WWW.PHARMJOURNAL.RU

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN2305-2066

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ®

СТРАТЕГИЧЕСКИЙ ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПАРТНЕР

pharmtech & ingredients

АНАЛИТИКА ЭКСПО

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ

GXP ГИАС и ЛОТ

КОМПЛЕКСНОЕ РЕШЕНИЕ
по сериализации и агрегации

В НОМЕРЕ:

ИОНООБМЕННЫЕ СМОЛЫ КАК ИНГРЕДИЕНТЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ТОКСИКАНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ РЕАГЕНТОВ

ТРЕНДЫ МИРОВОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА: НЕРЕАЛИЗОВАННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РАЗВИТИЯ

МЕТОДИКА СОВМЕСТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОТРИАЗОЛА, ТРИАЗОЛОПИРИМИДИНОНА И НИТРОТРИАЗОЛОПИРИМИДИНОНА

ИЗУЧЕНИЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА «ГМДП, ЛИОФИЛИЗАТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ»

РАЗРАБОТКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ПРОВЕДЕНИЯ МЕРОПРИЯТИЙ В АПТЕЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЯХ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ФАРМАКОНАДЗОРА

№ 4 (21) НОЯБРЬ 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»
ФГАОУ 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	8	**Introduction**
Росаккредитация сообщает	10	**RusAccreditation reports**
Интервью	12	**Interview**
Мероприятия	26	**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.	34	*Zagorulko E.Y., Teslev A.A.*
ГЕЛИ ДЛЯ ПРИЕМА ВНУТРЬ. ЧАСТЬ 2. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА (ОБЗОР)		GELS FOR ORAL ADMINISTRATION. PART 2. EXCIPIENTS (REVIEW)
Полковникова Ю.А., Леньшин А.С., Глушко А.А., Хиова О.М.	44	*Polkovnikova Yu.A., Lenshin A.S., Glushko A.A., Khishova O.M.*
МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ СИСТЕМ «КРЕМНИЙ – РАСТВОРИТЕЛЬ – ВИНПОЦЕТИН» И «ДИОКСИД КРЕМНИЯ – РАСТВОРИТЕЛЬ – ВИНПОЦЕТИН»		MODELING AND ANALYSIS OF MOLECULAR DYNAMICS OF SILICON – SOLVENT – VINPOCETIN SYSTEMS AND SILICON – SOLVENT – VINPOCETIN DIOXIDE
Савельева К.Р., Андреевичева Т.Ю., Персанова Л.В., Остапюк О.А., Поляков С.В., Шестаков В.Н.	50	*Saveleva K.R., Andreevicheva T.Y., Pesanova L.V., Ostapyuk O.A., Poliyakov S.V., Shestakov V.N.*
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ БИФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МАЗИ		DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY AND METHODS OF CONTROL OF BIFUNCTIONAL OINTMENT
Секция «Современные ингредиенты лекарственных форм»		**«Modern ingredients of medicinal forms» section**
Кедик С.А., Суслов В.В., Малкова А.П., Шняк Е.А., Домнина Ю.М.	56	*Kedik S.A., Suslov V.V., Malkova A.P., Shnyak E.A., Domnina Y.M.*
ГЕЛЕОБРАЗУЮЩИЕ ПОЛИМЕРЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЖИДКИХ ЭМБОЛИЗАТОВ		GEL-FORMING POLYMERS FOR EMBOLIZATION
Анурова М.Н., Бахрушина Е.О., Лапик И.В., Кречетов С.П.	64	*Anurova M.N., Bakhrushina E.O., Lapik I.V., Krechetov S.P.*
СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ГЛАЗНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ ОПТИМУМОВ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ГЕЛЕЙ		THE DETERMINATION OF THE RHEOLOGICAL OPTIMUM OF OPHTHALMIC GELS. MODERN ASPECTS OF THE OPHTHALMIC DOSAGE FORMS DEVELOPMENT
Секция «Лекарственные средства из природного сырья»		**«Drugs from Natural Raw Materials» section**
Рогожникова Е.П., Марданлы С.Г., Мизина П.Г.	72	*Rogozhnikova E.P., Mardanly S.G , Mizina P.G.*
ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ЭКСТРАГИРОВАНИЯ И ТИПА ЭКСТРАГЕНТА НА ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА НАСТОЕК ИЗ ЦВЕТКОВ НОГОТКОВ		THE INFLUENCE OF THE EXTRACTION METHOD AND THE TYPE OF EXTRACTANT ON THE QUALITY OF INFUSIONS FROM MARIGOLD FLOWERS
Демина Н.Б., Воробьева Д.Д.	78	*Demina N.B., Vorobyeva D.D.*
ИОНООБМЕННЫЕ СМОЛЫ КАК ИНГРЕДИЕНТЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ		ION-EXCHANGE RESINS AS INGREDIENTS DRUG FORMULATIONS

Раздел «Аналитические методики и методы контроля»

«Analytical and Quality Control Methods» part

Секция «Контроль качества химико-фармацевтических препаратов»

«Quality Control of Chemical Drug Products» section

Риццо Д.Д., Чен К.Э. **84**

КРИТИЧНОСТЬ ЭКСЦИПИЕНТОВ КЛАССА SUPER REFINED™ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ РЕЦЕПТУР

Rizzo G.J., Chen K.H.

THE IMPORTANCE OF CHROMATOGRAPHICALLY PURIFIED EXCIPIENTS

Баклыков А.В., Артемьев Г.А., Главатских С.А., Копчук Д.С. **88**

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ А, D_3 И Е В СОСТАВЕ ПРЕМИКСОВ «МАУЭРВИТ» И «ГРАНДВИТАМ» МЕТОДОМ УЛЬТРАВЭЖХ

Baklykov A.V., Artem'ev G.A., Glavatskikh S.A., Kopchuk D.S.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF VITAMINS A, D_3 AND E IN PREMIXES «MAUERVIT» AND «GRANDVITAM» BY ULTRA HPLC

Баклыков А.В., Тумашов А.А., Котовская С.К., Уломский Е.Н., Русинов Г.Л., Русинов В.Л., Копчук Д.С., Чупахин О.Н., Чарушин В.Н. **98**

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

Baklykov A.V., Tumashov A.A., Kotovskaya S.K., Ulomskiy E.N., Rusinov G.L., Rusinov V.L., Kopchuk D.S., Chupakhin O.N., Charushin V.N.

METHOD OF SIMANTENOUS DETERMINATION OF AMINOTRIAZOLE, TRIAZOLOPYRIMIDINONE AND NITROTRIAZOLOPIRIMIDINONE - SUBSTRATE AND SEMI-PRODUCTS OF SYNTHESIS OF DRUG «TRIAZID» BY HPLC METHOD

Лазовская О.И., Леонтьев В.Н., Литвинова Е.В. **104**

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНИБУТА В ТАБЛЕТИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

Lazovskaya O.I., Leontiev V.N., Litvinova E.V.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SPECTROFLUORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHENIBUT IN TABLET DRUGS

Секция «Химико-токсикологический анализ»

«Chemical and Toxicological Analysis» section

Соснов А.В., Власов М.И., Садовников С.В., Руфанов К.А., Семченко Ф.М., Соснова А.А., Радилов А.С., Савельева Е.И. **108**

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ТОКСИКАНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ РЕАГЕНТОВ

Sosnov A.V., Vlasov M.I., Sadovnikov S.V., Rufanov K.A., Semchenko F.M., Sosnova A.A., Radilov A.S., Savelieva E.I.

DETECTION OF TOXICANTS BASED ON LUMINESCENT REAGENTS

Секция «Поиск и разработка новых лекарственных средств»

«New Drug Search and Development» section

Фабричный С.Ю., Семин А.А., Наркевич И.А. **126**

ОБОСНОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВ ИЗУЧЕНИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КАК ИСТОЧНИКА СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ЖИРОВОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Fabrichniy S.Yu., Semin A.A., Narkevich I.A.

SUBSTANTIATION OF THE PROSPECTS FOR STUDYING NATURAL COMPOUNDS AS A SOURCE OF DRUG DEVELOPMENT FOR THE CORRECTION OF FAT AND CARBOHYDRATE METABOLISM

Абышев А.З., Нгуен К.Б. **132**

СИНТЕТИЧЕСКИЕ, КОВАЛЕНТНО КОМБИНИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 2-Н-1-БЕНЗОПИРАН-2-ОНА

Abyshev A.Z., Nguyen C.B.

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

Куваева Е.В., Колесник Д.А., Ксенофонтова Г.В., Семакова Т.Л., Яковлев И.П. **140**

СИНТЕЗ И СТРОЕНИЕ НЕКОТОРЫХ N-АРИЛБЕНЗАМИДИНОВ

Kuvaeva E.V., Kolesnik D.A., Ksenofontova G.V., Semakova T.L., Yakovlev I.P.

SYNTHESIS AND STRUCTURE OF SOME N-ARYLBENZAMIDINES

Научно-производственный рецензируемый журнал
РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Тарадейко Т.И., Сидорова М.В., Галашева С.Н., Иозеп А.А. **144** *Taradeyko T.I., Sidorova M.V., Galasheva S.N., Iozep A.A.*

ОСОБЕННОСТИ КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА АМИДА КАРБОКСИЭТИЛАЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

THE FEATURES OF ACID HYDROLYSIS OF AMIDE OF CARBOXYETHYL ALGINIC ACID

Молдавский А., Юраков А.М., Супургибеков М.Б., Елагин П.И., Лалаев Б.Ю., Фридман И.А. **148** *Moldavsky A., Yurakov A.M., Supurghibekov M.B., Elagin P.I., Lalaev B.Yu., Fridman I.A.*

СИНТЕЗ БЕНДАМУСТИНА ГИДРОХЛОРИДА В ПРОТОЧНОМ МИКРОРЕАКТОРЕ

SYNTHESIS OF BENDAMUSTINE HYDROCHLORIDE IN FLOW MICROREACTOR

Секция «Контроль качества биопрепаратов»

«Quality Control of Biological Products» section

Савельева К.Р., Персанова Л.В., Шестаков В.Н., Поляков С.В. **154** *Saveleva K.R., Pesanova L.V., Shestakov V.N., Poliyakov S.V.*

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКОЙ ВЯЗКОСТИ ИНЪЕКЦИОННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА НАТРИЯ

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF INTRINSIC VISCOSITY OF INJECTABLE DRUG WITH CHONDROITIN SULFATE

Абрамова Е.Г., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Комиссаров А.В., Савицкая Л.В., Генералов С.В., Галкина М.В., Гаврилова Ю.К., Кочкин А.В., Никифоров А.К. **160** *Abramova E.G., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V., Komissarov A.V., Savitskaya L.V., Generalov S.V., Galkina M.V., Gavrilova Yu.K., Kochkin A.V., Nikiforov A.K.*

РАЗРАБОТКА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ПРЕДПРИЯТИЯ (СОП) СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ

DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL SAMPLE TO ASSESS SPECIFIC ACTIVITY OF ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN OBTAINED FROM EQUINE BLOOD SERUM

Исайкина П.М., Долгова В.П., Аскретков А.Д., Орлова Н.В. **166** *Isaykina P.M., Dolgova V.P., Ascretcov A.D., Orlova N.S.*

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ КЛЕТОК ХОЗЯИНА (CHO) МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В БЕЛКЕ АДАЛИМУМАБ

QUANTITATIVE DETERMINATION OF HOST CELL PROTEINS (CHO) BY THE METHOD OF ENZYME IMMUNOASSAY IN THE PROTEIN ADALIMUMAB

Секция «Биологические методы анализа»

«Biological Methods of Analysis» section

Сачивкина Н.П. **176** *Sachivkina N.P.*

НОВЫЙ ПОДХОД К ДЕЗИНФЕКЦИИ ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ (МИКРОБИОЛОГИЧЕКИЕ АСПЕКТЫ)

A NEW APPROACH TO DISINFECTION OF CLEANROOMS (MICROBIOLOGICALLY ASPECTS)

Секция «Контроль качества лекарственного растительного сырья»

«Quality Control of Herbal Drug Products» section

Тринеева О.В. **180** *Trineeva O.V.*

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ОБЪЕКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО И СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ФАРМАЦИИ (ОБЗОР)

METHODS OF DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PLANT AND SYNTHETIC ORIGINS IN PHARMACY (REVIEW)

Тихомирова О.М., Загорулько Е.Ю., Ерузин А.А., Ожигова М.Г., Сычев М.М. **198** *Tikhomirova O.M., Zagorulko E.Y., Eruzin A.A., Ozhigova M.G., Sychev M.M.*

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ПЛАЗМОЙ НА УРОВЕНЬ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

THE INFLUENCE OF LOW-TEMPERATURE PLASMA TREATMENT ON MICROBIAL CONTAMINATION LEVEL OF MEDICINAL PLANT RAW MATERIAL

Суина И.О., Тернинко И.И. **202** *Suina I.O., Terninko I.I.*

ИЗУЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И ЧИСЛОВЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА СЫРЬЯ *ARISTOLOCHIA CLEMATITIS* L.

STUDY OF TECHNOLOGICAL PARAMETERS AND THE NUMERICAL INDICATORS OF THE QUALITY OF RAW MATERIALS *ARISTOLOCHIA CLEMATITIS* L.

Карташова Н.В., Самылина И.А., Стреляева А.В., Кузнецов Р.М. **206** *Kartashova N.V., Samylina I.A., Strelyaeva A.V., Kuznetsov R.M*

ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЭФИРНОГО МАСЛА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ СЕМЯН ЛИМОННИКА КИТАЙСКОГО (*SCHISÁNDRA CHINÉNSIS* BAILL.) С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ХРОМАТО-МАСС – СПЕКТРОМЕТРИИ

STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL RECEIVED FROM HERBAL DRUG PRODUCTS OF SHIZANDRA CHINESIS' SEEDS (*SCHISÁNDRA CHINÉNSIS* BAILL.) BY THE CHROMATOMASS-SPECTROMETRY METHOD

Буханова У.Н., Селезенев Н.Г., Сухосырова Е.А., Копашева Ю.М., Гирба Н.Н. **212** *Bukhanova U.N., Selezenev N.G., Sukhosyrova E.A., Kopasheva Y.M., Girba N.N.*

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ СБОРА «ЛОРПОЛИФИТ» ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COMBINATION PLANT MEDICINAL PRODUCT «LORPOLIPHYT» FOR THE TREATMENT OF DISEASES OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT

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

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

Филиппова Н.И., Теслев А.А. **218** *Filippova N.I., Teslev A.A.*

ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРИ ОЦЕНКЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ *IN VITRO*

APPLICATION OF MATHEMATICAL MODELING IN THE EVALUATION OF *IN VITRO* DRUG RELEASE

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

Журавлева М.С., Андронова Т.М., Нестерова Е.И. **228** *Zhuravleva M.S., Andronova T.M., Nesterova E.I.*

ИЗУЧЕНИЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА «ГМДП, ЛИОФИЛИЗАТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ» ПРОИЗВОДСТВА АО «ПЕПТЕК» (РОССИЯ) В СХЕМАХ СОЧЕТАННОЙ АНТИБИОТИКО-ИММУННОЙ ТЕРАПИИ НА МОДЕЛИ ИНФИЦИРОВАННОЙ РАНЫ КОЖИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ У КРЫС

STUDY OF WOUND HEALING ACTIVITY OF A MEDICINAL PRODUCT «GMDP LYOPHILIZATE FOR PREPARATION OF SOLUTION FOR INJECTION» PRODUCTION JSC «PEPTEK» (RUSSIA) IN THE SCHEMES OF COMBINED ANTIBIOTIC-IMMUNE THERAPY ON THE MODEL OF INFECTED SKIN WOUNDS AND SOFT TISSUES IN RATS

Гребенкин Д.Ю., Станишевский Я.М., Шохин И.Е., Стойнова А.М., Карпова М.А., Корякова А.Г., Рябова А.В., Бровченко Б.В., Смирнов А.А. **238** *Grebenkin D.Yu., Stanishevskiy Ya.M., Shohin I.E., Stoinova A.M., Karpova M.A., Koryakova A.G., Ryabova A.V., Brovchenko B.V., Smirnov A.A.*

ИССЛЕДОВАНИЕ КИШЕЧНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ И Pgp-ТРАНСПОРТА ФОСФАЗИДА С ПРИМЕНЕНИЕМ МОДЕЛИ Caco-2

Caco-2 INTESTINAL PERMEABILITY AND Pgp-AFFINITY OF PHOSPHAZIDE

Орлова В.С., Орлова Е.В., Петрова О.В., Станишевский Я.М. **244** *Orlova V.S., Orlova E.V., Petrova O.V., Stanishevskiy Ya.M.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ СЕЛЕКТИВНОГО АКТИВАТОРА Ca-ЗАВИСИМОЙ NO-СИНТАЗЫ НА ГЕМОСТАЗ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

INVESTIGATION OF A CA-DEPENDENT INDUCER ON HEMOSTASIS PROPERTIES IN LABORATORY ANIMALS

Орлова В.С., Орлова Е.В., Тимохина А.С., Станишевский Я.М. **248** *Orlova V.S., Orlov E.V., Timokhina A.S., Stanishevskiy Ya.M.*

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА «ВИТАНАМ»

THE STUDY OF IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF THE VITANAM

Демьяненко И.А., Калмыкова Н.В., Мельникова С.В., Третьякова А.В., Марченко А.И., Михина Л.В., Суслов А.П.

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГИЗИРУЮЩЕГО И ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ «МАТЕРИАЛ КОЛЛАГЕНОВЫЙ РАССАСЫВАЮЩИЙСЯ КОЛЛОСТ®, ГЕЛЬ» НА ДОКЛИНИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ *IN VIVO*

256 *Demyanenko I.A., Kalmykova N.V., Melnikova S.V., Tretyakova A.V., Marchenko A.I., Mikhina L.V., Suslov A.P*

THE STUDY OF ALLERGENIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF THE MEDICAL DEVICE «RESORBABLE COLLAGEN MATERIAL COLLOST®, GEL» IN THE PRE-CLINICAL MODELS *IN VIVO*

Секция «Клинические исследования»

«Clinical Trials» section

Радькова Е.А., Петрова И.Н., Леус К.А., Добромыслов И.А.

ОТЧЕТ О КЛИНИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ: ОБЗОР РЕГУЛЯТОРНЫХ ТРЕБОВАНИЙ И ОРГАНИЗАЦИОННО-ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ

262 *Radkova E.A., Petrova I.N., Leus K.A., Dobromyslov I.A.*

CLINICAL STUDY REPORT: AN OVERVIEW OF REGULATORY DOCUMENTS AND THE ORGANIZATIONAL AND PRACTICAL ASPECTS OF DEVELOPMENT

Раздел «Регуляторные вопросы»

«Regulatory Issues» part

Рожнова С.А., Цыпкина А.В., Белохвостова О.С.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТАНДАРТА IDEF0 ПРИ ПОДГОТОВКЕ К ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКЕ

270 *Rozhnova S.A., Tsypkina A.V., Belokhvostova O.S.*

THE USE OF THE IDEF0 STANDARD IN PREPARATION FOR PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT

Акамова А.В., Немятых О.Д., Наркевич И.А.

МНОГОВЕКТОРНЫЙ МАРКЕТИНГОВЫЙ АНАЛИЗ РОССИЙСКОГО РЫНКА ФИТОПРЕПАРАТОВ

276 *Akamova A.V., Nemyatykh O.D., Narkevich I.A.*

MULTIPLE VIEW MARKETING ANALYSIS OF THE RUSSIAN PLANT-BASED DRUGS MARKET

Демидёнок Д.А., Петрова Т.А., Наркевич И.А., Маркова В.А.

ТРЕНДЫ МИРОВОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА: НЕРЕАЛИЗОВАННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РАЗВИТИЯ

282 *Demidyonok D.A., Petrova T.A., Narkevich I.A., Markova V.A.*

GLOBAL PHARMACEUTICAL MARKET TRENDS: OPPORTUNITIES FOR DEVELOPMENT

Ибрагимова Г.Я., Гайсаров А.Х.

РАЗРАБОТКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ПРОВЕДЕНИЯ МЕРОПРИЯТИЙ В АПТЕЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЯХ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ФАРМАКОНАДЗОРА

288 *Ibragimova G.Ia., Gaisarov A.Kh.*

THE DEVELOPMENT OF THE FUNCTIONAL MODEL OF THE CONDUCTING ACTIVITIES IN PHARMACIES FOR IMPLEMENTATION OF PHARMACOVIGILANCE

Сиукаева Д.Д., Немятых О.Д., Наркевич И.А., Павленко Н.И.

КОМПЛЕКСНАЯ МАРКЕТИНГОВАЯ ОЦЕНКА РЫНКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПНЕВМОНИИ У ДЕТЕЙ

292 *Siukaeva D.D., Nemyatyh O.D., Narkevich I.A., Pavlenko N.I.*

COMPREHENSIVE ASSESSMENT OF THE MARKET DRUGS FOR TREATMENT OF PNEUMONIA IN PEDIATRICS

Раздел «История фармации»

«History of Pharmacy» part

Сидоров К.О., Лин А.А., Марченко Н.В.

АКТИВНЫЕ СУБСТАНЦИИ ДЛЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВ: ПРОШЛОЕ, НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ

298 *Sidorov K.O., Lin A.A., Marchenko N.V.*

ACTIVE SUBSTANCES FOR DOMESTIC MANUFACTURER OF MEDICINES: PAST, PRESENT AND FUTURE

Гузев К.С.

АССОРТИМЕНТЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЁМОВ, КОТОРЫЕ ПРИМЕНЯЛИ ПЕРВЫЕ ВРАЧИ

304 *Guzev K.S.*

ASSORTMENTS OF DRUGS AND TECHNOLOGICAL RECEIVES, WHICH THE FIRST DOCTORS APPLIED

Публикации партнеров **310** ***Partner Publications***

FPS
FOOD PHARMA SYSTEMS

Серия R&D струйных мельниц от FPS

PilotMill-Zero
Самая маленькая струйная мельница в мире

Струйная мельница PilotMill-Zero – это оптимальное решение от компании FPS для тонкого измельчения новых химических соединений (весом всего несколько милиграмм).

Характеристики:

- Загрузка: 10 мг – 100 мг
- Проверка возможности микронизации молекулы на ранней стадии
- Высокая производительность и надежность

Результаты внутренних испытаний струйной мельницы PilotMill-Zero на лактозе:

- Выход 7,5 мг из 10 мг (75%)
- Выход 16,4 мг из 20 мг (82%)
- Выход 190 мг из 200 мг (95%)

LaboMill / PilotMill-1
Струйные мельница

Струйные мельницы LaboMill / PilotMill-1 от компании FPS предназначены для применения в научно-исследовательских лабораториях, где на стадии разработки для изучения доступно небольшое количество вещества

Несмотря на небольшие размеры, струйные мельницы LaboMill и PilotMill-1 обеспечивают полную масштабируемость процесса тонкого измельчения совместно с пилотными и промышленными струйными мельницами FPS.

Струйные мельницы LaboMill и PilotMill-1 могут легко интегрироваться в систему изоляторов FPS для обеспечения безопасного обращения и технической обработки сильнодействующих АФИ или токсичных веществ.

Характеристики:

- Загрузка: 200 мг – 100 г
- Экспериментально доказанная степень извлечения продукта выше 85%
- Исполнение в футеровке (AISI316L / Керамика / ПТФЕ)
- Возможность дозации сырья
- Верхняя или нижняя разгрузка (PilotMill-1 и LaboMill соответственно)

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

Уважаемые читатели, подписчики и авторы журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств»!

Вы держите в руках юбилейный выпуск ваковского издания! В ноябре 2017 года исполняется 5 лет с момента выхода первого номера журнала, созданного для широкого круга специалистов фармацевтического рынка: сотрудников отделов разработки, контроля качества, регистрации, производства и развития, лабораторных центров, контрактно-исследовательских организаций, научных и образовательных учреждений, профильных органов власти.

5 лет в контексте современной России – не такой и большой период, но это и время для подведения первых итогов работы, постановки новых амбициозных задач. Мы росли и развивались вместе с российским фармрынком, что обусловило трансформацию ключевых блоков журнала. С 2014 года, когда наш рынок перешел на стандарты GMP, журнал стал выходить при поддержке ФБУ «ГИЛС и НП»; у нас появился постоянный раздел *«Регуляторные вопросы»*, где главные аудиторы, проводящие инспекции фармплощадок на соответствие стандартам надлежащей производственной практики, представляют пояснения и дают рекомендации по организации производства в соответствии с международными требованиями. В 2017 году в связи с трансформацией законодательства, касающегося лабораторных центров (внедрение стандартов GLP), с помощью Росаккредитации мы запустили постоянную рубрику, где размещаются актуальные материалы по данным вопросам, и создали информационный проект *«Новости GLP»*. И конечно же, одним из главных достижений за эти 5 лет стало признание журнала научным сообществом: с 2015 года мы входим в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук. В ближайших планах – вхождение в международные базы данных.

Спасибо, что вы остаетесь с нами, готовите интересные публикации, принимаете активное участие в проводимых редакцией мероприятиях! Надеемся, что журнал *«Разработка и регистрация лекарственных средств»* помогает вам в вашей непростой работе создания столь важных и необходимых всем нам современных лекарственных препаратов.

С уважением, директор журнала
Евгения Дорина

Уважаемая Редколлегия!

От имени Федерального бюджетного учреждения «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» и от себя лично поздравляю Вас с юбилеем журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», который за время своего существования стал надежным информационным партнером нашего института.

Пятилетие – это время, когда можно говорить о первых серьезных результатах деятельности, оценить достижения, зоны роста и потенциал дальнейшего развития. Мы по-настоящему гордимся успехами Вашего издания, которое за пятилетний срок деятельности сумело достичь статуса ведущего научно-производственного отраслевого журнала. Стоит отметить, что высокую значимость издания подтверждает факт включения журнала в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук. Без сомнения, такой серьезный результат достигнут благодаря колоссальной работе всей редколлегии, которая отлично знает пути достижения стоящих целей и сфокусирована на эффективной и качественной рабочей деятельности.

Эффективность – это то слово, которое определяет и объединяет всю нашу работу. Качество – это путеводная звезда, которая движет нас к знаниям, развитию и перспективам . Наше учреждение в равной степени с изданием «Разработка и регистрация лекарственных средств» заинтересовано в повышении уровня экспертизы на рынке – ведь это в конечном итоге сказывается на качестве и безопасности лекарственных средств.

Желаем всему Вашему коллективу новых профессиональных побед, ярких достижений и дальнейших успехов. Для нас большая честь работать с Вами в крепком тандеме.

С уважением, Директор
В.Н. Шестаков

Уважаемая редакция журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств», от лица Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии поздравляю вас с юбилеем издания!

Издание ваковского журнала в непростых экономических условиях, открытость редакции к приему статей научного сообщества и их публикация на безвозмездной основе вызывают уважение и восхищение вашей работой.

Мы ценим то, что вы делаете для всего научного мира вот уже на протяжении 5 лет. За это время сотрудники ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России неоднократно публиковали материалы о разработках и открытиях, которые проводились в стенах академии. И нам крайне приятно, что эти материалы бьmи востребованы не только нашими коллегами из научной среды, но и на производстве многих фармацевтических компаний России. Редакторскому коллективу удалось, пожалуй, невозможное: синтезировать науку и практические аспекты разработки и производства фармацевтических продуктов. Как один из постоянных авторов, я не только просматриваю свои статьи, но и узнаю об интересных новинках в области оборудования, которое при нынешнем уровне развития фармотрасли позволяет максимально автоматизировать R&D-процессы, минимизируя влияние человеческого фактора. На страницах журнала нередко появляются интересные материалы рекомендательного и разъяснительного характера в отношении трансформирующегося законодательства. Эти материалы представляют наибольшую ценность, поскольку их готовят ключевые сотрудники Минздрава и Минпромторга России, Росздравнадзора, а также ФБУ «ГИЛС и НП». Интересен и формат мероприятий, который позволяет в эпоху расцвета event-индустрии и в силу невозможности посетить все отраслевые события познакомиться с материалами, представляемыми коллегами в рамках этих событий.

Желаю вам продолжать держать высокую планку, новых интересных статей, постоянного прироста читателей и авторов и, конечно же, вслед за признанием и высокой оценкой вашей работы Министерством образования и науки Российской Федерации получить признание международного сообщества – получить статус издания из базы данных Scopus.

С наилучшими пожеланиями,
ректор ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России
Игорь Анатольевич Наркевич

Уважаемые Коллеги!

СибГМУ гордится тем, что является одним из учредителей такого важного и перспективного издания, как «Разработка и регистрация лекарственных средств», которое является уникальной площадкой для обсуждения широкого круга вопросов фармацевтической разработки и исследований лекарственных средств.

Надеемся, что академический вклад университета в части работы редакционной коллегии и научных публикаций будет способствовать продвижению журнала в международные базы цитирования для увеличения охвата целевой аудитории «Разработки и регистрации лекарственных средств».

Сибирский государственный медицинский университет поздравляет Вас с юбилеем и желает Журналу процветания и благополучия!

Ректор ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России
Ольга Сергеевна Кобякова

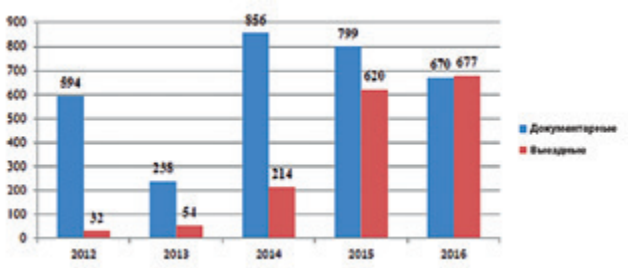
СЕМИНАР «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ АККРЕДИТОВАННЫХ ИСПЫТАТЕЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ (ЦЕНТРОВ)»

В рамках серии семинаров Национальный институт аккредитации при Федеральной службе по аккредитации провел очередной семинар, посвященный актуальным аспектам деятельности аккредитованных испытательных лабораторий (центров). В частности, сотрудники Росаккредитации и Национального института аккредитации дали подробные пояснения руководителям испытательных лабораторий, менеджерам по качеству, иным специалистам относительно текущих изменений в требованиях, предъявляемых к аккредитованным испытательным лабораториям и центрам, порядке подготовки к процедуре аккредитации и подтверждения компетентности. Эксперты также рассказали о правилах формирования областей аккредитации, одновременного прохождения процедуры подтверждения компетентности с иными процедурами, предоставлении и содержании отчетности о деятельности аккредитованных испытательных лабораторий (центров), их действии по результатам прохождения указанных процедур, а также о специфике государственного контроля за деятельностью аккредитованных испытательных лабораторий (центров).

Состоявшийся 15–16 августа 2017 года семинар был посвящен вопросам, часто возникающим у представителей испытательных лабораторий (центров) в ходе осуществления профессиональной деятельности. Отличительная особенность проводимых Национальным институтом аккредитации семинаров заключается в том, что сотрудники испытательных лабораторий (центров) могут не только получить разъяснения от компетентных специалистов, но также в рамках практической части мероприятия закрепить полученные знания, например по правилам оформления областей аккредитации при ее сокращении или расширении или по формам представления сведений о работниках испытательной лаборатории (центра), ее оснащенности средствами измерений, вспомогательным оборудованием и т.д. Не обошлось без таких практических занятий и в этот раз. Однако мы остановимся более подробно на докладе заместителя начальника управления – начальника отдела контроля за деятельностью аккредитованных лиц Федеральной службы по аккредитации **Татьяны Александровны Жмурко**.

ОБЗОР НАРУШЕНИЙ, ДОПУЩЕННЫХ ИСПЫТАТЕЛЬНЫМИ ЛАБОРАТОРИЯМИ, И РЕШЕНИЯ РОСАККРЕДИТАЦИИ ПО НИМ

В 2016 году Росаккредитация провела 1347 внеплановых выездных и документарных проверочных мероприятий, в том числе 670 документарных проверок и 677 выездных проверок на основании жалоб на деятельность аккредитованных лиц (271 проверка) и поручений Правительства Российской Федерации (41 проверка).



По итогам этих проверок было приостановлено действие аккредитации 144 аккредитованных лиц (68 – у сотрудников органов по сертификации и 76 – у сотрудников испытательных лабораторий), а для 52 было вообще прекращено действие аккредитации (13 – у сотрудников органов по сертификации и 39 – у сотрудников испытательных лабораторий). Если посмотреть на статистику I полугодия 2017 года, то из 112 проведенных по тем же основаниям, что и в прошлом году, проверок Росаккредитацией выявлены нарушения в 92 случаях. И уже приостановлено действие аккредитации 60 аккредитованных лиц, а полностью прекращено у 19.

Так в чем же причина и каковы типичные нарушения, которые допускают испытательные лаборатории?

Татьяна Жмурко среди самых несоблюдаемых испытательными центрами требований критериев аккредитации назвала следующие:

- отсутствие лабораторий по адресу, указанному в реестре аккредитованных лиц (то есть юридический адрес объекта, на который были предоставлены документы о праве собственности или аренды, оказывается фиктивным);
- отсутствие актуальных договоров аренды помещений или наличие договора аренды на офисное помещение;
- отсутствие по внесенному в реестр аккредитованных лиц адресу расположения лаборатории испытательного оборудования, средств измерений и стандартных образцов, соответствующих требованиям законодательства Российской Федерации об обеспечении единства измерений, а также иных технических средств и материальных ресурсов, необходимых для выполнения работ по исследованиям (испытаниям) и измерениям в соответствии с требованиями нормативных правовых актов, документов в области стандартизации, правил и методов исследований (испытаний) и измерений, в том числе правил отбора образцов (проб), и иных документов, указанных в области аккредитации или в реестре аккредитованных лиц;
- одновременное использование двумя и более аккредитованными лабораториями, осуществляющих деятельность по разным адресам, одного и того же испытательного оборудования и средств измерений (с одним заводским номером), что нередко случается в центрах коллективного пользования;
- отсутствие соответствующих помещений и специальных условий для органолептического анализа в лабораториях, выполняющих данный вид работ;
- частичное отсутствие расходных материалов или сведений, подтверждающих их контроль и оценку соответствия установленным требованиям;
- отсутствие компетентного персонала, отвечающего требованиям критериев аккредитации;
- отсутствие технических записей, подтверждающих фактическое проведение испытаний в соответствии с методиками, указанными в области аккредитации;
- проведение испытаний вне области аккредитации или за пределами целевой области применения методик без оценки пригодности;
- отсутствие в протоколах испытаний числовых значений фактических результатов испытаний с допустимыми отклонениями (согласно методикам испытаний и техническим требованиям);
- несоблюдение утвержденного руководства по качеству и документов СМК в деятельности испытательных лабораторий и метрологических служб;
- отсутствие или недоступность актуальных редакций документов (в том числе СМК) для персонала на всех участках деятельности лаборатории, а значит, и использование персоналом неактуальных версий документов.

НОВЕЛЛЫ АВГУСТА В СФЕРЕ АККРЕДИТАЦИИ

Ни один семинар, организованный или проходящий под эгидой одного из органов государственной власти, не обходится без разъяснений относительно вступивших в силу нормативно-правовых актов, влияющих на деятельность ключевых участников мероприятия. Именно поэтому в ходе своей презентации о государственном контроле за деятельностью аккредитованных испытательных лабораторий **Татьяна Жмурко** дала разъяснения относительно вступивших в силу в 2017 году изменений в приказ Минэкономразвития России от 30 мая 2014 г. № 329 «Об утверждении Положения о составе сведений о результатах деятельности аккредитованных лиц, об изменениях состава их работников и о компетентности этих работников, об изменениях технической оснащенности, представляемых аккредитованными лицами в Федеральную службу по аккредитации, порядке и сроках представления аккредитованными лицами таких сведений в Федеральную службу по аккредитации».

Представитель Росаккредитации рассказала о вступивших в силу изменениях, касающихся сведений, предоставляемых аккредитованными в национальной системе аккредитации органами по сертификации: они должны дополнительно предоставлять такие сведения, как дата и номер протокола исследований и измерений, сформированного при внесении испытательной лабораторией (центром) сведений в Федеральную государственную информационную систему Росаккредитации, с указанием сведений об аккредитованном лице, проводившем исследования и измерения. Как пояснила представитель Росаккредитации, эти данные можно внести в личном кабинете аккредитованного лица во ФГИС Росаккредитации при внесении сведений о выданном сертификате соответствия. «При этом обращаем внимание, что действие новой редакции распространяется на соответствующие сведения, представляемые в Росаккредитацию с 1 августа 2017 года» – пояснила **Татьяна Жмурко**.

С анонсом тематических семинаров, проводимых Национальным институтом аккредитации, можно ознакомиться на официальном сайте организации niakk.ru, а также в рубрике «Объявления» на сайте Федеральной службы по аккредитации fsa.gov.ru.

В преддверии 5-летнего юбилея научно-производственного рецензируемого журнала «Разработка и регистрация лекарственных средств» из перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, мы подготовили серию интервью с нашими учредителями, которые также подвели итоги и рассказали об эволюции своей деятельности на фармацевтическом рынке.

Открывает блок интервью компании-основателя и инициатора создания журнала – Группы компаний «Фармконтракт», которая с 2012 по 2017 гг. прошла путь от дистрибьютора технологического и аналитического оборудования, покрывающего потребности более 90% отечественных фармкомпаний и предприятий химической промышленности, до ведущего химико-фармацевтического холдинга России, предугадывающего потребности своих клиентов и предоставляющего услуги по проектированию, строительству и оснащению «под ключ» объектов всех отраслей промышленности. За это время существенно расширился и портфель оборудования, представляемого холдингом на рынке России и СНГ на правах эксклюзивного дилерства в области прецизионных аналитических систем (Agilent Technologies, Brucker, Beckman Coulter), систем лабораторного, пилотного и промышленного культивирования микроорганизмов (GE Life Science, Sartorius, Merck, Inforce, Inoxpa), климатического оборудования различного назначения и инкубаторов (BINDER, GFL), оборудования для молекулярно-биологических и генетических исследований (GE Healthcare, Beckman Coulter, Bio-RAD) систем выделения и очистки продуктов (GE Healthcare, Merck) и оснащения других известных производителей лабораторного и промышленного оборудования.

Следующий блок представлен нашим соучредителем из системы высшего профессионального образования, лучшим медицинским вузом Сибири – СибГМУ. СибГМУ – крупный научно-образовательный и клинический комплекс со 130-летней историей, включающий 7 факультетов, на которых обучаются более 5 500 студентов из 55 регионов России и 28 стран мира, вуз является абсолютным лидером по количеству бюджетных мест среди медицинских вузов за Уралом. Студенты СибГМУ имеют уникальную возможность проходить обучение и практику на базе университетских многопрофильных клиник. Клиники СибГМУ являются одними из ведущих многопрофильных учреждений в Сибири и предоставляют все виды медицинской помощи: экстренную, амбулаторную, стационарную специализированную и высокотехнологичную. Ежегодно в университетских клиниках получают медицинскую помощь более 20 тысяч пациентов из 55 регионов России.

С 2015 года СибГМУ стал не просто номинальным соучредителем нашего журнала. В настоящее время при поддержке научного управления вуза начата подготовка документов по включению журнала в перечни международных реферативных баз данных Scopus и Web of Science, а сотрудники и аспиранты СибГМУ в каждом номере делятся своими научными открытиями с нашими читателями.

Надеемся, что представленные интервью положат начало хорошей традиции – новому формату регулярных публикаций.

Директор по проектированию и технологии ГК «Фармконтракт» Константин Фроленков подготовил для нас материал, раскрывающий особенности работы холдинга при создании «под ключ» объектов для разработки и культивирования штаммов микроорганизмов как в научно-исследовательских, так и в промышленных целях.

К.А. Фроленков
ГК «Фармконтракт», Москва

ПОТЕНЦИАЛ ПРИМЕНЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ МЕТАБОЛИТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ

Разработка лекарственных средств является комплексным процессом, включающим не только поиск новых молекул, обладающих заданной биологической активностью, но и выявление на ранних этапах разработки определенных рисков, связанных с эффективностью и безопасностью. Это относится как к инновационным, так и к воспроизведенным (дженерики) лекарственным средствам.

Основными задачами, требующими особого внимания при разработке лекарственного средства, являются:

1. Доказательство биоэквивалентности – для генерических лекарственных средств;
2. Поиск возможных метаболитов – для инновационных молекул.

Исследования и доказательство биоэквивалентности пероральных лекарственных форм является обязательным условием разработки и регистрации генерических лекарственных средств [1].

Зачастую такие исследования выполняются с участием здоровых добровольцев, и фармакокинетический профиль лекарственного препарата строится по результатам определения концентрации активного ингредиента в плазме крови во времени [2].

Для активных ингредиентов, подвергающихся быстрому метаболизму в организме, применяют также метод определения первичных метаболитов в плазме крови. Кроме того, если известно, что исследуемое лекарственное вещество подвергается биотрансформации, контролируемой генетически полиморфными изоферментами цитохрома Р-450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6), для снижения вариабельности фармакокинетических параметров целесообразно генотипирование добровольцев с целью исключения участия в исследовании лиц с генотипами «медленного» и «быстрого» метаболизма.

ПЕРВИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ АФИ

С этой целью широко применяются стандартные образцы первичных метаболитов активных фармацевтических ингредиентов (АФИ), используемые как на стадии разработки аналитических методик, так и на стадии биоаналитических испытаний.

Метаболическое картирование, или определение метаболического профиля, АФИ – это исследование, позволяющее на ранних этапах разработки инновационных лекарственных средств предсказать направление метаболизма АФИ, выявить активные метаболиты, определить метаболическую устойчивость либо, наоборот, выбрать пролекарство в качестве основной молекулы-кандидата для разработки и исследований.

Любая из указанных задач, будь то синтез определенного метаболита или исследование метаболического профиля АФИ, сводится к селективному введению функциональных групп в молекулу.

Задача селективного введения функциональных групп в органическом синтезе до сегодняшнего дня имеет важное значение. Многие научные коллективы разрабатывают специфические катализаторы окисления химических соединений в определенное положение углеродной цепи, однако до настоящего времени эти решения остаются трудоемкими и не могут быть

воспроизведены с целью коммерческого производства [3].

Другим методом является выделение специфических ферментных систем, включающих цитохромы, оксигеназы, редуктазы, позволяющие моделировать процесс метаболизма лекарственных средств. Отличительной особенностью данной техники является специфичность и селективность, однако требования к условиям проведения экспериментов, конформационная нестабильность ферментов, необходимость функционирования ферментативных комплексов делает такой подход мало продуктивными, и используется он в основном как модель для фундаментальных исследований [4].

Наиболее перспективный путь наработки метаболитов – использование рекомбинантных клеточных культур, позволяющий соединить в одной клетке (бактерий или одноклеточных дрожжей) всю цепочку ферментов и использовать собственные инструменты и механизмы клетки для обеспечения процессов ферментативного метаболизма активных фармацевтических ингредиентов [5].

Принцип использования микроорганизмов для селективного синтеза стереоизомеров не является новым. Примером являются работы Нейберга и Хирша по превращению бензальдегида в (-)-фенилацетилкарбинол еще в 1921 году.

На сегодняшний день в мире накоплено достаточно экспериментальных данных для направленного синтеза производных лекарственных средств с использованием рекомбинантных микроорганизмов, экспрессирующих широкий спектр цитохромов CYP3A4, CYP2D6, CYP2C17, редуктаз, таких как стероид-5-альфаредуктаза, дегидрогеназа, 20-ГСД и другие ферменты [6–8].

Это достаточно широкая группа ферментов, отвечающая в организме за различные функции, в том числе и метаболизм ксенобиотиков, включая лекарственные средства, токсины и загрязняющие агенты, а также метаболизм эндогенных веществ, таких как стероиды и простагландины [9, 10].

Концептуально ферменты, метаболизирующие лекарственные средства, делятся на две группы:

- Ферменты фазы I катализируют (в основном окислительные) реакции, которые обычно приводят к введению функциональной группы в молекулы субстрата. Семейства ферментов фазы I включают цитохромы P450 (CYP) и флавинзависимые монооксигеназы (FMO), также моноаминоксидазы (MAOs), дегидрогеназы, изомеразы, гидролазы и другие.
- Ферменты фазы II катализируют конъюгативные реакции, обычно приводящие к образованию растворимых соединений, которые легче выводятся из организма. Ферменты семейства II фазы включают UDP-глюкуронозилтрансферазы (UGT), глутатионтрансферазы (GST), сульфотрансферазы (SULT) и N-ацетилтрансферазы (NAT).

С точки зрения промышленности задачи, перечисленные в таблице 1, могут быть определены в связи с направлением исследований *in vitro* метаболизма лекарств и биологическим объектом для изучения метаболитов лекарственных средств. Выбор биокатализатора(-ов) диктуется решаемыми задачами.

В качестве субстратов могут применяться:

- прототипы лекарственных препаратов / лекарственные препараты;
- биологически активные продукты природного происхождения;
- полусинтетические производные биологически активных продуктов природного происхождения.

Таблица 1.

