы (до 25 машинописных страниц, включая иллюстративный материал и список литературы), рассматривающие экспериментальные исследования в области фармацевтической технологии и разработки, вопросы оценки качества, эффективности, безопасности воспроизведенных и оригинальных лекарственных средств и регистрации лекарственных средств.

Журнал также публикует предлагаемые авторами и одобренные редакционной коллегией обзорные статьи по актуальным проблемам фармацевтической технологии, разработки и регистрации лекарственных средств (до 40 машинописных страниц, включая иллюстративный материал и список литературы).

Работы приоритетного характера (1-3 машинописные страницы), содержащие не более 3 иллюстраций, публикуются в виде коротких сообщений.

Текст статьи должен быть представлен в редакцию на адрес электронной почты: info@pharmjournal.ru, набранным в текстовом редакторе MS Word версии не ниже 2003. Название файла – фамилия первого автора. Редакция не несет ответственности за содержание и достоверность представленного материала.

Первая страница статьи начинается с УДК и названия статьи на русском языке, напечатанного заглавными буквами по центру. Далее следует список авторов на русском языке. Для каждого автора указываются инициалы и фамилия, сначала пишутся инициалы, потом фамилия автора. Инициалы отделяются от фамилии автора одинарным пробелом. Затем следуют точные названия и адреса (с обязательным указанием почтового индекса) всех учреждений (с цифровой пометкой, где работает каждый из авторов), звездочкой в верхнем регистре помечен автор, ответственный за переписку (* – ссылка на телефон и адрес электронной почты). Редакция не несет ответственности за искаженное воспроизведение имен собственных, допущенное по вине автора.

Затем приводится краткое резюме статьи (**Резюме**.) на русском языке (не более 100 слов). Далее следуют ключевые слова (**Ключевые слова**:) (не более 6) на русском языке.

Далее в том же порядке: название статьи заглавными буквами по центру, список авторов с указанием точных названий и адресов с почтовым индексом всех учреждений/организаций (также с цифровой пометкой в верхнем регистре, указывающей, где работает каждый из авторов), краткое резюме (**Abstract**.) и ключевые слова статьи (**Keywords**:) в переводе на английский язык.

Текст экспериментальной статьи и коротких сообщений должен быть разбит на разделы: 1) ВВЕДЕНИЕ; 2) МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ; 3) РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ; 4) ЗАКЛЮЧЕНИЕ; 5) ЛИТЕРАТУРА (все буквы в названиях разделов - заглавные).

Все сокращения и аббревиатуры, использованные в тексте статьи, должны быть расшифрованы (либо при первом употреблении в скобках, либо в конце статьи в списке сокращений). Расшифровка сокращений и аббревиатур иноязычных терминов должна быть представлена на языке оригинала.

Правила набора. Интервал между словами должен быть один пробел, перенос слов не делать, текст набирается шрифтом Times New Roman, 14 кеглем через полтора интервала. Название статьи набирается заглавными буквами полужирным шрифтом, инициалы и фамилии авторов – полужирным шрифтом. При обозначении единиц измерения должна использоваться система единиц СИ. Международные непатентованные названия фармацевтических субстанций и торговые наименования лекарственных средств необходимо оформлять в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств. При описании в работе результатов клинических исследований необходимо привести номер и дату разрешения на проведение клинического исследования согласно Реестру выданных разрешений на проведение клинических исследований лекарственных препаратов. При описании используемых общелабораторных реактивов следует приводить их наименование, класс чистоты, фирму-производитель и страну происхождения. При описании специфических импортных реактивов необходимо дополнительно приводить каталожный номер реактива. При описании исследуемых лекарственных средств необходимо приводить их торговое наименование, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности. При описании используемых стандартных образов приводить количественное содержание активного вещества в стандартном образце, фирму-производитель, страну происхождения, серию и срок годности. Названия лекарственных средств следует писать со строчной буквы на русском языке с обязательным указанием международного непатентованного названия, а при его отсутствии – группировочного или химического названия. Числовые данные необходимо указывать цифрами, в десятичных дробях использовать запятые. Математические и химические формулы писать четко, с указанием на полях букв алфавита (русский, латинский, греческий), а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов. К статье может быть приложено необходимое количество таблиц и рисунков. Все таблицы и рисунки должны иметь номер и название, текст статьи должен содержать ссылку на них.

К статье необходимо приложить список всей цитируемой литературы, оформленный в соответствии с действующим ГОСТ Р 7.0.5-2008. В тексте статьи следует указывать номер ссылки в квадратных скобках цифрами в соответствии с пристатейным списком литературы. Ссылки нумеруются в порядке цитирования. Перед списком указывается ЛИТЕРАТУРА прописными буквами. Список литературы должен представлять собой полную затекстовую ссылку. Для книг и сборников указываются точные названия по титульному листу, место и год издания, страницы; для нормативных документов – тип документа и принявший его орган (постановление Правительства Российской Федерации, приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации и т. п.), дата утверждения, номер и точное название. Для журнальных статей указываются фамилия и инициалы авторов, полное название статьи, название журнала, год, номер выпуска, номера страниц.

Решение о публикации принимает редакция. Редакция журнала оставляет за собой право вносить стилистические изменения, не искажающие смысл. Корректура не высылается.

Образец оформления статей, примеры сокращения единиц измерения и оформления ссылок представлены на сайте журнала: www.pharmjournal.ru.

Подписка на научно-производственный журнал*

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Журнал выходит 1 раз в квартал

АНКЕТА ПОДПИСЧИКА

Фамилия: _____

Имя: _____

Отчество: _____

Предприятие: _____

Должность: _____

Отдел: _____

Необходимое количество экземпляров журнала: _____

Телефон: _____

Факс: _____

E-mail: _____

Почтовый индекс: _____

Город, район, область: _____

Адрес: _____

Пожалуйста, отметьте один или несколько вариантов

Наиболее интересные для Вас разделы: ☐ Новые методики анализа ☐ Регистрационные вопросы	*Какие материалы вы хотели бы видеть в следующих номерах:* ☐ Практические пособия выполнения анализов ☐ Новости фармацевтической отрасли ☐ Пути решения трудностей при регистрации ☐ Аналитические статьи и обзоры ☐ Оборудование для разработки и анализа
Нужно ли размещать тематические рекламные блоки в журнале: ☐ *Да* ☐ *Нет*	*Ваши предложения и пожелания:* _____ _____ _____ _____

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

ВНИМАНИЕ! Почтовая доставка за пределы России, в т.ч. страны ЕАЭС, ЕС, а также Украину, Узбекистан, Туркменистан **платная**.

* Отсканированную копию заполненной анкеты необходимо выслать на электронный адрес редакции: **info@pharmjournal.ru** или на почтовый адрес:
115054, Москва, ул. Дубининская, д. 57, стр. 2, оф. 2.306.
Также Вы можете оформить подписку на нашем сайте в разделе «Подписка»: **www.pharmjournal.ru**

Благодарим Вас за неоценимый вклад в развитие Журнала!