Задачи и модели метаболизма, применяемые в исследовательских целях

Применение	Подходящий биокатализатор
1. Аналитический профиль препаратов и кандидатов а) установление метаболического профиля с анализом структурно-функциональных свойств; б) предсказание наиболее предпочтительного метаболического пути *(in vivo)*	Коммерчески доступные препараты печени. Рекомбинантные цитохромы человека / млекопитающих. Рекомбинантные бактерии и дрожжи
2. Синтез метаболитов (в масштабе нескольких миллиграммов) а) установление / подтверждение структуры выделенных / очищенных метаболитов (МС, ЯМР)	Рекомбинантные цитохромы человека. Рекомбинантные бактерии и дрожжи
3. Препаративный синтез основных метаболитов а) для фармакологической и токсикологической оценки (в масштабе до 100 мг); б) для программ по скриннингу производных АФИ (в масштабе до нескольких грамм)	Рекомбинантные цитохромы человека. Рекомбинантные бактерии и дрожжи
4. Идентификация и производство новых метаболитов с новыми и/или модифицированными свойствами в качестве соединений-лидеров для программ скриннинга (в масштабе до нескольких грамм)	Рекомбинантные бактерии и дрожжи

Развитие фармацевтической отрасли неизбежно способствует росту потребности в стандартных образцах, особенно применяемых на аналитических этапах различных фаз клинических испытаний. Основным направлением разработки отечественных фармпредприятий является комбинирование препаратов различных фармакотерапевтических групп для достижения эффекта синергии в лечении хронических заболеваний [24]. При этом понимание совместного метаболизма лекарственных средств и влияние на их эффективность и безопасность становится ключевой задачей как на этапе разработки нового препарата, так и на этапе клинических испытаний.

Таблица 2.

Цитохром-Р-450-катализируемые превращения прокариот [11–16]

Микроорганизм	Штамм	Р450	Катализируемая реакция / субстраты
Arthrobacter simplex	ATCC 6946		Гидроксилирование метаболитов Даназола
Bacillus megaterium	ATCC 14581	P450рм-1	Гидроксилирование жирных кислот и их производных
Bacillus megaterium *Corynebacterium* sp. *Escherichia coli* *Moraxella* sp.	ATCC 13368	P450meg	15β-гидроксилирование 3-оксо-Δ^4-стероидов Гидроксилирование боковой цепи гваякола
Mycobacterium rhodochrous *Pseudomonas oleovorans*	UC 6176		Конверсия тромбоксана B_2 в ди-нортромбоксан B_2 Деалкилирование 4-алкоксибензоатов
Pseudomonas putida *Saccharopolyspora erythreae*	ATCC 17453	P450cam	Окисление камфоры и других терпенов Дегалогенирование хлорпикрина, Гидроксилирование 6-деоксиэритронолида В в эритронолид В
Streptomyces carbophilus *Streptomyces setonii* *Streptomyces* sp.		P450sca1 P450sca2	Гидроксилирование компактина в правастатит О-деметилирование лигниноподобных веществ (вератрол, гваякол) Окисление холестерина
Streptomyces griseolus	ATCC 11796	P450su1 P450su2	Окисление производных сульфонилмочевины
Streptomyces griseus *Streptomyces lavendulae*	ATCC 13273	P450soy	Неспецифичные реакции окисления, деметилирования, гидроксилирования Генерирование метаболитов амитриптилина
Streptomyces lincolnensis	ATCC 25466		N-деметилирование амитриптилина, нортриптилина, кодеина и метазоцина
Streptomyces rimosus	NCIB 8229		N-деметилирование диазепама
Streptomyces paucisporogenes	ATCC 12596		N-деметилирование кодеина
Streptomyces spectabilicus	NRRL 2494		Гидроксилирование акроницина в 9-гидроксиакроницин
Streptomyces sp. *Xanthobacter* sp.	UC 5761		18- и 19- гидроксилирование PGE_{2a} и PGF_{2a}

Таблица 3.

Цитохром-Р-450-катализируемые превращения эукариот [11–16]

Микроорганизм	Штамм	Р450	Катализируемая реакция / субстраты
Aspergillus alleaceus	QM 1915		Гидроксилирование акроницина в 9-гидроксиакроницин
Aspergillus alleaceus	NRRL315		6-О-деметилирование папаверина
Aspergillus ochraceus			C_{11} гидроксилирование прогестерона
Candida albicans		$P450_{14dm}$	14а-деметилирование ланостерола
Candida tropicalis (various strains)		$P450_{alk}$	Окисление гексобарбитала, аминопирина, этилморфина, 4′-гидроксилирование бифенила
Cunninghamella bainieri (C. echinulata)	ATCC 9244		Ароматическое гидроксилирование, N- и О-деметилирование амитриптилина, хлорпромазина, кодеина, диазепама и метазоксина
Cunninghamella blakesleeana	CMI 53585		N-деметилирование кодеина, диазепама
Cunninghamella echinulata	NRRL 3655 IMI 199844		N-деметилирование амитриптилина, хлорпромазина, кодеина, диазепама и метазоксина
Cunninghamella elegans	ATCC 9245 ATCC 36112		О-деметилирование 10,11- диметоксиопорфина в изоапокодеин
Fusarium reticulatum	CBS 18435		Гидроксилирование даназола и метаболитов
Microascus trigonosporus	NRRL1570		18- и 19-гидроксилирование 9-оксо-13-(цис)-простеноевой кислоты
Rhizopus nigricans	ATCC 6227b		C_{11} гидроксилирование прогестерона
Rhizopus stolonifer	ATCC 12939		Гидроксилирование даназола и метаболитов
Saccharomyces cerevisiae		$P450_{14dm}$	14а-деметилирование ланостерола, окисление бензо[а] пирена, нафтиламина, циклофосфамида, гексобарбитала, аминопирина,
Trichosporon cutaneum			Деметилирование аминопирина

Таблица 4.

Цитохром-Р-450 катализируемые превращения в рекомбинантных микроорганизмах (отдельные представители) [17–23]

Микроорганизм	Штамм	Р450	Субстрат / Катализируемая реакция
Salmonella typhimurium *Escherichia coli*	TA1535 BL21	CYP1A2	Кофеин / N3-деметилирование Флутамид / 2-гидроксилирование Напроксен / О-деметилирование Оланзапин / N-деметилирование и 2-/ 7-гидроксилирование Пропранолол / N-дезизопропилирование
Escherichia coli	DH5a	CYP2A6	Кумарин / 7-гидроксилирование Эфавиренц / 7-гидроксилирование Летрозол / образование карбинола Пилокарпин / 3-гидроксилирование Тегафур / образование 5-фторурацила
Escherichia coli	JM109	CYP2B6	Циклофосфамид / 4-гидроксилирование Эфавиренц / 8-гидроксилирование Ифосфамид / 4-гидроксилирование Невирапин / 3-гидроксилирование Трамадол / N-деметилирование
Escherichia coli *Saccharomyces cerevisiae*	JM109 AH22 BJ5457	CYP2C8	Амиодарон / N-деэтилирование Имитиниб / N-деметилирование Монтелукаст / 36-гидроксилирование Паклитаксел / 6а-гидроксилирование Розиглитазон / N-деметилирование и р-гидроксилирование
Escherichia coli *Saccharomyces cerevisiae*	DH5a PYPD	CYP2C9	Диклофенак / 4-гидроксилирование Этодолак / 6- и 7-гидроксилирование Флуоксетин / N-деметилирование Ибупрофен / 2- и 3-гидроксилирование Лорноксикам / 5'-гидроксилирование
Saccharomyces cerevisiae	AH22	CYP2C19	Амитриптилин / N-деметилирование Клопидогрель / образование 2-оксо-клопидогреля Имипрамин / N-деметилирование Омепразол / 5-гидроксилирование Венлафаксин / N-деметилирование
Pichia pastoris *Saccharomyces cerevisiae*	X-33 AH22	CYP2D6	Декстрометрофан / О-деметилирование Лоратадин / окисление до дезлоратадина Тамоксифен / 4-гидроксилирование Трописетрон / 5- и 6-гидроксилирование Венлафаксин / О-деметилирование
Saccharomyces cerevisiae	YB225 BY4741	CYP3A4/5	Кларитромицин / 14-(R)-гидроксилирование и N-деметилирование Кодеин / N-деметилирование Эрлотиниб / О-деметилирование Невирапин / 2-гидроксилирование Силденафил / N-деметилирование

В этом контексте трансгенные рекомбинантные микроорганизмы становятся не только востребованными продуцентами метаболитов, но и отличной моделью для изучения взаимодействия лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 12 апреля 2010 года № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
2. Оценка биоэквивалентности лекарственных средств. Методические указания Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 12.05.2008.
3. J.A.R. Salvador et al. Catalytic Oxidative Processes in Steroid Chemistry: Allylic Oxidation, – Selective Epoxidation, Alcohol Oxidation and Remote Functionalization Reactions // Current Organic Chemistry. 2006. № 10(17). P. 2227–2257.
4. T. Shimada, H.Yamazaki, Cytochrome P450 Reconstitution Systems // Methods in Molecular Biology. 1998. V. 107. P. 85-94.
5. E.M. Gillam. Human cytochrome P450 enzymes expressed in bacteria: reagents to probe molecular interactions in toxicology // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 1998. № 25. P. 877–886.
6. M. Geuer. Chemistry Today. 2013. V. 31(3). URL: http://www.teknoscienze.com/tks_issue/vol-314/ (дата обращения 25.08.2017).

7. M. Dietrich et al. Recombinant production of human microsomal cytochrome P450 2D6 in the methylotrophic yeast Pichia pastoris // Chembiochem. 2005. № 6(11). P. 2014–2022.
8. V. Shkumatov et al. Prikl Biokhim Mikrobiol. 2006. № 42(5). P. 539–546.
9. F.P. Guengerich. Human cytochrome P450 enzymes // Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry / Ed. by Or. de Montellano, R. Paul. – New York: Springer, 2005. P. 377–530.
10. A. Parkinson. Biotransformation of xenobiotics // Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons / ed. by Klaassen, C.D. – New York: McGraw-Hill, 2001. P. 133–224.
11. F.S. Sariaslani. Microbial cytochromes P-450 and xenobiotic metabolism // Adv Appl Microbiol. 1991. № 36. P. 133–178.
12. J.P. Rosazza, R.V. Smith. Microbial models for drug metabolism // Adv Appl Microbiol. 1979. № 25. P. 169–208.
13. G.J. Sewell, C.J. Soper, R.T. Parfitt. The screening of some microorganisms for their ability to N -dealkylate drug molecules // Appl Microbiol Biotechnol. 1984. № 19. P. 247–251.
14. R.V. Smith, P.J. Davis. Induction of xenobiotic monooxygenases // Adv Biochem Eng. 1980. № 14. P. 61–100.
15. R. Azerad. Microbial models for drug metabolism // Adv Biochem Eng/ Biotechnol. 1999. № 63. P. 169–218.
16. K. Srisilam, C. Veeresham. Biotransformation of drugs by microbial cultures for predicting mammalian drug metabolism // Biotechnol Adv. 2003. № 21. P. 3–39.
17. B.B. Palma, C.W. Fisher, J. Rueff, M. Kranendonk. Prototype systems containing human cytochrome P450 for high throughput real-time detection of DNA damage by compounds that form DNA-reactive metabolites // Chem. Res. Toxicol. 2016. № 29. P. 747–756.
18. P. Quehl, J. Hollender, J. Schüürmann, T. Brossette, R. Maas, J. Jose. Co-expression of active human cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 reductase on the cell surface of Escherichia coli // Microbial Cell Factories. 2016. V. 15. № 1. P. 1.
19. P. Souc˘ek. Expression of Cytochrome P450 2A6 in Escherichia coli // Archives of Biochemistry and Biophysics. 1999. V. 370. № 2. P. 190–200.
20. N. Hanioka, K. Matsumoto, Y. Saito, S. Narimatsu. Functional Characterization of CYP2C8.13 and CYP2C8.14: Catalytic Activities toward Paclitaxel, Nordic Pharmacological Society // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2007. № 107. P. 565–569.
21. P.K.N. Rao, S.K. Suman, Y.R. Kiran. Co-Expression of Recombinant Human CYP2C9 with Human Cytochrome P450 Reductase in Protease Deficient S.cerevisiae Strain at a Higher Scale Yields an Enzyme of Higher Specific Activity // Drug Metabolism Letters. 2010. № 4. P. 246–253.
22. M. Dietrich, L. Grundmann, K. Kurr, L. Valinotto, T. Saussele, R.D. Schmid, S. Lange. Recombinant Production of Human Microsomal Cytochrome P450 2D6 in the Methylotrophic Yeast Pichia pastoris. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222729 (дата обращения 25.08.2017).
23. M. Fasullo, J. Freedland, N. St. John, C. Cera, P. Egner, M. Hartog, X. Ding. An InVitro System for Measuring Genotoxicity Mediated by Human CYP3A4 in Saccharomyces cerevisiae // Environmental and Molecular Mutagenesis. 2017. № 58(4). P. 217–227.
24. М. Гетьман. Локализация, как форма трансфера знаний, опыта и навыков // Новости GMP. 2017. № 1(12). С. 86–89.

Летом 2016 года в журнале «Разработка и регистрация лекарственных средств» появилась новая секция, посвященная вопросам биотехнологий в производстве фармацевтических продуктов. Эта секция возникла в связи с открытием нового направления в структуре нашего учредителя, ГК «Фармконтракт», и включением в его портфель представляемого высокотехнологичного оборудования биореакторных систем американской компании GE Healthcare. Команда биотехнологов занимается не только проработкой решений для биопроизводств России, но и активно делится своим практическим опытом, раскрывает кейсы, опирающиеся на прошлую работу по созданию лидирующих в области биотехнологических разработок, проектированию производственной площадки на начальном этапе и постановке промышленного производства АФС для препаратов «Нейпомакс», «Растан» и готового лекарственного средства «Инфибета». Для нашего юбилейного выпуска эти специалисты международного уровня в сфере биотехнологий подготовили материал о действии нестероидных противовоспалительных средств, опиоидов и их аналогов.

АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА ИНГИБИРОВАНИЕ НОЦИЦЕПТИВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИНЦИПИАЛЬНО ИЗМЕНЯТ БУДУЩЕЕ МЕДИЦИНЫ

В настоящее время одной из основных причин обращения людей за врачебной помощью является боль. До 20% взрослого населения развитых стран страдает от хронической боли. Боль – это защитная реакция организма, сигнал об опасности, формирующийся в нашем мозге при негативном воздействии на органы и ткани, роль которого в том, чтобы сохранить организм человека в рабочем состоянии. Другими словами, это защитная реакция организма человека ради своего спасения, однако развитие патологических процессов может нарушать эту защитную функцию и приводить к необоснованным страданиям.

Первая сигнальная молекула, которая «сообщает» центральной нервной системе о боли, была открыта в 1931 году. Её назвали веществом Р. Лишь спустя 40 лет была определена её химическая структура – нейропептид из семейства тахикининов, Приставка «нейро» здесь потому, что пептид (или, проще, белок) вырабатывается нервными клетками – нейронами и выделяется из них при возникновении боли. Дальнейшие исследования показали наличие большего количества других сигнальных молекул, принимающих участие в болевых ощущениях, и до конца полная картина сложных взаимодействий системы распознавания боли (ноцицептивная система) и системы внутренней компенсации боли (антиноцицептивная или анальгетическая система) не известны до сих пор.

Во все времена проблема устранения боли являлась актуальной. Обезболивание – устранение чувствительности организма к боли искусственным путем.

«Путь к открытию обезболивающих препаратов был труден и долог. Когда-то для этих целей применяли только народные средства, а при проведении хирургических операций – алкоголь, опий, скополамин, индийскую коноплю и даже такие негуманные способы, как оглушение ударом по голове или частичное удушение»[1].

Первое обезболивающее средство – ацетилсалициловая кислота – было синтезировано в 1853 году. Сегодня оно известно во всем мире как «Аспирин». С тех пор получено множество соединений различной химической природы, которые подавляют болевые ощущения без нарушения сознания. Эти средства получили название анальгетики.

Современная медицина – это огромный рынок лекарственных препаратов. Различные обезболива-

[1] Регистр лекарственных средств России. РЛС-Пациент. 2003. – Москва, Регистр Лекарственных Средств России, 2002. Часть 3. Мир лекарств, Глава 3.9. Ненаркотические анальгетики и нестероидные противовоспалительные средства.

ющие препараты широко представлены в каждой аптеке. В качестве обезболивающих средств традиционно используются: морфин и другие опиоиды, аспирин и другие нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), а также разнообразные вещества неспецифического действия – антиконвульсанты и антидепрессанты. Из-за различного характера, локализации боли и причин ее возникновения сильные обезболивающие широко востребованы, в связи с чем возникают вопросы: насколько эффективны современные, подавляющие боль лекарственные средства и нужны ли нам сегодня обезболивающие препараты нового поколения? Чтобы получить ответы на эти вопросы мы обратились к экспертам.

Эксперт-биотехнолог в области биофармацевтического производства ГК «Фармконтракт», ранее научный сотрудник лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН, к.х.н. *Бобрускина Наталья Вячеславовна*:

Если сосредоточиться на проблеме лекарственных препаратов, используемых сегодня для снятия боли и воспаления, то можно обнаружить дефицит фармакологических мишеней, то есть того на что используемые сегодня лекарства оказывают прямое действие. Побочное действие в этом случае можно особо не учитывать, ведь у всех лекарственных препаратов оно проявляется всегда. Из основных реализованных идей по снятию болевых ощущений наша цивилизация использует технологию блокирования синтеза простагландинов циклооксигеназами (ЦОГ) – путь действия нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) и активирование антиноцицептивной системы – путь действия опиоидов и их аналогов. Самые доступные НПВС сегодня не снимают эффективно сильные и хронические боли. Низкая эффективность этих средств предполагает увеличение курса приёма, а это сопровождается серьёзными осложнениями: увеличением риска сердечно-сосудистых заболеваний, таких как тромбообразование, инфаркт миокарда, инсульт и расстройство желудочно-кишечного тракта, включая образование язвы. При этом они обладают бесспорным плюсом – отсутствием эффекта привыкания и психотропного действия. Опиоиды способны активировать опиоидные рецепторы, что приводит к активации антиноцицептивной системы, так что в итоге болевые стимулы, формирующиеся в периферической нервной системе, не распространяются далее и не достигают тех центров головного мозга, где боль как чувство или эмоция формируется. Система ноцицепции, генерирующая и проводящая болевой сигнал в ЦНС от участков воспаления или повреждения, противостоит системе опиоидных рецепторов, поэтому в результате долгого употребления опиодных анальгетических средств развиваются эффекты толерантности (сильное падение эффективности обезболивающего действия) и гиперальгезии (болезненные стимулы вызывают боль большей интенсивности, чем должны быть в норме).

Как НПВС, так и опиоидные анальгетики постоянно модифицируются. Предлагаемые формы с замедленным высвобождением или комбинации с защитными веществами направлены на снижение побочных эффектов и повышение потребительских качеств традиционных препаратов. Однако не всегда эти манипуляции приводят к желаемому эффекту: например, недавно консультативный комитет FDA пришел к выводу, что преимущества переформулированной формы выпуска «Оксиморфина» («Opana ER») несопоставимы с рисками угрозы для здоровья, и рекомендовало компании Endo Pharmaceuticals начать добровольное изъятие препарата с рынка. Ранее с рынка был вынужден уйти препарат «Rofecoxib» – НПВС с селективным действием на ЦОГ-2, который, несмотря на селективность к ферменту, увеличивал риск сердечно-сосудистых заболеваний в течение 18 месяцев после начала приема.

Таким образом, с точки зрения потребителя, существует острая необходимость в поиске природных молекул, эффективно подавляющих боль через взаимодействие с новыми типами клеточных мишеней, что приведет к разработке новых методов лечения болевых синдромов и производству лекарств, которые смогут дополнить две существующие группы анальгетических препаратов.

Пока в этом сегменте нет реальных препаратов на рынке, но поиски химических и полипептидных лигандов ведутся множеством научных подразделений как в академической науке, так и в лабораториях крупных фармацевтических компаний.

На протяжении многих лет в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А Овчинникова РАН (ИБХ РАН) ведутся масштабные работы, направленные на поиск анальгетиков нового поколения, специфично воздействующих на молекулярные механизмы генерации боли с минимальными побочными эффектами.

Одним из основоположников данного направления исследований был академик РАН Евгений Васильевич Гришин. Специалисты ИБХ РАН, обладая колоссальным опытом исследований биоактивных молекул пептидной природы, в поиске перспективных кандидатов на роль анальгетиков нового поколения обратились к природным источникам – ядам пауков, скорпионов и морских беспозвоночных. Как оказалось, природные яды фактически представляют собой своеобразные библиотеки полипептидов с различными биологическими свойствами, которые содержат целые семейства полипептидных молекул – селективных модуляторов функциональной активности отдельных рецепторов и ионных каналов. В распоряжении ученых оказались созданные самой природой и уникальные по своему многообразию молекулы, которые потенциально могут стать высокоэффективными анальгетиками. Пептидные токсины как предшественники лекарственных средств имеют массу преимуществ. У них совершенно уникальная специфичность действия, достаточно высокая стабильность, низкая иммуногенность и, что немаловажно, нет особых проблем с производством.

Руководитель лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН, д.х.н. *Козлов Сергей Александрович*:

Боль – это колоссальная проблема для всего человечества, к тому же хроническая боль, возникающая при отсутствии реального угрожающего фактора, в настоящее время является значимой социальной, экономической и, естественно, медицинской проблемой. Именно эта разновидность боли является основной причиной обращения пациентов за медицинской помощью. Согласно официальной статистике, пятая часть всех пациентов, страдающих хроническими болевыми синдромами, не реагируют на традиционные анальгетики, а это миллионы людей. Следовательно, задача создания обезболивающих препаратов нового поколения является архиважной и требует пристального внимания не только ученых и медиков, но и представителей бизнес-сообщества.

В числе кандидатов на принципиально новые лекарства ученые стали рассматривать препараты пептидной природы, ориентированные на ингибирование ноцицептивной системы. В паре ноцицепция – антиноцицепция первая система играет ведущую роль, снижение ее активности не вызывает ответа опиоидзависимой системы компенсации боли. Поэтому не стоит ожидать наркотического действия от препаратов, нацеленных на снижение чувствительности ноцицептивной системы. Эффективность прямого воздействия на ноцицептивную систему выше, чем опосредованный эффект НПВС через систему регуляции синтеза простагландинов. Исходя из этого, вещества ингибиторы ноцицептивной системы могут занять свободную пока нишу анальгетических препаратов, одновременно эффективно снижающих боль и развитие воспаления без проявления эффекта наркотической зависимости. А значит, пригодных для открытой безрецептурной продажи.

В настоящее время в нашей лаборатории созданы уникальные базы данных пептидных молекул. При поиске новых анальгетиков мы изучаем лекарственные растения, токсины членистоногих, змей и морских беспозвоночных и уже нашли в них несколько природных молекул, эффективно подавляющих боль через взаимодействие с новыми типами клеточных мишеней. Среди них несколько перспективных анальгетиков – ингибиторов ноцицептивного пути прошли или были предложены к доклиническим испытаниям при поддержке федеральных целевых программ Минпромторга и Минобрнауки России.

Наши анальгетики, в практический потенциал и безопасность которых мы верим, взаимодействуют с ионотропными рецепторами, располагающимися на чувствительных нейронах преимущественно в периферической нервной системе. Из множества рецепторов мы отобрали для нацеленного поиска активных молекул те, которые распознают закисление внеклеточной среды, температуру и внеклеточные метаболиты воспаления, как одни из наиболее перспективных мишеней для фармакологического воздействия.

Еще в середине XX века было показано, что большие дозы капсаицина (алкалоид перца, ответственный за характерное жжение этого продукта) вызывают у экспериментальных животных новый тип анальгезии. После введения капсаицина вначале наблюдается возбуждение и поведенческая реакция, вызванная болью, а затем наступает длительный период потери чувствительности к ряду внешних стимулов. Рецептор капсаицина у млекопитающих был идентифицирован: это *transient receptor potential vanilloid 1* (ваниллоидный рецептор 1) или TRPV1, который сегодня можно считать главным молекулярным интегратором болевого сигнала. TRPV1 играет важную роль в ряде патологических состояний: при болях воспалительного характера, раке, нейропатических и висцеральных болях,

заболеваниях дыхательных путей, панкреатитах и мигренях. Для коррекции генерации и проведения сигнала боли было разработано много антагонистов TRPV1, обладающих противоболевым эффектом, но побочным эффектом регулирования работы TRPV1 стала гипертермия, как следствие сильного ингибирования этого термочувствительного рецептора.

Успехи в области поиска новых анальгетических молекул были достигнуты при анализе состава экстрактов морских анемон. Одни из самых древних хищников на планете, эти малоподвижные морские обитатели вырабатывают в специальных стрекательных клетках яд для защиты от нападения и ловли добычи. Для людей практически все виды морских анемон неопасны, но контакт с ними может вызвать болезненное жжение из-за содержания в яде цитотоксинов. Хроматографическое разделение яда морских анемон до индивидуальных компонентов и тестирование таких компонентов в тестах *in vitro* позволило найти первые лиганды с анальгетической активностью нового типа.

Нам удалось в экстракте морской анемоны найти пептидный модулятор TRPV1, который не просто ингибировал рецептор в модельных экспериментах *in vitro*, но изменял действие на потенцирующее при использовании малых концентраций активирующих агентов. «Мягкое» действие на рецептор и очень незначительный гипотермический эффект (понижение температуры тела на 0,6 °С) пептида, названного APHC3, сочетается с сильным анальгетическим эффектом в дозах 0,01–0,1 мг/кг. Испытания пептида на животных показали его полную безвредность (4 класс безопасности, МТД>2000 мг/кг при в/м и подкожном методе введения), поэтому следующим этапом будет проведение 1-й стадии клинических испытаний, где эффективность обезболивающего действия пептида необходимо будет сравнить с действием плацебо и/или НПВС при артритах, а также с действием опиоидных анальгетиков при паллиативной помощи. Имеющиеся на сегодня экспериментальные данные более чем позитивны. Действие пептида APHC3 в экспериментах *in vivo* в тесте «горячая пластина» показало эффективность его применения в дозе 0,1 мг/кг, достоверно неотличимую от эффективности использования морфина в дозе 1 мг/кг. В эксперименте «открытое поле» APHC3 в этой же дозе не изменял тревожность и двигательную активность по сравнению с контрольной группой. Влияние на систему гомеостаза и сердечно-сосудистую систему не обнаружено.

Из экстракта двух различных морских анемон удалось также выделить два пептида различной структуры, которые были способны усиливать активность рецептора TRPA1 – самого непонятного и очень важного рецептора ноцицепции.

TRPA1 экспрессируется в чувствительных нейронах, иннервирующих различные ткани, такие как кожа, эпителий кишечника или лёгких, мочевой пузырь, причем он практически всегда колокализуется с TRPV1 и его обнаруживают примерно на половине TRPV1-положительных чувствительных нейронов. Основная функция этого рецептора – распознавание различных химических соединений, в том числе воспалительных агентов, вырабатываемых нашим организмом в ответ на повреждение (воспалительная защитная реакция). Вещества, активирующие TRPA1, вызывают жжение, механическую и термическую гиперчувствительность, а также нейрогенное воспаление. Наследственное заболевание синдром эпизодической боли, которое характеризуется неожиданно возникающей изнурительной болью при голодании или физической нагрузке, связано с единственной мутацией в этом рецепторе, приводящей к его избыточной активности. В то время как рассмотренный выше рецептор TRPV1 чувствует опасное повышение температуры, у млекопитающих TRPA1 активируется температурами ниже 18 °С в модельных экспериментах. Однако исследования нокаутных мышей показали, что он не принимает участия в восприятии холода в норме, но участвует в холодовой гиперчувствительности при воспалении.

Оба пептида имеют значительный потенциал для дальнейшей разработки и внедрения как анальгетических и/или противовоспалительных агентов. Обезболивающие и противовоспалительные эффекты пептидов уже продемонстрированы, наилучшие результаты показал пептид Ms 9a-1 в дозе 0,3 мг/кг при внутривенном введении в тестах на развитие воспаления CFA. Следующим этапом разработки для обоих пептидов должны стать доклинические исследования.

Экстракт из еще одного вида морской анемоны помог найти и охарактеризовать пептидный ингибитор для ASIC-каналов млекопитающих, названный Ugr 9-1. Рецепторы ASIC выполняют роль детекторов кислоты во многих типах клеток периферической и центральной нервной системы. Они осуществляют важную функцию мониторинга локального изменения внеклеточного уровня pH при нормальной нейрональной активности в ЦНС. Однако задействованы они и в патологических процессах. При ишемии и гипоксии усиливается гликолиз, в результате чего происходит накопление молочной кислоты и последующий ацидоз ткани. В периферической нервной системе и в тканях внутренних органов ASIC ответственны за чувствительность к боли, возникающей при тканевом ацидозе в мышцах, сердечной ишемии, повреждении роговицы, воспалении и местной инфекции. В нейронах периферической нервной системы в основном представлены рецепторы ASIC3, активность которых необходимо понижать для купирования нежелательной боли.

Пептид Ugr 9-1 имеет малый размер – 29 аминокислотных остатков, что делает его пригодным для прямого химического синтеза. Стабильность структуры и устойчивость к деградации обеспечиваются дву-

мя дисульфидными мостиками, поэтому правильное замыкание дисульфидов не является большой технологической проблемой. Для кислотно-чувствительных каналов наиболее показательными тестами на животных моделях являются эксперименты по измерению кислото-индуцированных болей и тепловой гиперчувствительности, в которых пептид проявлял значительный анальгетический эффект в дозе 0,1–0,5 мг/кг.

Помимо пептидов из морских анемон, хотелось бы отметить растительный лиганд, получивший название севанол. Эта молекула – 9,10-диизоцитриловый эфир эпифилловой кислоты – была получена из уксуснокислого экстракта лекарственного растения *Thymus armeniacus*, мы его знаем как чабрец, и полезное влияние этого растения на человека неоднократно упоминается в разных источниках. Севанол является первым природным низкомолекулярным соединением, ингибирующим обе компоненты тока канала ASIC3. На моделях кислото-индуцированной боли севанол эффективен в дозе 0,1–1 мг/кг, но в тесте тепловой гиперчувствительности, вызванной воспалительным процессом, он показал ярко выраженный анальгетический эффект в дозе 0,01 мг/кг. Высокая биологическая активность делает его перспективным кандидатом для создания анальгетического препарата принципиально нового типа (по мишени действия), нацеленного на ингибирование ноцицептивной системы. Доклинические испытания севанола начаты в 2017 году.

Руководитель биотехнологического направления ГК «Фармконтракт» к.б.н. *Бобрускин Алексей Игоревич*:

Внедряя новые обезболивающие лекарственные средства в жизнь, мы понимаем, что конкуренция новых анальгетиков со старыми препаратами на рынке будет достаточно серьезной. Принципиально следует брать в расчет два основных момента.

Во-первых, это страх перед скрытыми побочными эффектами. А именно, все побочные эффекты в результате длительного использования традиционных типов анальгетиков уже известны и понятны как основные противопоказания к применению, так и основные направления модификации этих лекарственных средств для снижения побочного действия. Новые препараты не имеют пока строго аргументированных ограничений по использованию, как старые, а значит, потенциально могут быть более опасными. Эта проблема не будет решена в период выхода ЛС на рынок, и доказательства отсутствия/наличия побочных эффектов удастся получить в полной мере только после практического многолетнего применения. Поэтому все массовые случаи воспалительной и легкой боли будут по-прежнему купироваться медикаментами группы НПВС.

Во-вторых, сравнение соотношения цена/эффективность. Конкурировать новые анальгетики на начальном этапе внедрения могут только с опиоидными анальгетиками, предлагая сопоставимую цену и эффективность, при отсутствии самого главного ограничения – развитие наркотической зависимости у пациента (что подразумевает возможность свободной продажи через аптеки). Это опять приводит нас к пониманию более высокой конкурентоспособности НПВС на массовом рынке обезболивающих средств.

Но несмотря на все сложности с внедрением новых анальгетиков в жизнь, есть три очевидных и весомых довода в пользу создания обезболивающих препаратов нового поколения.

Разработка обезболивающих препаратов на основе пептидов является одним из приоритетных направлений мировых фармацевтических компаний. В развитие данного направления вкладываются огромные средства, так как все понимают, что при выпуске эффективного и безопасного препарата он будет востребован, а учитывая то, что к препаратам на основе пептидов нет привыкаемости и они не дают токсичных метаболитов, перед такими препаратами открывается хорошая перспектива на фармацевтическом рынке. С точки зрения прогресса наука должна помогать разрабатывать новые методологические подходы для медицины. Новые биоактивные молекулы со специфическим действием на определенные рецепторы позволяют тонко регулировать работу определенных систем в организме, поэтому вместо сильного терапевтического удара по всему организму можно будет осуществлять точечное превентивное лечение. В теории организмы млекопитающих и человека устроены принципиально одинаково и фармакологические агенты приблизительно с равной эффективностью реагируют с клеточными мишенями. Однако на практике иногда проявляются отличия в уровне ответа, специфичности действия, метаболизме препарата, в том числе на уровне индивидуума. Поэтому дальнейший поиск эффективных препаратов необходим всегда. Только таким путем мы сможем набрать достаточное количество разнообразных лекарственных средств, среди которых врачи смогут выбрать наиболее эффективное или наименее вредное для каждого конкретного пациента.

Профессор, д.м.н., ректор Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) Ольга Сергеевна Кобякова рассказала нашим читателям о сотрудничества вуза с фармацевтической промышленностью и тесных разносторонних связях одного из старейших медицинских университетов России с производителями лекарственных средств.

О.С. Кобякова
СибГМУ, Томск

В 2017 году университет первым и единственным среди медицинских вузов России получил статус опорного.

Миссией программы опорных университетов является создание в регионах центров образовательных, научных и социальных инноваций в целях повышения темпов развития территорий России, в том числе за счёт укрепления и расширения взаимодействия образовательных организаций с реальным сектором экономики в направлении подготовки специалистов для промышленности и получения совместных инновационных продуктов.

Университет исторически тесно сотрудничает с фармацевтической отраслью в направлении подготовки специалистов и проведения совместных научных исследований и разработок. Так, 11–12 октября 2017 года на базе СибГМУ прошла рабочая встреча с представителями фармацевтической индустрии, в которой приняли участие 12 крупных фармацевтических компаний, таких как «Р-Фарм», «Органика», «Синтез». В ходе встречи были обсуждены вопросы взаимовыгодного сотрудничества в направлении подготовки специалистов, проведения клинических исследований лекарственных средств, реализации совместных научно-исследовательских проектов и разработки фармацевтических продуктов с последующим их выводом на рынок.

Для ликвидации существующего разрыва между научно-исследовательскими разработками и выводом их результатов на рынок в СибГМУ функционирует центр трансляции медицинских технологий в качестве комплексной инфраструктуры для проведения полного цикла клинических исследований лекарственных средств и клинических испытаний медицинских изделий, обеспечивающий сокращение сроков внедрения в практическое здравоохранение методов диагностики и лечения для улучшения состояния здоровья населения Российской Федерации и реализации стратегии опережающего импортозамещения.

В состав комплексной инфраструктуры полного цикла клинических исследований/испытаний входят следующие подразделения: центр трансфера технологий, центр клинических исследований, центр внедрения технологий, клиническая база СибГМУ.

ЦЕНТР КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Вуз аккредитован на проведение I–IV фаз клинических исследований и клинических испытаний изделий медицинского назначения; с 2002 года в СибГМУ проведено более 170 международных клинических исследований II–IV фаз. С 2013 г. в университете осуществляется проведение клинических исследований I фазы. Стоит отметить, что СибГМУ является единственным в России вузом, аккредитованным на проведение клинических исследований технологическим парком «Сколково».

В СибГМУ работает более 20 главных исследователей, соответствующих требованиям Федерального закона РФ от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств». Около 40% исследователей имеют опыт аудита (по результатам аудитов не было выявлено Major или Critical Finding). Все исследователи имеют сертификаты GCP и опыт работы с центральными лабораториями, компаниями-вендорами и владеют навыками работы как с hard-copy, так и с электронными ИРК с различными интерактивными системами.

Основными нозологическими направлениями, по которым осуществляются клинические исследо-

вания лекарственных средств, являются терапия, пульмонология, кардиология, педиатрия, аллергология, иммунология, инфекционные болезни, паразитарные инвазии, эндокринология, диабетология, детская эндокринология, акушерство и гинекология, неврология, гематология, заболевания доношенных и недоношенных новорожденных, вопросы естественного и искусственного вскармливания, рационального питания детей и кормящих матерей, хирургия, детская хирургия, ортопедия, дерматология и др.

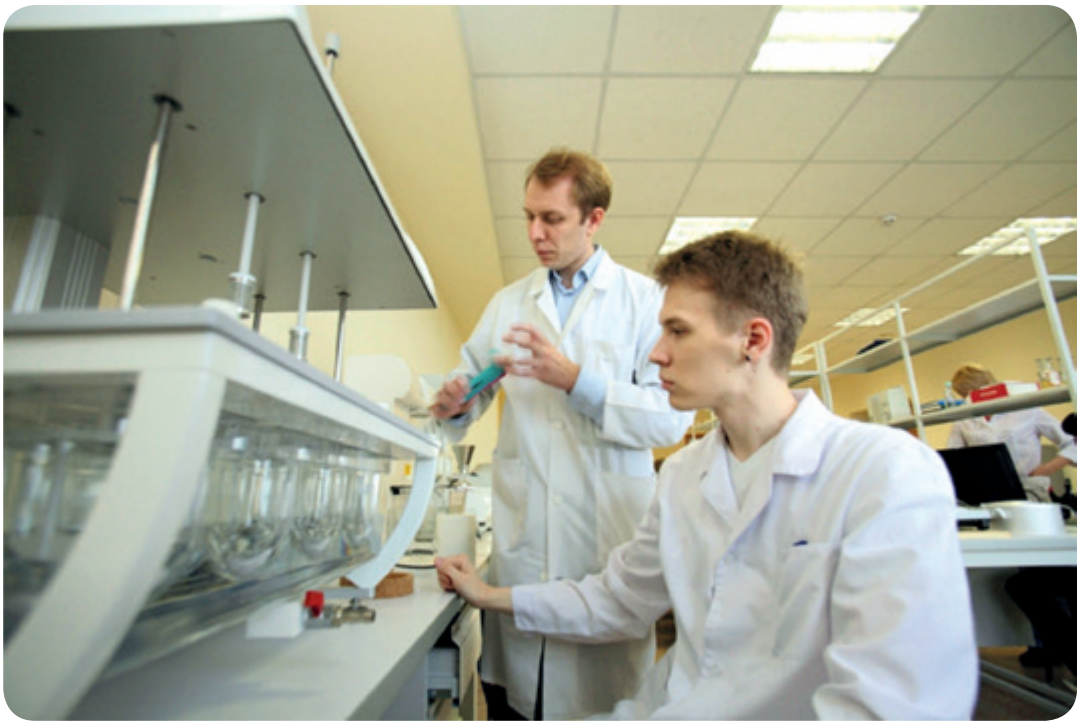
Университет обладает кадровым составом, имеющим компетенции и значительный опыт в области проектирования и разработки документации для клинических исследований лекарственных средств, клинических испытаний изделий медицинского назначения. Специалисты СибГМУ являются авторами-разработчиками комплексных научно-исследовательских проектов национального уровня.

ЦЕНТР ВНЕДРЕНИЯ ТЕХНОЛОГИЙ

Центр внедрения технологий (ЦВТ) является первым в России опытно-производственным инжиниринговым участком, созданным на базе вуза и оборудованным в соответствии со стандартом GMP. Целью работы подразделения является обеспечение инжиниринговых услуг в области фармацевтики, в том числе по разработке технических регламентов, фармстатей, а также производству малых партий фармсредств в соответствии с GMP. В сфере компетенций центра внедрения технологий СибГМУ находится разработка технологий производства, методов стандартизации, технологических регламентов и инструкций, фармакопейных статей, спецификаций и другой нормативной документации, организация доклинических и клинических исследований (в том числе биоэквивалентности), составление регистрационных досье.

Центр располагает парком оборудования для разработки технологий получения активных фармацевтических субстанций из биологических объектов, инъекционных растворов, гранулированных порошков, микрокапсул и других форм, а также форм для наружного применения. Стоит отметить, что 29 сентября 2017 года СибГМУ первым среди медицинских вузов была получена лицензия Минпромторга России на производство лекарственных средств. Среди образовательных организаций подобными правами обладают лишь РУДН и НИ ТПУ.

ЦВТ СибГМУ принимает активное участие в реализации ФЦП «ФАРМА-2020»: на базе центра выполняется разработка технологий производства трёх инновационных лекарственных средств в рамках данной ФЦП. Также центр активно сотрудничает



с фармацевтическими предприятиями сибирского региона, являясь связующим звеном между медицинской наукой и фармацевтическим производством. Центр внедрения технологий СибГМУ имеет опыт выполнения работ по фармацевтической разработке как оригинальных препаратов, так и препаратов-дженериков по заказам российских предприятий-фармпроизводителей (ОАО «Фармстандарт», ЗАО «Кемеровская фармацевтическая фабрика», ООО «МедКонтрастСинтез»).

ОБРАЗОВАНИЕ В СибГМУ

Университет активно проводит подготовку врачей-исследователей. Так, в настоящее время в удобном дистанционном формате доступно обучение по курсу «Надлежащая клиническая практика. Основы доказательной медицины и методология планирования клинических исследований».

В 2015–2016 годах в рамках ФЦП «ФАРМА-2020» СибГМУ разработана программа дополнительного профессионального образования «Комплексное проектирование клинических исследований лекарственных средств, испытаний изделий медицинского назначения и проведение клинических исследований и испытаний».

Кроме того, в университете идёт постоянный поиск талантов среди студентов и регулярная работа с ними: в 2015 и 2016 годах для студентов проведены «Школы «медицинского писателя» в рамках которых было подготовлено более десяти специалистов по написанию медицинских текстов научного и нормативного характера, все выпускники школ опубликовали свои работы в журналах перечней ВАК, Scopus и WoS, некоторые из них в настоящее время являются сотрудниками университета и приобрели большой опыт под-

готовки медицинских документов, включая федеральные нормативные акты.

В настоящее время наметилась тенденция к появлению требований к междисциплинарности знаний и умений у специалистов биомедицинского сектора. По этой причине СибГМУ активно развивает сетевое взаимодействие с другими образовательными организациями и представителями отрасли. Так, университетом создана практикоориентированная базовая кафедра совместно с НПО «Микроген». Кроме того, на сегодняшний день совместно с НИ ТПУ реализуется сетевая магистратура «Инжиниринг в биотехнологических и фармацевтических производствах», подобный опыт позволяет университету создавать образовательные программы в соответствии с интересами заказчиков.

Стоит отметить, что университет стремится к наивысшему качеству реализации проектов и программ, по этой причине с 2016 года в университете внедряются принципы проектного управления, СибГМУ первым из медицинских вузов России прошел добровольную аккредитацию образовательной программы дополнительного профессионального образования «Управление проектами». Вуз подтвердил свое соответствие требованиям Национальной ассоциации управления проектами «СОВНЕТ» и методологии Международной ассоциации управления проектами (IPMA), в настоящее время на базе университета проходят регулярные циклы обучения управлению проектами с участием сертифицированных преподавателей.

Таким образом в Сибирском государственном медицинском университете сформирована мощная база для подготовки специалистов фармацевтической и биомедицинской отраслей, успешно функционируют подразделения, проводящие научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы. Широкий опыт проведения исследований и разработок, а также продуктивное сотрудничество с индустриальными партнёрами позволяет СибГМУ успешно участвовать в развитии фармацевтической отрасли, развивая и укрепляя медицинскую науку на российской и международной аренах.

ПРАВОВЫЕ ВОПРОСЫ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ

10 октября 2017 года «Ведомости. Практика» (ИД «Ведомости») собрали ключевых представителей государственных ведомств, профессиональных сообществ и фармацевтического бизнеса на одной площадке, где они обсудили актуальные вопросы правового регулирования отечественного фармрынка. Фармотрасль, как и другие, вынуждена функционировать в условиях «новой нормальности» и столкнулась с новыми реалиями. В этой связи участники ежегодной конференции отмечают, что появление новых механизмов поддержки ведет к рискам, которые зачастую превышают возможные плюсы. Именно поэтому все стейкхолдеры сегодня уделяют пристальное внимание правовым аспектам рынка трансфера технологий, особенностям параллельного импорта и сопряженным с ним вопросам противодействия проникновению контрафактной продукции на отечественный рынок.

В рамках конференции для специалистов российского фармрынка прошло обсуждение одной из самых актуальных тем: *«Ценообразование: особенности и нововведения»*. При этом, как отметил, генеральный директор АРФП **Виктор Дмитриев**, данная тема актуальна не только для национального рынка, но и для глобального фармрынка в целом. «Недавно мы с коллегами приняли участие в Европейском форуме по здравоохранению, где тема ценообразования на лекарственные средства была одной из ключевых, – пояснил представитель ассоциации. – Достаточно интересными были предложенные практические упражнения – участники должны были выбрать препарат для инвестирования и определить для него приемлемую цену. Вывод, который был единодушным: инвестиции – это не гуманитарная помощь. И когда компания инвестирует, она должна четко понимать, когда эти деньги вернутся. Возврат средств зависит от многих составляющих: от количества пациентов, принимающих препарат, от продолжительности жизни пациентов, от возможностей государства и страховой компании по возмещению и т.д. В другом задании надо было выбрать три нозологии для инвестирования в препараты для их лечения. Изначально все сделали акцент на препарате для нозологии, которая развивается у детей и фактически лишает их жизни к 30 годам, но в финале, когда все просчитали, оказалось гораздо выгоднее для инвесторов вкладывать средства в разработку препаратов для людей старше 50 лет с онкологическими заболеваниями. Потому что и количество больных больше, и вероятность возврата средств гораздо выше. Тема абсолютно неоднозначна: она не только экономическая, но и политическая, социальная, этическая. Естественно, что эти вопросы актуальны и для нашей страны».

Заместитель генерального директора по работе с органами государственной власти компании BIOCAD **Алексей Торгов**, комментируя проект методики ценообразования, предложил использовать индикативный метод определения цены для всех категорий лекарственных препаратов, а также внести изменения в список референтных стран. «Новая редакция методики ценообразования на лекарственные средства предполагает исключение из перечня референтных стран Украины и стран с наиболее высокими ценами (Ирландия, Италия, Дания, Португалия), а также добавление страны с низкими ценами (Сербия). Мы предлагаем дополнительно исключить из указанного перечня Республики Сербия и Хорватия в связи с тем, что в настоящее время Банком России не установлен официальный курс российского рубля относительно национальных валют этих стран. А также исключить страны с высокой волатильностью курса национальных валют (Турция и Румыния) и страны, входящие в ЕАЭС», – отметил **Алексей Торгов**.

Виктор Дмитриев поддержал позицию представителя BIOCAD, добавив, что, общаясь с коллегами из Молдавии, узнал о негативном влиянии российского списка референтных стран на систему здравоохранения Молдавии: «Компании отказываются от регистрации своих препаратов в этой стране, так как Молдавия является референтной страной для России. Население – 3 млн, рынок небольшой, покупательная способность населения невысокая. Компании перестали поставлять свои препараты, чтобы их цены не

сравнивали с ценами на российском рынке, который в сотню раз больше, как и платежеспособность населения. Возникла проблема – лекарства ввозят в чемоданах. Получилось, что население Молдавии поставили в неудобное положение и в России ожидаемого эффекта от реферирования цен не получили», – подчеркнул эксперт.

Помимо индикативного метода определения цены, представитель BIOCAD предлагает отказаться от нового понижающего коэффициента, который согласно новой редакции методики ценообразования должен составить 65%, отдав предпочтение текущему положению.

Точку зрения **Алексея Торгова** во многом разделяет и руководитель департамента коммуникаций и связей с государственными органами компании GlaxoSmithKline **Камиль Сайткулов**, убежденный в том, что новая методика ценообразования должна сохранить баланс интересов между участниками рынка, в первую очередь между производителем и покупателем, и установить справедливый уровень цен, позволяющий удовлетворить потребности населения в лекарственных препаратах, государству – исполнять функции по лекарственному обеспечению нуждающихся пациентов, а производителю – покрывать производственные и иные (регуляторные) издержки и формировать разумную прибыль для дальнейших инвестиций.

Президент компании «Активный компонент» **Александр Семенов** отметил, что введение новых правил ценообразования на лекарственные препараты из перечня ЖНВЛП делает отечественный фармацевтический бизнес инвестиционно непривлекательным. Более того, данная политика может привести к исчезновению некоторых лекарственных средств с рынка. Для предотвращения потенциальной угрозы необходима гибкая система цен без ограничения рентабельности производителей, создание более благоприятных условий для развития российских производств активных фармацевтических субстанций, фиксация цен на субстанции для российских производителей готовых лекарственных средств, что, в свою очередь, приведет к увеличению маржинальности производства ЖНВЛП.

Заместитель руководителя ФАС России **Рачик Петросян** отметил, что определение взаимозаменяемости и эквивалентности лекарственных средств носит ключевое значение для ценообразования на госзакупках, как на стадии формирования начальной цены контракта, так и на стадии участия в закупке: «Без решения вопроса о взаимозаменяемости, определения эквивалентности лекарственных средств у нас не будет объективных цен на препараты, закупаемые за счёт бюджетов всех уровней». От скорости решения Минздравом России вопроса определения взаимозаменяемости лекарственных средств во многом зависит эффективность расходования бюджета, и экономия бюджетных средств в частности. «Сегодня информационная система позволяет рассчитать средневзвешенную цену на единицу действующего вещества в рамках одного МНН. Сравнивая эти данные со стоимостью лекарственных препаратов по торговым наименованиям, можно увидеть существенные отличия цен, и зачастую препараты с наибольшей стоимостью существуют в условиях минимальной конкуренции», – рассказал замглавы ФАС России.

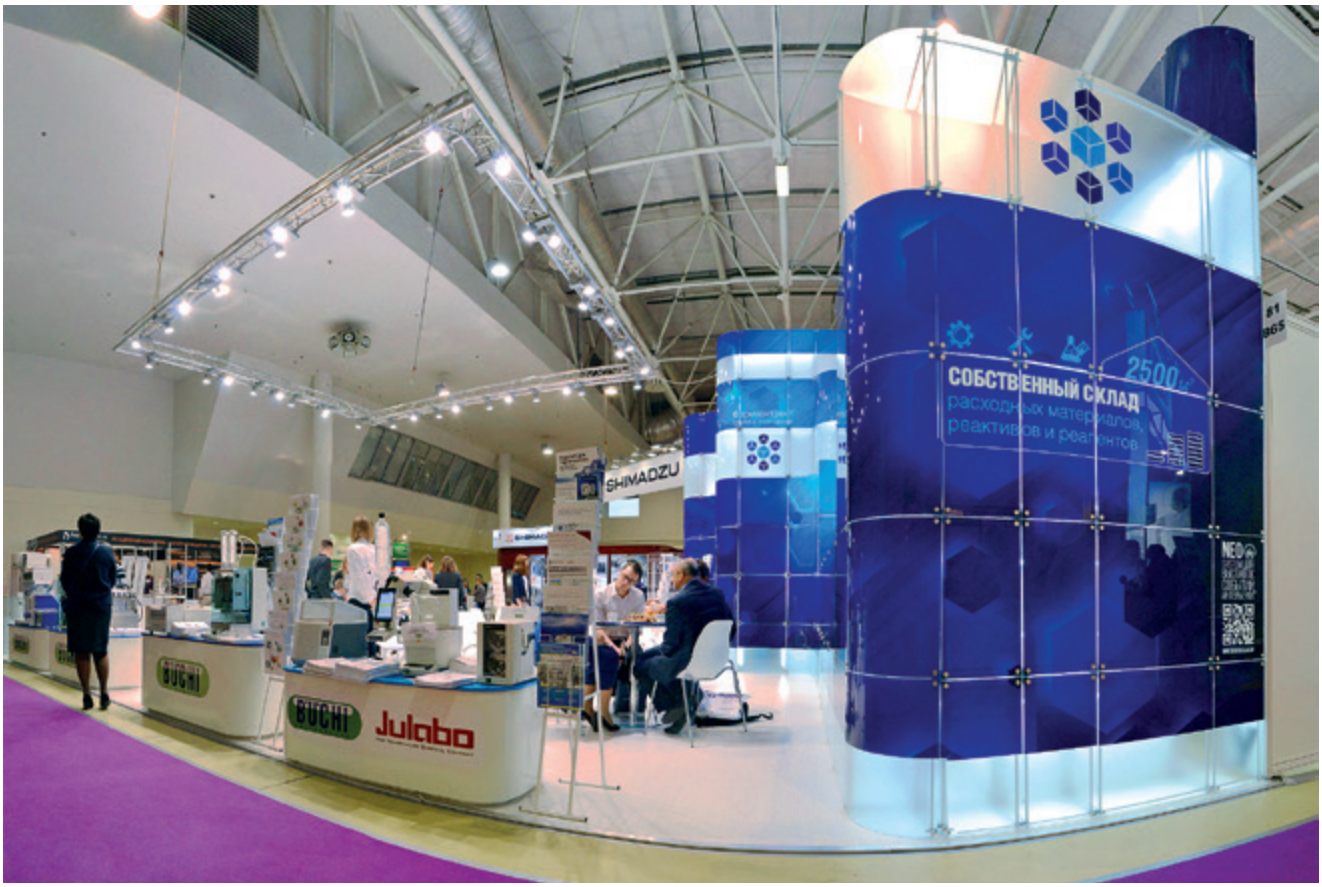
Подводя итоги сессии, **Виктор Дмитриев** отметил, что вопросы ценообразования чувствительны и решать их надо совместно. Безусловно, крайне важен баланс интересов бизнеса, государства и пациентов. Важно использовать международный опыт, но необходимо учитывать и российские особенности: экономическую ситуацию, задачи по реализации стратегии «ФАРМА-2020», механизмы покрытия.

Исполнительный директор СПФО **Лилия Титова** обратила внимание участников конференции на тот факт, что наибольшие опасения вызывает коммерческий рынок: «Исходя из новой методики ценообразования, потребитель рискует лишиться части торговых наименований, к которым привык, или ощутить удар по качеству выпускаемых лекарственных средств». О том, какие изменения в законодательной базе в части госзакупок ожидаются в ближайшее время, какая работа проделана в текущем году, а также как нововведения отразятся на правоприменительной практике, рассказала директор департамента бюджетной политики в сфере контрактной системы Министерства финансов Российской Федерации **Татьяна Демидова**: «В текущем году внесены изменения в постановление Правительства Российской Федерации от 05.02.2015 г. № 102 «Об ограничениях и условиях допуска отдельных видов медицинских изделий, происходящих из иностранных государств, для целей осуществления закупок для обеспечения государственных и муниципальных нужд»; идет разработка механизма, предусматривающего реализацию трехэтапной конкурсной процедуры при осуществлении закупок лекарственных препаратов из перечня ЖНВЛП; осуществляется работа над проектом нового приказа о предоставлении 15% стоимостной преференции участникам закупок, предлагающей к поставке товар, происходящий из государств-членов ЕАЭС; завершается активная работа по созданию и введению в эксплуатацию каталога товаров, работ, услуг для государственных и муниципальных нужд, введение которого в полную эксплуатацию ожидается уже с 1 декабря текущего года».

Завершилась конференция от ИД «Ведомости» сессией *«Интеллектуальная собственность: актуальная практика»*, поскольку, по мнению исполнительного директора AIPM **Владимира Шипкова,** устойчивое развитие фармацевтической отрасли без решения вопросов интеллектуальной собственности невозможно.

XX МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА «ХИМИЯ-2017»

23–26 октября 2017 года в Москве работала юбилейная выставка химической промышленности и науки – «Химия-2017». Приветствуя гостей и участников лучшей по охвату рынка и профессиональному интересу в России и странах СНГ выставки, заместитель министра промышленности и торговли Российской Федерации Серей Цыб зачитал поздравительные письма от президента, премьер-министра и министра промышленности и торговли Российской Федерации, в каждом из которых отмечалась высокая консолидация бизнеса, науки и региональных органов власти с целью развития химической промышленности именно на площадках «Химии». Как было отмечено в письме Дениса Мантурова, история выставки отражает этапы развития и достижения отечественного химического комплекса. Химическая отрасль – драйвер роста национальной экономики, определяющий успешное развитие смежных отраслей промышленного производства. Показатели производства химической продукции ежегодно демонстрируют стабильно растущий уровень. Например, как отметил замминистра, химическая промышленность по итогам прошлого года показала серьезный прирост привлеченных инвестиций, составивших 480 млрд руб. (рост на 14%). Учитывая вышесказанное, вполне логично выглядит тот факт, что на протяжении многих лет постоянными партнерами мероприятия со стороны бизнес-структур выступают 3 известнейшие компании: «Уралхим», «Уралкалий» и «Фармконтракт». И если первые две являются генераторами инновационных химических продуктов, то ведущий химико-фармацевтический холдинг России покрывает весь сегмент организации этих производств от этапа проектирования и строительства (реконструкции) заводов и лабораторий до поставки швейцарских реакторных систем, обеспечивающих синтез самого широкого спектра продуктов органической и неорганической химии.



В этом году команда ГК «Фармконтракт» представила на «Химии» не просто хорошо известные химикам реакторные системы **BuchiGlasUster** для проведения реакций в малых объемах под давлением (в том числе в металлическом сосуде), теста катализаторов; линейку лабораторных реакторных систем **BUCHI Labortechnik**; реакторы **Schmizo** для растворения, смешения и экстракции; автоматизированные системы для клеточных исследований и скрининга на фармацевтическом производстве от **Beckman Coulter** и многое другое. Отличительной особенностью этого года являлось представление решений для отработки методов получения твердых активных фармацевтических ингредиентов путем синтеза, очистки и выделения, а также решений в области гидрирования. В частности, технологи ГК «Фармконтракт» представили 2 решения по проведению процесса гидрирования в условиях R&D-лаборатории с целью последующего масштабирования на предприятиях, специализирующихся на продуктах органической химии, полимерном и нефтехимическом синтезе, в области пищевой промышленности.

«Процесс гидрирования с использованием газообразного водорода широко применяется в лабораториях и на промышленных производствах в органическом и нефтехимическом синтезе, синтезе полимеров, пищевой и фармацевтической химии. Как известно, протекание подобного процесса обычно требует сочетания высоких температур и давления до 100 и более атмосфер. В зависимости от природы синтезируемых соединений, температурной стабильности реагентов и продуктов, а также особенностей протекания реакции подход к реализации процесса гидрирования может быть различным. Получение продуктов в герметичных реакторах-автоклавах BUCHI в комплексе с контролируемой подачей водорода и управлением давлением **bpc 2** обеспечивает возможность высочайшей точности дозирования газа и управления параметрами процесса, что позволяет контролировать конверсию процесса и подбирать режимы с высокой селективностью. Сенсорная панель управления с встроенной функцией предупреждения об утечке водорода обеспечивает не только максимальное удобство работы, но и безопасность оператора. В то же время проточный реактор ThalesNano, несомненно, открывает новые горизонты перед исследователями, работающими со сложными и медленно протекающими процессами (т.н. «dead chemistry»). Высокая эффективность и жёсткие условия при кратковременности процесса позволяют, с одной стороны, добиться впечатляющих значений конверсии для широкого спектра процессов, с другой – сохранить продукты, имеющие ограниченную устойчивость при высоких температурах, неспособные выдержать длительное перемешивание при высоких температурах. Нельзя не упомянуть также о традиционной для «flow chemistry» безопасности процессов, достигаемой за счёт небольшого объёма реакционной зоны. Наконец, такой подход предопределяет лёгкость выделения финального продукта, поскольку на выходе из реактора исследователь получает его раствор, не требующий дополнительной очистки. Следует упомянуть, что оба варианта процесса подлежат масштабированию и после отработки методики в условиях R&D могут быть внедрены в производство без существенных затрат времени и средств на адаптацию», – пояснил суть предлагаемого аппаратурного решения главный технолог ГК «Фармконтракт» **Олег Новожилов**.

Стоит отметить, что впервые на стенде холдинга были представлены новые услуги сервисного центра «Фармконтракт»: поставка химических реактивов, органических растворителей, питательных сред и ИФА-наборов. Как отметила руководитель сервисной службы **Юлия Исхакова**, в портфеле поставляемой продукции уже сегодня представлены химические реактивы для лабораторий (соли, кислоты, щелочи, органические растворители, буферные растворы, реагенты фармакопейного качества; прекурсоры III таблицы IV списка и т.д.), реагенты для биохимических лабораторий (ИФА-наборы, ПЦР-наборы, буферные растворы, белки), реагенты для микробиологических лабораторий (штаммы клеточных культур; питательные среды) и калибровочные стандарты для приборов.

Помимо обширной выставочной экспозиции, ГК «Фармконтракт» приняла активное участие в деловой программе, организовав семинар ***«Современные решения для химического синтеза в условиях R&D-лаборатории и производства»***, где представила ключевые аспекты разработки, масштабирования и производства продуктов фармацевтической, химической, биотехнологической и пищевой отраслей. Особый интерес у посетителей семинара вызвал доклад директора по проектированию и технологии ГК «Фармконтракт» **Константина Фроленкова**, который поделился со всеми собравшимися ключевыми аспектами разработки, масштабирования и производства АФИ, а также привел реальные примеры решения проблем масштабирования процессов химического синтеза АФИ, реализованные специалистами

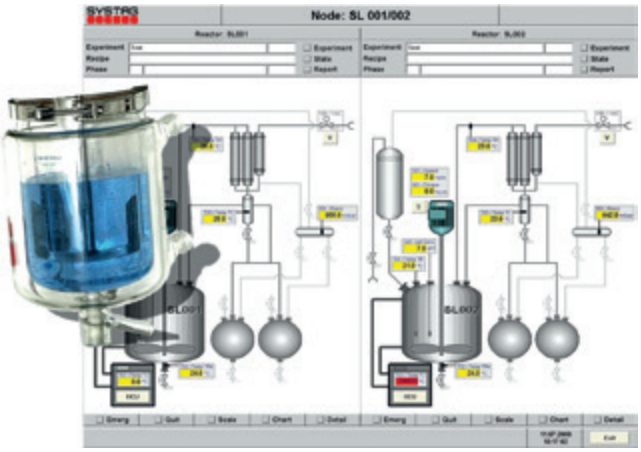
компании. На примере синтеза сорафениба, применяемого для терапии прогрессирующих опухолей почек и неоперабельной гепатоцеллюлярной карциномы, был показан процесс оптимизации лабораторной технологии с низким выходом целевого продукта до высокоэффективного коммерческого производства.

Константин Фроленков также познакомил собравшихся с решениями для аппаратурного оформления производственного процесса, учитывающими важнейшие аспекты масштабирования лабораторной технологии:

- Увеличение объема.
- Непропорциональное увеличение площади поверхности.
- Увеличение гетерогенности.
- Увеличение категории опасности.
- Увеличение времени.
- Снижение/изменение квалификации персонала.

Стоит отметить, что истинное гибкое производство требует постоянного доступа к данным процесса в режиме реального времени для лучшего понимания, постоянной оптимизации и способности быстро реагировать при возникновении сбоев или других нештатных ситуаций. Технология анализа процессов (PAT) необходима для достижения истинной согласованности, учитывая изменчивость, всегда присутствующую в фармацевтическом сырье, оборудовании и условиях обработки. Особенно хорошо зарекомендовали себя решения для автоматизации процессов швейцарской компании **SYSTAG**, представленной в портфеле ГК «Фармконтракт».

Решения, применяемые для автоматизации химических процессов в R&D- и пилотном масштабе, а также примеры реализованных проектов по автоматизации были рассмотрены главным технологом проектно-технологического отдела **Олегом Новожиловым**.



Компания производит системы автоматизации лабораторных, пилотных и промышленных производств, предоставляя как готовые решения, так и полностью индивидуальные проекты под определенные задачи заказчика. Одним из достоинств систем автоматизации **SYSTAG** является их совместимость с оборудованием различных производителей, что позволяет существенно экономить средства заказчика, не требуя переоборудования лаборатории или производства.

Системы автоматизации процессов **SYSTAG** – это

- отработка процедуры синтеза и подбор оптимального режима;
- получение данных для расчёта кинетики процесса;
- сбор аналитических данных с встроенных датчиков;
- сбор и анализ данных калориметрических измерений;
- наработка опытных партий продукта по данным успешной программы;
- масштабирование процесса.

Посетители семинара смогли обсудить насущные проблемы, связанные с особенностями подбора оборудования для химического синтеза АФИ, а также задать специалистам интересующие их вопросы относительно масштабирования технологии.

Второй день экспозиции традиционно считается самым массовым и популярным. Так случилось и в этот раз: несмотря на недружественную октябрьскую погоду от посетителей не было отбоя. И это вполне понятно, ведь «Химия» – единственная выставка в России, где технологи производственных предприятий встречаются с инженерами, проектирующими будущие линии, способные обеспечить выпуск заданного объема

конкретного продукта. В этом году российская выставка «Химия» совпала с международной выставкой «CPhI Worldwide», участие в которой поставщики технологического оборудования планируют за несколько лет вперед. В этой связи особый интерес для гостей отечественного мероприятия представлял стенд ведущего химико-фармацевтического холдинга России **ГК «Фармконтракт»**, являющегося эксклюзивным дистрибьютором самых востребованных производителей систем синтеза, очистки, кристаллизации и проч. Более того, как хорошо известно рынку, в команде холдинга собраны лучшие технологи страны, за плечами которых опыт работы на производственных площадках, что позволяет им свободно общаться с заказчиками, переводя их потребности на инженерный язык.

В этом году проектно-технологический отдел представил ряд универсальных решений как для химиков-органиков, так и для химиков-фармацевтов. Например, здесь можно было познакомиться с универсальной схемой отработки методов получения твердых активных фармацевтических ингредиентов, которая была положена в основу при разработке производственных линий по синтезу фармацевтической субстанции «Мирамистин» и нового производственного корпуса одного из старейших фармацевтических заводов «Биохимика».

Получение субстанций для производства твёрдых лекарственных форм – одна из типичных задач фармацевтической химии. Однако, как пояснили технологи ГК «Фармконтракт», в зависимости от особенностей процесса – объёма партии получаемого продукта, химической природы субстанции и реагентов (токсичность, взрывоопасность, коррозионная активность и т.п.), требований к классу чистоты помещений и т.п. – аппаратурное оформление производственной линии будет отличаться. Тем не менее в большинстве случаев для получения активного фармацевтического ингредиента, используемого далее при приготовлении готовых лекарственных форм, последовательность стадий включает следующие шаги:

1) химический синтез субстанции (одна или несколько стадий);
2) горячая фильтрация для очистки механических примесей, активированного угля или другого сорбента;
3) кристаллизация полученного продукта при охлаждении;
4) выделение и последующая осушка полученного продукта от следов растворителя.

Для синтеза целевого продукта специалисты советовали обратить внимание на стальные реакторы **INOXPA**, из которых горячая суспензия или азот попадают в друк-фильтры **BuchiGlasUster**, в которых происходит очистка от механических примесей. После этого фильтрат или азот подвергаются кристаллизации, суспензия кристаллизата через насос попадает в фильтрующую центрифугу (технологи холдинга в своей работе отдают предпочтение продукции **Rousselet Robatel**). Далее осадок продукта подвергается сушке в вакуумно-сушильном шкафу, и затем продукт подается на размол. Последний процесс может проходить в вихревой мельнице **FPS** типа ProMill 8. Стоит отметить, что данная схема является наиболее

типичным примером реализации цикла получения твёрдого активного фармацевтического ингредиента в пилотном масштабе для отработки процесса, внешнего аудита на соответствие требованиям GMP и последующего масштабирования, а также внедрения на производство. В то же время, помимо основных единиц, схема может включать полный комплект сопутствующего оборудования для дозирования жидких и порошкообразных продуктов, температурного контроля (термостаты или промышленные системы обогрева/охлаждения), изоляторов и барьерных систем для работы с цитостатиками или другими токсичными АФИ, а также системами CIP- и SIP-очистки. «При необходимости работа данной линии может быть полностью автоматизирована, в том числе имеется возможность включения всех модулей в единую проектируемую или уже имеющуюся систему диспетчеризации», – обращают внимание заказчиков технологи холдинга.

Помимо комплексных решений, каждый мог найти здесь и конкретные единицы оборудования: подобрать бюджетные версии автоматизированных реакторов для R&D-процессов **SYSTAG** ePAT, водяные бани широкого спектра применения **Julabo PURA** в модельном ряде от 5 до 30 л, системы температурного контроля **Julabo PRESTO** с глубоким высокодинамичным охлаждением и повышенной мощностью нагрева (W50 и W50t, покрывающие диапазон температур от –50 °C до +250 °C) и множество других приборов.

«ГК «Фармконтракт» стала уже постоянным спонсором ключевого события в конгрессно-выставочной индустрии химической промышленности и науки. Пожалуй, сложно представить, что холдинг, имеющий прямое отношение к химической промышленности, когда-нибудь откажется от активного участия в выставке «Химия». Причем мы стараемся не только показать новинки технологического оборудования для химического синтеза, но и дополнить деловую программу мероприятия, в рамках которого представлены все направления химической отрасли. Наверное, поэтому наши экспозиции и деловые программы вызывают такой интерес со стороны гостей», – отметил президент холдинга **Сергей Быковский**. И действительно, редко где еще можно увидеть такое разнообразие оборудования для химического синтеза. Здесь представлены химические реакторы, емкостное оборудование, трубопроводная обвязка, теплообменники, аппараты для фильтрации, кристаллизаторы, системы жидкостной экстракции и температурного контроля, оборудование для регенерации сырья и тонкой очистки продуктов, дозирования жидкостей, газов и порошков для любого диапазона давлений и температур, линии вакуума, подачи инертного газа, сжатого воздуха, очищенной воды и даже сами химические реактивы! В то же время команда высококвалифицированных инженеров-технологов за счет 2D- и 3D-моделирования установок осуществляет решение такой проблемы, как жесткая привязка к задаче, стоящей перед пользователем, и к условиям, в которых он работает (совместимость всех компонентов с уже имеющимся оборудованием и помещениями).

В то же время любая выставочная экспозиция – это площадка, на которой представляются как хорошо востребованные рынком модели, так и некоторые новинки. 2017 год ознаменовался первым участием в коллективной экспозиции ведущего химико-фармацевтического холдинга России производителя автоматизированных систем для геномики, протеомики, клеточного анализа, дозирования и готовых реактивов для выделения и осаждения клеток – **Beckman Coulter**. Представленный TOC-анализатор QbD 1200 снискал заслуженное признание химиков, работающих с органическим углеродом, ведь он позволяет максимально быстро и точно определить его общее содержание в очищенной воде. Помимо этого, **Beckman Coulter** демонстрировал возможности и портативного счетчика аэрозольных частиц MET ONE 3400, который разработан специально для применения в чистых помещениях, классифицируемых по ISO14644. Был также представлен счетчик частиц HIAC 9703+ для контроля готовых лекарственных средств на содержание довидимых включений. Участие представителей компании **Beckman Coulter** в коллективной экспозиции ГК «Фармконтракт» позволило гостям выставки «Химия» не только записаться на демонстрацию приборов, но и провести испытание своих продуктов на территории своих лабораторных комплексов.

Обширный ряд на самом, пожалуй, ярком стенде демонстрировал и давний партнер холдинга – швейцарский производитель лабораторного оборудования, **BUCHI Labortechnik**.

Как отметили гости и участники выставки «Химия», юбилейное мероприятие стало одним из самых ярких событий, подводящих итоги года развития химической промышленности страны.

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЕ БЛИСТЕРНЫЕ МАШИНЫ O.M.A.R.

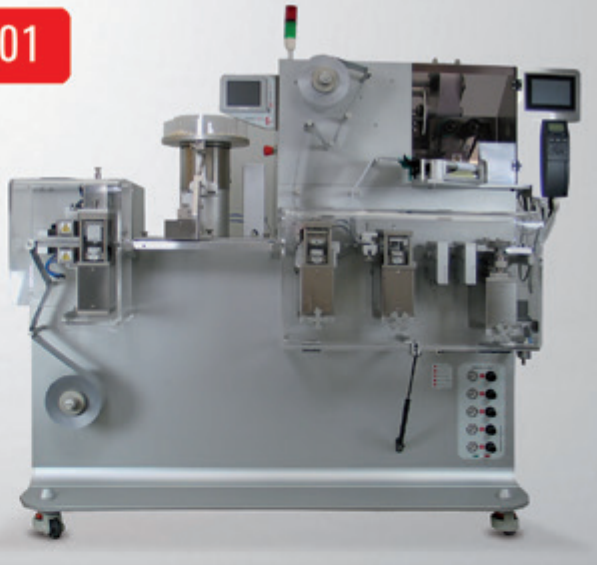
Автоматическая блистерная машина BF 150

- Автоматическая установка форматов
- Регулировка усилия сжатия и перестройка каждой станции
- Max. глубина термоформования: 27 мм
- Производительность: около 30-35 штук в минуту с максимальным размером блистера 170x120 мм (ALU + ALU / PVC + ALU)

Автоматическая блистерная машина BF 50 HT

- Max. глубина термоформования: 27 мм
- Возможность упаковывать шприцы и пероральные твердые продукты
- Производительность: около 16 блистеров в минуту с максимальным размером блистера 170x100мм. (ALU + ALU / PVC + ALU)

стр. 401



Автоматическая де блистерная машина S200

- Извлекает любой вид продукта из блистерной упаковки с различными формами и различными материалами, в том числе с особыми методами покрытия.
- Max. формат блистера 130x100 мм (ПВХ + ALU / Child Proof)
- Производительность: 40/50 штук в минуту 100x120 мм (ALU + ALU / PVC + ALU)

Автоматическая стрип упаковочная машина BF 35 балконного типа

- Оснащена системой тепловой передачи печати для печати переменных данных: штрих-коды, QR-код, логотипы и текст
- Производительность: около 25 штук в минуту с максимальным размером блистера 100x35 мм (ALU + ALU / PVC + ALU)

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

УДК 615.454.1

ГЕЛИ ДЛЯ ПРИЕМА ВНУТРЬ. ЧАСТЬ 2. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА (ОБЗОР)

Е.Ю. Загорулько[1]*, А.А. Теслев[1]

Резюме. В статье представлена характеристика вспомогательных веществ, входящих в состав гелей для приема внутрь. Описаны свойства основных гелеобразователей, подсластителей и консервантов. Проанализирован состав лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище в форме гелей для приема внутрь, представленных на российском рынке.

Ключевые слова: гель для приема внутрь, вспомогательные вещества, гелеобразователь, подсластитель, консервант, состав.

GELS FOR ORAL ADMINISTRATION. PART 2. EXCIPIENTS (REVIEW)

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

Abstract. The characteristics of the excipients as components of gels for oral administration have been considered in the article. The properties of gelatinizing, sweetening and preservation agents have been described. The compositions of the commercially available on the Russian market medical products and dietary supplements in the form of gels for oral administration have been analyzed.

Keywords: gel for oral administration, excipients, gelatinizing agent, sweetening agent, preservation agent, composition.

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

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

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

ВВЕДЕНИЕ

Проведенный аналитический обзор данных литературы позволил выявить основные группы вспомогательных веществ, используемых при производстве гелей для приема внутрь: гелеобразователи; растворители; консерванты; регуляторы pH; корригенты вкуса. В состав данной формы могут входить также вещества, создающие условия для гелеобразования, антиоксиданты, корригенты цвета, эмульгаторы (в случае эмульгелей) и др. [1–6].

Целью работы является характеристика основных групп вспомогательных веществ, входящих в состав гелей для приема внутрь.

ГЕЛЕОБРАЗОВАТЕЛИ

Общая характеристика

Наиболее распространенными гелеобразователями для лекарственных препаратов (ЛП) и БАД к пище в такой форме являются пектины, альгинаты, агар-агар, каррагинаны, карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), натрийкарбоксиметилцеллюлоза (Na-КМЦ), ксантановая и гуаровая камеди, гуммиарабик [2–5].

Эти вещества находят также широкое применение в пищевой промышленности. Их относят к группе гидроколлоидов – соединений полисахаридной (или белковой) природы, добавляемых в пищевые продукты с целью придания им требуемой вязкости и консистенции, а также с целью стабилизации пищевых дисперсных систем [6–8].

Согласно литературным данным, в состав гелей для приема внутрь могут также входить полиэтиленоксид, поливиниловый спирт, модифицированный крахмал, гидроксилэтилцеллюлоза (ГЭЦ), гелловая камедь, камедь рожкового дерева, желатин, ксилоглюкан и др. [1, 8–12].

Известны экспериментальные исследования, посвященные разработке пероральных пролонгированных гелей на основе интерполимерного комплекса полиметакриловой кислоты и полиэтиленгликоля (композиционный полимерный носитель, ФГУП «НИИ полимеров», Россия), а также частично нейтрализованного сополимера метакриловой кислоты и этилакрилата Kollicoat™ MAE 100 P (BASF, Германия) [13, 14].

Характеристика основных гелеобразователей в составе гелей для приема внутрь представлена в таблице 1, их структурные формулы приведены на рисунке 1 [6, 11, 12, 15–28].

Таблица 1.

Характеристика гелеобразователей в составе гелей для приема внутрь [6, 11, 12, 15–28]

№ п/п	Название	Описание	Химическая природа	Разновидности	Характеристика	Производители (примеры)
1	Агар-агар (получают экстракцией из водорослей родов *Gracilaria* (97%), *Gelidium* и *Ahnfeltia*)	Порошок от белого до кремового цвета без постороннего запаха и остаточных красящих веществ	Смесь сложных эфиров сульфатов кальция, натрия галактозы и 3,6-сополимеров ангидрогалактозы	Деление на основе желирующих свойств (например, агар 700, 900 и 1000)	Обладает желирующими и загущающими свойствами, высокой влагоабсорбирующей способностью. Нерастворим в холодной воде, при температуре от 95–100 °С растворяется полностью. Горячий раствор является прозрачным, при его охлаждении до 35–40 °С образуется гель. Свойства гелей на основе агар-агара зависят от вида водорослей, времени их сбора и качества подготовки сырья	Agarpac (Чили), Algas Marinas (Чили), Proagar (Чили), GreenAgar (Китай), Qixiang (Китай), Fujian Putian (Китай), Indoalgas (Индонезия)
2	Пектины (экстракция из плодов цитрусовых и яблок)	Порошки без запаха от светло-кремового до коричневого цвета	Смесь пектовых, пектиновых кислот и их солей	НМ – высокоэтерифицированные, LM – низкоэтерифицированные, LMA – низкоэтерифицированные амидированные	Высокоэтерифицированные пектины образуют термически необратимые гели в кислой среде, низкоэтерифицированные (LM и LMA) – под действием ионов двухвалентных металлов (обычно для этих целей используют ионы кальция), их гели термообратимы. НМ-пектины стандартизуют по прочности студня, LM- и LMA-пектины – по активности реакции с ионами кальция. В зависимости от скорости и температуры начала гелеобразования НМ-пектины делят на быстро и медленно желирующие. Первые имеют более высокую степень этерификации и образуют гели при более высоких значениях pH	Andre Pectin (Китай), Herbstreith & Fox (Германия), Cargill (США), Danisco (Дания), Haisheng Pectin (Китай)
3	Каррагинан [экстракция из красных водорослей, в основном рода Furcellaria (*Furcellaria fastigata*)]	Порошок от белого до светло-коричневого цвета со слабым запахом	Линейный полимер сульфатированной галактозы, фрагменты которого связаны α-1,3- и β-1,4-связями	В зависимости от степеней полимеризации и этерификации выделяют каррагинаны каппа, йота, лямбда	***Каппа.*** Нерастворим в холодной воде; в сочетании с ионами натрия даёт термически обратимые высокопрочные гели. ***Йота.*** Образует гель средней прочности и высокой эластичности. Обладает термообратимым свойством. Применяется для разжижения гелей, суспензий. ***Лямбда.*** Образует растворы высокой вязкости, обладающие свойством псевдопластичности. Подходит для создания пен, эмульсий и суспензий в условиях температурных скачков	Shemberg (Филиппины), Shanghai Brilliant Gum (Китай), Danisco (Дания), CEAMSA (Испания), CP Kelco (США)
4	Ксантановая камедь (получают ферментацией культуры *Xanthomonas campestris*)	Белый или сероватобелый сыпучий порошок без запаха и вкуса	Полисахарид с пируватными и ацетильными функциональными группами группами	–	Используется в качестве загустителя, гелеобразователя и стабилизатора. Хорошо набухает в горячей и холодной воде. Растворы ксантановой камеди стабильны при температуре 100–110 °С и значениях pH 2–12	CP Kelco (США), ADM (США), Danisco (Дания), Deosen Corporation Ltd. (Китай)

Окончание табл.1

№ п/п	Название	Описание	Химическая природа	Разновидности	Характеристика	Производители (примеры)
5	Гуаровая камедь (получают экстракцией из семян растения *Cyamopsis tetraganoloba*)	Порошок белого цвета без запаха	Высокоэтерифицированный галактозно-маннозный полимер	–	Используется в качестве загустителя, стабилизатора и гелеобразователя. Хорошо растворяется в холодной воде с образованием вязких растворов или гелей в зависимости от концентрации	Vikas (Индия), Supreme Gums (Индия), Premcem Gums (Индия), Gelcrem (Италия)
6	Альгинаты	Желтовато-белый, иногда с сероватым оттенком, волокнистый порошок, гранулы	Натриевые, калиевые соли альгиновых кислот (состоят из остатков D-маннуроновых и L-глюкуроновых кислот)	Категорию присваивают в зависимости от вязкости (например, альгинаты натрия 300, 550 и 1000)	В воде образуют вязкие растворы или гели, применяются как загустители, стабилизаторы, эмульгаторы и гелеобразователи. При взаимодействии с ионами кальция образуют нерастворимые соли. Нерастворимы в кислой среде (при pH<3). Гели на основе альгинатов являются термически необратимыми	Danisco (Дания), Quindao Bright Moon Seaweed Group Co. (Китай)
7	Гуммиарабик	Белый кристаллический порошок	Смесь калиевых, кальциевых и магниевых солей арабиновой кислоты	–	Медленно растворим в холодной воде, хорошо растворим в тёплой воде с образованием слабокислого раствора	CNI (Франция), Agrisales (Англия)
8	Натрийкарбоксиметилцеллюлоза	Белый кристаллический порошок	Натриевая соль целлюлозогликолевой кислоты	–	Растворима в горячей и холодной воде, растворе спирта этилового 50%. В водных растворах является полиэлектролитом и обладает свойствами защитных коллоидов. Гели Na-КМЦ прозрачны, без вкуса и запаха, устойчивы при хранении; pH от 6,5 до 8	Akzo Nobel (Нидерланды), CP Kelco (США)

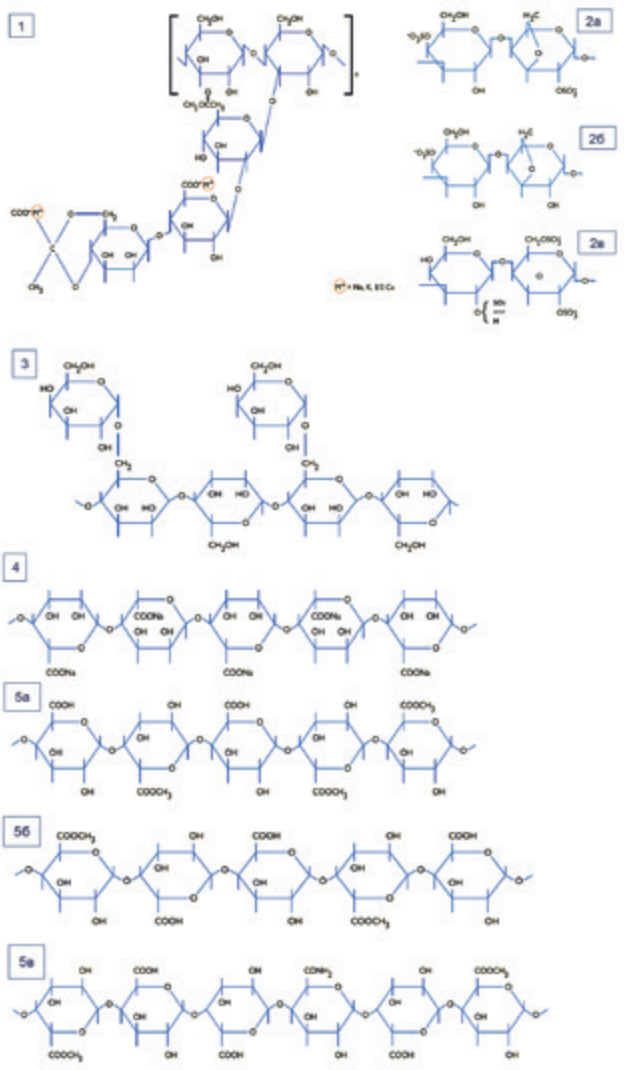


Рисунок 1. Фрагменты структурных формул гелеобразователей:

1 – ксантановая камедь; 2 – каррагинаны: а – каппа, б – йота, в – лямбда; 3 – гуаровая камедь; 4 – альгинат натрия; 5 – пектины: а – высокоэтерифицированный (HM), б – низкоэтерифицированный (LM), в – низкоэтерифицированный амидированный (LMA) [23]

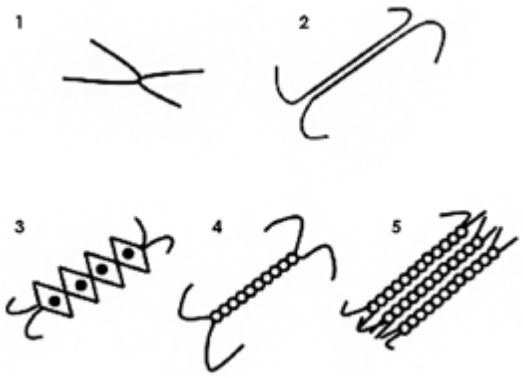


Рисунок 2. Модели участков соединения молекул полисахаридных гелей:

1 – точечная сшивка; 2 – расширенная блок-подобная зона соединения; 3 – модель «ячеек» (*egg-box model*) зон соединения в альгинатных и пектиновых гелях (блоки полисахаридных цепей связаны ионами кальция); 4 – зона двойного соединения; 5 – зона соединения, образованная агрегацией спиральных сегментов полисахаридных цепей [29]

Рисунок 3. Сравнение текстур гелей различных гидроколлоидов [6]

При растворении или набухании в воде молекулы гелеобразователей могут образовывать различные пространственные конфигурации. В работе Morris с соавторами предложены модели участков молекул полисахаридных гелей, связанных между собой (рисунок 2) [29].

Структурно-механические свойства гелей зависят от физико-химических свойств гелеобразователя [12, 30–32]. На рисунке 3 представлена сравнительная характеристика текстур гелей на основе различных гелеобразователей [6].

Факторы, влияющие на гелеобразование

В научной литературе описаны различные механизмы гелеобразования, в общем случае их можно разделить физически (изменение температуры) и химически индуцированные (изменение pH среды, добавление ионов, ферментов и других веществ) [11, 12, 31–33].

Важнейшими характеристиками гелеобразователей, непосредственно влияющими на свойства гелей, являются ***степень полимеризации*** и соотношение числа функциональных групп (***степень этерификации, степень амидирования, ацетилирования*** и др.).

Так, на процесс гелеобразования пектина влияет степень его этерификации: у HM-пектинов с более высокой степенью замещения величина показателя гелеобразования выше, поэтому их относят к быстро желирующим пектинам [6, 34]. Высоко- и низкоацетилированные геллановые камеди различаются по механизмам и условиям гелеобразования [12].

Вязкость растворов полимеров во многом определяется их молекулярной массой. Так, для 1% раство-

ров гуаровой камеди соотношение структурной вязкости к скорости сдвига повышается с повышением молекулярной массы. В общем случае влияние молекулярной массы гелеобразователя на структурно-механические свойства гелей наиболее выражено в области низких концентраций [6].

Концентрация гелеобразователя наряду с его молекулярной массой является одним из важнейших факторов, определяющих вязкость геля. На рисунке 4 представлена зависимость структурной вязкости гелей на основе гуммиарабика от его концентрации.

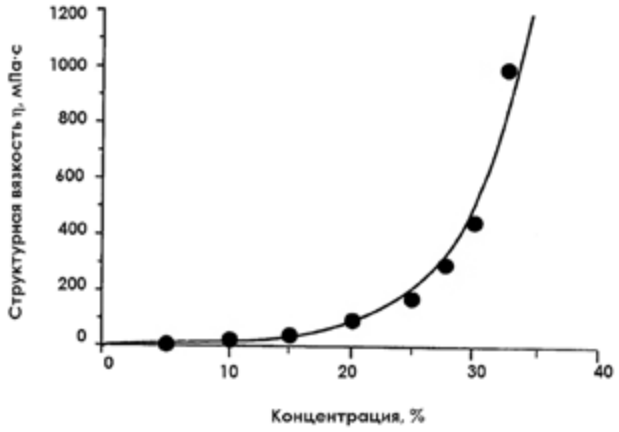


Рисунок 4. Зависимость структурной вязкости гелей на основе гуммиарабика от его концентрации [6]

В исследовании [34] проводили сравнительное изучение структурной вязкости гелей на основе пектина яблочного, пектина цитрусового, ГЭЦ и натрия альгината в концентрациях от 1% до 5% (рисунок 5).

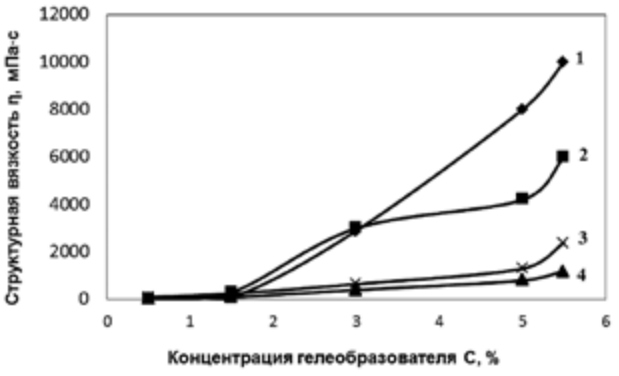


Рисунок 5. Зависимость структурной вязкости гелей от концентрации гелеобразователя:

1 – ГЭЦ, 2 – натрия альгинат, 3 – пектин яблочный, 4 – пектин цитрусовый (20 об/мин, 20 °С) [34]

Реологические характеристики данных гелей значительно отличаются. Так, основы с ГЭЦ имеют наиболее высокие значения вязкости, а наименьшие – основы с пектинами цитрусовым и яблочным. Основы с натрия альгинатом занимают промежуточное положение. Гелевые основы с ГЭЦ и натрия альгинатом образуются от 1,5% концентрации, а гели на основе пектинов – начиная с 3,0% концентрации полимеров. При концентрации пектина 4,0–5,5% гели обладают удовлетворительными потребительскими характеристиками [34].

Изменение ***температуры*** инициирует процесс гелеобразования многих гидроколлоидов. Некоторые полимеры образуют гели при нагревании (агар-агар), при нагревании с последующим охлаждением (каппа-, йотта-каррагинаны, геллановая камедь) или при охлаждении (камедь рожкового дерева) [11, 12].

При этом часто температура гелеобразования определяется химическим строением конкретного гелеобразователя. Известно, что температура гелеобразования 1,5% раствора геля агара, полученного из водорослей рода *Gracilaria*, составляет 42–45 °С, а из водорослей рода *Pterocladia* – 33–35 °С, что объясняется различной степенью метоксилирования углерода C_6 агаробиозы в составе агара (чем она выше, тем выше температура гелеобразования) [6].

На рисунке 6 представлены данные по изучению влияния температуры на структурную вязкость гелей для различных гелеобразователей [34].

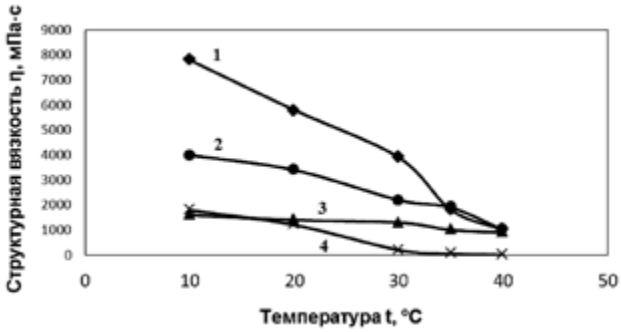


Рисунок 6. Зависимость структурной вязкости гелевых основ от температуры:

1 – ГЭЦ, 2 – натрия альгинат, 3 – пектин яблочный, 4 – пектин цитрусовый [34]

В исследовании [34] установлено, что наибольшее значение структурной вязкости при температуре 13 °С имеют гели на основе ГЭЦ. Однако при 20 °С структурная вязкость этих основ резко снижается, а при более высокой температуре (34 °С) уменьшается практически в 2 раза. Гелевая основа с натрия альгинатом в интервале от 13 °С до 34 °С практически не теряет своих вязкостных характеристик [34].

Влияние температуры на прочностные и вязкостные свойства описанных гелевых основ можно объяс-

нить изменением скорости броуновского движения компонентов дисперсной системы, влияющего на возможность межмолекулярных взаимодействий за счет вандерваальсовых сил, которые способствуют образованию коагуляционных структур [34].

Из анализа полученных зависимостей следует, что гели на основе пектинов сохраняют свою текучесть и пластичность при температурах от 13 до 20 °С, но при температуре 40 °С гелевая основа пектина цитрусового теряет свою вязкость в отличие от геля на основе пектина яблочного [34].

Сохранение текучести геля на основе пектина яблочного может быть объяснено его более прочной и стабильной структурой в отличие от геля на основе пектина цитрусового. Таким образом, гелевые основы с пектином яблочным и натрия альгинатом менее подвержены влиянию температурных колебаний [34].

На процесс гелеобразования многих гидроколлоидов существенное влияние оказывает значение ***pH среды***. Так, высокоэтерифицированные HM-пектины образуют гели при низких значениях pH (менее 3,5) и в присутствии сахарозы. Вязкость гелей каррагинанов и гуммиарабика снижается при значениях pH ниже 4,3. Растворы ксантановой камеди стабильны в широком диапазоне значений pH (2–12) [6, 11, 35].

Часто для гелеобразования, помимо создания определенного pH среды, требуется введение в систему катионов. Альгинаты, низкоэтерифицированные LM-пектины образуют гели в присутствии ионов двухвалетных металлов (кальция) при значениях pH ниже 4,0. Низкоацетилированная гелановая камедь образует гели в присутствии ионов кальция, калия, магния и др. При этом прочность гелей повышается при увеличении концентрации ионов до определенного предела [6, 23].

При образовании гелей каррагинанов в присутствии солей вначале происходит переход от клубков молекул к спиралям с их последующей агрегацией. При этом ионы металлов, связываясь с молекулами полимеров, снижают электростатическое отталкивание между ними, способствуя агрегации полимерных цепей. На рисунке 7 представлены структуры гелей каппа-каррагинана с ионами калия и йота-каррагинана с ионами кальция [6].

При разработке составов гелей для приема внутрь необходимо учитывать, что некоторые ***сахара*** в процессе гелеобразования могут играть роль дегидратирующих агентов, что может приводить к изменению структурно-механических характеристик. Так, при гелеобразовании низкоацетилированной гелановой камеди присутствие сахаров в системе снижает расход ионов, необходимых для инициирования процесса. При этом определенная концентрация сахара может способствовать повышению эластичности геля [6, 35, 38].

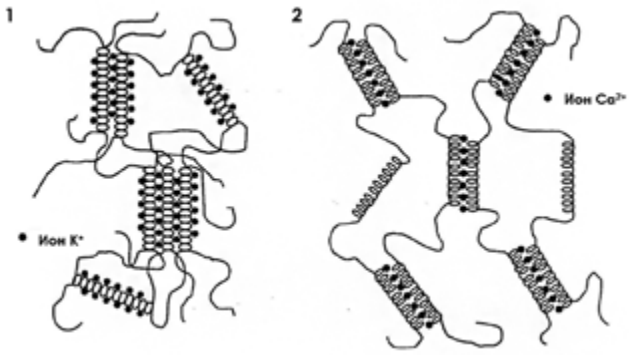


Рисунок 7. Гелеобразование каррагинанов в присутствии катионов:

1 – твердый, хрупкий гель каппа-каррагинана с ионом калия; 2 – эластичный гель йота-каррагинана с ионом кальция [6]

В исследовании [36] изучена зависимость вязкости системы «пектин – сахароза» от соотношения компонентов. Влияние концентрации сахарозы на структурную вязкость исследуемого геля представлено на рисунке 8.

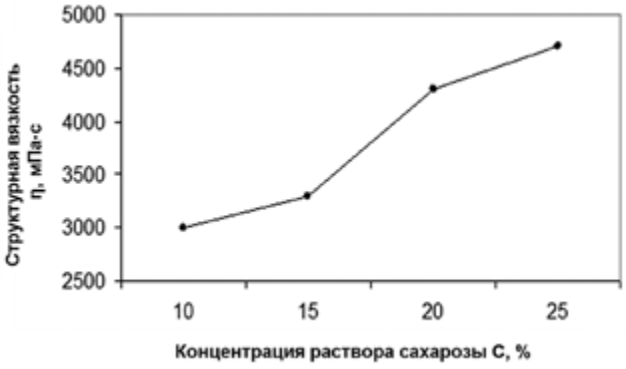


Рисунок 8. Зависимость структурной вязкости геля на основе пектина яблочного (5,5%) от концентрации сахарозы (20 об/мин, 20 °С) [34, 36]

Установлено, что структурная вязкость исследованных пектиновых гелей после добавления сахарозы повышается почти в 2 раза [34, 36].

Таким образом, гелеобразование гидроколлоидов зависит как от структуры молекулы полимера, так и от условий проведения процесса.

Смеси гелеобразователей

Гидроколлоиды могут выполнять функцию как собственно гелеобразователей, так и загустителей в зависимости от концентрации их растворов и других факторов [6, 11, 23, 35].

Для улучшения реологических характеристик гелей часто используют смеси различных гидроколлоидов. Природа синергизма может быть связана как с физическим взаимодействием, так и с химической ассоциацией молекул этих соединений.

В случае низких концентраций двух неассоциирующих гелеобразователей при их смешении будет образовываться гомогенная среда [рисунок 9 (1, 2)]. При высоких концентрациях возможно разделение на две фазы, каждая из которых будет обогащена одним из гелеобразователей [рисунок 9 (3)] [6].

Химическое взаимодействие молекул гелеобразователей может приводить к изменению свойств образованных гелей [рисунок 9 (4)] [6]. Типы бинарных полисахаридных гелевых структур представлены на рисунке 9 [37].

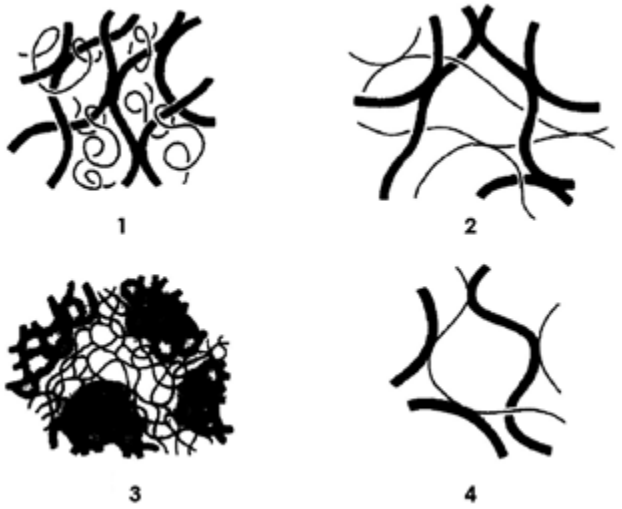


Рисунок 9. Типы бинарных полисахаридных гелевых структур:

1 – одиночная полимерная сеть, содержащая второй полимер в геле; 2 – взаимопроникающие сети; 3 – сети, разделенные фазой; 4 – связанная полимерная сеть [37]

Примерами систем, образованных в результате синергического взаимодействия гелеобразователей, являются гели ксантановой камеди и галактоманнанов (гуаровой камеди, камеди рожкового дерева). Основная цепь молекул галактомананнов состоит из остатков маннозы, а боковые цепи – из остатков галактозы. Степень и характер замещения у разных соединений различны. Так, гуаровая камедь имеет основную цепь с большим замещением, поэтому для развития синергического эффекта при гелеобразовании необходимы большие ее количества по сравнению с другими галактоманнами [6].

Ксантановая камедь взаимодействует с незамещенными участками основной цепи молекул галактоманнанов с образованием участков спиралевидного переплетения молекул. Этот процесс ускоряет гелеобразование и способствует повышению вязкости образующихся гелей [6].

Взаимодействие ксантановой камеди с галактоманнами зависит от соотношения компонентов, величины pH и наличия ионов в среде. Установлено, что гели с наибольшей вязкостью образуются при соотношении 80:20 для смеси «гуаровая камедь – ксантан» (рисунок 10) и 50:50 для смеси «камедь рожкового дерева – ксантан» [6].

При ассоциации камеди рожкового дерева и ксантановой камеди образуется термообратимый гель [6].

Наибольший синергический эффект взаимодействия ксантановой камеди с галактоманнанами достигается в деионизированной среде при нейтральных значениях pH [6].

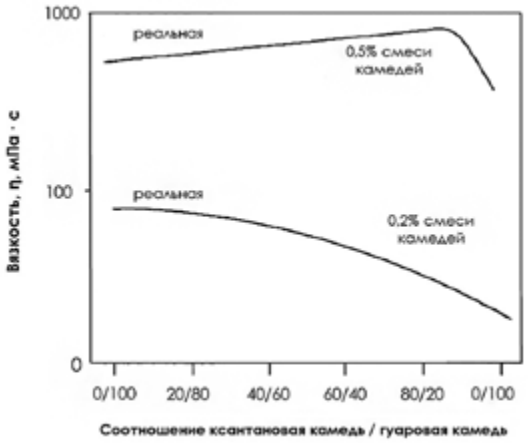


Рисунок 10. Структурная вязкость смесей ксантановой и гуаровой камедей (вискозиметр Brookfield LTV, 60 об/мин, 25 °C) [6]

Синергизм при гелеобразовании описан и для смесей галактоманнанов с каппа-каррагинанами. Их взаимодействие происходит по схожему механизму. Экспериментально установлено, что гели с наибольшей прочностью образуются при соотношениях каппа-каррагинана и камеди рожкового дерева от 60:40 до 40:60 [6].

Синергия по похожему механизму протекает и в смеси камеди рожкового дерева с агарами, полученными из некоторых видов водорослей [6].

В литературе описаны гели на основе комплексов гелеобразователей с галактоманнами: геллановая камедь – натрия альгинат – КМЦ; геллановая камедь – желатин; каппа-каррагинан – геллановая камедь; каппа-каррагинан – камедь рожкового дерева; геллановая камедь – агар-агар; каппа-каррагинан – геллановая камедь – пектин – камедь рожкового дерева и др. [11, 12, 38–41].

Гелеобразователи в составе ЛП и БАД к пище

Представленные на российском рынке ЛП и БАД к пище в форме гелей для приема внутрь содержат в составе как отдельные гелеобразователи, так и их смеси (рисунок 11).

Рисунок 11. Гелеобразователи в составе ЛП и БАД к пище в форме гелей для приема внутрь, представленных на российском рынке [2–5, 42–47]

Биологическая активность

В некоторых случаях важным свойством многих гидроколлоидов является их фармакологическая неиндифферентность [6, 16, 48, 49].

Установлено, что пектины и ряд других полисахаридов способны снижать уровень холестерина крови, уменьшая тем самым риск развития атеросклероза; связывать и выводить из организма токсины [35, 50].

В эксперименте установлена эффективность использования в профилактическом питании пищевых продуктов с сочетанным содержанием пектина и витаминов [50].

В работе [51] описаны следующие свойства альгиновой кислоты и альгинатов: способность связывать и выводить из организма радионуклиды, при высоких ионообменных и сорбционных свойствах; оказывать регенеративное действие; способствовать нормализации кишечной перистальтики.

КОРРИГЕНТЫ ВКУСА

Вкус геля для приема внутрь определяется комбинацией вкусовых характеристик действующих и вспомогательных веществ. Следует отметить, что вязкая структура данной формы способствует маскировке вкуса действующих веществ за счет обволакивающих свойств гелевой фазы [52].

При этом большое значение имеют органолептические показатели гелеобразователя. Отмечено, что разновидности одного и того же гидроколлоида, полученные из разного сырья, имеют разный вкус [12]. Например, органолептические показатели яблочного, цитрусового и свекольного пектинов различны. Исследователи отмечают, что наилучшим вкусом и запахом обладает пектин яблочный [34].

Компоненты растительного происхождения, входящие в состав БАД к пище в форме гелей для приема внутрь, также могут выполнять функцию корригентов вкуса. Соответствующие примеры рассмотрены в первой части статьи [55].

Наиболее распространенным способом улучшения вкуса гелей для приема внутрь является введение корригентов.

Примеры натуральных ароматизаторов в составе ЛП и БАД к пище: масло мяты перечной («Пепсан-Р», «Лаборатории Роза-Фитофарма», Франция), комплекс масел биксина, апельсина, лимона и мандаринового масла («Трансулоза», «Майоли Спиндлер Лабораториз», Франция), натуральный ароматизатор «Шоколад» («Эджел GLO», Agel Enterprises, LLC, США), натуральный ароматизатор «Апельсин» («СУПРАДИН® Киндер гель», Bayer Consumer Care AG, Швейцария) и др. [2–5, 46].

Как правило, в состав гелей для приема внутрь входят также и подсластители [1, 11, 53]. Наибольшее применение находят сахароза, фруктоза, сорбит и их комбинации (рисунок 12).

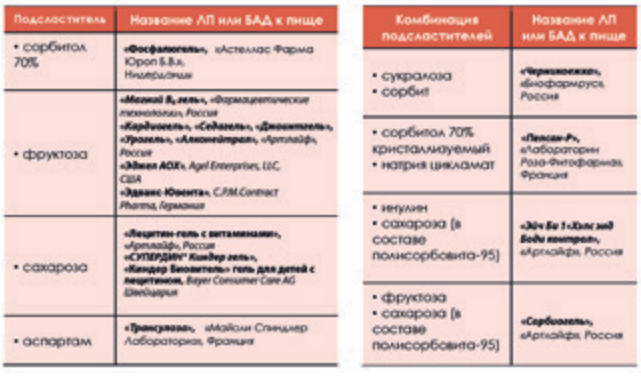


Рисунок 12. Подсластители в составе ЛП и БАД к пище в форме гелей для приема внутрь, представленных на российском рынке [2–5, 42–47]

Чаще всего для выбора корригирующих добавок используют метод оценки вкусового профиля с помощью балльной системы, разработанный А.И. Тенцовой, и метод оценки вкуса с помощью буквенных и числовых индексов, предложенный И.А. Егоровым [52].

КОНСЕРВАНТЫ И РЕГУЛЯТОРЫ pH

Как правило, гели для приема внутрь являются гидрофильными и содержат в качестве растворителя воду [54], поэтому в их состав требуется введение консервантов.

В научной литературе приведены сведения об использовании в качестве консервантов для данной ЛФ этилпараоксибензоата, метилпараоксибензоата, бензойной, сорбиновой кислот, натрия цитрата и другие [1].

Наиболее распространенными консервантами для ЛП и БАД к пище в форме гелей для приема внутрь являются кислота лимонная, натрия бензоат, калия сорбат и их комбинации (рисунок 13).

Консерванты	Названия ЛП или БАД к пище
• кислота лимонная • калия сорбат	**«Черникоежка»**, «Биофармуса, Россия **«Лецитин-гель свитаминами»**, «Артлайф», Россия
• кислота лимонная • натрия бензоат	**«Эджил GLO»**, Agel Enterprises, LLC, США **«Эдванс-Ювента»**, C.P.M. Contract Pharma, Германия
• кислота лимонная • калия сорбат • низин	**«Абрикот монина»**, «Глорион», Россия
• кислота лимонная • калия сорбат • натрия бензоат	**«Магний B_6 гель»**, «Фармацевтические технологии», Россия **«Кардиогель»**, **«Седагель»**, **«Джоинтгель»**, **«Гастрогель»**, **«Урогель»**, «Артлайф», Россия
• калия сорбат • натрия бензоат	**«Эйч Би 1«Хэлс энд Боди контрол»**, «Артлайф», Россия **«Алкомейтрал»**, «Артлайф», Россия
• натрия бензоат	**«Эджил AOX»**, Agel Enterprises, LLC, США
• метилпарагидроксибензоат	**«Пепсан-Р»**, «Лаборатории Роза-Фитофармак, Франция

Рисунок 13. Консерванты в составе ЛП и БАД к пище в форме гелей для приема внутрь, представленных на российском рынке [2–5, 42–47]

Следует отметить, что кислоты лимонная, сорбиновая, аскорбиновая и другие в составе гелей для приема внутрь выполняют также функцию регуляторов pH [17].

Одним из вариантов поддержания определенных значений pH в геле является также введение компонентов буферных систем [17]. Такую систему образуют, например, кислота лимонная и кальция цитрат («Сорбиогель», «Артлайф», Россия) [44].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К основным группам вспомогательных веществ, используемых при производстве гелей для приема внутрь, относятся гелеобразователи, растворители, консерванты и корригенты вкуса.

Наиболее распространенными гелеобразователями для ЛП и БАД к пище в форме гелей для приема внутрь являются следующие гидроколлоиды: пектины, альгинаты, агар-агар, каррагинаны, КМЦ, Na-КМЦ, ксантановая и гуаровая камеди, гуммиарабик. При этом часто в состав вводят комбинации гелеобразователей с эффектом синергизма (ксантановая камедь – гуаровая камедь и др.).

Структурно-механические свойства гелей зависят от физико-химических свойств гидроколлоида и условий гелеобразования (температуры, давления, значения pH, наличия солей и др.).

С целью коррекции вкуса и запаха в состав гелей для приема внутрь вводят подсластители (сахароза, фруктоза, сорбит и др.) и ароматизаторы.

Наличие воды в составе гелей для приема внутрь обусловливает введение консервантов (кислота лимонная, натрия бензоат, калия сорбат и их комбинации).

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/ (дата обращения 04.02.2017).
3. Регистр лекарственных средств России. URL: http://www.rlsnet.ru/lec_index_id_93.htm (дата обращения 04.02.2017).
4. Реестр продукции, прошедшей государственную регистрацию (выданные Федеральной службой, включая Управления). URL: http://fp.crc.ru/gosregfr/?type=list (дата обращения 04.02.2017).
5. Регистр БАД: Единый электронный справочник. URL: http://www.registrbad.ru/ (дата обращения 04.02.2017).
6. Справочник по гидроколлоидам / Под ред. Г.О. Филлипса и П.А. Вильямса, пер. с английского. – СПб.: ГИОРД, 2006. 536 с.
7. M.J. Dille, K.I. Draget, M.N. Hattrem. Modifying Food Texture. Chapter 9. The effect of filler particles on the texture of food gels // Ed. by: J.C. Rosenthal. – UK: Woodhead Publishing, 2015. P. 183–200.
8. E. Dickinson. Food colloids research: historical perspective and outlook // Advances in Colloid and Interface Science. 2011. V. 165. P. 7–13.
9. 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.
10. 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.
11. S. Banerjee, S. Bhattacharya. Food gels: gelling process and new applications // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2012. V. 52. P. 334–346.
12. Handbook of Hydrocolloids, 2nd ed. // Ed. by G.O. Phillips, P.A. Williams. – UK: Woodhead Publishing, 2009. 948 p.
13. М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, С.П. Кречетов. Изучение влияния состава комбинированной матрицы на реологические характеристики экспериментальных образцов пероральных гелей нимесулида // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4(17). С. 98–104.

14. 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.
15. К.В. Алексеев, И.А. Грицкова, С.А. Кедик. Полимеры для фармацевтической технологии / Под ред. проф. С.А. Кедика. – М.: Изд-во ИФТ, 2011. 511 с.
16. Physician's Desk Reference (PDR) for Herbal Medicines / Ed. by T. Fleming. 2000. 858 p.
17. Ассортиментный перечень для кондитерского и хлебопекарного производств. Торгово-промышленная группа компаний Союзснаб. 2015. С. 5–28.
18. CP Kelco. Products. URL: https://www.cpkelco.com/products/ zakazali (дата обращения 10.04.2017).
19. Новые химические технологии. Пектины. URL: http://newchemistry.ru/glossary/glossary.php?gloss_id=3341 (дата обращения 27.11.2016).
20. Foodchem International Corporation. Xanthan gum. URL: http://ru.foodchem.cn/products/Xanthan-Gum (дата обращения 10.04.2017).
21. Загустители и гелеобразователи. URL: https://soyuzopttorg.com/catalog (дата обращения 10.04.2017).
22. КМЦ вместо гуара // Бизнес пищевых ингредиентов. 2012. № 2. С. 21.
23. Functional ingredients for food. Danisco A/C. 2016. P. 104–113.
24. Xanthan – good for water. URL: http://www.danisco.com/product-range/xanthan/ (дата обращения 10.04.2017).
25. Pectin – jelling agent. URL: http://www.danisco.com/product-range/pectin/ (дата обращения 10.04.2017).
26. Пектины – виды и применение. URL: https://soyuzopttorg.com/1977/pektin (дата обращения 10.04.2017).
27. Агар, еще агар // Бизнес пищевых ингредиентов. 2013. № 6. С. 16–17.
28. Агар. URL: https://soyuzopttorg.com/1977/agar_zakazali (дата обращения 10.04.2017).
29. V. Morris. Polysaccharides: their role in food microstructure // Understanding and controlling the microstructure of complex foods / Ed. by D. Julian McClements. – Cambridge: Woodhead Publishing, 2007. P. 3–39.
30. Г. Шрамм. Основы практической реологии и реометрии. – М.: Колос-С, 2003. 312 с.
31. Е. Бибик. Реология дисперсных систем. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1981. 172 с.
32. А.И. Тенцова, В.М. Грецкий. Современные аспекты исследования и производства мазей. – М.: Медицина, 1980. 192 с.
33. T. Moschakis. Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions // Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2013. V. 18. P. 311–323.
34. С. М. Запорожська. Розробка складу і технології вітамінного препарату для дітей у формі гелю: автореф. дисс. ... к.фарм.н. – К.: Нац. мед. Академія післядипломної освіти ім. П. Шупика, 2010. 23 с.
35. Advances in Food Rheology and its Applications. Food Gels: Gelling Process and New Applications // Ed. by J. Ahmed, P. Ptaszek. 2017. P. 335–353.
36. С.М. Запорожська, І.І. Баранова, І.М. Грубник. Розробка складу і технології вітамінного гелю для дітей // Вісник фармації. Технологія лікарських препаратів . 2009. № 1(59). С. 27–29.
37. A. Nazir, A. Asghar, A. Aslam Maan. Advances in Food Rheology and its Applications. Chapter 13. Food Gels: Gelling Process and New Applications / Ed. by J. Ahmed, P. Ptaszek. 2017. P. 335–353.
38. S. Bayarri, I. Rivas, L. Izquierdo et al. Influence of texture on the temporal perception of sweetness of gelled systems // Food Research. 2007. V. 40. P. 900–908.
39. E. Arda, S. Kara, O. Pekcan. Synergistic effect of the locust bean gum on the thermal phase transitions of κ-carrageenan gels // Food Hydrocolloids. 2009. V. 23. P. 451–459.
40. S.H. Jong, J. Klok, F.V. Velde. The mechanism behind microstructure formation in mixed whey protein–polysaccharide cold-set gels // Food Hydrocolloids. 2009. V. 23. P. 755–764.
41. M. Caggioni, P.T. Spicer, D.L. Blair et al. Rheology and microrheology of a microstructured fluid: the gellan gum case. Journal of Rheology. 2007. V. 51. P. 851–865.
42. Эйч Би 1 «Хэлс энд Боди контрол» (HB 1 «Health&Body control») // «Артлайф», официальный сайт. URL: http://www.lsgeotar.ru/eych-bi-khels-end-bodi-13834.html#lek_form (дата обращения 29.03.2017).
43. Описание продукта – PD 210225-2.4EN. GRINDSTED® FF M 612. Система стабилизаторов Danisco A/C. 2016. 3 p.
44. Артлайф. Фитогели. URL: http://www.artlife.ru/catalog/b/fito.html (дата обращения 04.02.2017).
45. Черникоежка. URL: http://chernikoezhka.ru/ (дата обращения 27.11.2016).
46. Agel. URL: http://agel.ru/products/gel/ (дата обращения 04.02.2017).
47. Gloryon. URL: https://www.gloryon.com/ruCY/info (дата обращения 27.11.2016).
48. Биологически активные вещества растительного происхождения: В 3-х т. / Российская академия наук, Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина. – М.: Наука, 2000. Т. 1. 347 с.
49. 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.
50. Т.В. Спиричева, В.Б. Спиричев, В.М. Коденцова и др. Эффективность использования в профилактическом питании пищевых продуктов с сочетанным содержанием пектина и витаминов // Вопросы питания. Т. 80. № 4. 2011. С. 49–54.
51. А.Г. Одинец, О.И. Орлов, В.К. Ильин. Радиопротекторные и антиоксидантные свойства геля из бурых морских водорослей // Вестник восстановительной медицины. 2015. № 6(70). С. 89–96.
52. М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина. Проблемы коррекции органолептических свойств лекарственных препаратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 13. С. 64–73.
53. A.C. Mosca, F. Velde. Taste enhancement in food gels: Effect of fracture properties on oral breakdown, bolus formation and sweetness intensity // Food Hydrocolloids. 2015. V. 43. P. 794–802.
54. Приказ Минздрава России от 27.07.2016 N 538н «Об утверждении Перечня наименований лекарственных форм лекарственных препаратов для медицинского применения» (Зарегистрировано в Минюсте России 17.08.2016 № 43291).
55. Е.Ю. Загорулько, А.А. Теслеев. Гели для приема внутрь. Часть 1. Лекарственные препараты и биологически активные добавки к пищи (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 3(20). С. 42–48.

УДК 615.454.22

МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ СИСТЕМ «КРЕМНИЙ – РАСТВОРИТЕЛЬ – ВИНПОЦЕТИН» И «ДИОКСИД КРЕМНИЯ – РАСТВОРИТЕЛЬ – ВИНПОЦЕТИН»

Ю.А. Полковникова[1]*, А.С. Леньшин[1], А.А. Глушко[2], О.М. Хишова[3]

Резюме. Моделированием молекулярной динамики изучен процесс адсорбции и десорбции винпоцетина с поверхности кристаллического кремния и оксида кремния в различные среды. Установлена десорбция винпоцетина в воду как с поверхности кремния, так и с поверхности оксида кремния. Характер десорбции винпоцетина с кремния и оксида кремния при pH 6,8 и pH 7 различается незначительно (в пределах погрешности результатов моделирования). Десорбция винпоцетина в кислой среде (pH 2) с кремния и оксида кремния происходит более эффективно и с большей скоростью по сравнению со средами с pH 6,8 и pH 7.

Ключевые слова: молекулярная динамика, винпоцетин, адсорбция, кремний, оксид кремния.

MODELING AND ANALYSIS OF MOLECULAR DYNAMICS OF SILICON-SOLVENT-VINPOCETIN SYSTEMS AND SILICON-SOLVENT-VINPOCETIN DIOXIDE

Yu.A. Polkovnikova[1]*, A.S. Lenshin[1], A.A. Glushko[2], O.M. Khishova[3]

Abstract. The process of desorption of vinpocetine on the surface of crystalline silicon and silicon oxide in various media has been studied by molecular dynamics modeling. The desorption of vinpocetine in water has been established both from the surface of silicon and from the surface of silicon oxide. The character of the desorption of vinpocetine from silicon and silicon oxide at pH 6.8 and pH 7 differs insignificantly (within the error of the simulation results). The desorption of vinpocetine in acidic medium (pH 2) from silicon and silicon oxide occurs more efficiently and at a higher rate, compared to pH 6.8 and pH 7.

Keywords: molecular dynamics, vinpocetine, adsorption, silicon, silicon oxide.

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394018, Россия, г. Воронеж, ул. Студенческая, д. 3

2 – Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, 357500, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

3 – УО «Витебский государственный медицинский университет», 210023, Республика Беларусь, г. Витебск, пр-т Фрунзе, д. 27

1 – Voronezh State University, 3, Studencheskaya str., Voronezh, 394018, Russia

2 – Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University of the Ministry of Health Care of Russia, 11, Kalinina prosp., Pyatigorsk, 357500, Russia

3 – Vitebsk State Medical University, 27, Frunze avenue, Vitebsk, 210023, Republic of Belarus

* адресат для переписки:
E-mail: juli-polk@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Выбор компонентов лекарственной формы требует учета физико-химических факторов, влияющих на высвобождение действующих веществ, таких как температура, химический состав и pH среды [1]. Правильная интерпретация экспериментальных данных, полученных при изучении высвобождения действующего вещества из таких систем доставки, как наночастицы, невозможна без понимания физико-химических процессов, происходящих на молекулярном уровне [2, 3].

Полезным инструментом для данной цели является вычислительная химия, позволяющая моделировать динамику исследуемых систем на атомарном уровне, теоретически оценивать термодинамические и кинетические характеристики исследуемых процессов [4]. Исходными данными для моделирования процессов высвобождения является химическая структура действующего вещества и веществ, входящих в состав наночастиц. На основе данных о химической структуре могут быть построены пространственные молекулярные модели компонентов лекарственной формы и с использованием метода молекулярной механики проведено моделирование молекулярной динамики эволюции исследуемых систем во времени [5]. Таким образом, моделирование методом молекулярной механики является основой для более точного – квантово-химического моделирования.

Цель исследования – изучение процесса адсорбции и десорбции винпоцетина на поверхности кристаллического кремния и оксида кремния в среде воды, раствора HCl 0,01 М и фосфатной буферной смеси с pH 6,8.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для моделирования процесса адсорбции и десорбции винпоцетина на поверхности кремния и оксида кремния в различных средах предварительно были построены модели компонентов исследуемых систем и вычислены заряды их атомов квантово-химическим методом. В качестве компонентов исследуемых систем использованы модели молекулы винпоцетина в виде основания и в виде катиона, а также модели фрагментов кристаллической решетки кремния и оксида кремния. Пространственные модели компонентов были построены с использованием программы Hyper Chem 8,01 (лицензия HC80SA-4-1BBF6).

Для построенных моделей молекул произведена оптимизация геометрии методом молекулярной механики mm+ [6]. После этого оптимизация геометрии производилась с использованием метода ab initio (UHF 3-21G*). Далее осуществлялся расчет зарядов атомов методом ab initio (DFT UB3LYP 6-31G*) [7].

После сборки моделей производилась нормализация заряда в соответствии с формулой:

$$C_i = C_i' - \bar{C}, \quad (1)$$

где C_i – нормализованный заряд атома i; C_i' – исходный заряд атома i; $\bar{C}$ – средний исходный заряд.

Полученные фрагменты были далее использованы для сборки моделируемых систем в программе «Биоэврика» [5]. В зависимости от растворителя использованы различные степени протонирования молекул. При моделировании высвобождения винпоцетина в кислую водную среду (pH=2) использовался катион винпоцетина. Структура поверхности кремния варьировалась в зависимости от величины pH. Гидроксильные группы на поверхности оксида кремния частично ионизировались для вычислений при pH 6,8 и pH 7 [8, 9].

Сборка и моделирование молекулярной динамики исследуемых систем осуществлялась в программе «Биоэврика». Системы помещались в прямоугольные граничные условия, и производилась оптимизация их геометрии методом молекулярной механики (Amber94) [10]. После этого устанавливались прямоугольные периодические граничные условия и дополнительно производилась оптимизация геометрии.

Моделирование молекулярной динамики осуществлялось методом молекулярной механики в силовом поле Amber94 с шагом 1 фс. Вандерваальсово и электростатическое взаимодействия рассчитывались для межатомных расстояний менее 2 нм. В процессе моделирования использовались прямоугольные периодические граничные условия. Для поддержания постоянной температуры применялся термостат Берендсена [11] отдельно для растворителя с ионами и системы «кристалл – винпоцетин». Время релаксации термостата составляло 10 фс. Термостатирование осуществлялось в соответствии с графиком, приведенным в таблице 1. Температура, задаваемая термостатом, линейно изменялась между моментами времени графика.

Таблица 1.

График работы термостата в процессе моделирования молекулярной динамики

Время, фс	Температура, К
0	0
300000	310

На первом этапе производилось моделирование всей системы в течение 10 нс с целью термодинамического уравновешивания. Далее производилось моделирование адсорбции винпоцетина в течение 100 нс.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственные модели молекулы винпоцетина в виде основания и катиона, а также фрагментов кристаллической решетки кремния и оксида кремния представлены на рисунках 1–3.

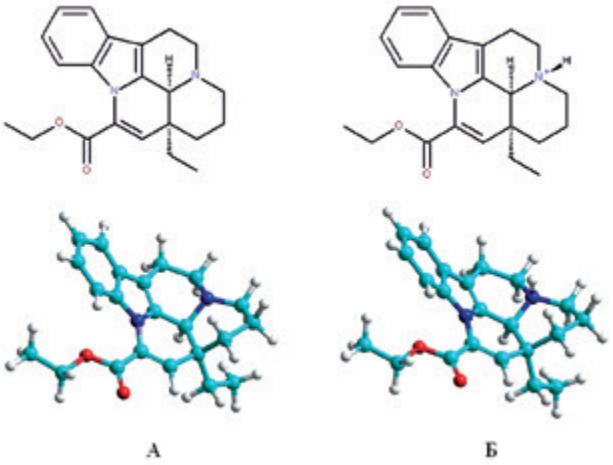


Рисунок 1. Химическая структура и пространственное строение винпоцетина (А – основание, Б – катион)

На рисунках 4 и 5 показаны пространственные структуры винпоцетина в виде основания и катиона (рисунок 4), а также фрагментов кристаллической решетки кремния и оксида кремния (рисунок 5).

В таблице 2 приведены изображения пространственных структур моделируемых систем в различные моменты времени термодинамического уравновешивания, а также структуры, сформированные конформацией молекулы винпоцетина на поверхности кремния.

Винпоцетин связывается с адсорбентом этильными группами с группами –H и –OH на поверхности.

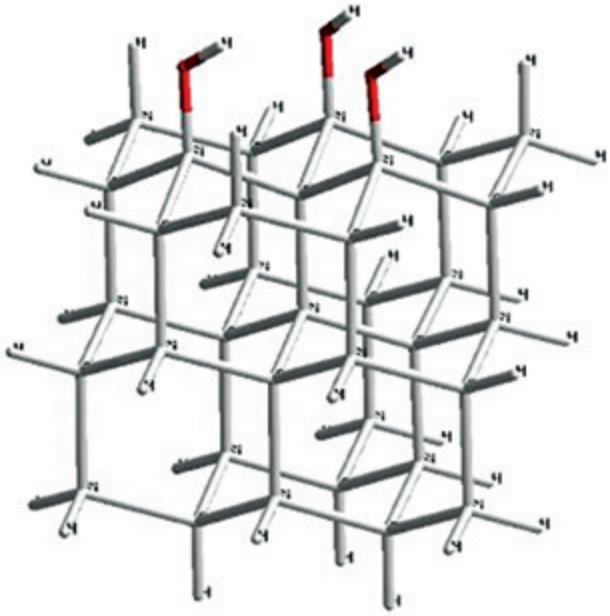


Рисунок 2. Пространственное строение фрагментов кристаллической решетки кремния с группами SiH и SiOH на поверхности

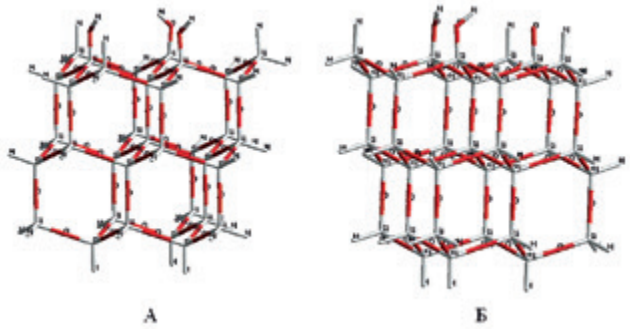


Рисунок 3. Пространственное строение фрагментов кристаллической решетки оксида кремния (SiO_2) при pH=2 (А) и при pH=6-7 (Б)

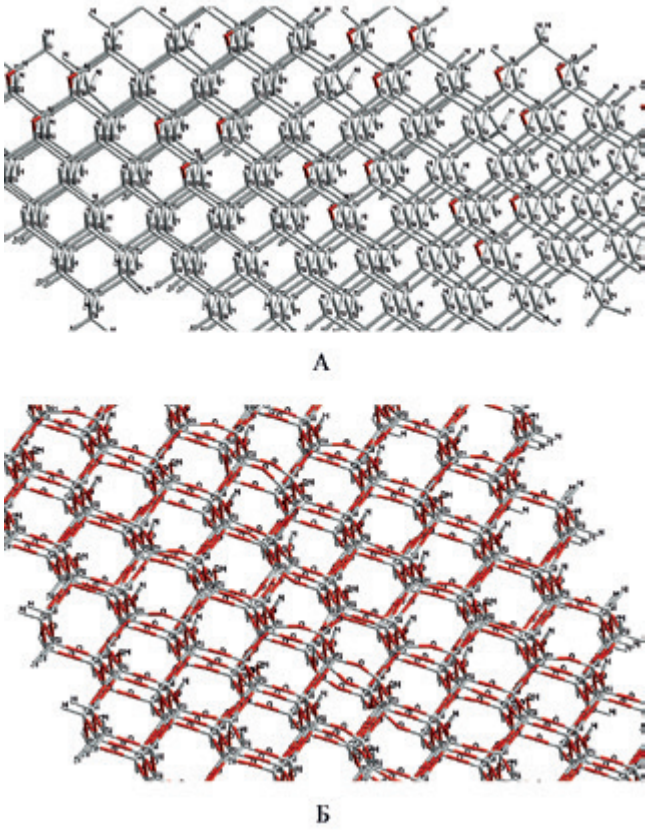


Рисунок 5. Пространственное строение кристаллической решетки кремния с заместителями –Н и –ОН на поверхности (А) и оксида кремния (Б)

Также в данном взаимодействии участвует кислород сложноэфирной связи винпоцетина, образующий водородные связи с –ОН-группами адсорбента.

В процессе связывания с оксидом кремния участвует сложноэфирная группа винпоцетина, образуя водородные связи с –ОН-группами поверхности адсорбента. Для адсорбции при pH 6,8 и pH 7 важную роль в

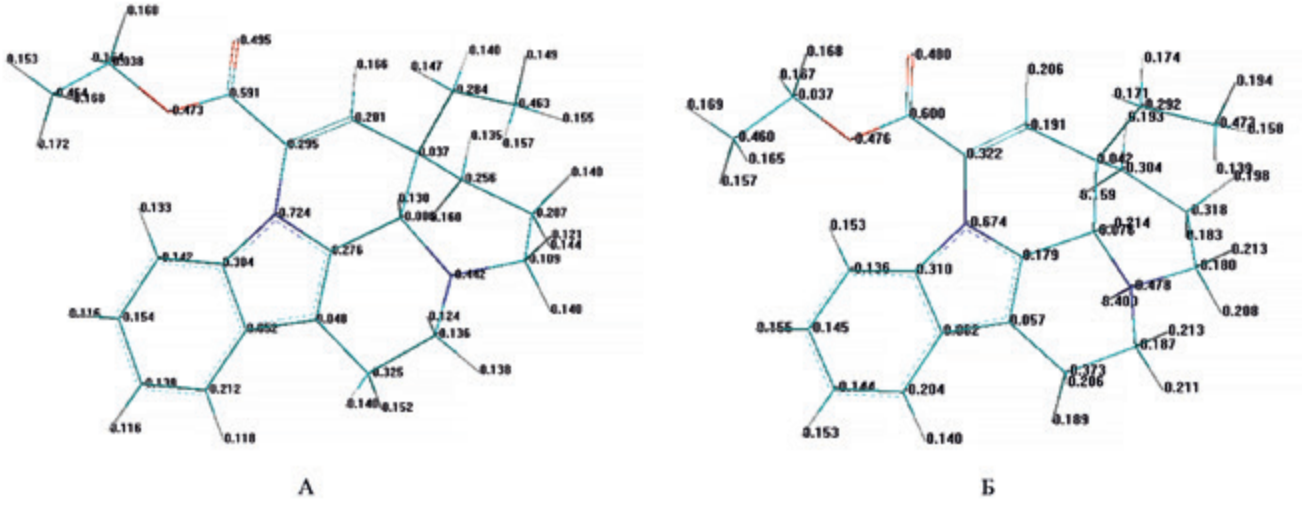
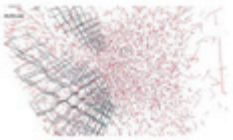
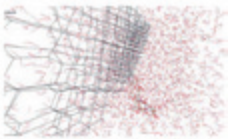
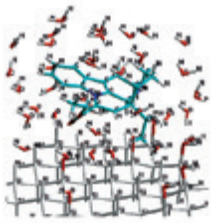
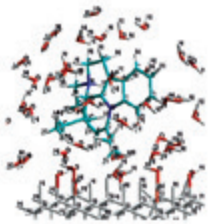
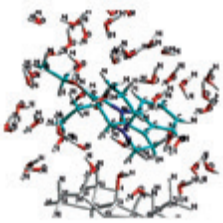
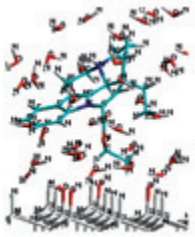
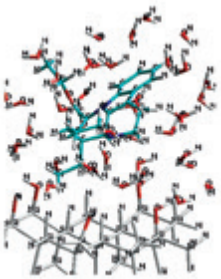
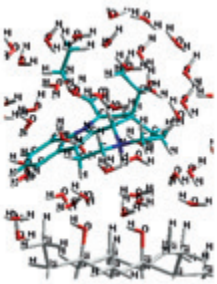


Рисунок 4. Пространственная структура и заряды атомов молекулы винпоцетина (оптимизация геометрии UHF 3-21G*, расчет зарядов атомов UB3LYP 6-31G*): А – основание, Б – катион

связывании винпоцетин-катиона играет электростатическое взаимодействие, так как на поверхности оксида кремния образуются ионизированные гидроксильные группы с отрицательным зарядом [9].

Таблица 2.

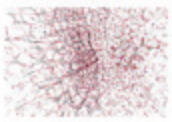
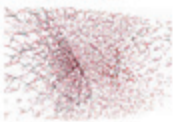
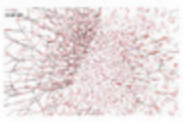
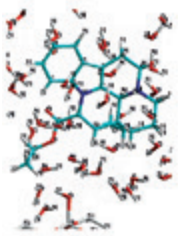
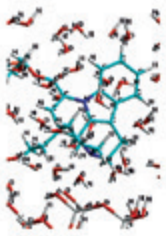
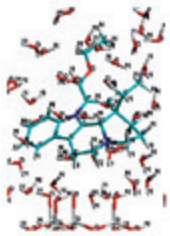
Состояние молекулы винпоцетина у поверхности кремния в различные моменты времени

Время, нс	Кремний – винпоцетин	Кремний – винпоцетин-катион
Термодинамическое уравновешивание		
10		
Конформация адсорбата		
1		
2		
3		

По результатам анализа вандерваальсова взаимодействия между винпоцетином и поверхностью адсорбента были определены средние длительности связывания молекулы винпоцетина с поверхностью кремния (рисунок 6) и оксида кремния (рисунок 7). Для этого было определено среднее время, в течение которого модуль энергии вандерваальсова взаимодействия между молекулой (ионом) винпоцетина и адсорбентом превышал 2 кДж/моль. Временные ряды энергии вандерваальсова взаимодействия предварительно подвергались сглаживанию методом скользящего среднего (окно усреднения 1,6 нс).

Таблица 3.

Состояние молекулы винпоцетина у поверхности оксида кремния (SiO_2) в различные моменты времени

Время, нс	Оксид кремния – винпоцетин-катион	Оксид кремния ионизированный – винпоцетин	Оксид кремния ионизированный – винпоцетин-катион
Термодинамическое уравновешивание			
10			
Конформация адсорбата			
1			

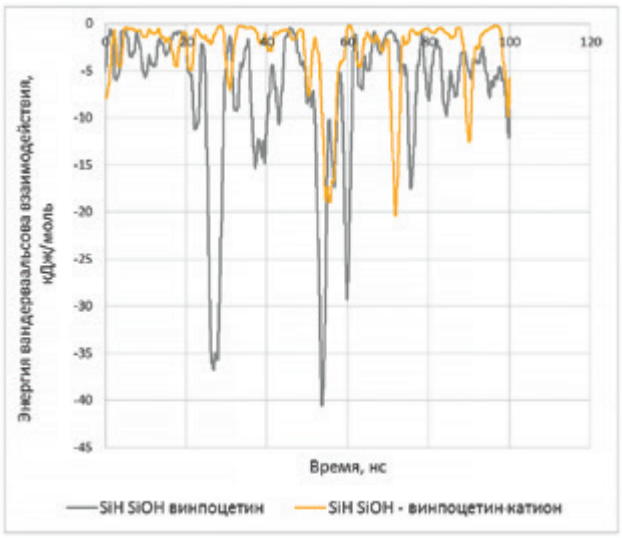


Рисунок 6. Динамика изменения энергии вандерваальсова взаимодействия между молекулой (ионом) винпоцетина и кремнием

С целью оценки энергии активации десорбции винпоцетина проводилось моделирование молекулярной динамики перехода молекулы винпоцетина с поверхности адсорбента в воду под действием постоянной силы 3 кДж/(моль · нм), направленной перпендикулярно поверхности адсорбента. Для моделирования молекулярной динамики использовалась методика, аналогичная предыдущей. На рисунке 8 представлены графики изменения энергии вандерваальсова взаимодействия винпоцетина с адсорбентом.

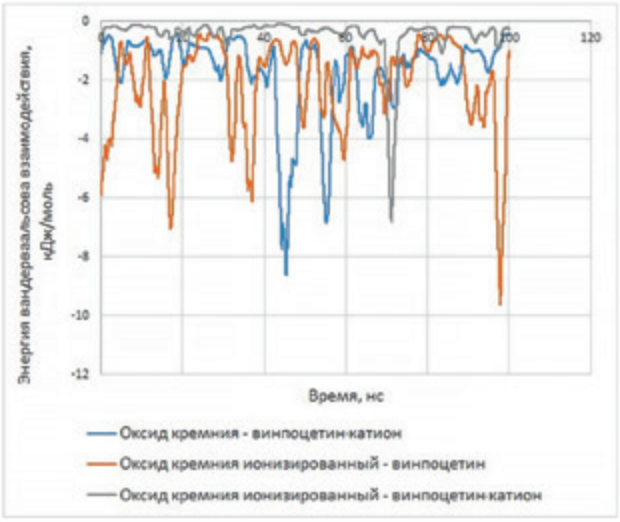


Рисунок 7. Динамика энергии вандерваальсова взаимодействия между молекулой (ионом) винпоцетина и оксидом кремния

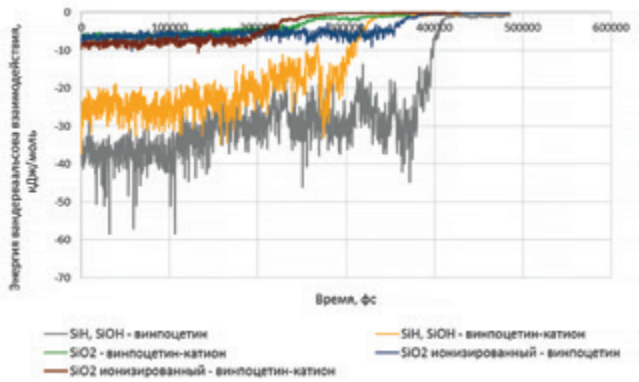


Рисунок 8. Энергетический профиль десорбции винпоцетина с поверхности кремния и оксида кремния в воду

Полученные данные использовались для оценки длительности десорбции винпоцетина методом молекулярной механики. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Результаты оценки кинетических характеристик адсорбции винпоцетина на кремнии и оксиде кремния методом молекулярной динамики

Система	Средняя длительность связывания винпоцетина с поверхностью, нс
SiH, SiOH – винпоцетин	5,75
SiH, SiOH – винпоцетин-катион	2,05
SiO_2 неионизированый – винпоцетин-катион	1,58
SiO_2 ионизированый – винпоцетин	3,18
SiO_2 ионизированый – винпоцетин-катион	2,57

В соответствии с полученными результатами (таблица 4) десорбция винпоцетина в виде катиона происходит быстрее по сравнению с десорбцией основания. Длительность десорбции молекулы винпоцетина с поверхности кремния и оксида кремния различается в зависимости от ионизации функциональных групп.

Полученные результаты далее были использованы для оценки длительности десорбции винпоцетина с поверхности кремния и оксида кремния при различных значениях pH растворителя (воды).

Учитывая показатель константы диссоциации винпоцетина pKa=7,1 [12] и используя уравнение Гендерсона – Хассельбаха [13], можно рассчитать относительное содержание винпоцетин-основания и винпоцетин-катиона в растворе:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pKa}}{1+10^{pH-pKa}}, \quad (2)$$

$$\beta = 1-\alpha, \quad (3)$$

где α и β – относительное содержание винпоцетин-основания и винпоцетин-катиона в растворе соответственно.

С учетом доли ионизированных и неионизированных молекул винпоцетина при различных pH (рисунок 9) и характеристик адсорбции, полученных методом молекулярной динамики для обеих форм винпоцетина на различных адсорбентах, были рассчитаны средняя длительность связывания и энергия активации для данных адсорбентов при различных pH. Для этого были рассчитаны взвешенные средние длительности связывания и энергии активации десорбции. В качестве весов были использованы относительные содержания винпоцетина и винпоцетин-катиона при различных pH (таблица 5).

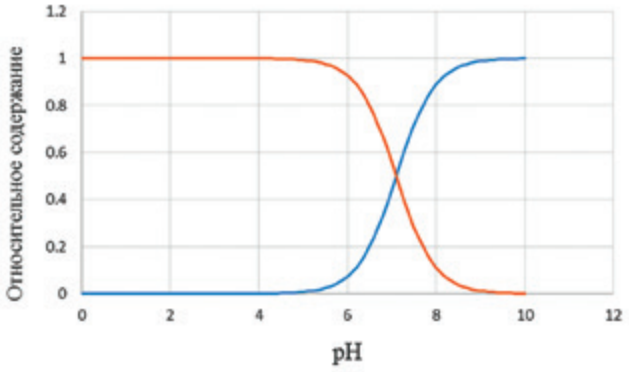


Рисунок 9. Относительное содержание винпоцетин-основания и винпоцетин-катиона в растворе в соответствии с уравнением Гендерсона – Хассельбаха

Таблица 5.

Расчет кинетических характеристик адсорбции винпоцетина для различных значений pH

pH	Доля основания	Доля катиона	Длительность связывания винпоцетина с адсорбентом, нс	
			Кремний	SiO_2
2	0,00	1,00	2,05	1,58
6.8	0,33	0,67	3,28	2,78
7	0,44	0,56	3,69	2,84

Анализ зависимости длительности десорбции винпоцетина при различных pH позволяет сделать вывод о более прочном связывании препарата с адсорбентом при pH 6,8 и pH 7 по сравнению с pH 2. Длительность связывания винпоцетина с кремнием существенно не отличается от длительности связывания с оксидом кремния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты моделирования молекулярной динамики свидетельствуют о возможности стабильной адсорбции винпоцетина на поверхности кремния и оксида кремния.

Винпоцетин способен десорбироваться в воду как с поверхности кремния, так и с поверхности оксида кремния.

Десорбция винпоцетина в кислой среде (pH 2) с кремния и оксида кремния происходит более эффективно и с большей скоростью по сравнению со средами с pH 6,8 и pH 7.

Характер десорбции винпоцетина с кремния и оксида кремния при pH 6,8 и pH 7 различается незначительно (в пределах погрешности результатов моделирования).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю.А. Полковникова, А.С. Леньшин, П.В. Середин. Наночастицы с нейротропными лекарственными средствами на основе пористого кремния // Неорган. материалы. 2017. № 53(5). С. 479–485.
2. Н.Б. Демина, С.А. Скатков, А.И. Тенцова. Нанотехнологические аспекты современной лекарственной формы // Фармация. 2012. № 4. С. 47-50.
3. Н.Б. Демина, С.А. Скатков, А.И. Тенцова. Перспективные стратегии развития технологии наноносителей // Фармация. 2012. № 7. С. 53–55.
4. Ю.А. Полковникова, А.А. Глушко, И.Ю. Михайловская, Ё.С. Кариева. Моделирование процесса высвобождения винпоцетина из микрокапсул с гидрофобной оболочкой // Фармация и фармакология. 2017. № 5(4). С. 344–367.
5. Т.А. Гендугов, Л.И. Щербакова, А.А. Глушко и др. Изучение взаимодействия производных 4-оксопиримидина с активным центром циклооксигеназы-2 методом молекулярной динамики // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 2-2. URL: https://science-education.ru/ru/article/view?id=22796 (дата обращения 06.09.2017).
6. J. Brian Teppen. HyperChem, release 2: molecular modeling for the personal computer // J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1992. V. 32. P. 757–759.
7. B.W Clare., C.T. Supuran. Semi-empirical atomic charges and dipole moments in hypervalent sulfonamide molecules: descriptors in qsar studies // J. Mol. Struct. (Theochem). 1998. V. 428. P. 109–121.
8. S. K. Ramakrishnan, E. Estephan, M. Martin et al. Molecular Mechanism of Selective Binding of Peptides to Silicon Surface // J. Chem. Inf. Model. 2014. V. 54. P. 2117–2126.
9. F.S. Emami, V. Puddu, R.J. Berry, V. Varshney, S.V. Patwardhan, C.C. Perry. Force Field and a Surface Model Database for Silica to Simulate Interfacial Properties in Atomic Resolution Chem // Mater. 2014. V. 26. P. 2647–2658.
10. В. И. Минкин, Б. Я. Симкин, Р. М. Миняев. Строение молекул. – Ростов-на-Дону: Феникс, 1997. 560 с.
11. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Van Gunsteren, A. Dinola, and J. R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath // J. Chem. Ph ys. 1984. V. 81. P. 3684–3690.
12. S. Golob, M. Perry, M. Lusi, M.R. Chierotti, I. Grabnar, L.D. Lassiani, D. Voinovich, M.J. Zaworotko. Improving Biopharmaceutical Properties of Vinpocetine Through Cocrystallization // J. Pharm. Sci. 2016. V. 105. №. 12. P. 3626–3633.
13. A.G. Hills. pH and the henderson-hasselbalch equation // Am. J. Med. 1973. V. 55. P. 131–133.

УДК 615.324; 615.454.1; 543.063; 543.435; 543.42.062; 543.422.3-76

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ БИФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МАЗИ

К.Р. Савельева[1]*, Т.Ю. Андреевичева[1], Л.В. Персанова[1], О.А. Остапюк[1], С.В. Поляков[1], В.Н. Шестаков[1]

Резюме. Разработана новая бифункциональная мазь с хондроитина сульфатом и целекоксибом на гидрофильной основе. Определены оптимальные условия приготовления и технологические свойства мази. Предложены методы стандартизации активных компонентов в бифункциональном препарате. Количественное определение хондроитина сульфата в мази проведено методом турбидиметрического титрования. Средняя относительная погрешность определения при P=95% – не более 2,01%. Количественное определение целекоксиба проведено УФ-спектрофотометрическим методом. Средняя относительная погрешность определения при P=95% – не более 3,22%.

Ключевые слова: бифункциональная мазь, хондроитина сульфат, целекоксиб, полиэтиленгликоль, диметилсульфоксид.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY AND METHODS OF CONTROL OF BIFUNCTIONAL OINTMENT

K.R. Saveleva[1]*, T.Y. Andreevicheva[1], L.V. Persanova[1], O.A. Ostapyuk[1], S.V. Polyakov[1], V.N. Shestakov[1]

Abstract. A new bifunctional ointment with chondroitin sulfate and celecoxib on a hydrophilic base was developed. The optimum conditions of the technology and technological properties of the ointment were determined. The techniques for quantitativecontrol of active components in a bifunctional ointment are developed. Quantitative determination of chondroitin sulfate in an ointment was conducted by turbidimetric titration. A relative error of determination with confidence probability P=95% is not more than 2,01%. Quantitative determination of celecoxib was conducted by spectrophotometry. A relative error of determination with confidence probability P=95% is not more than 3,22%.

Keywords: bifunctional ointment, chondroitin sulfate, celecoxib, polyethylene glycol, dimethylsulfoxide.

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации, 109044, Россия, г. Москва, Лавров переулок, д. 6.

1 – State Institute of Drugs and Good Practices of the Ministry of Industry and Trade of Russian Federation, 6, Lavrov lane, Moscow,109044, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: saveleva@gilsinp.ru
Тел.: 8 (495) 676 43 60 доб. 2–28

ВВЕДЕНИЕ

Болезни опорно-двигательной системы занимают важное место в современной медицине, причем в последние годы их количество имеет определенную тенденцию к росту. Одним из самых распространённых заболеваний опорно-двигательной системы является остеоартроз (ОА). Это болезнь суставов, в основе которой лежит поражение суставного хряща с вторичными изменениями суставных поверхностей. Дистрофические изменения в суставах заключаются в постепенной дегенерации связок, хряща, капсул суставов. Наиболее типичными симптомами подобных заболеваний являются боль, частичная утрата подвижности, изменение структуры сустава.

Развитие заболевания не влияет на продолжительность жизни, но возникновение хронического болевого синдрома является одной из главных причин преждевременной потери трудоспособности, значительного снижения качества жизни пациентов и инвалидизации. Согласно отчету ВОЗ о социальных последствиях заболеваний, ОА коленных суставов занимает 4-е место среди причин нетрудоспособности у женщин и 8-е – у мужчин [1]. Одной из основных причин роста числа больных с дегенеративно-метаболическими поражениями суставов является глобальное постарение населения [2]. В результате проведенных эпидемиологических исследований было установлено, что количество больных ОА составляет около 15% населения Земли [1].

В России распространенность ОА составляет более 20 на 1 тыс. населения в возрасте 18 лет и старше. Ежегодно в России впервые регистрируется около 600 тыс. случаев ОА. Так, по официальным данным, заболеваемость ОА в России за последние годы возросла на 35%. Прогнозируют, что к 2020 г. встречаемость ОА в популяции может достичь 57%. При этом наблюдается тенденция роста заболеваемости за счет возрастной группы моложе 45 лет [3].

Лечение остеоартроза до недавнего времени было направлено скорее на уменьшение симптомов болезни, нежели на ее причину. Анальгетики, нестероидные противовоспали-

тельные и стероидные средства составляли основу лечения ОА. Однако побочные эффекты большинства этих лекарственных средств заставили пересмотреть показания к их широкому назначению больным ОА и способствовали разработке препаратов, способных контролировать течение болезни.

В последние годы широкое распространение в клинической практике получили лекарственные препараты на основе гликозаминогликанов. Среди таких препаратов первостепенная роль принадлежит естественным компонентам хрящевого межклеточного вещества – хондроитина сульфату и глюкозамину. Эти препараты способны контролировать течение заболевания, замедлять темпы его прогрессирования, стабилизировать структурные изменения в гиалиновом хряще и предупреждать развитие остеоартроза в интактных суставах [4]. Большой интерес представляют комбинированные препараты, в состав которых входят хондроитина сульфат, глюкозамина сульфат, глюкозамина гидрохлорид, с добавлением нестероидных противовоспалительных препаратов. Это сочетание действующих веществ усиливает и взаимодополняет фармакологические эффекты препаратов. Однако пероральное применение препаратов, особенно нестероидных противовоспалительных препаратов, ограничивается из-за большого числа побочных явлений, прежде всего со стороны желудочно-кишечного тракта и сердечно-сосудистой системы.

В связи с этим перспективным является применение локальной противовоспалительной терапии, так как лекарственные препараты в виде мазей, кремов, гелей позволяют избежать системных побочных реакций, особенно у пожилых пациентов [5]. Несмотря на то, что в медицинской практике используются разнообразные лекарственные средства, создание доступных, эффективных и безопасных лекарственных препаратов, которые позволяют не только контролировать симптомы болезни, но и останавливать ее прогрессирование, остается одной из актуальных проблем.

Целью настоящего исследования является разработка технологии и методов контроля бифункциональной мази, содержащей два активных компонента разного фармакологического действия, а именно корректор метаболизма костной и хрящевой ткани – хондроитина сульфат и нестероидное противовоспалительное средство группы коксибов – целекоксиб.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе работы были использованы: хондроитина сульфата субстанция – порошок для пероральных лекарственных форм (98,8%, Bioiberica, Испания, с.12/0002, срок годности март 2018 г.), целекоксиба субстанция – порошок (99,0%, Alembic Pharmaceutical Limited, Индия, серия 1502001984, срок годности март 2019 г.), диметилсульфоксид (фарм., Panreac, Испания, № 191954), полиэтиленгликоль-400 (фарм., Panreac, Испания, № 142436), полиэтиленгликоль-4000 (фарм., Panreac, Испания, № 142438), стандарт Европейской Фармакопеи хондроитина сульфата натрия № Y0000280, серия 2.0, стандарт Европейской Фармакопеи целекоксиба № Y0001445, серия 2.0, цетилпиридиний хлорид C9002 (Sigma-Aldrich, США), диметилсульфоксид УФ-ИК-ВЭЖХ-ГПХ (Panreac, Испания, № 361954).

Аппаратура: гомогенизатор Silent CrusherM (Heildolph, Германия), магнитная мешалка с подогревом (IKA, Германия), pH-метр pH 21 (Hanna, Германия), климатическая камера KBF 115 (Binder, Германия), лабораторная настольная центрифуга (Eppendorf, Германия), ротационный визкозиметр Rheotest RV 2.1, автоматический титратор T50 (Mettler Toledo, Швейцария), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Австралия), фильтрующая мембрана диаметром 33 мм Millex-HA с размером пор 0,45 мм, фильтрующая мембрана диаметром 33 мм Millex-PVDF с размером пор 0,45 мм.

Магнитная мешалка с подогревом IKA

Экспериментальная часть

Технология приготовления образцов. В обогреваемый смеситель загружают полиэтиленгликоли. Нагревают смесь до температуры 65–67 °С пока не расплавится высокомолекулярный полиэтиленгликоль. В расплав добавляют субстанцию целекоксиб и растворяют при интенсивном перемешивании (2000–3000 об/мин). В очищенной воде растворяют при перемешивании и нагревании до 43–47 °С навеску хондроитина сульфата до полного растворения. В раствор хондроитина сульфата приливают смесь основы с целекоксибом, интенсивно перемешивают и добавляют диметилсульфоксид. Смесь гомогенизируют при 5000–6000 об/мин [6].

Методика определения термической устойчивости

Три пробирки диаметром 14 мм и высотой 100 мм или цилиндры вместимостью 25 см^3 наполняют на 2/3 объема испытуемой системой, закрывают пробками,

помещают в камеру с температурой 60 °С и выдерживают 24 ч, после чего определяют стабильность. Образцы считаются стабильными, если после термостатирования в пробирках не наблюдалось расслоения.

Методика определения агрегативной устойчивости

Метод основан на выделении жидкой фазы из системы при центрифугировании. При проведении испытания две пробирки наполняют на 2/3 объема испытуемой мазью. Пробирки выдерживают 20 мин при 45 °С, после чего устанавливают в гнезда центрифуги. Центрифугирование проводят в течение 5 мин при частоте вращения 6000 об/мин. Система является стабильной, если не наблюдается расслоения.

Определение реологических характеристик лекарственной формы проводили на ротационном вискозиметре Rheotest 2 на цилиндре H, с константой k=2,74 при температуре 37 °С с предварительным растапливанием образцов по методике.

Растворы для количественного определения хондроитина сульфата

Стандартный раствор хондроитина сульфата натрия. 0,025 г (точная навеска) стандартного образца хондроитина сульфата натрия (предварительно высушенного при температуре 105 °С в течение 4 ч) помещают в мерную колбу объемом 25 мл, растворяют в воде, раствор доводят до метки тем же растворителем. 2,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, раствор доводят до метки водой.

Испытуемый раствор. Около 0,1 г (точная навеска) мази помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объем до метки тем же растворителем. Перед использованием раствор фильтруют через мембрану Millex-HA с размером пор 0,45 мкм.

Раствор титранта. 1,0 г цетилпиридиния хлорида моногидрата помещают в мерную колбу объемом 1000 мл, растворяют в воде, доводят до метки тем же растворителем.

Методика проведения анализа. По 50 мл стандартного и испытуемого растворов титруют раствором титранта цетилпиридиния хлорида. Для определения конечной точки титрования используют автотитратор, снабженный фототродом с длиной волны в видимой области 520 нм.

Растворы для количественного определения целекоксиба

Стандартный раствор целекоксиба. 0,025 г (точная навеска) стандартного образца целекоксиба помещают в мерную колбу объемом 25 мл, растворяют в диметилсульфоксиде, раствор доводят до метки тем же растворителем. 0,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, раствор доводят до метки диметилсульфоксидом.

Испытуемый раствор. Около 0,2 г (точная навеска) мази помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в диметилсульфоксиде и доводят объем до метки тем же растворителем. Перед использованием раствор фильтруют через мембрану Millex-PVDF с размером пор 0,45 мкм.

Измеряют оптическую плотность стандартного и испытуемого образцов при длине волны λ=261 нм в кварцевой кювете 10 мм и рассчитывают содержание целекоксиба в мг на 1 г мази.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве активных компонентов в работе были использованы хондроитина сульфат натрия и целекоксиб. На терапевтический эффект мазей большое влияние оказывает характер основ, которые отличаются большим разнообразием и способны оказывать существенное влияние на высвобождение действующих веществ, отвечающих за необходимый лечебный эффект. Это обусловливается разнообразием физико-химических свойств как действующих, так и вспомогательных компонентов, используемых при разработке мазевой композиции. Для выбора мазевой основы было приготовлено несколько композиций мазей с использованием разных носителей: липофильных и гидрофильных. Для введения целекоксиба в липофильную основу, состоящую из ланолина и вазелина, предварительно была проведена работа по определению растворимости субстанции в диметилсульфоксиде. Были наработаны образцы мази с различными концентрациями активных компонентов, диметилсульфоксида, ланолина и вазелина. Все образцы оказались нестабильными, расслоение мази происходило в течение 24 ч.

Разработку технологии бифункциональной мази проводили с использованием гидрофильных основ. При выборе компонентов основы руководствовались тем, что целекоксиб хорошо растворяется в ПЭГ-400, что должно облегчить его ввод в композицию. В качестве компонентов гидрофильной основы использовали ПЭГ-400, ПЭГ-1500, ПЭГ-4000, ДМСО, воду очищенную. Были приготовлены образцы на гидрофильной основе с различными концентрациями активных и вспомогательных компонентов. Результаты представлены в таблице 1.

Технология получения бифункциональной мази состояла из следующих стадий: подготовка мазевой основы и растворение в ней действующего вещества целекоксиба, подготовка водного раствора хондроитина сульфата, смешение раствора хондроитина сульфата с мазевой основой, гомогенизация, фасовка и упаковка мази.

Таблица 1.

Составы образцов мази

№ образца	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Наименование	**Состав, %**										
Хондроитина сульфат	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Целекоксиб	5	5	5	5	5	5	1	1	1	1	1
Диметилсульфоксид	10	10	10	10	10	10	5	10	10	5	5
ПЭГ-400	50	50	50	45	40	48	55	47	45	48	50
ПЭГ-1500	20	10	–	15	20	12	–	–	–	–	–
ПЭГ-4000	–	10	20	–	–	–	14	25	25	25	19
Вода	10	10	10	20	20	20	20	12	14	16	20
Устойчивость	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+

Образцы с различным содержанием ПЭГ-1500 оказались неоднородными по массе, жидкими и нестабильными. Следует отметить, что системы с содержанием целекоксиба 5% и различным соотношением полиэтиленгликолей также были нестабильны. В течение двух дней в этих образцах наблюдалось выпадение целекоксиба. Агрегативно устойчивыми оказались образцы № 8-11 с содержанием ПЭГ-4000 в диапазоне 19–25%, ПЭГ-400 – 47–50% и целекоксиба – 1%. Системы проверяли на термическую и агрегативную стабильность.

Таблица 2.

Исследование образцов на агрегатитвную стабильность

№ образца	8	9	10	11
Стабильность в центробежном поле	+	+	+	+
Термостабильность	+	+	+	+
pH	6,10	6,09	6,09	6,39

Испытания показали, что образцы № 8–12 являются стабильными в центробежном поле и к термическим нагрузкам.

Кинетику структурообразования исследуемых образцов изучали в области изменения градиента скорости течения от малых к большим и от больших к малым скоростям. Структурно-механические характеристики оказывают заметное влияние на процессы высвобождения и всасывания лекарственных веществ из мазей, а также на их потребительские свойства: намазываемость, адгезию, способность выдавливаться из туб. Реологическим исследованиям подверглись образцы 8-11 (таблица 3).

Как видно, с увеличением содержания ПЭГ-4000 происходит рост предела текучести, системы становятся более вязкими. При увеличении концентрации частиц в системе возрастает вероятность их взаимодействия. Если частицы соединяются в сплошной каркас, то его присутствие создает сильное сопротивление потоку. При этом дисперсионная среда оказывается иммобилизированной в «петлях» структурной сетки, образованной полимером, течение системы не наблюдается при приложении бесконечно малого напряжения, что и объясняет рост предела текучести.

Таблица 3.

Результаты реологических исследований образцов № 8–11

№ образца	8	9	10	11
Вязкость макс., Па·с	182,67	257,39	340,42	16,61
Вязкость мин., Па·с	2,07	2,44	4,74	0,81
Предел текучести, Па	172	171	178	26

У образцов 8, 9, 10 достаточно высокое напряжение сдвига (≥150 Па), в то время как у образца 11 оно на порядок ниже. Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что последний образец будет легче выдавливаться из туб и лучше распределяться по поверхности кожи даже при небольшом «втирании». Данные реологических исследований таких характеристик, как эффективная вязкость, предельное напряжение сдвига, восстановление структуры после нагрузки, показали, что образец бифункциональной мази № 11 относится к системе с тиксотропным типом структуры, для которой характерны упруго-вязкие свойства.

С помощью турбидиметрического титрования определяли хондроитина сульфат в испытуемом образце № 11. Добавление избытка цетилпиридиний хлорида к раствору хондроитина сульфата ведет к возрастанию мутности и выпадению преципитата, что позволяет определять хондроитина сульфат с помощью турбидиметрического титрования в видимой области в образце бифункциональной мази.

Стандартный раствор хондроитина сульфата натрия и испытуемый раствор образца № 11 бифункциональной мази титровали раствором цетилпиридиния хлорида 1 мг/мл с использованием детектора фототрода при длине волны 520 нм. Как свидетельствуют экспериментальные данные, количественное содержание хондроитина сульфата в бифункциональной мази составляет 46,20±0,79 мг на 1 г мази. Относительная погрешность анализа находится в пределе ±3,22%.

Для подтверждения специфичности методики определения хондроитина сульфата была приготовлена модельная смесь № 1 (целекоксиб – 1%, ДМСО – 5%, ПЭГ-400 – 50%, ПЭГ-4000 – 19%, вода – 25%). Принципиальное отличие модельной смеси от образца № 11 заключалось в отсутствии в рецептуре хондроитина сульфата. Кривая титрования модельной смеси приведена на рисунке 2.

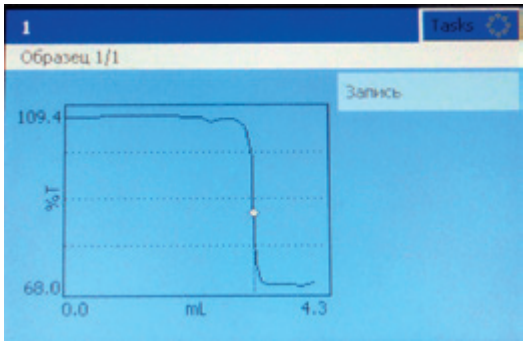


Рисунок 1. Кривая турбидиметрического титрования образца бифункциональной мази № 11

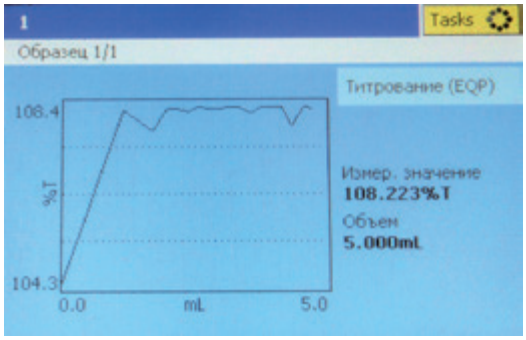


Рисунок 2. Кривая турбидиметрического титрования модельной смеси № 1

Как видно из рисунка 2, модельная смесь № 1 не титруется цетилпиридиния хлоридом. При добавлении титранта пропускание монотонно возрастает, не наблюдается ни падения пропускания, ни точки перегиба. По результатам титрования модельной системы можно утверждать, что присутствующие активные (целекоксиб) и вспомогательные (ПЭГ, ДМСО) компоненты мази не мешают количественному определению хондроитина сульфата.

Изучение УФ-спектра раствора мази в диметилсульфоксиде показало, что имеется максимум поглощения при длине волны 261±2 нм, совпадающий с максимумом поглощения раствора стандартного образца целекоксиба в диметилсульфоксиде (рисунок 3). Это позволяет рекомендовать указанный метод для идентификации целекоксиба в бифункциональной мази.

С помощью метода УФ-спектрофотометрии определяли содержание целекоксиба в образце мази № 11. Для расчета количественного содержания целекоксиба в мази измеряли оптическую плотность в максимуме поглощения 261 нм стандартного и испытуемого растворов. Как свидетельствуют экспериментальные данные, количественное содержание целекоксиба в мази составляет 9,52±0,11 мг на 1 г мази. Относительная погрешность анализа находится в пределе ±2,01%.

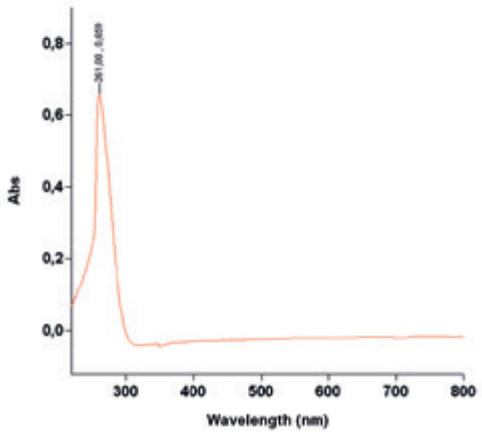


Рисунок 3. УФ-спектр раствора стандартного образца целекоксиба в диметилсульфоксиде

Предложенные методики оценки количественного содержания активных компонентов бифункциональной мази на основе хондроитина сульфата можно рекомендовать для ее стандартизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технология бифункциональной мази, содержащей в качестве активных компонентов хондроитина сульфат и целекоксиб на гидрофильной основе, состоящей из смеси ПЭГ-400/ПЭГ-4000. В ходе исследования разработаны методики количественного определения активных компонентов в бифункциональной мази: хондроитина сульфата натрия – методом турбидиметрического титрования и целекоксиба – УФ-спектрофотометрическим методом.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.Л. Барсук. Современные аспекты фармакотерапии остеоартроза: хондропротекторы для местного и перорального применения // РМЖ. Независимое издание для практикующих врачей. URL: http://www.rmj.ru/articles_8686.htm (дата обращения 16.10.2017).
2. О.М. Фоломеева, Ш.Ф. Эрдес. Распространенность и социальная значимость ревматических заболеваний в Российской Федерации // Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. URL: http://www.rlsnet.ru/articles_461.htm (дата обращения 16.10.2017).
3. Е.А. Долгова, Д.Р. Ракита. Фармакоэпидемиология остеоартрита в Рязанской области // Современные проблемы науки и образования. 2012. № 6. URL: www.science–education.ru/106–7403 (дата обращения 16.10.2017).
4. Н.Н. Крюков и др. Справочник терапевта. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2013. 446 с.
5. Л.И. Алексеева. Современные представления о диагностике и лечении остеоартроза // Русский медицинский журнал. 2000. № 8–9. С. 377–379.
6. Патент РФ № 2582974. Комбинированная активная композиция для лечения заболеваний опорно – двигательной системы / В.Н. Шестаков, Т.Ю Андреевичева, Л.В. Персанова, К.Р. Савельева. – Бюл. № 12. 2016.

Оборудование для мягких желатиновых капсул, блистерных машин и счетно–фасовочных линий от Sky Softgel Co. LTD

Качественные продукты с высочайшим уровнем сервиса и новейшими запатентованными технологиями – все это Sky Softgel!

Мягкие желатиновые капсулы:

полный цикл производства от приготовления до фасовки в любой тип упаковки

Счетно–фасовочные линии:

технология подачи, подсчета, фасовки, укупорки не требует форматных частей при переходе на другой продукт, другую емкость! При этом Вы можете использовать как пластиковую, так и стеклянную емкости!

Блистерные машины:

- технология моментальной модульной системы замены форматных частей;
- машины балконного типа, со всеми современными системами инспекции, протяжки на основе сервоприводов, с питателями под различные типы продуктов!

Pharmcontract® group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

www.phct–group.com

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

info@phct–group.com

УДК 616-005.749.4; 615.462; 615.466

ГЕЛЕОБРАЗУЮЩИЕ ПОЛИМЕРЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЖИДКИХ ЭМБОЛИЗАТОВ

С.А. Кедик[1,2], В.В. Суслов[1,2]*, А.П. Малкова[3], Е.А. Шняк[1,2], Ю.М. Домнина[1,2]

Резюме. В обзоре литературы представлены сведения о полимерах, применяемых для эмболизации кровеносных сосудов. Рассмотрены существующие и перспективные средства для эмболизации сосудов. Особое внимание уделено полимерам и композициям на их основе, способным образовывать гели при введении в кровеносное русло.

Ключевые слова: полимер, эмболизация, химиоэмболизация, эмболизаты, эмболы, гелеобразующие вещества.

GEL-FORMING POLYMERS FOR EMBOLIZATION

S.A. Kedik[1,2], V.V. Suslov[1,2]*, A.P. Malkova[3], E.A. Shnyak[1,2], Y.M. Domnina[1,2]

Abstract. The review is about on polymers used as embol for vascular occlusion. Existing and developed means for embolization vascular were considered. Particular attention is paid to polymers and compositions on their basis, which it is capable of forming gel structures suitable for occluding vessels.

Keywords: polymer, embolization, chemoembolization, embolizates, embols, gel-forming materials.

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

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

3 – АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» («ИМБИИТ») 143090, Россия, Московская обл., г. Краснознаменск, ул. Строителей, д. 10, к. 1

1 – Moscow Technological University (ITHT), 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

2 – Institute of pharmaceutical technologies, 21/32, Skolkovskoe highway, Moscow, 121353, Russia

3 – Institute of biomedical research and technology (IBRT), 12/1, Stroiteley str., Krasnoznamensk, Moscow District, 143090, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: suslov@ipt.ru.com
Тел.: +7 (925) 518 73 79

ВВЕДЕНИЕ

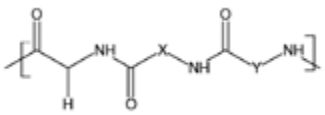
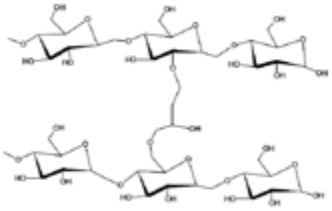
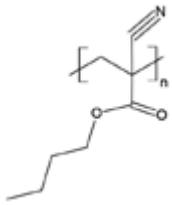
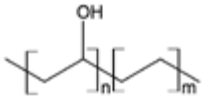
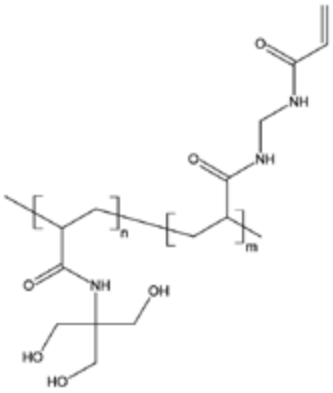
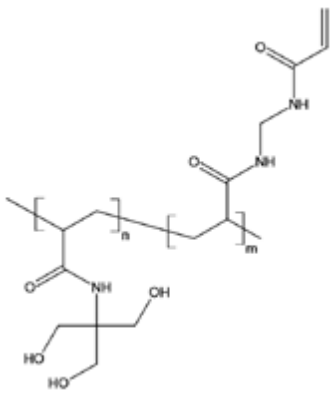
Понятие «эмболизация» – блокирование кровеносных сосудов – возникло в начале XX века, когда Роберт Доуборн (Dawbarn) предложил способ лечения злокачественных новообразований, включающий обработку питающих опухоль кровеносных сосудов, что способствовало прекращению поступления по ним крови к опухоли [1]. Первые попытки использования различных материалов для физического блокирования кровотока были предприняты с использованием фрагментов мышц [2]. Также нашли применение гранулы из нержавеющей стали и желатиновые губки, первоначально разработанные как кровоостанавливающие материалы для открытой хирургии. Желатиновые губки использовали в качестве эндоваскулярных тромбоэмболических агентов, в качестве материала, альтернативного мышечным фрагментам. Позднее Томас Спикман предложил использовать для блокирования каротидно-кавернозных фистул «кашицеобразную» смесь желатина с солевым раствором, которую вводили внутрь сонной артерии [3]. Широкое внедрение эмболизации в медицинскую практику началось после 1960 года в результате развития методов рентгеноскопии, позволивших проводить ангиографию сосудов в режиме реального времени.

В настоящее время применение эмболизации позволяет проводить эффективную терапию острых желудочно-кишечных кровотечений, сосудистых патологий и онкологических заболеваний, например гепатоцеллюлярной карциномы. При терапии онкологических заболеваний для эмболизации используют материалы, которые дополнительно содержат цитостатические средства или другие терапевтические агенты. Такой метод получил название «химиоэмболизация».

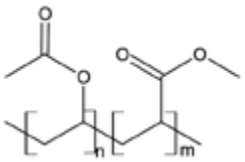
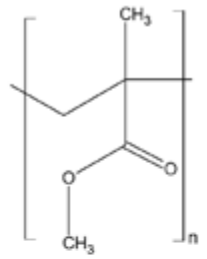
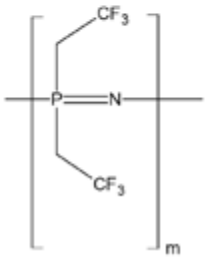
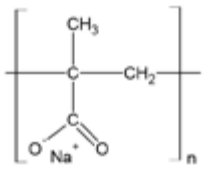
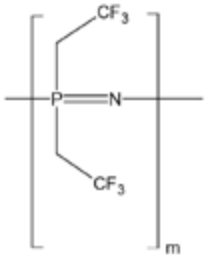
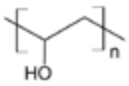
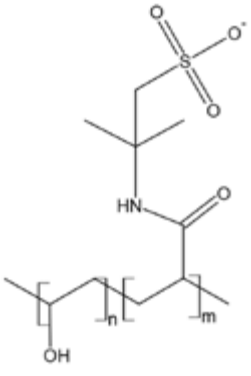
В состав современных средств для проведения эмболизации входят различные полимеры и материалы на их основе (таблица 1) [4]. Следует отметить, что синтетические полимерные материалы не вызывают хронических воспалений, характерных для веществ и материалов животного происхождения [5].

Таблица 1.

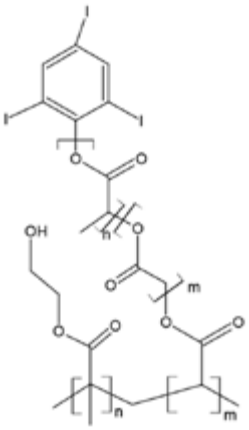
Вещества и материалы, применяемые для эмболизации кровеносных сосудов

№	Торговое наименование	Вещество	Структурная формула	Форма применения	Лит-ра
1	GelFoam® (Pfizer, inc., США)	Денатурированный коллаген	 X – преимущественно пролин Y – любая аминокислота, кроме триптофана	Гемостатическая губка	[6]
2	Spherex® (Magle life Sciences, Швеция) EmboCept® (Pharmacept, Германия)	Перекрестно-связанный крахмал		Микросферы	[7]
3	Trufill® (Cordis Neurovascular, Inc., США)	Поли(н-бутилцианоакрилат)		Клей	[8]
4	Onyx® (Covidien, США)	Сополимер поливинилового спирта и полиэтилена		Раствор в диметилсульфоксиде	[9]
5	Embosphere® (Merit Medical System, Inc., США)	Сополимер (N-акрилоил-2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диола) и (N-метилен-бис-акриламида), кросс-сшитый с желатином и глутаровым альдегидом		Суспензия микросфер	[10]
	Embogold® (Merit Medical Systems, Inc., США)	Сополимер (N-акрилоил-2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диола) и (N-метилен-бис-акриламида), кросс-сшитый с желатином и глутаровым альдегидом с добавлением 2% элементарного золота		Суспензия микросфер	[10]

Продолжение табл. 1

№	Торговое наименование	Вещество	Структурная формула	Форма применения	Лит-ра
6	HepaSphere и QuadraSphere® (Merit Medical Systems, Inc., США)	Сополимер поливинилацетата и полиметилакрилата		Суспензия микросфер	[11]
7	Embozene® (CelNova BioSciences, Inc., США)	Ядро: полиметилметакрилат Оболочка: поли(бис[трифторэтокси]фосфазен)	 	Суспензия микросфер	[12]
	Oncozene™ (CelNova BioSciences, Inc., США)	Ядро: полиметилакрилат натрия Оболочка: поли (бис[трифторэтокси]фосфазен)	 	Суспензия микросфер	[13]
8	Contour™ (Boston Scientific, США)	Поливиниловый спирт		Суспензия частиц неправильной формы	[6]
9	DC Bead® (BTG) LC Bead® (BTG) Bead Block® (BTG), США	Сополимер поливинилового спирта и (2-акриламидо-2-метилпропансульфоната)		Суспензия микросфер	[14]

Окончание табл. 1

№	Торговое наименование	Вещество	Структурная формула	Форма применения	Лит-ра
10	PHIL™ (MicroVention, Inc., США)	Сополимер полигидроксиэтилметакрилата, полилактида и полигликолида со связанным трийодфенолом		Раствор в диметилсульфоксиде	[4, 15]

Средства для эмболизации можно разделить на два типа: первый – механические тромбоэмболические агенты и второй – тромбоэмболические агенты, направляемые потоком крови [2]. Среди средств второго типа можно выделить биоразлагаемые/резорбируемые микросферы, визуализированные микросферы и жидкие эмболизаты.

Данный обзор описывает перспективные гелеобразующие полимеры, разрабатываемые в качестве жидких эмболизатов, способных формировать эмболы при введении в кровеносные сосуды (*in situ*).

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ГЕЛЕОБРАЗУЮЩИЕ ПОЛИМЕРЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЖИДКИХ ЭМБОЛИЗАТОВ

Имеющиеся в настоящее время на фармацевтическом рынке средства, такие как *н*-бутилцианоакрилат, Onyx® и PHIL™, содержат в своем составе токсичные цианистые соединения и растворители (например, диметилсульфоксид, N-метилпирролидон) [16–18].

Основной целью при разработке новых жидких эмболизатов является использование в их составе веществ и материалов, позволяющих отказаться от использования токсичных веществ и растворителей. Такими веществами могут быть соединения, способные формировать гелевые структуры по одному из следующих механизмов: полимеризация, физическое гелеобразование или ионная сшивка (таблица 2). Основными параметрами, характеризующими жидкие эмболизаты, являются вязкость, токсичность, набухание, биосовместимость, биоразлагаемость, механические свойства и эластичность.

Неразлагаемые и неадгезивные жидкие эмболизаты для использования при лечении внутричерепных аневризм и *артериовенозной мальформации* [19, 20] были разработаны на основе смесей мономеров, способных к сополимеризации – поли(пропиленгликоль)диакрилата (ППГДА) с пентаэритрита тетракис-(3-меркаптопропионатом) (ТМ) [21] и поли-(N-изопропилакриламида-ко-акриловой кислоты) (N-ИПАСАК) и поли-(N-изопропилакриламид)-ко-гидрокси-этилметакрила [22]. Достоинствами этих жидких эмболизатов является то, что при их введении в сосуды в достаточном объеме отсутствует риск реканализации. Кроме того, эти материалы не содержат токсичных компонентов и компонентов животного происхождения и не образуют токсичных продуктов распада.

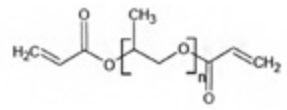
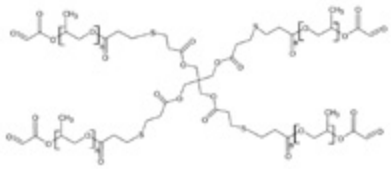
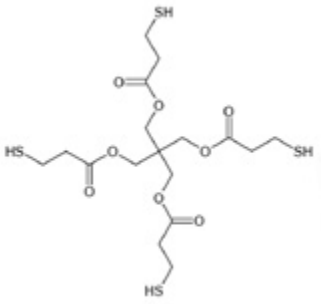
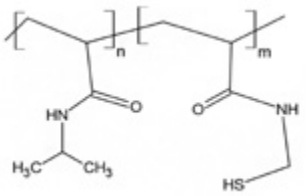
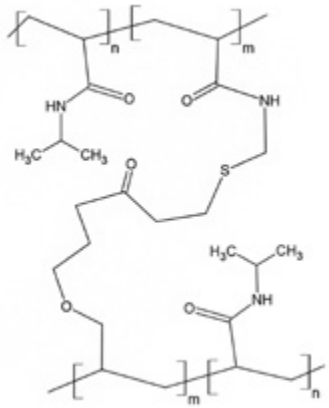
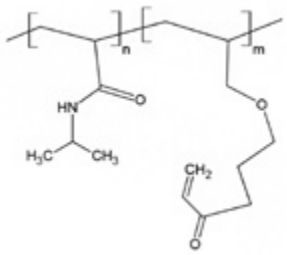
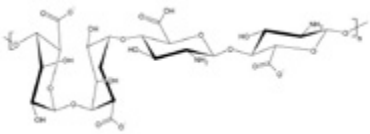
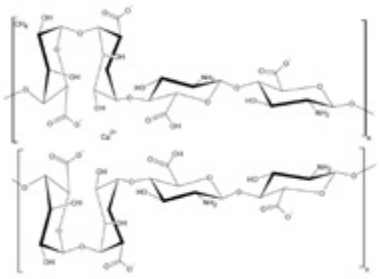
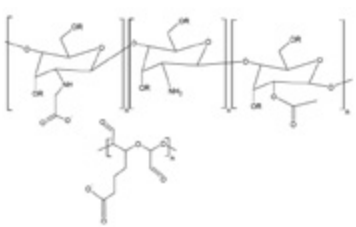
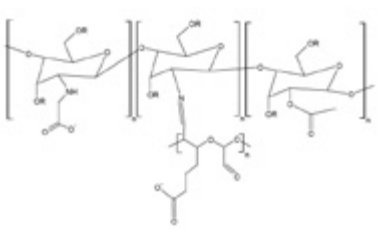
Оба мономера, ППГДА и ТМ, в нормальных условиях являются жидкими веществами, способными в водной среде, содержащей нуклеофильные активаторы, вступать в реакцию сополимеризации и формировать матрицу из гидрогеля [10, 12]. Для визуализации перед введением раствор смеси мономеров ППГДА и ТМ, взятых в мольном соотношении 2:1, смешивают при pH 11,0 в соотношении 3:1 с рентгеноконтрастным веществом – меглумина иоталамат и перемешивают в течение 2 мин [23, 24]. Время полимеризации и гелеобразования смеси ППГДА – ТМ составляет 10 мин и может регулироваться посредством изменения соотношения мономеров, pH среды и времени перемешивания смеси мономеров [19, 24].

Следует отметить, что свободный меглумина иоталамат при высоких значениях pH является цитотоксичным, однако его введение в состав полимерной матрицы, состоящей из сополимера ППГДА и ТМ, снижает токсичность данного соединения [24].

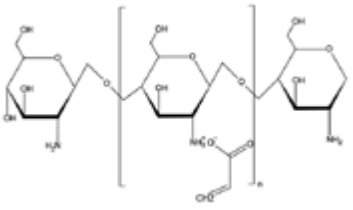
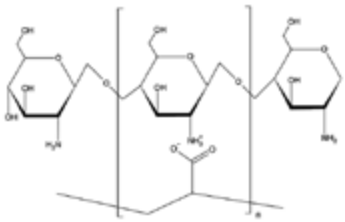
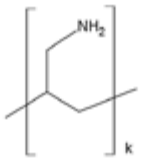
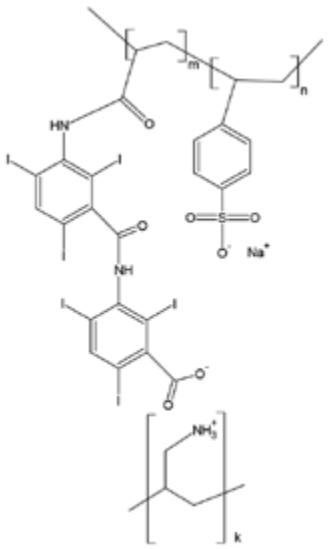
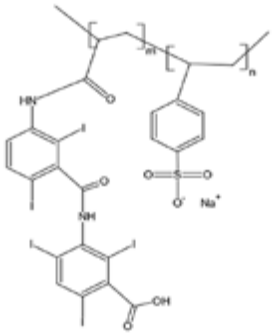
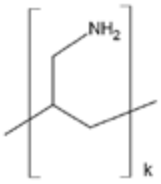
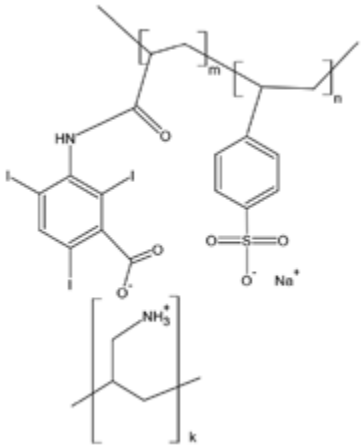
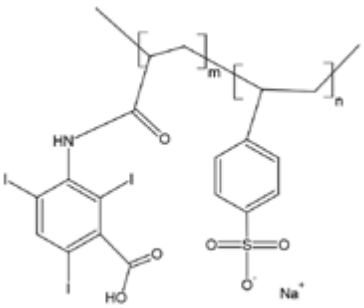
Мономер N-ИПАСАК имеет низкую критическую температуру растворения в водной среде –32 °C, ниже которой он растворим и выше которой он выделяется из раствора [25–27].

Таблица 2.

Разрабатываемые жидкие эмболизаты на основе гелеобразующих полимеров

№	Исходные вещества		Структурная формула в гелеобразном состоянии	Механизм гелеобразования
1	Поли-(пропиленгликоль) диакрилат			Полимеризация
	Пентаэритрит тетра-(3-мер-каптопропионат) ППГДА/ТМ			
2	Сополимер N-изопропилакриламида и цистеамина			Полимеризация и физическое гелеобразование
	Сополимер N-изопропилакриламида и гидроксиэтилметакрилата			
3	Альгинат натрия			Ионное сшивание
	Кальция хлорид	$CaCl_2$		
4	Карбоксиметилхитозан и окисленная карбоксиметилцеллюлоза			Полимеризация

Окончание табл. 2

№	Исходные вещества		Структурная формула в гелеобразном состоянии	Механизм гелеобразования
5	Хитозана акрилат			Ионное сшивание/ полимеризация
6	Полиаллиламин			Ионное сшивание
	Сополимер N-[3-(карбокси-2,4,6-трийодфенил-карбомоил)-2,4,6-трийодфенил]акриламида]			
7	Полиаллиламин			Ионное сшивание
	Сополимер N-карбокси-2,4,6-трийодфенилакриламида и стиролсульфоната натрия			

Еще одним перспективным составом для эмболизации является смесь окисленной карбоксиметилцеллюлозы и карбоксиметилхитозана, которые являются биосовестимыми и биоразлагаемыми полимерами. Образование геля происходит в результате взаимодействия карбонильной и аминной групп [28, 29].

Основой эмболизатов, формирующих гелевые структуры за счет ионной сшивки, являются различные полианионные и/или поликатионные полимеры. Одним из наиболее интересных является биоразлагаемый альгинат натрия – полисахарид, выделенный из бурых водорослей. Альгинат натрия представляет собой сополимер β-D-маннуроновой кислоты и α-L-гулуроновой кислоты. Отсутствие токсичных мономеров, инициаторов, побочных продуктов или растворителей в процессе гелеобразования альгината делает его использование в составе жидких эмболизатов весьма перспективным [30, 32]. Альгинат натрия, раст-

воренный в воде, сразу же начинает формировать нелипкий гидрогель в присутствии ионов кальция или других двухвалентных металлов [31]. Если к раствору альгината натрия добавить соли кальция перед инъекцией, может произойти образование геля внутри катетера и его закупоривание. Для предотвращения этого введение растворов альгината натрия и солей кальция осуществляют раздельно с помощью двухпросветного катетера [30, 33, 34].

Введение фермента альгинат-лиазы позволяет выборочно удалять альгинатные эмболы из окклюдированных сосудов [35], что дает возможность закупоривать сосуды, а затем восстанавливать в них кровоток. Это является новым терапевтическим методом лечения, который практически недоступен с использованием существующих эмболизатов. Следует отметить, что существует несколько проблем, связанных с безопасностью использования альгинатных гелей, к ним относятся: вытекание материала из полости во время введения и непреднамеренная эмболизация нецелевых сосудов [35, 36].

Возможность применения для эмболизации была показана на животных моделях для pH-чувствительных полиэлектролитных комплексов, сформированных взаимодействием полианионного хитозана и полиакриловой кислоты. Синтез полиэлектролита осуществляли полимеризацией акриловой кислоты на молекулах хитозана. Для этого хитозан растворяли в водном растворе акриловой кислоты и выдерживали при 50 °С в течение 48 ч. Полученный продукт очищали с применением диализа при pH=11 и лиофильно высушивали. Затем смешивали раствор полученного полиэлектролитного комплекса с раствором рекомбинантного фактора роста эндотелия в фосфатном буфере и получали гидрогель, который вводили в артерию, подвергаемую эмболизации [37].

Другим примером являются рентгеноконтрастные гидрогели, представляющие собой полиэлектролитные комплексы, формируемые полипропиленамином и карбоксилсодержащими сополимерами – сополимером N-[3-(карбокси-2,4,6-трийодфенилкарбомоил)-2,4,6-трийодфенил]акриламида] или N-карбокси-2,4,6-трийодфенилакриламида и стиролсульфоната натрия.

Производные акриламида, имеющие трийодфенильную и карбоксильную группы, синтезировали и сополимеризовали со стиролсульфонатом натрия при различных температурах и различных молярных соотношениях инициатора и мономеров. Гидрогели получали путем смешивания водных растворов полученных рентгеноконтрастных сополимеров и полиаллиламина. Применимость полученных гидрогелей для транскатетерной артериальной эмболизации (TAE) для гепатоцеллюлярной карциномы изучали посредством их введения в вену изолированной почки. Было обнаружено, что некоторые из полученных гидрогелей обладают ярко выраженными рентгеноконтрастными свойствами и после введения в вену остаются там, что делает такие гидрогели перспективными для эмболизации сосудов [38, 39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные исследования в области гелеобразующих полимеров позволили создать ряд новых перспективных жидких эмболизатов, которые затвердевают или загустевают после введения в кровеносные сосуды, формируя эмболы (*in situ*). Главным преимуществом жидких эмболизатов является их способность закупоривать как крупные, так и мелкие кровеносные сосуды различного диаметра и полностью заполнять просвет сосудов. Обобщение литературных данных показывает, что по сравнению с полимерами, традиционно используемыми в качестве основы жидких эмболизатов (Onyx®, PHIL и Trufill®), применение гелеобразующих полимеров позволяет отказаться от агрессивных и токсичных растворителей и не требует использования токсичных цианистых соединений.

Так, эмболы на основе альгината формируются в результате смешения водных растворов нетоксичных альгината натрия и кальция хлорида. Кроме того, возможность направленного разрушения альгинатных эмбол путем введения специфических ферментов позволит проводить обратимую эмболизацию, что невозможно для традиционно используемых полимеров. Обратимая эмболизация весьма востребована при проведении хирургических операций, где есть вероятность потери крови и имеется необходимость снижения ее циркуляции с последующим восстановлением кровотока.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Zheng et al. Transcatheter arterial chemoembolization combined with radiofrequency ablation can improve survival of patients with hepatocellular carcinoma with portal vein tumour thrombosis: extending the indication for ablation // Clinical radiology. 2014. Т. 69. № 6. P. 253–263.
2. J. Hoshino et al. Intravascular embolization therapy in patients with enlarged polycystic liver // American Journal of Kidney Diseases. 2014. Т. 63. №. 6. P. 937–944.
3. J. Enriquez et al. Gastroduodenal artery recanalization after transcatheter fibered coil embolization for prevention of hepaticoenteric flow: incidence and predisposing technical factors in 142 patients // Acta Radiologica. 2013. Т. 54. № 7. P. 790–794.
4. A. Poursaid et al. Polymeric materials for embolic and chemoembolic applications // Journal of Controlled Release. 2016. Т. 240. P. 414–433.
5. M. Biondi et al. Investigation of the mechanisms governing doxorubicin and irinotecan release from drug-eluting beads: mathematical modeling and experimental verification // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2013. Т. 24. № 10. P. 2359–2370.
6. S. Vaidya, K.R. Tozer, J. Chen. An overview of embolic agents // Seminars in interventional radiology. 2008. Т. 25. № 03. P. 204–215.

7. Патент США 9708416. Microspheres of hydrolysed starch with endogenous, charged ligands / M. Malmsjo et al. – 2017.
8. R.E. Kania et al. Early postoperative CT scanning for juvenile nasopharyngeal angiofibroma: detection of residual disease // American journal of neuroradiology. 2005. Т. 26. № 1. P. 82–88.
9. M.K. Kolber et al. Ethylene vinyl alcohol copolymer (onyx) embolization for acute hemorrhage: a systematic review of peripheral applications // Journal of Vascular and Interventional Radiology. 2015. Т. 26. № 6. P. 809–815.
10. A. Laurent et al. Trisacryl gelatin microspheres for therapeutic embolization, I: development and in vitro evaluation // American journal of neuroradiology. 1996. Т. 17. № 3. P. 533–540.
11. A.L. Lewis. Embolisation devices from biomedical polymers for intra-arterial occlusion and drug delivery in the treatment of cancer // Biomaterials for Cancer Therapeutics: Diagnosis, Prevention and Therapy. 2013. P. 207.
12. S. Stampfl et al. Arterial distribution characteristics of Embozene particles and comparison with other spherical embolic agents in the porcine acute embolization model // Journal of Vascular and Interventional Radiology. 2009. Т. 20. №.12. P. 1597–1607.
13. B. Guiu et al. Idarubicin-loaded ONCOZENE drug-eluting embolic agents for chemoembolization of hepatocellular carcinoma: in vitro loading and release and in vivo pharmacokinetics // Journal of Vascular and Interventional Radiology. 2015. Т. 26. № 2. P. 262–270.
14. C.D. Gadaleta, G. Ranieri. Trans-arterial chemoembolization as a therapy for liver tumours: New clinical developments and suggestions for combination with angiogenesis inhibitors // Critical reviews in oncology/hematology. 2011. Т. 80. № 1. P. 40–53.
15. N. Koçer et al. Preliminary experience with precipitating hydrophobic injectable liquid in brain arteriovenous malformations // Diagnostic and Interventional Radiology. 2016. Т. 22. № 2. P. 184.
16. M.F. Brothers et al. n-Butyl 2-cyanoacrylate-substitute for IBCA in interventional neuroradiology: histopathologic and polymerization time studies // American Journal of Neuroradiology. 1989. Т. 10. № 4. P. 777–786.
17. H.V. Vinters et al. The histotoxicity of cyanoacrylates // Neuroradiology. 1985. Т. 27. № 4. P. 279–291.
18. C.M. Riley et al. Gelling process differences in reverse emulsion, in situ gelling polymeric materials for intracranial aneurysm embolization, formulated with injectable contrast agents // Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials. 2011. Т. 96. № 1. P. 47–56.
19. V. Cheng et al. Poly (N-isopropylacrylamide-co-poly (ethylene glycol))-acrylate simultaneously physically and chemically gelling polymer systems // Journal of Applied Polymer Science. 2007. Т. 106. № 2. P. 1201–1207.
20. Патент США 8048407. In situ gelling self-reactive materials for embolization / B. Vernon, M. Birdno, M.C. Preul. – 2011.
21. B. Vernon, A. Martinez. Gel strength and solution viscosity of temperature-sensitive, in-situ-gelling polymers for endovascular embolization // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2005. Т. 16. № 9. P. 1153–1166.
22. C.R. Brennecka et al. *In vivo* experimental aneurysm embolization in a swine model with a liquid-to-solid gelling polymer system: initial biocompatibility and delivery strategy analysis // World neurosurgery. 2012. Т. 78. № 5. P. 469–480.
23. C.R. Brennecka, M.C. Preul, B.L. Vernon. In vitro delivery, cytotoxicity, swelling, and degradation behavior of a liquid-to-solid gelling polymer system for cerebral aneurysm embolization // Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials. 2012. Т. 100. № 5. P. 1298–1309.
24. B. Jeong, S.W. Kim, Y.H. Bae. Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels // Advanced drug delivery reviews. 2012. Т. 64. P. 154–162.
25. H.H. Bearat et al. Synthesis, characterization and properties of a physically and chemically gelling polymer system using poly (NIPAAm-co-HEMA-acrylate) and poly (NIPAAm-co-cysteamine) // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2011. Т. 22. № 10. P. 1299–1318.
26. H.H. Bearat, M.C. Preul, B. L. Vernon. Cytotoxicity, *in vitro* models and preliminary in vivo study of dual physical and chemical gels for endovascular embolization of cerebral aneurysms // Journal of Biomedical Materials Research. Part A. 2013. Т. 101. № 9. P. 2515–2525.
27. L. Weng et al. An in situ forming biodegradable hydrogel-based embolic agent for interventional therapies // Acta biomaterialia. 2013. Т. 9. № 9. P. 8182–8191.
28. L. Bédouet et al. Anti-angiogenic drug delivery from hydrophilic resorbable embolization microspheres: an *in vitro* study with sunitinib and bevacizumab // International journal of pharmaceutics. 2015. Т. 484. № 1. P. 218–227.
29. O. Jordan, E. Doelker, D.A. Rüfenacht. Biomaterials used in injectable implants (liquid embolics) for percutaneous filling of vascular spaces // Cardiovascular and interventional radiology. 2005. Т. 28. №. 5. P. 561–569.
30. S. Vaidya, K.R. Tozer, J. Chen. An overview of embolic agents // Seminars in interventional radiology. 2008. Т. 25. № 3. P. 204–215.
31. B.P. Barnett et al. In vitro assessment of EmboGel and UltraGel radiopaque hydrogels for the endovascular treatment of aneurysms // Journal of Vascular and Interventional Radiology. 2009. Т. 20. № 4. P. 507–512.
32. T.A. Becker, D.R. Kipke, T. Brandon. Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization // Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2001. Т. 54. № 1. P. 76–86.
33. T.A. Becker, D. R. Kipke. Flow properties of liquid calcium alginate polymer injected through medical microcatheters for endovascular embolization // Journal of Biomedical Materials Research. Part A. 2002. Т. 61. № 4. P. 533–540.
34. B.P. Barnett, P. Gailloud. Assessment of embogel – A selectively dissolvable radiopaque hydrogel for embolic applications // Journal of Vascular and Interventional Radiology. 2011. Т. 22. № 2. P. 203–211.
35. J. Raymond et al. Alginate for endovascular treatment of aneurysms and local growth factor delivery // American journal of neuroradiology. 2003. Т. 24. № 6. P. 1214–1221.
36. H. Pan et al. Embolization of a common carotid aneurysm with rhVEGF coupled to a pH-responsive chitosan in a rat model // Journal of neurosurgery. 2010. Т. 112. № 3. P. 658–665.
37. M. Okamura et al. Synthesis and properties of radiopaque polymer hydrogels: polyion complexes of copolymers of acrylamide derivatives having triiodophenyl and carboxyl groups and p-styrene sulfonate and polyallylamine // Journal of Molecular Structure. 2000. Т. 554. № 1. P. 35–45.
38. M. Okamura et al. Synthesis and properties of radiopaque polymer hydrogels II: copolymers of 2,4,6-triiodophenyl or N-(3-carboxy-2,4,6-triiodophenyl)-acrylamide and p-styrene sulfonate // Journal of molecular structure. 2002. Т. 602. P. 17–28.
39. K. Saralidze et al. Injectable polymeric microspheres with X-ray visibility. Preparation, properties, and potential utility as new traceable bulking agents // Biomacromolecules. 2003. Т. 4. № 3. P. 793–798.

УДК 615.2

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ ГЛАЗНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕОЛОГИЧЕСКИХ ОПТИМУМОВ ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ГЕЛЕЙ

М.Н. Анурова[1], Е.О. Бахрушина[1], И.В. Лапик[1,2], С.П. Кречетов[2]

Резюме. В статье рассмотрены основные требования, предъявляемые к офтальмологическим гелям. Приведено изучение реологических характеристик глазных гелей, зарегистрированных в Российской Федерации: Корнерегель®, Солкосерил®, Видисик®, Офтагель®, Офтан-Тимогель®, Систейн-гель®. Обоснованы параметры реологических измерений, проводимых для офтальмологических гелей. На основании полученных результатов предложены оптимумы реологических характеристик, которые могут быть рекомендованы к использованию при разработке данной лекарственной формы.

Ключевые слова: глазные гели, офтальмологические лекарственные формы, фармакопейные требования, ротационная вискозиметрия, пластическая вязкость, предел текучести, реологические оптимумы.

THE DETERMINATION OF THE RHEOLOGICAL OPTIMUM OF OPHTHALMIC GELS. MODERN ASPECTS OF THE OPHTHALMIC DOSAGE FORMS DEVELOPMENT

M.N. Anurova[1], E.O. Bakhrushina[1], I.V. Lapik[1,2], S.P. Krechetov[2]

Abstract. The article describes the main requirements for ophthalmic gels and presents the study of the rheological properties of ophthalmic gels, registered in the Russian Federation: Korneregel®, Solcoseryl®, Vidisic®, Ophtagel®, Oftan-Timogel®, Systein gel®. The parameters of rheological measurements conducted for ophthalmic gels are substantiated. On the basis of the results obtained, optimum rheological characteristics are suggested, which can be recommended for use in the development of ophthalmic gels.

Keywords: ophthalmic gels, ophthalmic dosage forms, pharmacopeial requirements, rotary viscosimetry, plastic viscosity, yield stress, rheological optimum.

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

2 – Центр живых систем ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», 141701, Россия, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9, стр. 7

1 – FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskij University), 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

2 – Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 9/7, Institutskiy per., Dolgoprudny, Moscow region, 141701, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: amn25@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

По информации Всемирной организации здравоохранения на 2017 год, около 300 млн человек во всем мире страдают от нарушения зрения. Согласно статистическим данным Министерства здравоохранения Российской Федерации по заболеваемости населения за 2016 год, число пациентов, страдающих болезнями глаза, его придаточного аппарата, а также миопией достигло 20 млн человек.

В терапии офтальмологических заболеваний ключевую роль играет медикаментозное лечение, направленное прежде всего на поддержание нормального физиологического состояния пациентов.

В современной офтальмологии особенно остро стоит вопрос комплаентности лечения пациентов с такими хроническими заболеваниями, как глаукома, катаракта, возрастная макулярная дегенерация, синдром сухого глаза. Согласно опубликованным данным, главными проблемами, препятствующими высокой приверженности лечению пациентов, являются несвоевременное обращение к специалисту, нерегулярный прием прописанного медикамента, микробная контаминация препарата, а также проблемы с правильностью инстилляции [1].

Таким образом, для повышения приверженности пациентов терапии офтальмологических заболеваний приобретают актуальность разработки в сфере создания новых глазных лекарственных форм и их современной упаковки.

Согласно ОФС.1.4.1.0003.15 глазные лекарственные формы представляют собой стерильные жидкие, мягкие или твердые лекарственные формы, предназначенные для местного применения (на глазном яблоке и/или конъюнктиве), инъекционного и имплантационного введения в тка-

ни глаза. Мягкие глазные лекарственные формы для местного применения подразделяются на мази глазные и гели глазные. Европейская Фармакопея (Eur.Ph. 8.0) допускает также использование кремов в терапии офтальмологических заболеваний.

В настоящее время на территории Российской Федерации зарегистрировано 353 лекарственных препарата для применения в офтальмологии. 89% препаратов представлены в лекарственной форме капель, 9% приходится на долю мягких лекарственных форм, из которых 26 – наименования глазных мазей и 6 – глазных гелей (рисунок 1).

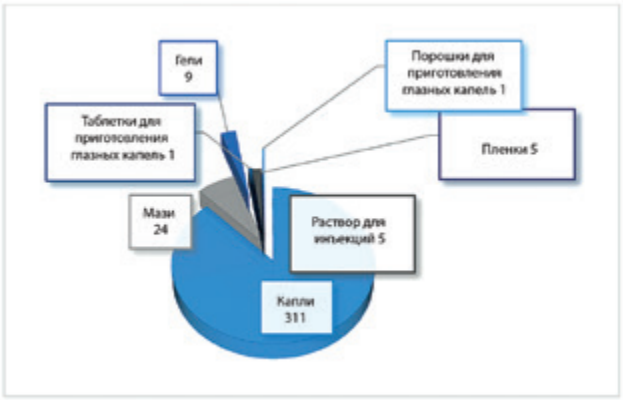


Рисунок 1. Лекарственные формы для офтальмологического применения, зарегистрированные на российском фармацевтическом рынке на 2017 год, по данным Государственного реестра лекарственных средств

В то время как к твердым лекарственным формам, например к глазным пленкам, Государственной фармакопеей XIII изд. предъявляются специальные требования (размер, время растворения, потеря в массе при высушивании и др.), а препараты для интравитреальных инъекций должны соответствовать требованиям, предъявляемым ко всем парентеральным препаратам, показатели качества глазных капель и глазных гелей во многом схожи.

В ОФС «Глазные лекарственные формы» отмечается, что увеличение продолжительности действия глазных капель может достигаться дополнительным введением загустителей, в роли которых могут выступать производные целлюлозы: гидроксипропилметилцеллюлоза (0,3–0,5%), метилцеллюлоза (0,1–0,7%), натрийкарбоксиметилцеллюлоза (1–2%) и др. При анализе рынка препаратов, представленных в лекарственной форме глазных капель, было показано, что более 50% препаратов содержат в своем составе пролонгаторы из группы производных целлюлозы [2].

Концентрация гелеобразования для полимеров группы производных целлюлозы в зависимости от марки и производителя может варьироваться в широком диапазоне, приблизительно от 0,5 до 10%, что, в свою очередь, позволяет рассматривать некоторые препараты в форме глазных капель как гели малой вязкости [3].

Таким образом, при разработке лекарственных препаратов для применения в офтальмологии в форме гелей можно рекомендовать оперировать не только требованиями, предъявляемыми нормативной документацией к мягким и полутвердым (согласно иностранным фармакопеям) лекарственным формам (таблица 1), но и общими требованиями ГФ XIII к глазным каплям.

Таблица 1.

Требования, предъявляемые к мягким (полутвердым – *semi-solid*) глазным лекарственным формам

Показатели качества	ГФ XIII изд.	Eur.Ph. 8.0, 2014	USP 35	JPH 17	Примечания
Стерильность	+	+	+	+	–
Однородность дозирования	+	+		–	–
Подлинность и количественное определение консервантов и антиоксидантов	+	–		–	Для ЛФ, содержащих консерванты и антиоксиданты
Размер частиц	+	+		+	Для гетерогенных систем
Металлические частицы	+	–		+	Для препаратов, упакованных в металлические тубы
Кислотное число	+	–		–	Для ЛФ, в составе имеющих легкоокисляемые и подверженные гидролизу вещества
Перекисное число	+	–		–	Для ЛФ, в составе имеющих легкоокисляемые и подверженные гидролизу вещества
Вязкость	+	–		–	Для гелей, представленных растворами карбомера, – ротационная вискозиметрия при температуре 25 °С

Согласно общим требованиям все глазные лекарственные формы должны быть стерильны. Осмоляльность глазных лекарственных форм должна находиться в пределах осмоляльности 0,6–2,0% раствора натрия хлорида, а оптимальное значение pH глазных лекарственных форм должно соответствовать pH слезной жидкости – 7,4. Значение pH должно находиться в пределах от 3,5 до 8,5. Для обеспечения стабильности глазных лекарственных форм в их состав могут входить антиоксиданты и вещества, регулирующие pH среды. Основа для мягких глазных лекарственных форм должна быть стерильной, нейтральной, равномерно распределяться на слизистой оболочке глаза и не содержать каких-либо посторонних примесей.

Мягкие глазные лекарственные формы предназначены, как правило, для нанесения на конъюнктиву. Гели глазные могут также наноситься на веки и роговицу. Способ введения офтальмологических мягких

лекарственных форм при применении в терапии глазных патологий дает им преимущество по сравнению с популярными глазными каплями.

В исследовании A.J. Tatham с соавторами на 85 пациентах, использующих глазные капли в терапии офтальмологических патологий, было показано, что множественные ошибки при проведении инстилляции лекарственного препарата в 42,4% случаев приводили к касанию наконечником флакона век и ресниц или бульбарной конъюнктивы и роговицы, что впоследствии приводило к контаминации содержимого флакона и возникновению инфекционных заболеваний переднего отрезка глаза [4]. В 2013 году учеными M. Krilis и M. Coroneo был предложен альтернативный способ введения глазных капель с помощью нанесения препарата на указательный палец ведущей руки [5]. Как было показано в проведенных исследованиях, риск инфекционных осложнений при такой манипуляции не выше, чем при использовании контактных линз или мягких лекарственных форм для офтальмологического применения.

Таким образом, было доказано, что применение глазных гелей не только способно повысить комплаентность терапии офтальмологических заболеваний, но и является потенциально более безопасным с точки зрения развития микробной контаминации препарата и последующих бактериальных инфекций глаза. Кроме того, глазные гели обладают следующими преимуществами при их применении:

- длительное поддерживание концентрации действующего вещества на терапевтическом уровне без существенных колебаний;
- снижение частоты возникновения устойчивой микрофлоры, аллергических реакций и т.д.;
- уменьшение вводимой суточной дозы лекарственного вещества;
- сокращение числа приемов до 1–2 раз в течение суток;
- удобство применения и, как следствие, улучшение качества жизни.

Для разработки новых перспективных лекарственных препаратов в форме глазных гелей важно изучать и контролировать их реологические свойства, так как они напрямую влияют на стабильность лекарственной формы, скорость высвобождения действующих веществ, удобство и простоту применения, точность дозирования.

Целью данной работы являлось определение и обоснование реологических оптимумов гелей на основе изучения реологических характеристик образцов офтальмологических лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящее время на российском фармацевтическом рынке офтальмологические средства представлены шестью лекарственными препаратами в форме гелей: Корнерегель® (ООО «ВАЛЕАНТ», Россия), Солкосерил® (Valeant Pharmaceuticals Germany GmbH, Германия), Видисик® (ООО «ВАЛЕАНТ», Россия), Офтагель® (URSAPHARM Arzneimittel GmbH, Германия), Офтан-Тимогель® (EXCELVISION AG, Швейцария), Систейн-гель® (Alcon Cusi, Испания). Данные лекарственные препараты созданы на основе различных гелеобразователей в различных концентрациях – карбомеров (от 1 до 3%), натрийгидроксиметилцеллюлозы, гуаровой камеди. Также в эксперименте изучали реологические свойства геля Блефарогель®, не зарегистрированного в качестве лекарственного препарата, применяющегося в косметологии для профилактики и снятия воспалительных явлений век при ношении контактных линз. Наряду с гелеобразователем – редкосшитым акриловым полимером карбополом – в состав геля Блефарогель® входит гиалуроновая кислота, проявляющая свойства гелеобразователя уже в низких концентрациях [6].

Реологические характеристики лекарственных препаратов изучали методом ротационной вискозиметрии на вискозиметре Lamy Rheology RM 200 (Франция) с помощью измерительной системы «цилиндр в цилиндре» MS-DIN 33, рекомендованной производителем для образцов с низкой и средней вязкостью. Программное обеспечение RHEOMATIK (ver. T, Lamy Rheology, Франция).

Государственная фармакопея XIII изд. нормирует измерение вязкости для гелей, содержащих в составе карбополы, при температуре 25 °С. Однако на этапах разработки новых лекарственных форм для контроля их стабильности и прогнозирования структурно-механического поведения в процессе промышленного производства, хранения и инстилляции рекомендуется проводить измерения в широких диапазонах скоростей сдвига при нескольких температурах [7].

В эксперименте использовали следующие режимы реологических измерений: при скорости сдвига от 0 до 350 $с^{-1}$ при температуре 25 °С – для моделирования реологического поведения образцов в процессе производства, при скорости сдвига от 0 до 1000 $с^{-1}$ при температуре 37 °С – для моделирования поведения образцов при применении пациентом. Ширина изучаемого диапазона вызвана тем, что при моргании после инстилляции гель подвергается высоким сдвиговым напряжениям. При этом структура лекарственной формы должна обеспечивать равномерность распределения по слизистой оболочке и отсутствие вытекания препарата. Выбранные диапазоны скоростей сдвига были обоснованы в работах [7] и [8]. Поскольку глазные гели являются низковязкими текучи-

Таблица 2.

Перечень лекарственных и косметических препаратов в форме глазных гелей, зарегистрированных в Российской Федерации

Торговое наименование	Фирма-производитель	Состав	Гелеобразователь
Корнерегель®	ООО «ВАЛЕАНТ» (Россия)	Карбомер Цетримид Динатрия эдетат Натрия гидроксид Вода для инъекций	Карбомер 1,0%
Солкосерил®	Valeant Pharmaceuticals Germany GmbH (Германия)	Натрийкарбоксиметилцеллюлоза Кальция лактат Пропиленгликоль Метилпарагидроксибензоат Пропилпарагидроксибензоат Вода для инъекций	Натрийкарбоксиметилцеллюлоза
Видисик®	ООО «ВАЛЕАНТ» (Россия)	Карбомер Цетримид Сорбитол Натрия гидроксид Вода для инъекций	Карбомер 2,0%
Офтагель®	URSAPHARM Arzneimittel GMBH (Германия)	Карбомер 974Р Бензалкония хлорид Сорбитол Лизина моногидрат Натрия ацетат Поливиниловый спирт Вода для инъекций	Карбомер 974Р 2,5%
Офтан-Тимогель®	EXCELVISION AG (Швейцария)	Тимолол Бензалкония хлорид Карбомер Лизина моногидрат Поливиниловый спирт Натрия ацетата тригидрат Сорбитол Вода для инъекций	Карбомер 3,0%
Систейн-гель®	Alcon Cusi (Испания)	Полиэтиленгликоль-400 Пропиленгликоль Гидроксипропилгуар Сорбитол Аминометилпропанол Борная кислота Калия хлорид Натрия хлорид Динатрия эдетат ПОЛИКВАД® (поликватерний-1) Кислота хлористоводородная и/или натрия гидроксид для доведения pH Вода очищенная	Гидроксипропилгуар 7,0%
Блефарогель®	ООО «Гетель-Медика» (Россия)	Карбомер Сок алоэ Метилпарабен Пропилпарабен Глицерин Пропиленгликоль Вода деионизированная	Карбомер, гиалуроновая кислота / концентрации не указаны

ми системами, в режимы реологических измерений не был включен этап изучения при низких скоростях сдвига, моделирующий процесс экструзии препарата из упаковки.

Для качественной оценки и интерпретации полученных результатов определяли пластическую вязкость и предел текучести образцов по модели Кэссона для вязко-пластичных тел с пределом текучести с помощью программного обеспечения RHEOMATIK. Измерение проводилось при температуре 25 °С в диапазоне скоростей сдвига от 0 до 300 $с^{-1}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты реологических измерений офтальмологических гелей приведены в таблице 3. Согласно полученным данным, изучаемые глазные гели мож-

но условно разделить на две категории по величинам пластической вязкости и пределов текучести.

Таблица 3.

Значения пластической вязкости и пределов текучести лекарственных препаратов

Лекарственный препарат	Пластическая вязкость, Па·с	Предел текучести, Па
Офтагель®	0,075	7,65
Офтан-Тимогель®	0,118	5,92
Систейн-гель®	0,079	2,37
Блефарогель®	0,121	9,4
Корнерегель®	0,188	21,7
Солкосерил®	0,175	13,1
Видисик®	0,141	23,7

Первая из них – лекарственные препараты, обладающие низкой вязкостью и низким пределом текучести. К ним относятся препараты Офтагель®, Офтан-Тимогель®, Систейн-гель® и Блефарогель®. Значения пластической вязкости этих гелей лежат в диапазоне от 0,075 до 0,121 Па·с, пределы текучести определяются в диапазоне от 2,37 до 9,4 Па. Согласно ОФС.1.4.1.0003.15 оптимальные значения кинематической вязкости для глазных капель лежат в диапазоне от 5 до 15 мм^2/с, но не должны превышать максимального значения 150 мм^2/с, что в переводе в единицы определяемой в эксперименте пластической вязкости при плотности гелей около 1 мг/мл приблизительно равно 0,005–0,015 Па·с и 0,15 Па·с соответственно. Таким образом, с точки зрения структуры, вязкостных характеристик и течения изучаемые образцы гелей Офтагель®, Офтан-Тимогель®, Систейн-гель® и Блефарогель® могут быть отнесены к жидкой лекарственной форме «глазные капли».

Вид первичной упаковки и дозирующего устройства для жидких и мягких офтальмологических лекарственных форм целесообразно выбирать с учетом их реологических характеристик. На рисунке 2 представлены первичная и вторичная упаковки изучаемых препаратов, относящихся к первой группе. Отметим, что все глазные гели из этой категории, обладающие низкой вязкостью и пределом текучести, близкими к глазным каплям, упакованы в полимерные флаконы, снабженные дозатором-капельницей и колпачком – упаковкой, характерной для глазных капель.

Рисунок 2. Первичная и вторичная упаковки лекарственных препаратов Офтагель®, Систейн-гель®, Офтан-Тимогель® и Блефарогель®

Рисунок 3. Виды дозаторов первичной упаковки препаратов Систейн-гель®, Блефарогель®, Офтагель®, Офтан-Тимогель®

На рисунке 3 представлены дозаторы, которыми снабжена первичная упаковка изучаемых препаратов. Подобный дозатор позволяет извлекать жидкие фармацевтические средства по одной капле, обеспечивая экономичное расходование препарата. Пластиковая упаковка отличается высокими барьерными свойствами, устойчивостью к перепадам температуры, механическим воздействиям, а также к влаге, жирам и кислотам. Кроме того, такой флакон является легкой и компактной упаковкой.

Ко второй категории изучаемых офтальмологических гелей относятся препараты Корнерегель®, Солкосерил® и Видисик®. Значения их пластических вязкостей лежат в диапазоне от 0,141 до 0,188 Па·с, что превышает установленный ГФ XIII предел вязкости глазных капель. Однако наиболее показательным отличием от препаратов, отнесенных к первой группе, является диапазон пределов текучести, составляющий от 13,1 до 23,7 Па. На основании этих данных можно сделать вывод, что изучаемые образцы гелей Корнерегель®, Солкосерил® и Видисик® обладают высокими пределами текучести: в состоянии покоя они представляют собой вязкоупругое тело, а при сдвиговом напряжении, равном вычисленным пределам, начинают течь, подобно жидким формам. Такое поведение характерно для истинных трехмерных структур, что позволяет в полной мере относить образцы из второй группы к гелям.

Рисунок 4. Первичная и вторичная упаковки лекарственных препаратов Солкосерил®, Корнерегель® и Видисик®

Лекарственные препараты, отнесенные ко второй группе, упакованы в полимерные тубы, снабженные насадкой для удобства введения геля и бушоном. Длина насадки в среднем составляет 15 мм, внутренний диаметр уменьшается от 3,5 до 1 мм.

Для лекарственных препаратов в форме гелей, упакованных в тубы с различными насадками, целесообразно изучать реологические свойства в дополнительном диапазоне сдвиговых скоростей, эквивалентном величине сдвигового напряжения при экструзии из упаковки. Для систем с высокой вязкостью напряжение сдвига при экструзии из тубы в некоторых случаях

может превышать предел текучести, что будет приводить к разрушению трехмерной структуры геля, потере консистентных свойств и, как следствие, неудовлетворительным потребительским характеристикам. Для препаратов Солкосерил®, Корнерегель® и Видисик® величина напряжения сдвига при экструзии не превышала 5 Па, что позволяло гелям сохранять свои структурно-механические свойства. Данный показатель был рассчитан по времени экструзии, диаметру сопла и количеству экструдированного препарата [7].

Для всех изучаемых препаратов по данным реологических измерений строили кривые течения и вязкости. По характеру кривой течения можно судить о типе течения вязко-пластичного тела, пределе текучести, прочности структуры. По форме кривых вязкости, представленных в координатах зависимости вязкости от скоростей сдвига, можно делать выводы о степени тиксотропности образца, а также о значении динамической вязкости в конкретных диапазонах значений скоростей сдвига.

Гели Офтагель®, Систейн-гель®, Офтан-Тимогель® и Блефарогель® имеют неньютоновский характер течения, предел текучести этих офтальмологических гелей менее выражен. Значения предела текучести для этих образцов находятся в диапазоне 5–10 Па (рисунки 5Б, 7Б). Гели текучи, легко принимают форму измерительной системы.

Гели Солкосерил®, Корнерегель® и Видисик® также имеют неньютоновский характер течения, как можно судить по кривым течения при различных температурах (рисунки 5Б, 7Б), а также высокие значения пределов текучести при двух температурах.

По кривым вязкости (рисунки 5А, 7А) видно, что все изучаемые гели тиксотропны при различных температурах измерений, их вязкости возвращаются к исходным значениям при уменьшении скорости сдвига от 300 до 0 $с^{-1}$ и от 1000 до 0 $с^{-1}$ соответстсвенно. По графикам видно, как с течением времени измерения вязкость образцов Офтагель®, Систейн-гель®, Офтан-Тимогель® и Блефарогель® снижается до 0,1–0,3 Па·с, а затем возвращается к значениям 0,5–0,7 Па·с для 25 °С и 0,4 Па·с для 37 °С. Небольшое увеличение вязкости по сравнению с начальными значениями можно отнести к погрешности измерения и возможному неравномерному распределению образца в измерительной системе.

Кривые вязкости и течения гелей Офтагель® и Офтан-Тимогель® близки, особенно при повышенных температурах, когда вязкость геля снижается. Это можно объяснить тем фактом, что эти гели очень близки по составу: в качестве гелеобразователя использовался карбомер в практически одинаковых количествах и остальные вспомогательные вещества содержались в аналогичном количестве. Небольшое различие имеется на кривой текучести 25 °С, и его можно объяснить незначительным расхождением в соотношении входящих в состав препарата компонентов.

Систейн-гель®, гелеобразователем в котором выступил гидроксипропилгуар, демонстрирует чуть более низкие значения вязкости.

Кривые вязкости препаратов Корнерегель® и Видисик® при температуре 37 °С лежат в одном диапазоне и значительно отличаются от реологических профилей других гелей (рисунок 6А). Аналогично ведут себя и кривые течения этих образцов (рисунок 6 Б). Таким образом, препараты Корнерегель® и Видисик® после закладывания за нижнее веко, в отличие от других глазных гелей, представленных на российском фармацевтическом рынке, обладают сравнительно высокими значениями вязкости, что позволяет им длительно обеспечивать терапевтический эффект.

На основании проведенных реологических исследований были экспериментально обоснованы оптимумы вязкостей глазных гелей при двух температурах – хранения и применения (рисунки 7А, Б). При температуре 25 °С оптимальные значения динамической вязкости лежат в диапазоне от 0,5 до 3,5 Па·с при 30 $с^{-1}$ и от 0,11 до 0,64 Па·с при 300 $с^{-1}$, при температу-

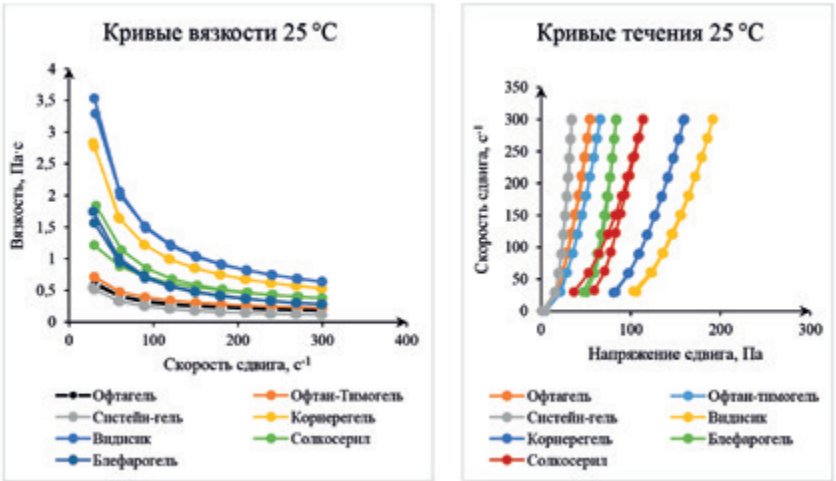


Рисунок 5. А – кривые вязкости офтальмологических гелей, измеренной при температуре 25 °С; Б – кривые течения офтальмологических гелей, измеренного при температуре 25 °С

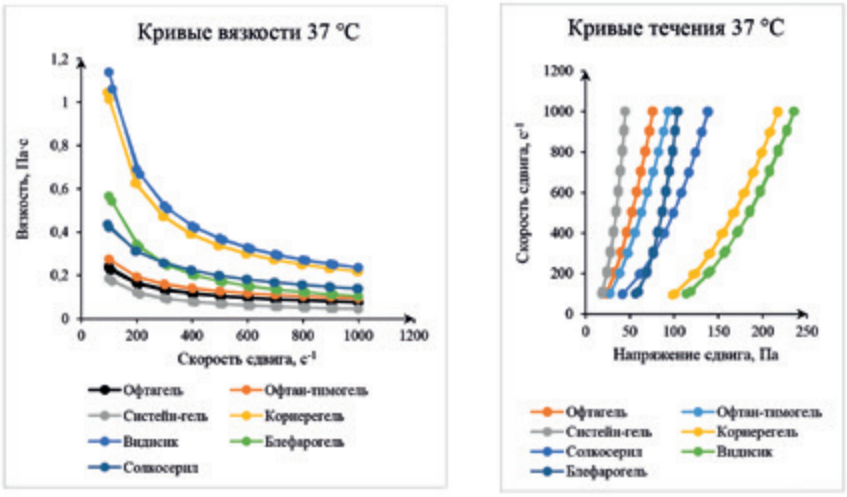


Рисунок 6. **А – кривые вязкости офтальмологических гелей, измеренной при температуре 37 °С; Б – кривые течения офтальмологических гелей, измеренного при температуре 37 °С**

ре 37 °С – от 0,17 до 1,12 Па·с при 30 $с^{-1}$ и от 0,045 до 0,25 Па·с при 1000 $с^{-1}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрены основные требования к офтальмологическим лекарственным формам. Определены оптимумы вязкости в интервалах скоростей сдвига, соответствующих применению и хранению офтальмологических гелей. На основании экспериментального изучения реологических параметров глазных гелей, зарегистрированых на территории России, можно рекомендовать следующие оптимумы для разработки новых лекарственных форм данной группы: динамическая вязкость в интервале от 0,5 до 3,5 Па·с при 30 $с^{-1}$ и от 0,11 до 0,64 Па·с при 300 $с^{-1}$ (при температуре 25 °С) и в диапазоне от 0,17 до 1,12 Па·с при 30 $с^{-1}$ и от 0,045 до 0,25 Па·с при 1000 $с^{-1}$ (при температуре 37 °С).

ЛИТЕРАТУРА

1. И.А. Королёва, Ж.Г. Оганезова. Терапия хронических заболеваний в офтальмологии: вопросы комплаентности // Клиническая офтальмология. 2016. № 1. С. 59–63.
2. Регистр лекарственных средств России: РЛС. Энциклопедия лекарств. URL: https://www.rlsnet.ru (дата обращения 13.06.2017).
3. M.N. Anurova, E.O. Bakhrushina, N.B. Demina. Review of Contemporary Gel-Forming Agents in the Technology of Dosage Forms // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2015. V. 49. Is. 9. P. 627–634.
4. A.J. Tatham, U. Sarodia, F. Gatrad, A. Awan. Eye drop instillation technique in patients with glaucoma // Eye (Lond). 2013. V. 27. № 11. P. 1293–1298.
5. M. Krilis, M. Coroneo. Digital eye drop instillation – a novel method // Aust. Fam. Physician. 2013. V. 4(2). № 4. P. 201–202.
6. V. Velebný. Гиалуроновая кислота. Применение в фармацевтической промышленности // Материалы семинара компании CONTIPRO, Москва, 20 сентября 2016 г. URL: https://www.contipro.com/portfolio/manufacturer-of-hyaluronan-forms-and-specialities (дата обращения 12.11.2016).
7. М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, С.П. Кречетов. Изучение влияния состава комбинированной матрицы на реологические характеристики экспериментальных образцов пероральных гелей нимесулида // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4(17). С. 46–52.
8. S. Kumar, B.O. Haglund, K.J. Himmelstein. In Situ-Forming Gels for Ophthalmic Drug Delivery // Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. 1994. № 10(1). P. 47–56.

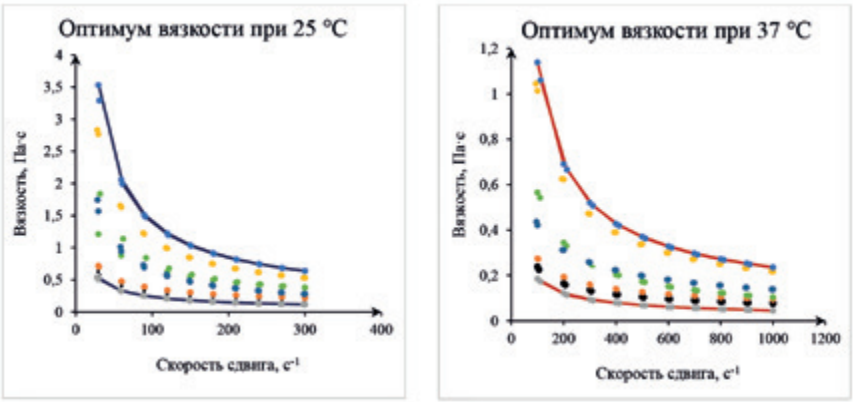


Рисунок 7. **Экспериментально установленные оптимумы вязкости офтальмологических гелей при температуре А – 25 °С; Б – 37 °С**

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

SEJONG PHARMATECH

Сушилка в псевдосжиженном слое

D5Lm

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

Высокоскоростной миксер

SM5C

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

Установка псевдоожиженного слоя сушки-грануляции

D5L

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

Optimized Technology
VANTIX

Лабораторная серия оборудования для таблетирования, капсулирования, сушки и грануляции

Таблеточные прессы серии P

P130S

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

Коатер серии C

C30FC

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

Установка псевдоожиженного слоя сушки-грануляции

C30JC

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

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

УДК 615.451.16

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ЭКСТРАГИРОВАНИЯ И ТИПА ЭКСТРАГЕНТА НА ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА НАСТОЕК ИЗ ЦВЕТКОВ НОГОТКОВ

Е.П. Рогожникова[1]*, С.Г. Марданлы[1], П.Г. Мизина[2]

Резюме. В работе рассмотрены возможности снижения концентрации этилового спирта при получении календулы настойки. Проведены исследования качества образцов в зависимости от концентрации использованного экстрагента. Установлено, что использование в качестве экстрагента этилового спирта концентрацией 40% и 20% при приготовлении настойки обеспечило лучшие количественные результаты по количественным показателям в сравнении с официнальной настойкой календулы, изготовленной на 70% этиловом спирте. Однако использование в качестве экстрагента этилового спирта с концентрацией менее 40% не гарантирует получения настоек с определенной микробиологической чистотой. Данные исследования могут быть использованы в фармацевтической промышленности при получении настоек с меньшим содержанием этилового спирта.

Ключевые слова: календулы настойка, экстрагент, метод экстрагирования.

THE INFLUENCE OF THE EXTRACTION METHOD AND THE TYPE OF EXTRACTANT ON THE QUALITY OF INFUSIONS FROM MARIGOLD FLOWERS

E.P. Rogozhnikova[1]*, S.G. Mardanly[1], P.G. Mizina[2]

Abstract. The paper discusses the possibility of reducing the concentration of ethanol in the preparation of calendula tincture. Sample quality research conducted depending on the concentration used extractant. It found that the use as the extractant ethanol concentration of 40% and 20% in the preparation of infusions showed better quantitative results in terms of quantity as compared with recognized calendula tincture made 70% ethanol, but use as ethyl alcohol extractant concentrations less than 40% doesn't guarantee the receipt of tinctures with a certain microbiological purity. These studies can be used in the pharmaceutical industry to obtain infusions with lower alcohol content.

Keywords: calendula tincture, extractant, extraction methods.

1 – ЗАО «ЭКОлаб», 142530, Россия, Московская область, г. Электрогорск, ул. Будённого, д. 1

2 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ «ВИЛАР»), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7

1 – CJSC «EcoLab», 1, Budennogo str., Elektrogorsk, Moscow region, 117216, Russia

2 – National Institute of Herbal and Aromatic Plants, 7, Green str., Moscow, 117216, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: ekolab-rogozhnikova@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Жидкие формы лекарственных средств имеют ряд преимуществ перед твердыми формами, прежде всего это:

- время наступления терапевтического эффекта;
- отсутствие большого количества вспомогательных веществ и наполнителей, действие которых на организм человека неоднозначно;
- простота и удобство применения [1].

Присутствие этилового спирта обуславливает некоторые ограничения при приёме таких препаратов детьми, беременными и кормящими женщинами, пациентами с заболеваниями печени, алкогольной зависимостью, водителей автотранспорта и др.

Значительное снижение этилового спирта в настойке без потери содержащегося комплекса растворенных биологически активных веществ является актуальной проблемой для фармацевтической промышленности еще и в связи с требованиями по ограничению объема тары, комплектности и упаковки лекарственных препаратов для медицинского применения, предназначенных для приема внутрь (чем выше концентрация спирта в препарате, тем в меньший номинальный объем может быть расфасован препарат) [2].

В настоящее время сохраняется научный интерес к лекарственному растительному сырью цветки ноготков в связи с перспективой создания фитопрепаратов [3] как для лечения, так и для профилактики заболеваний, а также открытия новых фармакологических свойств. В настоящее время наблюдается новый виток активности исследований по изучению антимикробных свойств календулы лекарственной.

П.В. Афанасьевой с соавт. (2016 г.) проведены исследования, подтверждающие антимикробную активность как настойки из цветков ноготков, так и экстрактов на 40% и 70% этиловом спирте [4].

Поэтому изучение возможности получения настойки календулы с низким содержанием спирта, вероятно, позволит расширить область назначения лекарственного препарата.

В связи с этим целью нашей работы явилось обоснование выбора оптимального экстрагента и рационального способа экстрагирования цветков ноготков для получения лекарственного препарата «Календулы настойка».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили образцы опытных серий ***настоек*** и ***настоев*** календулы, полученные из сырья, отвечающего требованиям ЛСР-003426/07-261007 производителя ОАО «Красногорсклексредства» (Россия), «Цветки ноготков, цельные «анго». В качестве веществ-свидетелей использовались стандартный образец рутина (регистрационный номер Chemical Abstracts Service (CAS): 13239, серия А0355330, годен до 01.2020 г.), стандартный образец кофейной кислоты (регистрационный номер CAS: 331-39-5, серия 2, годен до 01.2018 г.) и стандартный образец хлорогеновой кислоты (регистрационный номер CAS: 327-97-9, серия А0334316, годен до 05.2017 г.).

Испытания настоек проводили в соответствии с требованиями нормативной документации ЗАО «ЭКОлаб» [5] и ГФ XIII, ОФС.1.4.1.0019.15 «Настойки» [6], по показателям: «Описание», «Сухой остаток», «Содержание этилового спирта», «Подлинность», «Сумма флавоноидов», «Микробиологическая чистота». Определяли содержание сухого остатка по методике ГФ XIII, ОФС 1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» [7], содержание спирта этилового – по методике ГФ XIII, ОФС 1.2.1.0016.15 «Определение этилового спирта в жидких фармацевтических препаратах», метод дистилляции [8], подлинность (метод ТСХ) и содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин – с помощью спектрофотометра PortLab 511 (Великобритания) по методике НД ЗАО «ЭКОлаб» [5], микробиологическую чистоту – по методике ГФ XIII, ОФС 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», категория 2 [9].

Испытания настоев проводили в соответствии с требованиями нормативной документации ЗАО «ЭКОлаб» [5] по показателям: «Описание», «Сухой остаток» – по методике ГФ XIII, ОФС 1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» [7], «Подлинность», «Сумма флавоноидов».

Определение суммы флавоноидов

0,5 мл препарата помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 2% раствора алюминия хлорида в этиловом спирте, 0,1 мл кислоты уксусной, объем раствора доводили этиловым спиртом 95% до метки и перемешивали. Через 40 мин измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 408+2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 0,5 мл календулы настойки и 0,1 мл кислоты уксусной, доведенный этиловым спиртом 95% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл [5].

Параллельно в тех же условиях измеряли оптическую плотность раствора, содержащего 1 мл 0,05% раствора СО рутина, 5 мл раствора алюминия хлорида и 0,1 мл кислоты уксусной и доведённого этиловым спиртом 95% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

В качестве раствора сравнения для измерения оптической плотности раствора РСО рутина использовали раствор, состоящий из 1 мл 0,05% раствора СО рутина и 0,1 мл кислоты уксусной, доведенный этиловым спиртом 95% до метки в колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (X, %) в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 25 \times 1 \times 100 \times P}{A_0 \times 0{,}5 \times 100 \times 25 \times 100} = \frac{A \times a_0 \times P}{A_0 \times 50},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора СО рутина; a_0 – масса навески СО рутина в граммах; P – содержание основного вещества в стандартном образце в %.

Содержание суммы флавоноидов в календула настойке в пересчете на рутин должно быть не менее 0,05%.

Подлинность. Метод ТСХ [5]

На линию старта хроматографической пластинки «Сорбфил» наносили 20 мкл препарата, 10 мкл 0,05% раствора СО рутина (ФС 42-2508-87, ГФУ ФСО), 10 мкл 0,05% раствора СО кофейной (Евр. Ф. CAS: 331-39-5, ГФУ ФСО) и хлорогеновой (Евр. Ф. CAS: 327-97-9, ГФУ ФСО) кислот (срок годности растворов стандартных образцов – 1 сутки). Пластинку высушивали на воздухе, помещали в камеру со смесью растворителей безводная муравьиная кислота – вода – этилацетат (10:10:80) и хроматографировали восходящим способом. Затем пластинку опрыскивали последовательно 1% раствором дифенилборной кислоты β-этиламинового эфи-

ра (срок годности раствора 1 месяц) и 5% раствором полиэтиленгликоля-400 (срок годности раствора 1 месяц), нагревали пластинку до 100 °С и просматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого препарата в УФ-свете при 365 нм обнаруживаются:

- зона адсорбции с Rf около 0,35, соответствующая зоне РСО рутина с флюоресценцией желтовато-коричневого цвета;
- зона адсорбции с Rf около 0,92, соответствующая зоне СО кофейной кислоты с флюоресценцией светло-голубого цвета;
- зона адсорбции с Rf около 0,53, соответствующая зоне СО хлорогеновой кислоты с флюоресценцией светло-фиолетового цвета.

Допускается обнаружение дополнительных зон с Rf от 0,25 до 0,65 с флюоресценцией различного цвета.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образцы настоек получали методом мацерации (МК), дробной мацерации (ДМК) и перколяции (ПК). В лаборатории было изготовлено по 5 образцов настоек с использованием этилового спирта 70%, 40% и 20% в соотношении сырья и готовой настойки 1:10.

Для сравнительной характеристики разных образцов определяли следующие показатели: «Описание», «Сухой остаток», «Содержание этилового спирта», «Подлинность», «Сумма флавоноидов», «Микробиологическая чистота» [5, 9].

Результаты испытаний приведены в таблице 1.

В таблице 1 приведены экспериментальные данные, где показатель «Сухой остаток» для дробной мацерации имеет значения от 3,24 до 4,48%, а при использовании методов мацерации и перколяции были получены значения от 2,11 до 2,60%.

Все полученные образцы настоек прозрачные, желтовато-коричневого цвета. При снижении концентрации этилового спирта незначительно увеличивается интенсивность цвета.

В образцах, полученных методом дробной мацерации, при снижении концентрации спирта наблюдается увеличение показателя «Сухой остаток», однако содержание целевых веществ (показатель «Сумма флавоноидов») незначительно падает, но превышает аналогичный показатель в настойках, полученных двумя другими методами. При использовании метода мацерации и перколяции наблюдается незначительное снижение содержания целевых веществ (показатель «Сумма флавоноидов»), но при этом его значение сохраняется на уровне выше нормы, в то время как показатель «Сухой остаток» практически остается неизменным. Следовательно, рациональным является метод дробной мацерации.

По показателю «Подлинность» все образцы прошли испытание, присутствуют зоны адсорбции желтовато-коричневого цвета, светло-голубого цвета, светло-фиолетового цвета на уровне зон свидетелей (рутин, кофейная и хлорогеновая кислоты).

Изготовление настоек с использованием в качестве экстрагента 20% этилового спирта методами мацерации и перколяции не гарантирует соответствие требованию «Микробиологическая чистота». Достижение соответствия требованиям категории 2 по показателю «Микробиологическая чистота» возможно при использовании дополнительной фильтрации через фильтры с удерживающей способностью не более 0,5 мкм.

Для сравнительного изучения экстрагируемого комплекса биологически активных веществ этиловым спиртом низкой концентрации и водой очищенной из этого же сырья были изготовлены **настои**. Настои были изготовлены в соответствии с инструкцией [2]. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Результаты показали, что в настоях показатель «Сухой остаток» выше, чем в настойках, следовательно, в настоях присутствуют вещества, растворимые в воде и нерастворимые в этиловом спирте; показатель «Сумма флавоноидов» значительно ниже, чем в настойках (с использованием этилового спирта 70%, 40% концентрации): так, среднее значение суммы флавоноидов в настое 0,003%, а в настойках – от 0,048 до 0,111%. Показатель «Подлинность» подтвердил наличие в составе настоев веществ-свидетелей (рутин, хлорогеновая и кофейная кислоты).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнение показателей качественного и количественного содержания БАВ в настойках, изготовленных на этиловом спирте 40% и 70% и настоях, позволяет сделать предположение об идентичности состава БАВ в полученных извлечениях.

Метод дробной мацерации при приготовлении календулы настойки показал лучшие результаты по показателю «Сухой остаток» по сравнению с настойками, полученными методом перколяции и мацерации.

Использование в качестве экстрагента этилового спирта с концентрацией менее 40% не гарантирует получение настоек, соответствующих требованиям ГФ XIII, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», категория 2.

Таблица 1.

Показатели качества экспериментальных образцов календулы настойки

Номер образца	Описание (прозрачная жидкость желтовато-коричневого цвета со специфическим запахом)	Сухой остаток (не менее 2,1%)	Содержание этилового спирта, %	Подлинность	Сумма флавоноидов (не менее 0,05%)	Микробиологическая чистота (категория 2)
01/70 МК*	прозрачная жидкость желтовато-коричневого цвета со специфическим запахом	2,47	67	Соотв.	0,069	Соотв.
02/70 М К		2,31	66	Соотв.	0,065	Соотв.
03/70 М К		2,44	67	Соотв.	0,063	Соотв.
04/70 М К		2,31	67	Соотв.	0,066	Соотв.
05/70 М К		2,22	65	Соотв.	0,061	Соотв.
01/40 МК	прозрачная жидкость желтовато-коричневого цвета со специфическим запахом	2,11	36	Соотв.	0,051	Соотв.
02/40 М К		2,31	37	Соотв.	0,049	Соотв.
03/40 М К		2,26	37	Соотв.	0,052	Соотв.
04/40 М К		2,27	38	Соотв.	0,052	Соотв.
05/40 М К		2,29	37	Соотв.	0,050	Соотв.
01/20 М К	прозрачная жидкость желтовато-коричневого цвета со специфическим запахом	2,22	18	Соотв.	0,050	Не соотв.
02/20 М К		2,24	18	Соотв.	0,051	Не соотв.
03/20 М К		2,11	17	Соотв.	0,049	Не соотв.
04/20 М К		2,23	17	Соотв.	0,048	Не соотв.
05/20 М К		2,22	17	Соотв.	0,049	Не соотв.
01/65 ДМК**	прозрачная жидкость желтовато-коричневого цвета со специфическим запахом	3,52	65	Соотв.	0,111	Соотв.
02/65 ДМК		3,24	67	Соотв.	0,104	Соотв.
03/65 ДМК		3,32	65	Соотв.	0,109	Соотв.
04/65 ДМК		3,28	65	Соотв.	0,099	Соотв.
05/65 ДМК		3,47	65	Соотв.	0,112	Соотв.
01/35 ДМК	прозрачная жидкость желтовато-коричневого цвета со специфическим запахом	4,48	38	Соотв.	0,093	Соотв.
02/35 ДМК		4,46	36	Соотв.	0,089	Соотв.
03/35 ДМК		4,44	38	Соотв.	0,098	Соотв.
04/35 ДМК		4,41	37	Соотв.	0,097	Соотв.
05/35 ДМК		4,47	36	Соотв.	0,094	Соотв.
01/70 ПК***	прозрачная жидкость желтовато-коричневого цвета со специфическим запахом	2,49	68	Соотв.	0,070	Соотв.
02/70 П К		2,44	67	Соотв.	0,066	Соотв.
03/70 П К		2,45	67	Соотв.	0,071	Соотв.
04/70 П К		2,51	66	Соотв.	0,073	Соотв.
05/70 П К		2,53	67	Соотв.	0,068	Соотв.
01/40 П К	прозрачная жидкость желтовато-коричневого цвета со специфическим запахом	2,41	37	Соотв.	0,067	Соотв.
02/40 П К		2,47	37	Соотв.	0,065	Соотв.
03/40 П К		2,51	38	Соотв.	0,066	Соотв.
04/40 П К		2,55	37	Соотв.	0,063	Соотв.
05/40 П К		2,39	37	Соотв.	0,059	Соотв.
01/20 П К	прозрачная жидкость желтовато-коричневого цвета со специфическим запахом	2,51	18	Соотв.	0,060	Не соотв.
02/20 П К		2,60	18	Соотв.	0,061	Не соотв.
03/20 П К		2,59	17	Соотв.	0,057	Не соотв.
04/20 П К		2,57	18	Соотв.	0,051	Не соотв.
05/20 П К		2,54	18	Соотв.	0,053	Не соотв.

Примечание: *образцы календулы настойки, полученные методом мацерации (МК).
**образцы календулы настойки, полученные методом дробной мацерации (ДМК).
***образцы календулы настойки, полученные методом перколяции (ПК).

Таблица 2.

Показатели качества настоев из цветков ноготков

Растительное сырье	Номер образца	Описание	Сухой остаток, %	Подлинность	Сумма фла-воноидов, %
Цветки ноготков	01 К	прозрачная жидкость желтовато-коричневого цвета со специфическим запахом	1,34	Соотв.	0,0017
	02 К		1,30	Соотв.	0,0016
	03 К		1,31	Соотв.	0,0015
	04 К		1,24	Соотв.	0,0014
	05 К		1,36	Соотв.	0,0015
Среднее значение			1,31		0,0015
Значение, приведенное к соотношению 1 массовая часть сырья : 10 объемных частей настойки (1:10)*			2,62		0,003

Примечание: *Так как при получении настоев в соответствии с инструкцией соотношение сырье : полученный настой составляет 1:20, а в настойках используется соотношение 1:10, то полученные количественные значения пересчитаны на соотношение 1:10.

При снижении концентрации экстрагента наблюдается тенденция незначительного увеличения показателя «Сухой остаток» для метода дробной мацерации при переходе от 70% этилового спирта к 20% этиловому спирту, показатель «Сумма флавоноидов» снижается, но остается выше минимального порога.

По результатам проведенных исследований количественных и качественных показателей полученных образцов календулы настойки можно сделать вывод, что снижение концентрации этилового спирта в экстрагенте до 40% не влияет отрицательно на экстракцию целевых веществ. Оптимальным методом получения настойки из цветков ноготков является метод дробной мацерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Технология лекарственных форм. Т. 1. / Под. ред. Л.А. Кондратьевой. – М. 1991. С. 157–174.
2. Правила формирования перечня лекарственных препаратов для медицинского применения, в отношении которых устанавливаются требования к объему тары, упаковке и комплектности, перечня лекарственных препаратов для ветеринарного применения, в отношении которых устанавливаются требования к объему тары и определения таких требований (постановление правительства Российской Федерации от 23 июля 2016 г. № 716).
3. ЛП-003154-250815. Ноготков цветки. Инструкция по применению. Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx (дата обращения 15.10.2017).
4. П.В. Афанасьева, А.В. Куркина, В.А. Куркин, А.В. Лямин А.В. Жестков. Определение антимикробной активности извлечений цветков календулы лекарственной // Фармация и фармакология. 2016. Т. 4. № 2(15). С. 60–70.
5. PN001887/01-040310, изм. 1-3 «Календулы настойка» // Нормативная документация ЗАО «ЭКОлаб».
6. ОФС 1.4.1.0019.15. Настойки // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2.
7. ОФС 1.2.1.0016.15. Определение этилового спирта в жидких фармацевтических препаратах // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1.
8. ОФС 1.2.1.0010.15. Потеря в массе при высушивании // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1.
9. ОФС 1.2.4.0002.15. Микробиологическая чистота // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1.

visiopharma

Open Solutions
with Holistic Approach

УСТАНОВКА СЕРИАЛИЗАЦИИ

IJS-200 Series

Идеальное решение для фармацевтической сериализации упаковки с интуитивно понятным дизайном и интерфейсом программного обеспечения VisioPharma Line Manager (L2), которое имеет полную совместимость с аппаратными средствами

– регулируемые встроенные 2 конвейера для захвата коробки и точной настройки размеров

– струйный принтер высокой производительности для 1D/2D кодов и нанесения читаемых символов на основе технологии струйной термопечати TIJ

– визуальная система оценки и верификации кодов с опциональными OCR / OCV функциями (оптическое распознавание и проверка символов)

– настраиваемые узлы печати и верификации с эффективной производительностью до 300 коробок в минуту

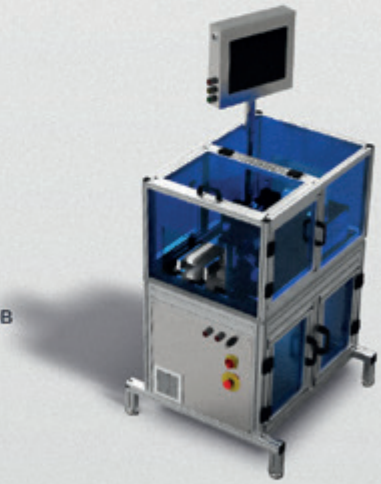
– скорость конвейера 30–60 м/мин

– тип конвейера PU соответствует FDA

– встроенная система отбраковки для некондиционных коробок в закрытую емкость отбраковки

– встроенный шкаф управления, автоматизации и IT компонентов

– соответствие GMP и 21 CFR часть 11.



Доступные решения в рамках комплексного подхода!

Pharmcontract® group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

УДК 615.4

ИОНООБМЕННЫЕ СМОЛЫ КАК ИНГРЕДИЕНТЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Н.Б. Демина[1]*, Д.Д. Воробьева[1]

Резюме. В статье рассмотрены вопросы применения ионообменных смол (ИОС) в качестве вспомогательных ингредиентов лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций. Основными функциями ИОС как вспомогательных веществ являются коррекция вкуса, дезинтеграция таблеток, стабилизация субстанций, контроль высвобождения и др. Приведены примеры использования ИОС в пероральных, офтальмологических, назальных, трансдермальных лекарственных формах. Хорошие технологические свойства ИОС и их стабильность позволяют включать их в различные лекарственные формы: твердые, жидкие, аппликационные.

Ключевые слова: ионообменные смолы, лекарственные формы, вспомогательные вещества, коррекция вкуса, дезинтеграция, модификация высвобождения.

ION-EXCHANGE RESINS AS INGREDIENTS DRUG FORMULATIONS

N.B. Demina[1]*, D.D. Vorobyeva[1]

Abstract. The article discusses the usage of ion-exchange resins (IOSs) as excipients and pharmaceutical substances. The main functions of IOSs as excipients are: taste masking, disintegration of tablets, stabilization of substances, modified release, etc. Were described the examples of IOSs usage in oral, ophthalmic, nasal, transdermal dosage forms. Good technological properties: solid, liquid, application.

Keywords: ion exchange resins, dosage forms, excipients, taste correction, disintegration, release modification.

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

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

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

ВВЕДЕНИЕ

Ионообменные смолы (ИОС) в фармацевтической технологии широко применяются для очистки, сепарации и выделения компонентов из их смеси, для диализа, хроматографии, а также с другими подобными целями. В то же время такие преимущества ИОС, как инертность, стерилизуемость, способность к высокой загрузке лекарственным веществом (ЛВ), отсутствие побочных эффектов, послужили обоснованием для применения их в составе лекарственных препаратов в качестве вспомогательных и даже активных компонентов [1–8].

ИОС – вспомогательные вещества, предназначенные для выполнения как традиционных функций, например дезинтеграции таблеток или коррекции вкуса горьких субстанций, так и для более сложных, например для регуляции скорости высвобождения ЛВ в препаратах с модифицированным высвобождением. Применение ИОС показало, что они являются технологичными, безопасными и эффективными эксципиентами, обеспечивающими гибкость рецептуры лекарственных препаратов, которая может быть легко изменена для достижения желаемых характеристик высвобождения ЛВ [1, 2, 4, 5].

ИОС – нерастворимые полимеры трехмерной макропористой структуры, содержащие кислотные или основные функциональные группы и способные к обратимому обмену противоионов в растворах. При пероральном приеме ЛВ высвобождается из нагруженной смолы – резината – путем обмена с ионами желудочно-кишечной жидкости сначала с поверхности частиц смолы, затем диффузией из внутренних слоев. Из-за большой молекулярной массы смолы не усваиваются организмом и поэтому инертны.

Для технологии важно, что ИОС – свободно сыпучие порошки со стандартным размером частиц, устойчивые к различным технологическим воздействиям. Тот факт, что эти материалы полностью нерастворимы во всех растворителях при любых значениях pH и не подвержены ферментному гидролизу, в сочетании с их регулируемым в процессе синтеза размером частиц означает, по мнению ряда авторов, что они не усваиваются организмом и поэтому нетоксичны и безопасны [1, 4, 6].

ВАЖНЫЕ СВОЙСТВА ИОС КАК ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ [5–9]

Эффективность ИОС в составе лекарственных форм главным образом зависит от их физико-химических свойств, таких как степень поперечной сшивки, пористость, кислотность/основность, прочность, стабильность, чистота, размер частиц и др.

Кислоты или основания [1, 5]. Как известно, ИОС делят на катионообменные, анионообменные и амфотерные (или биполярные).

Катионообменные смолы, в свою очередь, бывают как сильно-, так и слабокислотные. Анионообменные соответственно – сильно- и слабоосновные, а также промежуточной и смешанной основности.

Сильнокислотные катиониты – это катиониты, обменивающие катионы в растворах при любых значениях pH, слабокислотные – способные к обмену катионов в щелочных средах при pH>7.

Сильноосновные аниониты способны к обмену анионов любой степени диссоциации в растворах при любых значениях pH; слабоосновные аниониты способны к обмену анионов из растворов кислот при pH 1-6.

Значение pKa смолы будет иметь значительное влияние на скорость высвобождения ЛВ в желудочно-кишечном тракте.

Ионообменная емкость служит количественной мерой способности принимать обмениваемые противоионы и, следовательно, является одним из основных показателей ИОС, указывающим на ее эффективность. Обменная емкость рассчитывается как отношение числа ионных участков на единицу веса или объема смолы и определяет количество вещества, способное абсорбироваться смолой. Так, из-за громоздких ионных заместителей полистирольные ИОС, имеющие ионы сульфокислот, характеризуются меньшими значениями ионообменной емкости, чем ИОС, полученные из полимеров акриловой кислоты и имеющие карбоксильные группы.

Способность к смачиванию и набуханию. Набухание прямо пропорционально количеству гидрофильных функциональных групп, присоединенных к полимерной матрице, и обратно пропорционально степени связывания дивинилбензола в составе смолы. Набухание влияет на скорость гидратации и расширение объема смолы, что важно для абсорбции больших молекул. Смолы с низкой перекрестной сшивкой способны абсорбировать значительное количество воды и при набухании образуют мягкую гелевую структуру.

Поперечные связи. Процент сшивки влияет на физическую структуру частиц смолы. Степень перекрестного связывания контролируется количеством сшивающего агента, например дивинилбензола, используемого в процессе сополимеризации. Его доля определяет, в какой степени ИОС может свободно набухать и сжиматься.

Стабильность. ИОС при обычной температуре и в отсутствии мощных окислителей устойчивы к разложению.

Чистота и токсичность. Так как содержание ИОС в лекарственных формах, как правило, 60% или более, токсичность ионообменных смол является важным критерием качества. Однако их высокомолекулярная структура препятствует абсорбции и обеспечивает безопасность.

Размер частиц и форма. Скорость ионообменных реакций зависит от размера частиц смолы. Уменьшение размера частиц смолы значительно уменьшает время достижения равновесия с окружающей средой.

Пористость определяет размер ионов, которые могут проникать в матрицу смолы.

ОБЩАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ИОС [5, 6, 10, 11]

ИОС, предназначенные для использования в лекарственных формах, обычно представляют собой свободно текучие порошки с размерами частиц от 40 до 150 мкм. ЛВ, предназначенные для включения в резинаты (нагруженные лекарственным веществом ИОС), должны иметь в своей химической структуре кислотные или основные группы и период полураспада ($t_{1/2}$) от 2 до 6 ч. ЛВ должно хорошо абсорбироваться из всех областей желудочно-кишечного тракта, а также быть стабильным в желудочном соке.

Подготовка резинатов, как правило, заключается в смешивании ИОС с растворенным ЛВ в течение времени, достаточного для образования комплекса, обычно это несколько часов. Полученную дисперсию фильтруют и в случае необходимости сушат при температуре около 60 °C. Высушенный резинат – сыпучий порошок с физическими свойствами ИОС, пригодный для технологической переработки практически в любые лекарственные формы (жевательные, суспензии, капсулы, таблетки и др.). Для более точного контроля высвобождения возможно нанесение на частицы резинатов покрытия [3].

Результаты исследования технологии формирования резинатов подчеркнули ее влияние на характеристики лекарственной формы. В работе [10] это показано на примере комплексов рисперидона и амберлитовой смолы, получаемых с целью коррекции вкуса ЛВ. В исследовании комплексообразование проводили в процессе гранулирования или лиофилизации

или в растворе ЛВ при различных соотношениях ЛВ : ИОС. В результате установлено, что при проведении комплексообразования в растворе требуется меньшее количество ИОС. Массовое соотношение ЛВ : ИОС составило 1:1 и 1:2. При комплексообразовании при грануляции или лиофилизации для маскировки вкуса потребовалось существенно больше ИОС, эффективные соотношения ЛВ : ИОС составили 1:4 и 1:6. При физическом смешивании ЛВ и ИОС комплексообразования не происходило. Таким образом, тщательная оценка производственной процедуры указывает на характер и степень комплексообразования. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что применение ИОС для коррекции вкуса субстанций из-за высокого содержания ИОС перспективно в случае небольшой дозировки ЛВ, которая, как известно, определяет массу единицы лекарственной формы.

Особенности высвобождения ЛВ из резинатов [1, 12]. Когда загруженная смола поступает в организм, например в желудочно-кишечный тракт, начинается ионный обмен, в результате ЛВ высвобождается и этот процесс будет продолжаться до достижения термодинамического равновесия. Однако концентрация ЛВ в биожидкости не будет стабильной. Во-первых, часть выделяющегося ЛВ абсорбируется организмом. Во-вторых, смола начинает поглощать некоторые молекулы высвободившегося ЛВ, потому что они находятся на другой стороне равновесия.

Профиль высвобождения ЛВ из полученной лекарственной формы зависит от размера частиц резината, степени поперечного связывания смолы и его связи с ЛВ, природы смолы и ЛВ, а также от условий испытаний, важнейшим из которых является ионная сила среды растворения. Биодоступность препарата на основе резината, как и в общем случае, определяется высвобождением ЛВ и его абсорбцией в желудочно-кишечном тракте. Резинат будет высвобождать активное вещество только тогда, когда оно заменится на ион того же заряда из окружающей среды. Поскольку ионный обмен является равновесным процессом, его скорость будет зависеть от ионной силы и объема жидкости в месте высвобождения. Также следует учитывать, что высвобождение действующего вещества происходит не мгновенно, а во времени, так как оно должно диффундировать через смолу из внутренних слоев. В толстой кишке десорбция ЛВ из резинатов и его абсорбция организмом могут происходить медленнее из-за низкого содержания жидкости, защемления в фекалиях и плохого поглощения. Как уже было сказано, нерастворимая смола не абсорбируется и выводится из организма привычным путем.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ НАЗНАЧЕНИЕ ИОС КАК ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

Коррекция вкуса ЛВ в пероральных лекарственных формах представляет серьезную проблему, особенно для детей и пожилых пациентов. Маскировка неприятного вкуса ЛВ повышает ценность продукта и комплаентность терапии [13, 14]. Среди многочисленных доступных методов маскировки вкуса ионообменные смолы имеют преимущества – они недороги и могут быть использованы для приготовления многих лекарственных форм в промышленности. Да и сам механизм этого процесса при участии ИОС коренным образом отличается от маскировки горького вкуса подсластителем или ароматизатором. В научных публикациях имеются сведения о коррекции вкуса с помощью ИОС спирамицина, декстрометорфана, талампациллина гидрохлорида, бета-лактамных антибиотиков, ранитидина, пароксетина и других ЛВ [1, 5, 10, 15].

Устранение полиморфизма [5]. Полиморфизм часто характеризуется как способность ЛВ существовать в виде двух или более кристаллических фаз, имеющих различные конформации молекул в кристаллической решетке. Это огромная проблема для фармацевтической промышленности, так как многие твердые вещества могут существовать в различных физических формах, обладающих различными параметрами растворимости, стабильности и биодоступности, а главное, полиморфы могут меняться при технологическом воздействии (сушка, увлажнение, температура и др.).

Ионообменные смолы способны справиться с этой проблемой, потому что использование резинатов полностью исключает какие-либо полиморфные переходы при технологической переработке ЛВ.

Улучшение растворения плохо растворимых ЛВ в результате комплексообразования с ИОС может быть использовано для плохо и мало растворимых субстанций. Использование микронизации для увеличения скорости растворения может стать проблематичным, так как требует специального оборудования, зачастую может привести к агломерации мелких частиц после измельчения и к снижению стабильности. Активная механическая обработка ЛВ также может привести к плавлению и преобразованию его в другие кристаллические формы. Эти проблемы отсутствуют при получении комплексов с ИОС. Более того, стабильность адсорбата часто оказывается более высокой, чем у индивидуального вещества.

По мнению Dr. L. Hughes, технического специалиста Rohmand Haas Company, Spring House, PA, USA [1, 6], в случае плохо растворимых ионизированных ЛВ их высвобождение из резината может осу-

ществляться в некоторых случаях быстрее, чем из твердой лекарственной формы. Возможно, быстрое растворение происходит из-за отсутствия кристаллической решетки, ведь в резинате каждая молекула связана с функциональным сайтом ИОС.

На примере ламотриджина, который относится ко 2 классу биофармацевтической классификационной системы, показана возможность повысить растворимость субстанции в ородиспергируемых таблетках, содержащих его твердую дисперсию на основе GELUCIRE® и Kyron 314 в качестве дезинтегранта, Kyron T-154 или Kyron T-104 в качестве корригентов вкуса. Полное высвобождение ламотриджина из разработанной лекарственной формы *in vitro* происходило уже за 8 мин [16].

Повышение стабильности. Витамин B_{12} имеет срок годности всего несколько месяцев, а его адсорбат – более двух лет. Никотин изменяется под воздействием воздуха и света, но адсорбат никотина, используемый при изготовлении никотиновой жевательной резинки и леденцов, гораздо стабильнее [17, 18].

Протекция расплывания. С помощью резинатов можно устранить расплывание вещества в процессе производства и хранения. Резинаты расплывающихся и высокогигроскопичных препаратов, например таких, как вальпроат натрия, сохраняют свойства смолы: они негигроскопичны и остаются свободно сыпучими порошками. Поглощение ими воды аналогично ненагруженным смолам. Отсюда следует, что лекарственные формы расплывающихся или сильно гигроскопичных субстанций могут быть изготовлены без специального оборудования или контроля влажности воздуха, более того, поскольку расплывание при хранении устраняется, упрощаются требования к упаковке [1, 19].

Улучшение физических характеристик. Жидкие субстанции, будучи включенными в комплексы с ИОС, стабилизируются и становятся твердыми сыпучими порошками. Например, никотин, использующийся в никотиновых жевательных резинках, из жидкой формы с помощью ИОС становится стабильной, легкосыпучей субстанцией.

Дезинтеграция таблеток – важная характеристика, поскольку высвобождение ЛВ происходит после распада лекарственной формы. Некоторые дезинтегранты по своей природе являются адгезивными и неэффективны в отношении предотвращения связывания частиц, например, целлюлозы. Натрийкарбоксиметилцеллюлоза и альгинаты – клейкие и не для всех рецептур эффективны в отношении дезинтеграции. ИОС неадгезивны и могут быть использованы в таких рецептурах. После гидратации частицы смолы набухают в достаточной мере для разрушения прессованной лекарственной формы [9, 11, 19].

Скорость дезинтеграции может зависеть от прочности таблеток. Этот показатель важен еще и потому, что связан с истираемостью таблеток, пылеобразованием или разрушением при упаковке и транспортировке. Если необходимо снизить истираемость, зачастую повышают давление прессования, в результате возможно замедление скорости последующей дезинтеграции, что не всегда желательно. При введении в состав рецептуры лекарственной формы уже 2% ИОС в качестве дезинтегранта скорость распадемости таблетки в меньшей мере будет зависеть от давления прессования.

Применение ИОС в лекарственных формах для разных путей введения

Пероральные лекарственные формы [11, 16, 20, 21]. Использование ИОС показало их несомненные преимущества в развитии контролируемого или замедленного высвобождения. Резинаты могут также служить в качестве резервуара ЛВ (депо), которое обеспечивает длительное высвобождение ЛВ из гидрофильных полимерных таблеток. Контроль и воспроизводимость профиля высвобождения при использовании резинатов обеспечивается за счет физико-химической стабильности ИОС, инертной природы, однородного размера и сферической формы частиц. Обзор патентов [22], посвященных использованию ИОС в рецептурах лекарственных препаратов с целью коррекции вкуса и пролонгирования высвобождения, приведен в работе [13].

Как уже говорилось, перспективно применение ИОС в лекарственных формах, вкус которых играет существенную роль, например в ородиспергируемых таблетках и педиатрических сиропах. Так, в работе [20] Kyron T-114 успешно использован в составе ородиспергируемых таблеток, содержащих декстрометорфана гидробромид, хлорфенираминамалеат и фенилэфрина гидрохлорид.

Жидкие ЛФ, с одной стороны, характеризуются обычно высокой биодоступностью и легкостью приема, что делает их актуальными в детской практике. С другой стороны, они не всегда стабильны при хранении. С этой точки зрения преимущество имеют сухие сиропы, представляющие собой порошки или гранулы, которые перед пероральным приемом диспергируют в воде. Однако вкус жидких форм проявляется наиболее интенсивно и не всегда поддается коррекции, что может послужить причиной отказа от приема пациентом. В работе [23] предложен сухой сироп линезолида для использования в педиатрии. Для маскировки горького вкуса использованы различные ИОС: Kyron^{tm} разных марок и Indion 214. Последний включен в заключительный состав, наилучшим суспензирующим агентом признана гуаровая камедь.

ИОС в назальных препаратах [11, 19, 24]. В публикации [24] предложен назальный препарат на основе Amberlite®, содержащий никотин и предназначенный для прекращения курения. Для создания оптимального профиля высвобождения использовали ИОС двух марок – Amberlite® IRP69 и Amberlite® IR120. Совместное применение резинатов никотина позволило сформировать оптимальный профиль содержания ЛВ в плазме путем оптимальной комбинации носителей с пульсирующим и стабильным высвобождением. Следует отметить, что Amberlite® IRP69 и Amberlite® IR120 содержат катионообменные группы одной и той же ионообменной способности, но из-за различного размера частиц (10–150 мкм) демонстрируют различное высвобождение.

Трансдермальные лекарственные формы [19, 25]. С помощью ИОС возможно улучшение доставки ЛВ в составе трансдермальных лекарственных форм. Так, в [25] колебание скорости высвобождения кетопрофена из геля на основе карбопола, содержащего резинат, было значительно ниже при меньшей дозировке по сравнению с простыми гелями.

Офтальмологические лекарственные формы [11, 26, 27]. Препарат Betoptic® S [«АЛКОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ Лтд» (США)] предназначен для снижения повышенного внутриглазного давления и представляет собой стерильную офтальмологическую суспензию, твердой фазой которой является комплекс бета-адреноблокатора бетаксолола и катионообменной ИОС полистиренсульфоновой кислоты Amberlite® IRP 69. Интересно, что 0,25% офтальмологическая суспензия Betoptic® S показала повышенную биодоступность. Наступление гипотензивного действия наблюдается через 30 мин после закапывания, максимальный эффект развивается через 2 ч. После однократной инстилляции влияние на офтальмотонус сохраняется в течение 12 ч.

В работе [28] представлены результаты исследований по разработке полимерных матричных пленок, нагруженных комбинацией свободного диклофенака натрия и его комплекса с ИОС для построения профилей с немедленным и пролонгированным высвобождением соответственно. Пленки с содержанием 20% м/м ЛВ получены методом литья расплава, эффективность комплексообразования составила 99%. *In vivo* показано, что пленки способны доставлять и поддерживать терапевтические концентрации диклофенака натрия в передней глазной камере до 8 ч. То есть загруженные матричные пленки со свободным ЛВ и комплексом с ИОС могут представлять собой потенциальную офтальмологическую систему доставки ЛВ, демонстрирующую суммарно немедленное и длительное высвобождение.

Авторами [14, 21] рассматриваются разнообразные возможности применения ИОС: как корректоров вкуса, в виде порошков (простых, микрокапсулированных или покрытых), в pH-чувствительных лекарственных формах, например в гастроретентивных, в лекарственных формах для высвобождения в толстом кишечнике, трансдермальных лекарственных формах для ионофореза.

ИОС как фармацевтические субстанции. Некоторые ИОС нашли применение в качестве фармацевтических субстанций [29, 30]. Слабые катионообменные смолы используются для снижения уровня циркуляции натрия, в лечении гиперкалиемии. Сильно основные анионообменные смолы, например холестирамин и холестипол, нашли применение в терапии повышенных уровней липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Холестирамин и холестипол – сильные основные анионные ИОС в форме хлоридов. Эти смолы адсорбируют желчь и соли из желудочно-кишечного тракта, повышая метаболизм холестерина в печени для пополнения нормальных уровней желчи. Это, в свою очередь, приводит к значительному снижению ЛПНП в сыворотке. Применение ИОС перспективно при интоксикациях, в том числе лекарственных [4, 30]. Монографии на ряд ИОС были включены уже в 25-е издание USP [31–33].

В настоящее время для использования в лекарственных формах производятся ИОС фармацевтического качества, известные под торговыми наименованиями: **Duolite^{tm}** и **Amberlite^{tm}** производства The Dow Chemical Company, USA [34], **Indion** – Ion House, India [35], **Tulsion®** – Thermax House, India [36], **Purolite®** – Purolite Headquarters, USA [29, 37], **Doshion®** – Doshion Limited Corporate, India [38], **Kyron^{tm}** – Corel Pharma Chem, India [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ионообменные смолы – технологичные, стабильные и эффективные вспомогательные вещества, функции которых чрезвычайно широки. Они способны стабилизировать ЛВ, предотвращая возможные полиморфные переходы, улучшая растворимость, регулируя скорость высвобождения из лекарственной формы, маскируя горький вкус, обеспечивая дезинтеграцию твердых лекарственных форм. На примере анализа научных публикаций показана перспективность применения ИОС в пероральных, офтальмологических, назальных, трансдермальных лекарственных формах.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. Hughes. New Uses of Ion Exchange Resins in Pharmaceutical Formulation. Rohm and Haas Research Laboratories – Spring House. URL: http://www.dow.com/assets/attachments/business/process_chemicals/amberlite_and_duolite_pharmaceutical_grade_resins/New_Uses_of_Ion_Exchange_Resins_in_Pharmaceutical_Formulations.pdf (дата обращения 07. 09. 2017).
2. AMBERLITE™ and DUOLITE™ Ion Exchange Resins. URL: https://www.colorcon.com/products-formulation/all-products/polymers-controlled-release/ion-exchange-resins/amberlite-

duolite#product-literature (дата обращения 07. 09. 2017).

3. A. Bilandi, A.K. Mishra. Pharmaceutical Ion Exchange Reain – A Review // International Journal of Advanced Pharmaceutics. 2014. № 2(4). P. 134–145.
4. D.P. Elder. Pharmaceutical Applications of Ion-Exchange Resins // Journal of Chemical Education. 2005. 82 (4). P. 575-587
5. M.V. Srikanth, S.A. Sunil, N.S. Rao and al. Ion-Exchange Resins as Controlled Drug Delivery Carriers // J. of Scientific Research. 2010. № 2(3). P. 597–611.
6. L. Hughes. Ion Exchange Resinates – The Technology Behind the Mystery // Pharmaceutical Technology Europe. 2005. № 17(4). P. 38–42.
7. F.U. Rehman, S.N. Khan. Therapeutic Applications of Ion Exchange Resins // Ion Exchange Technology II: Applications / Ed. by Dr. M.L. Inamuddin. – Springer Science & Business Media. 2012. Chapter 7. P. 149–169.
8. S.K. Bajpai, S. Saxena, M. Bajpai. Ion Exchange Resins in Drug Delivery // Ion Exchange and Solvent Extraction. A Series of Advances. V. 18 / Ed. by A.K. Sengupta. – CRC Press. 2007. Chapter 3. P. 103–150.
9. X. Guo, R.-K. Chang, M.A. Hussain. Ion-exchange resins as drug delivery carriers // J. Pharmaceutical Sciences. 2009. № 98(11). P. 3886–3902
10. R.B. Shah, M.A. Tawakkul, V.A. Sayeed, M.A.Khan. Complexation between risperidone and amberlite resin by various methods of preparation and binding study // Drug development and industrial pharmacy. 2009. № 35(12). P. 1409–1418.
11. J.G. Mahore, K.J. Wadher, M.J. Umekar, P.K. Bhoyar. Ion-Exchange Resins: Pharmaceutical Applications and Recent Advancement // J. of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2010. № 1(2). P. 8–13.
12. S. Gupta, P. Benien, P.K. Sahoo. Ion Exchange Resins Transforming Drug Delivery Systems // Current drug delivery. 2010. № 7(3). P. 252–262.
13. Н.Б. Демина, М.Н. Анурова, Т. Асфура. Разработка рецептуры и технологии таблеток с экстрактом босвеллии // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 3(4). С. 12–20.
14. М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина. Проблемы коррекции органолептических свойств лекарственных препаратов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4(13). С. 64–74.
15. V.K. Suhagiya, A.N. Goyani, R.N. Gupta. Taste Masking by Ion Exchange Resins and its new Applications: A Review // Int. J. of Pharmaceutical Sciences and Research. 2010. № 1(4). P. 22–37
16. P.K. Lakshmi, S. Reddy, C. Kishore, B. Satish Reddy. Original Article Formulation and Evaluation of Oral Disintegrating Tablets of Lamotrigine Solid Dispersions // Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013. № 9(1). P. 1–12.
17. Патент RU 2436566C2. Фармацевтический продукт для интраорального введения никотина, включающий трометамол в качестве буферного агента / Пер Стен, Д. Димитрович и др. – Заявл. 16.05.2006; Опубл. 20.12.2011. URL: https://patents.google.com/patent/RU2436566C2/ru (дата обращения 01.10.2017).
18. Патент RU 2465904. Никотиновая композиция для перорального применения, содержащая аминокислотный буфер / С.-Б. Андерссон, Г. Бергенгрен и др.; патентообладатель «МАКНЕЙЛ АБ (SE)» – Заявл. 21.04.2008; опубл. 10.11.2012. URL: http://ru-patent.info/24/65/2465904.html (дата обращения 01.10.2017).
19. K.J. Akhlesh, K.S. Pravin, P. Mohan, K.J. Sunil. Ion Exchange Resins – Pharmaceutical and Clinical Applications // Asian J. of Biomaterial Research. 2016. № 2(2). P. 51–61.
20. D. Sahu, O.P. Sharma, J. Dhari and al. Kyron T-114 as an effective Precursor for development of fixed dose combination Orodispersible formulationusing taste masked Resinate Deepesh // Int. J. of Drug Development & Research. 2013. № 5(2) P. 393–406.
21. G.P. Kumar, M. Shikha, B. Snigdha and al. Ion Exchange Resins in Gastroretentive Drug Delivery: Characteristics, Selection, Formulation and Applications // J. Pharmaceutical Sciences and Pharmacology. 2014. № 1(4). P. 304–312.
22. A. Bilandi, A.K. Mishra, A. Bilandi et al. Ion Exchenge Resins: an Approach Towards Taste Masking of Bitter Drugs and Susteined Release Formulations with their Patents // Int. Res. J. Pharm. 2013. № 4(8). P. 65–74.
23. M.P. Akash, N.S. Viren. Formulation and Evaluation of Dry Syrup Containing Linezolid // PharmaTutor. 2015. № 3(5). P. 42–48.
24. Y.H. Cheng, P. Watts, M. Hinchcliffe et al. Development of a novel nasal nicotine formulation comprising an optimal pulsatile and sustained plasma nicotine profile for smoking cessation // J. Control. Release. 2002. № 79(1-3). P. 243–254.
25. L. Yu, S. Li, Y. Yuan et al. The delivery of ketoprofen from a system containing ion-exchange fibers // Int. J. Pharm. 2006. № 319(1-2). P. 107–113.
26. G.R. Adelli, S.P. Balguri, P. Bhagav and al. Diclofenac sodium ion exchange resin complex loaded melt cast films for sustained release ocular delivery // Drug Delivery. 2017. № 24(1). P. 370–379.
27. БЕТОПТИК С (BETOPTIC® S): инструкция по применению. URL: https://www.vidal.ru/drugs/betoptic%20s__4187 (дата обращения 07. 09. 2017).
28. G.R. Adelli, S.P. Balguri, P. Bhagav et al. Diclofenac sodium ion exchange resin complex loaded melt cast films for sustained release ocular delivery // Drug Delivery. 2017. № 24(1). P. 370–379.
29. Purolitee Application. Guide. Usage for Pharmaceutical and Biotechnology Applications // Ion Exchange in Pharmaceutical and Biotechnological Applications. 2012. URL: www.purolite.com (дата обращения 04.10.2017).
30. K. Malinovskaja-Gomez. Transdermal Iontophoresis – Delivery Control by Ion Exchange Fibers and Nanocarriers: Academic Dissertation. – Helsinki. 2016. 76 p.
31. Polacrilin Potassium. United States Pharmacopeia, 25th ed. – Washington, DC: USP Convention Inc., 2002. P. 2592.
32. Anion Exchange Resin. United States Pharmacopeia, 25th ed. – Washington, DC: USP Convention Inc., 2002. P. 2283.
33. Cation Exchange Resin. United States Pharmacopeia, 25th ed. – Washington, DC: USP Convention Inc., 2002. P. 2291.
34. Pharmaceutical Formulation Excipients. URL: http://www.dow.com/en-us/water-and-process-solutions/markets/healthcare/pharmaceutical-formulation-excipients (дата обращения 04. 10. 2017).
35. Ion Exchange. URL: http://www.ionindia.com/download/brochures/PhamaBrochure.pdf (дата обращения 04. 10. 2017).
36. URL:http://thermodynamic.co.in/tunisian-resins.php (дата обращения 04.10.2017).
37. Pharmaceutical Products. URL: http://www.purolite.com/leaf/pharmaceutical (дата обращения 04.10.2017).
38. Pharmapolymer. URL: http://doshionpolymers.com/product-category/product/pharma-polymer-product/excipients-pharma-polymer-product/ (дата обращения 04.10.2017).
39. Corel Pharma Chem. Pproduct URL: http://www.corelpharmachem.com/product.htm (дата обращения 04.10.2017).

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

CRODA www.croda.com; russia@croda.com; Tel./Fax +7 495 660 88 98 Статья публикуется на правах рекламы

УДК 615.074

КРИТИЧНОСТЬ ЭКСЦИПИЕНТОВ КЛАССА SUPER REFINED™ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ РЕЦЕПТУР

Д.Д. Риццо[1], К.Э. Чен[1]*

Резюме. В представленной работе описаны преимущества и важность суперчистых вспомогательных веществ для стабильности, целостности и безопасности лекарственных препаратов. Показано влияние различных примесей на активные фармацевтические субстанции (АФС), а также на клеточное раздражение. Доказано, что хроматографически очищенные вспомогательные вещества имеют решающее значение для эффективности, стабильности и надежности фармацевтических рецептур.

Ключевые слова: вспомогательные вещества, эффективность АФС, примеси, хроматографическая очистка, стабильность лекарственных средств.

THE IMPORTANCE OF CHROMATOGRAPHICALLY PURIFIED EXCIPIENTS

G.J. Rizzo[1], K.H. Chen[1]*

Abstract. In the present work critical importance and benefits of Super Refined excipients for drug stability, integrity and safety are described. It was shown, that impurities can disrupt API and cause cell irritation. It was proved, that chromatographically purified excipients are fundamental to develop efficient, stable and reliable pharmaceutical formulations.

Keywords: excipients, API efficacy, impurities, chromatographic purification, drug stability.

1 – «Крода Инкорпорейтед», США, Нью-Джерси, Эдисон, Коламбус Серкл, 300-А

1 – Croda Inc, 300-A Columbus Circle Edison, NJ 08837

*** адресат для переписки:**
E-mail: karen.chen@croda.com
Тел.: +1 732 417 0800 * 22162

ВВЕДЕНИЕ

Еще недавно фармацевтические вспомогательные вещества считали незаметными, неактивными компонентами, крайне мало влияющими на безопасность и эффективность рецептур с активными фармацевтическими субстанциями (АФС). Однако сейчас мнение изменилось. Вспомогательные вещества приобретают все большее значение как функциональные компоненты, которые способствуют общему повышению фармакологической активности конкретной АФС. Теперь в фармацевтической промышленности эти ранее незаметные вспомогательные вещества применяют для повышения растворимости, стабильности и эффективности, чтобы улучшить биодоступность постоянно изменяющихся современных АФС.

Одна из важнейших задач, которая по-прежнему стоит перед химическим сообществом, – разработка стабильного, надежного и безопасного продукта с сохранением желаемых фармакокинетических и фармакодинамических свойств АФС. Так, вспомогательное вещество может подвергаться окислению, что, как известно, затрудняет работу со сложными и чувствительными АФС. Эти трудности могут быть непосредственно связаны с количеством примесей в данном вспомогательном веществе, а именно: свободным этиленоксидом и 1,4-диоксаном; остаточными растворителями, такими как этиленгликоль и диэтиленгликоль; вторичными продуктами окисления, такими как формальдегид, высокомолекулярные альдегиды и перекиси; технологическими компонентами, такими как остаточные количества катализатора и следовые количества металлов, и, наконец, с высоким содержанием влаги. Примеси, находящиеся в эксципиентах, могут и будут ускорять разложение АФС, дестабилизировать эмуль-

сии, вызывать раздражение кожи и клеток [1, 2] и способствовать сшивке [3] желатина как в мягких, так и в твердых желатиновых капсулах, что в конечном итоге приведет к снижению эффективности лекарственного препарата. Поэтому крайне важно устранить или по крайней мере минимизировать, насколько это физически возможно, воздействие примесей на АФС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Посредством хроматографической очистки вспомогательных веществ оказалось возможным без нарушения химической структуры удалить многие типичные примеси. Хроматографический метод эффективно снижает содержание и удаляет полярные примеси и окисляющие вещества: влагу, остаточные катализаторы, перекиси и молекулы с альдегидной функциональностью. Удаление полярных загрязнений снижает взаимодействие активных веществ, что обеспечивает стабильность и целостность лекарственного средства.

Для того чтобы лучше продемонстрировать важность чистоты вспомогательных веществ, исследовали хроматографически очищенные (ХО) распространенные вспомогательные вещества в сравнении с их стандартными фармакопейными аналогами. Здесь описаны результаты этих исследований. Показано, как чистота вспомогательных веществ влияет на раздражение клеток, образование формальдегида, сшивку желатина и стабильность АФС. Раздражение клеток изучали с использованием полисорбата-80. Исследования по образованию формальдегида и сшивке желатина проводили на ПЭГ-400, а стабильность АФС для топических лекарственных форм оценивали на примере диметилизосорбида.

РАЗДРАЖЕНИЕ КЛЕТОК

Раздражение клеток вспомогательными веществами в рецептурах трансдермального, парентерального, местного и офтальмологического применения может оказать серьезный негативный эффект на функциональность тщательно разработанной лекарственной формы. В таких чувствительных областях применения определяющим параметром оценки конечного продукта будет переносимость пациентом. Поэтому очень важно минимизировать раздражение клеток вспомогательными веществами. Клеточное раздражение хроматографически очищенными и стандартными фармакопейными полисорбатами оценивали по трансэпителиальной проницаемости (ТЭП) [3]. Полисорбаты включили в состав простой системы ПАВ, которую прямо наносили на

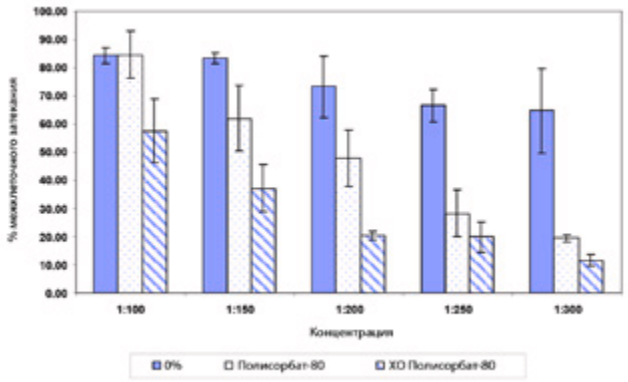


Рисунок 1. Анализ ТЭП: хроматографическая очистка на 40% уменьшает раздражение клеток стандартным фармакопейным полисорбатом-80

линию клеток почек собаки (MDCK) на 15 мин, после чего измеряли межклеточное затекание. Согласно результатам ТЭП раздражающая способность хроматографически очищенного полисорбата-80 была меньше на 40%, чем у стандартного фармакопейного образца (рисунок 1).

СШИВКА ЖЕЛАТИНА

Доказано, что формальдегид, содержащийся в эксципиентах, сшивает желатин. Вследствие этого компаниям, занимающимся капсулированием, для рецептур твердых и мягких желатиновых капсул необходимы вспомогательные вещества с низким содержанием формальдегида. Для изучения процесса сшивки применяли нарезанный на полоски желатин, используемый для производства мягких желатиновых капсул. Готовили растворы с содержанием одной части желатина (1% масс./об.) в воде (дистиллированной/деионизированной, ДД) и соответственно двух частей ХО-ПЭГ-400 либо двух частей ПЭГ-400 фармацевтического качества. Растворы взбалтывали в течение нескольких минут и оставляли стоять на 1 ч. После центрифугирования при 3500 об/мин в пробирках с желатином / водой / ПЭГ-400 фармацевтического качества обнаружили флокулянт, тогда как раствор в пробирках с желатином / водой / ХО-ПЭГ-400 остался прозрачным. После 10 мин центрифугирования при 10000 об/мин в пробирках с желатином / водой / ПЭГ-400 фармацевтического качества обнаружили твердый осадок, тогда как раствор в пробирках с желатином / водой / ХО-ПЭГ-400 или желатином в воде остался прозрачным (рисунок 2). Далее маточный раствор из всех пробирок анализировали методом ВЭЖХ. В результате между образцами ХО-ПЭГ-400 и ПЭГ-400 фармацевтического качества выявлена существенная разница. Твердый осадок в пробах с ПЭГ-400 фармацевтического ка-

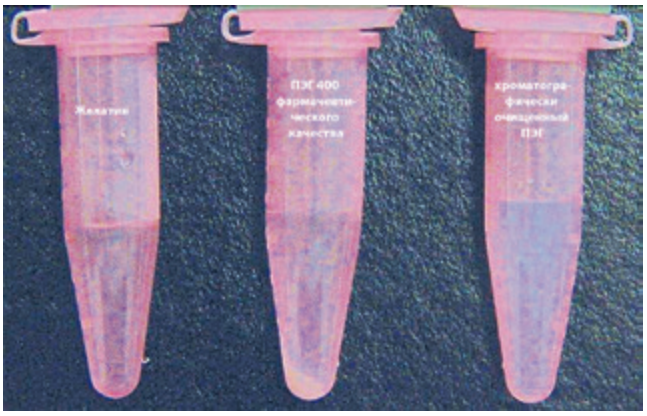


Рисунок 2. Сшивание желатина – желатин / вода / ХО-ПЭГ-400 и желатин / вода / ПЭГ-400 фармацевтического качества после центрифугирования при 10 000 об/мин

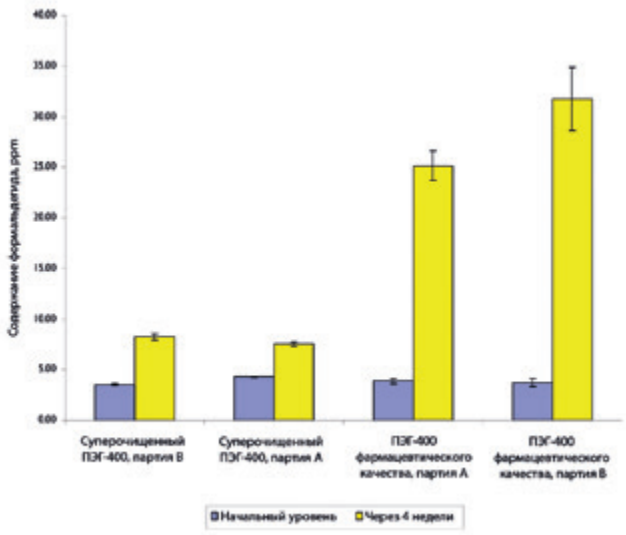


Рисунок 3. Обнаружение формальдегида: содержание формальдегида при выдержке 4 недели при 50 °C ниже в ХО-ПЭГ-400, чем в ПЭГ-400 фармацевтического качества

чества обусловлен образованием нерастворимого высокомолекулярного производного желатина за счет межмолекулярной сшивки. Остаточное содержание желатина в растворе было значительно меньше, и его структура отличалась от исходной (1% масс./об. в ДД-воде).

ОБНАРУЖЕНИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА

Известно, что формальдегид не только вызывает раздражение клеток, но и обладает высокой химической активностью, участвуя в нежелательной сшивке желатина в мягких и твердых желатиновых капсулах, что было продемонстрировано выше. И количественные, и визуальные данные прямо указывают на необходимость и преимущества обнаружения формальдегида и на важность ХО-эксципиентов для оптимальной эффективности АФИ в лекарственных средствах. Для оценки содержания формальдегида пробирки с ПЭГ-400 выдерживали 4 недели при 50 °C. Содержание формальдегида измеряли на 0-й и 4-й неделях путем дериватизации 2,4-пентандионом (ПДО) [4]. Обнаружено, что после 4 недель выдержки при 50 °C уровень формальдегида в ХО-ПЭГ-400 был ниже более чем на 60% по сравнению со стандартным ПЭГ-400 фармакопейного качества (рисунок 3). Аналогичное исследование по обнаружению формальдегида проводили с полисорбатом-80 и было показано, что хроматографически очищенный полисорбат-80, содержит на 81% меньше формальдегида, чем стандартный полисорбат-80 фармакопейного качества.

СТАБИЛЬНОСТЬ АФС

Как было отмечено выше, в современном химическом сообществе стабильность многих сложных химически активных молекул является абсолютно необходимой для обеспечения желаемых фармакологических свойств АФС. В случае разложения АФС не только возникает проблема нестабильности активного компонента, но и утрачивается целостность композиции, снижается общая эффективность лекарственного средства и изначальная биодоступность.

Для исследования влияния чистоты вспомогательных веществ на стабильность АФС был выбран диметилизосорбид (ДМИ), поскольку его обычно используют в качестве растворителя для АФС. ХО-ДМИ, содержавший 1 масс. % бензокаина, сравнивали со стандартными грэйдами ДМИ, содержавшими 1 масс. % бензокаина; все растворы выдерживали 9 недель при 50 °C. Образцы анализировали с помощью ВЭЖХ на 0, 2, 4, 6 и 9 неделях. Через 2 недели выход бензокаина в ХО-ДМИ составил 99%, тогда как у трех партий ДМИ стандартного качества выход бензокаина был 86, 98 и 88%. Спустя 9 недель количество бензокаина в трех партиях ДМИ стандартного качества еще снизилось до 78, 92 и 73%, тогда как выход бензокаина в ХО-ДМИ был по-прежнему 99% (рисунок 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данного исследования отчетливо демонстрируют важность чистоты вспомогательных веществ, преимущества, обеспечиваемые хроматографической очисткой, и то, как примеси могут нарушать параметры рецептуры при разработке. хроматографически очищенные вспомогательные вещества – от масел до полисорбатов, от полиэтиленгликолей до

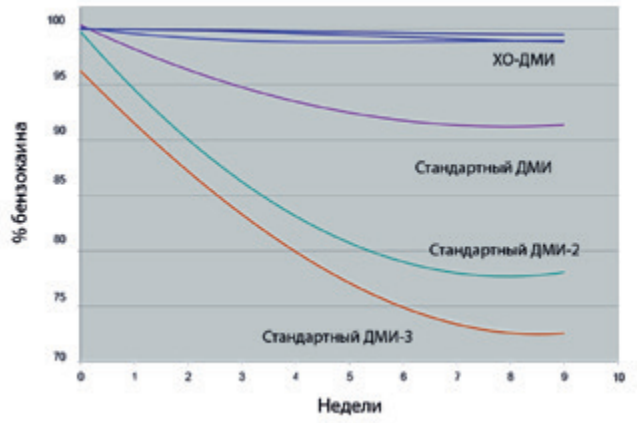


Рисунок 4. Стабильность АФС: процент высвобождения бензокаина из диметилизосорбида стандартного качества был значительно ниже после выдержки в течение 9 недель по сравнению с ХО-ДМИ

ДМИ – раскрывают перед разработчиками рецептур широкие возможности получения более стабильных конечных продуктов. Чистоту вспомогательных веществ необходимо рассматривать как определяющий параметр при планировании, разработке и создании новых лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Bergh, L. Shao, E. Gaefvert, J. Nilsson, E. Karlberg. Contact Allergens from Surfactants. Atmospheric Oxidation of Polyoxyethylene Alcohols. Formation of Ethoxylated Aldehydes, and Their Allergenic Activity // J. Pharm. Sci. 1998. № 87(3). P. 276–282.
2. M. Bergh, K. Magnusson, J. Nilsson and A-T. Karlberg. Formation of Formaldehyde and Peroxides by Air Oxidation of High Purity Polyoxyethylene Surfactants // Contact Derm. 1998. № 39(1). P. 14–20.
3. R. Tchao. Trans-Epithelial Permeability of Fluroescein **in vitro** as an Assay to Determine Eye Irritants // Alternate Methods in Toxicology. 1987. V. 6. Progess in *in vitro* Toxicology (ed. by A.M. Goldberg). P. 271–282.
4. Purity of PEG 400 affects the stability of gelatin capsule / AAPS Poster Abstract, R6012, AAPS, Nashville, November 6–10, 2005.
5. Purity of Dimethyl Isosorbide Affects API Stability / AAPS Poster Abstract, AAPS, Atlanta, November 16–20, 2008.

УДК 543.062

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ А, D_3 И Е В СОСТАВЕ ПРЕМИКСОВ «МАУЭРВИТ» И «ГРАНДВИТАМ» МЕТОДОМ УЛЬТРАВЭЖХ

А.В. Баклыков[1], Г.А. Артемьев[1,2], С.А. Главатских[1,2], Д.С. Копчук[1,3]*

Резюме. Разработана удобная методика анализа содержания витаминов А, D_3 и Е в составе премиксов (испытания проведены на примере премиксов «Мауэрвит» и «Грандвитам») методом ультраВЭЖХ. В методику были внесены необходимые изменения по сравнению с представленной ранее в ГОСТ Р 50928-96 ввиду наличия в составе премиксов компонентов, затрудняющих проведение анализа (в частности, твина-80). Разработанная методика опробована с точки зрения специфичности, правильности и прецизионности. Кроме этого, продемонстрирована возможность использования более простой с точки зрения процедуры методики для анализа витаминного экстракта, используемого в качестве сырья для производства премиксов.

Ключевые слова: ультраВЭЖХ, количественный анализ, витамины А, D_3 и Е.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF VITAMINS A, D_3 AND E IN PREMIXES «MAUERVIT» AND «GRANDVITAM» BY ULTRA HPLC

A.V. Baklykov[1], G.A. Artem'ev[1,2], S.A. Glavatskikh[1,2], D.S. Kopchuk[1,3]*

Abstract. A convenient method for analyzing the content of vitamins A, D_3 and E in premixes has been developed (the tests were carried out using the example of the premixes «Mauervit» and «randvitam») using ultra HPLC. The necessary changes of the procedure have been made in comparison with the ones presented previously in GOST R 50928-96 due to the presence in the premix components hampering analysis (in particular, Tween 80). The developed procedure has been tested in terms of specificity, accuracy and precision. In addition, the possibility of using a simpler procedure for the analysis of vitamins extract, used as raw material for premix production, has been demonstrated.

Keywords: ultra HPLC, quantitative analysis, vitamins A, D_3 and E.

1 – ФГБУН Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 620990, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, д. 22 / ул. Академическая, д. 20

2 – ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет», 620014, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3

3 – ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620002, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

1 – I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 20, Akademicheskaya str. / 22, Kovalevskoy str., Ekaterinburg, 620990, Russia

2 – Ural State Medicinal University, 3, Repina str., Ekaterinburg, 620014, Russia

3 – Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, 19, Mira str., Ekaterinburg, 620002, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: dkopchuk@mail.ru
Тел.: 8 (343) 374 11 89

ВВЕДЕНИЕ

Использование различных ветеринарных препаратов при разведении сельскохозяйственных животных в современных реалиях является необходимым условием успешного выполнения этой задачи. В частности, с этой целью часто применяются препараты, содержащие различные витамины. Это необходимо с точки зрения повышения питательности комбикормов и улучшения биологического действия их на организм сельскохозяйственных животных [1]. Витамины являются незаменимыми элементами, необходимыми для роста, развития и жизнедеятельности животных, и их содержание в кормах строго регламентируется, так как для живого организма вреден как недостаток витаминов, так и их избыток [2–4]. Следовательно, аналитический контроль содержания витаминов в подобных препаратах является важной и актуальной задачей. Однако к настоящему времени затруднительным является совместное определение нескольких витаминов, особенно при наличии значительного количества сопутствующих соединений в смеси. Используемые в настоящее время методы анализа (колориметрический, спектрофотометрический, ВЭЖХ) зачастую не позволяют выполнить эту задачу. В рамках данной работы предложено использовать с целью совместного определения витаминов А, D_3 и Е в составе премиксов «Грандвитам» и «Мауэрвит», выпускаемых технологической лабораторией ИОС УрО РАН, метод ультраВЭЖХ. Применение этого метода обычно позво-

ляет сократить расход используемых растворителей, а также время на проведение анализа при получении более точных и достоверных результатов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие коммерчески доступные реактивы:

1) витамин А (A2094,0010, Panreac, AppliChem, Vitamin A acetate, активность 1499 U/mg),
2) витамин D_3 (C9756, SIGMA, Cholecalciferol 98,2%, HPLC),
3) витамин Е (T3376, SIGMA, DL-α-Tocopherol acetate 96,7%, HPLC),
4) калия гидроксид (484016, Sigma-Aldrich),
5) метанол (494291, Aldrich, HPLC grade),
6) изопропанол (ч.д.а., ООО «Вектон»),
7) гексан (ч.д.а., ООО «Вектон»),
8) гидрохинон (H9003, Sigma-Aldrich).

В работе использовали жидкостной хроматограф Waters Acquity UPLC с фотодиодным детектором с колонкой Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 um, длиной 30 мм, диаметром 2,1 мм.

Для всех опробованных методик применяли следующие условия хроматографирования: термостатирование колонки при 25 °С, элюент – метанол (ВЭЖХ, 100 %), расход через колонку 0,3 $см^3$/мин, ввод 1,0 мкл. Детектирование осуществлялось при помощи детектора светодиодной матрицы при длине волны 254 нм (для витамина D_3), 286 нм (для витамина Е), 328 нм (для витамина А). Время проведения анализа 4 мин.

Мерные колбы, пробирки, пипетки и посуду, используемую для приготовления растворов, промывали хромовой смесью, затем дистиллированной водой и выдерживали в течение 4 ч в сушильном шкафу при температуре 100–150 °С.

1. Методика определения витаминов А, D_3, Е в премиксах «Мауэрвит» и «Грандвитам», а также в витаминном экстракте для премикса с экстракцией изопропанолом

1.1. Приготовление исходного раствора смеси витаминов А, D_3, Е в изопропаноле

Для получения раствора смеси витаминов А, D_3, Е с номинальными концентрациями витаминов 1,0 мг/мл, 0,05 мг/мл и 1,2 мг/мл соответственно в мерную колбу со шлифом вместимостью 10 мл помещали навески витаминов (таблица 1), взвешивали на аналитических весах, добавляли 5 мл изопропанола, после растворения и термостатирования доводили до метки изопропанолом.

Действительное значение концентрации каждого витамина в исходном растворе рассчитывали по формуле (1):

$$C_{исх} = m \cdot A/V, \quad (1)$$

где m – масса навески, мг; A – содержание основного вещества, мг/мл; V – объем приготовленного раствора, мл.

Полученные концентрации витаминов и необходимые навески представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Действительные концентрации витаминов А, D_3, Е в растворе

Вещество	Исходная концентрация раствора, мг/г	Навеска, г	Действительная концентрация в полученном растворе, мг/мл
Витамин А, масляный раствор	37,11	0,2750	1,020
Витамин D_3, масляный раствор	0,53	1,0093	0,054
Витамин Е, чистый	999,99	0,0125	1,205

1.2. Приготовление градуировочных растворов смеси витаминов в изопропаноле

В мерные колбы вместимостью 10 мл вносили по 0,5, 1, 2 и 5 мл исходного раствора смеси витаминов А, D_3, Е в изопропаноле и доводили до метки изопропанолом.

Рассчитывали действительные концентрации градуировочных растворов по формуле (2) (таблица 2).

$$C_{гр} = \frac{C_{исх} \cdot V_{исх}}{V_{гр}}, \quad (2)$$

где $C_{исх}$ – концентрация исходного раствора, мг/мл; $V_{исх}$ – объем исходного раствора, мл; $V_{гр}$ – объем градуировочного раствора, мл.

Таблица 2.

Действительные концентрации витаминов А, D_3, Е в градуировочных растворах

Наименование раствора	Концентрация витамина А, мг/мл	Концентрация витамина D_3, мг/мл	Концентрация витамина Е, мг/мл
Раствор I	0,051	0,003	0,060
Раствор II	0,102	0,005	0,121
Раствор III	0,204	0,011	0,241
Раствор IV	0,510	0,027	0,603
Раствор V	1,020	0,054	1,205

Каждый полученный раствор хроматографировали трижды в соответствии с вышеописанными условиями.

1.3. Проведение экстракции изопропанолом витаминов А, D_3, Е из премиксов

В мерные колбы вместимостью 10 мл вносили по 0,5, 1, 2 и 5 мл соответствующего премикса и доводили до метки изопропанолом. Выдерживали 10 мин, после чего хроматографировали дважды в соответствии с вышеописанными условиями.

1.4. Проведение экстракции изопропанолом витаминов А, D_3, Е из витаминного экстракта для премиксов

В мерные колбы вместимостью 10 мл вносили по 0,1 и 0,5 мл экстракта премиксов и доводили до метки изопропанолом. Выдерживали 10 мин, после чего хроматографировали дважды в соответствии с вышеописанными условиями.

2. Методика определения витаминов А, D_3, Е в премиксе «Мауэрвит» (экстракция гексаном)

2.1. Приготовление исходного раствора смеси витаминов А, D_3, Е в изопропаноле

Для получения исходного раствора витаминов А, D_3, Е в изопропаноле с номинальными концентрациями витаминов 1,0 мг/мл, 0,1 мг/мл и 1,1 мг/мл соответственно в мерную колбу со шлифом вместимостью 10 мл помещали навески витаминов (таблица 3), взвешивали на аналитических весах, добавляли 5 мл изопропанола, после растворения и термостатирования доводили до метки изопропанолом.

Действительное значение концентрации каждого витамина в исходном растворе рассчитывали по формуле (1) (таблица 3).

Таблица 3.

Действительные концентрации витаминов А, D_3, Е в растворе

Вещество	Исходная концентрация раствора, мг/г	Навеска, г	Действительная концентрация в полученном растворе, мг/мл
Витамин А, масляный раствор	37,11	0,2750	1,020
Витамин D_3, масляный раствор	0,53	1,0093	0,054
Витамин Е, чистый	999,99	0,0125	1,205

2.2. Методика пробоподготовки раствора смеси витаминов А, D_3, Е

В круглодонную колбу вместимостью 100 см^3, снабженную обратным холодильником, вносили навеску гидрохинона (0,03 г), добавляли 2 см^3 метанола, 2 см^3 исходного раствора витаминов А, D_3, Е в изопропаноле с номинальными концентрациями витаминов 1,0 мг/мл, 0,1 мг/мл и 1,1 мг/мл соответственно и 25 см^3 раствора для гидролиза (10 %-ный водно-спиртовой раствор гидроокиси калия: 5,0 г КОН в 2,5 см^3 дистиллированной воды и 22,5 см^3 этилового спирта). Полученный раствор нагревали на водяной бане при температуре 83±2 °С в течение 30 мин. Охлаждали содержимое колбы до комнатной температуры под струей холодной воды. Затем фильтровали содержимое колбы через бумажный обеззоленный фильтр «белая лента» с вакуумным насосом в колбу Бунзена, далее проводили экстракцию гексаном: к фильтрату добавляли 15 см^3 дистиллированной воды и 10 см^3 гексана, интенсивно перемешивали и переливали содержимое в делительную воронку на 250 см^3, промывали колбу 5 см^3 гексана в делительную воронку. После расслаивания нижний слой (водно-спиртовой) сливали обратно в колбу, а гексановый слой оставляли в делительной воронке. Повторяли экстракцию гексаном трижды. Затем промывали содержимое делительной воронки дистиллированной водой порциями по 20 см^3 до нейтральной реакции среды по индикаторной бумаге.

Промытый раствор помещали в сухую перегонную колбу объемом 250 см^3. Делительную воронку и фильтрующий материал промывали несколько раз гексаном порциями по 5 см^3, затем объединяли все полученные гексановые вытяжки и отгоняли гексан на водяной бане при температуре 85±2 °С.

Сухой остаток растворяли в 5 см^3 метанола, переносили в мерную колбу вместимостью 10 см^3, затем туда же добавляли метанол, которым омывали круглодонную колбу вместимостью 250 см^3 и воронку до объема в 10 см^3.

2.3. Приготовление градуировочных растворов смеси витаминов после пробоподготовки

В мерные колбы вместимостью 10 мл вносили по 0,5, 1, 2 и 5 мл раствора смеси витаминов А, D_3, Е, обработанного по вышеописанной методике, и доводили до метки метанолом.

Рассчитывали действительные концентрации градуировочных растворов по формуле (2) (таблица 4).

Каждый полученный раствор хроматографировали трижды в соответствии с условиями, представленными в п. 1.2.

2.4. Проведение пробоподготовки премикса «Мауэрвит»

Пробоподготовку проводили по методике, описанной в п. 1.2, но вместо 2 см^3 исходного раствора ви-

таминов А, D_3, Е в изопропаноле добавляли 2 см^3 соответствующего премикса.

Таблица 4.

Действительные концентрации витаминов А, D_3, Е в градуировочных растворах

Наименование раствора	Концентрация витамина А, мг/мл	Концентрация витамина D_3, мг/мл	Концентрация витамина Е, мг/мл
Раствор I	0,049	0,005	0,060
Раствор II	0,098	0,011	0,121
Раствор III	0,196	0,021	0,241
Раствор IV	0,490	0,053	0,603
Раствор V	0,980	0,107	1,205

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время существует множество работ, в которых описывается определение витаминов А, D_3, Е в различных объектах. С этой целью применяются колориметрические, спектрофотометрические и ВЭЖХ-методы анализа. Так, колориметрические методы определения витамина А в масляных растворах основаны на образовании цветных комплексов в присутствии треххлористой сурьмы [5]. Проблема данной методики заключается в том, что количественно можно определить витамин А только в простых растворах, любые сопутствующие вещества будут затруднять как проведение реакции, так и выполнение анализа. Определение витамина D_3 колориметрическим методом возможно после проведения реакции с двухлористым оловом [6], при которой образуется соединение, окрашенное в желто-розовый цвет, с максимумом поглощения света в области 500 нм. Количественное определение витамина D_3 в пищевых продуктах представляет собой чрезвычайно сложную задачу ввиду его низкого содержания, отсутствия чувствительных специфичных реакций на него и трудностей отделения от сопутствующих веществ. В связи с этим для многих продуктов с низким содержанием витамина D_3 до настоящего времени единственно приемлемым является метод ВЭЖХ [7].

Количественное определение витамина Е возможно произвести спектрофотометрически, колориметрически и методом ВЭЖХ. Спектрофотометрия в видимой области основана на способности токоферолов окисляться с образованием окрашенных продуктов [8], химическая структура и окраска которых разнообразны и зависят от характера окислителя. Наиболее известным из колориметрических методов анализа витамина Е, нашедшим широкое применение в аналитической практике, является метод Эммери – Энгеля [9]. Используя в качестве индикатора 2,2′-бипиридин или 1,10-фенантролин, фотометрически измеряют интенсивность окраски образовавшегося красного комплекса иона двухвалентного железа и соответствующего лиганда.

Таким образом, колориметрическое определение всех трех витаминов в одном растворе является трудоемкой задачей, требующей проведения специфических реакций с каждым из витаминов. Также известно, что совместное определение витаминов А, D_3, Е колориметрическим методом дает лишь удовлетворительные результаты [7].

Методы определения витаминов А, D_3, Е с помощью ВЭЖХ, описанные в литературе, можно разделить на 2 группы, а именно: используется метод растворения исследуемого вещества в спиртах (метанол [7, 10] или изопропанол [11]) с прямым вводом пробы в хроматограф, а также метод экстракции витаминов А, D_3, Е из образца гексаном с последующим гидролизом и анализом пробы [12–14]. Первая группа методов используется для простых растворов, не содержащих в своем составе ничего, кроме самих витаминов, жиров и растворителей. При попытке анализа проб, содержащих сложные матрицы, количественное определение витаминов данными методами невозможно [10]. Основной причиной этого является наличие в образце веществ, имеющих схожие с витаминами спектры поглощения. Вторая группа методов позволяет проводить количественное определение витаминов А, D_3, Е в растворах со сложными матрицами, но все найденные статьи описывают проведение анализа с использованием нормально-фазовой ВЭЖХ. При этом следует отметить, что использование метода ультраВЭЖХ для количественного анализа витаминов А, D_3 и Е к настоящему времени в литературе не описано, несмотря на определенные перспективы использования данного метода, особенно при проведении экспрессного разделения [15].

Технологической группой ИОС УрО РАН к настоящему времени освоено опытно-промышленное производство премиксов «Мауэрвит» и «Грандвитам», применяющихся в качестве кормовой добавки для крупного рогатого скота. Разумеется, на конечной стадии производства необходим контроль качества готовой продукции. Также необходим входной контроль содержания витаминов А, D_3, Е в экстракте для премиксов. Разрабатываемые и применяемые для контроля производства методики должны быть просты в исполнении, не требовать сложной пробоподготовки, использовать доступные реагенты и аппаратурное оформление.

В качестве основы методики в рамках данной работы были взяты методики определения витаминов А, D_3, Е согласно ГОСТ Р 50928-96 [14], в которые необходимо было внести изменения с целью проведения количественного анализа на ультраВЭЖХ Waters Acquity UPLC с использованием хроматографической колонки Waters Acquity UPLC BEH C18 и детектора Waters Acquity UPLC PDA.

Основной проблемой при проведении данного анализа является экстракция жирорастворимых витаминов А, D_3, Е из премиксов, так как методики экстракции, приведенные в ГОСТ Р 50928-96, были разработаны для количественного определения витаминов А, D_3, Е в сухих премиксах. В то же время премиксы «Мауэрвит» и «Грандвитам» являются жидкими, а их матрица содержит различные компоненты, в том числе эмульгаторы, заметно усложняющие проведение анализа.

Для разработки методики количественного определения витаминов А, D_3, Е в исследуемых растворах первоначально была проведена оценка хроматографических параметров (отклик детектора, время удерживания, предел детектирования) данных витаминов, при этом использовались градуировочные растворы витаминов А, D_3, Е в изопропаноле. При регистрации хроматограмм в случае элюирования 100% метанолом на колонке Waters Acquity UPLC BEH C18 был установлен следующий порядок выхода витаминов: А, D_3 и Е (рисунок 1). Время выхода последнего витамина Е составляет 2,98 мин, что позволяет ограничить время анализа 4 мин. Поскольку в ультраВЭЖХ используется колонка с меньшим внутренним объемом, чем в классической ВЭЖХ, объем вводимой пробы был уменьшен с 10 до 1 мкл. С целью детектирования были использованы длины волн, соответствующие максимуму поглощения каждого витамина.

Для построения градуировочных графиков вводили 3 раза по 1,0 мкл каждого градуировочного раствора (п. 1.2 раздела «Материалы и методы»), в результате получали зависимости площади пика от концентрации витаминов А, D_3, Е в растворе. Градуировочные графики строили по методу наименьших квадратов. Уравнение прямой линии имеет вид:

$$y = \alpha \cdot x + b,$$

где x – концентрация исследуемого соединения в растворе, мг/мл; y – площадь пика, мВ·с; α – tg α (α – угол наклона прямой линии).

Коэффициенты α и b рассчитываются по формулам 3 и 4.

$$\alpha = (n\Sigma x_i y_i - \Sigma x_i y_i)/(n\Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2) \quad (3)$$

$$b = (\Sigma y_i - a\Sigma x_i)/n \quad (4)$$

Градуировочный график для витамина А линеен в диапазоне концентраций 0,05–0,2 мг/мл, для витамина D – 0,003–0,055 мг/мл, для витамина Е – 0,06–1,2 мг/мл. Уравнения градуировочных графиков представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Уравнения градуировочных графиков и время удерживания витаминов А, D_3, Е

Название	Время удерживания, мин	Уравнение
Витамин А	1,257	y = 127199 · x – 3155
Витамин D_3	2,056	y = 219259 · x – 5274
Витамин Е	2,915	y = 232976 · x – 3180

Градуировочные графики для витаминов А, D_3, Е представлены на рисунках 2–4.

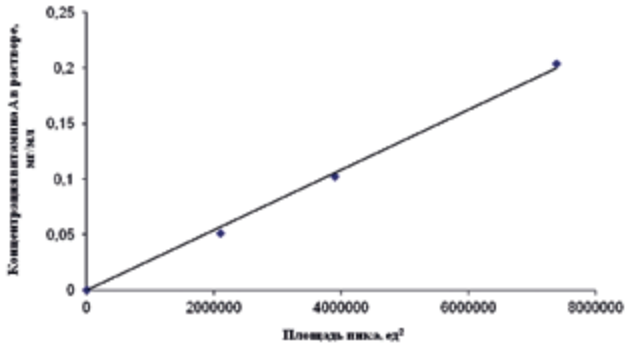


Рисунок 2. Градуировочный график по растворам витамина А в изопропаноле

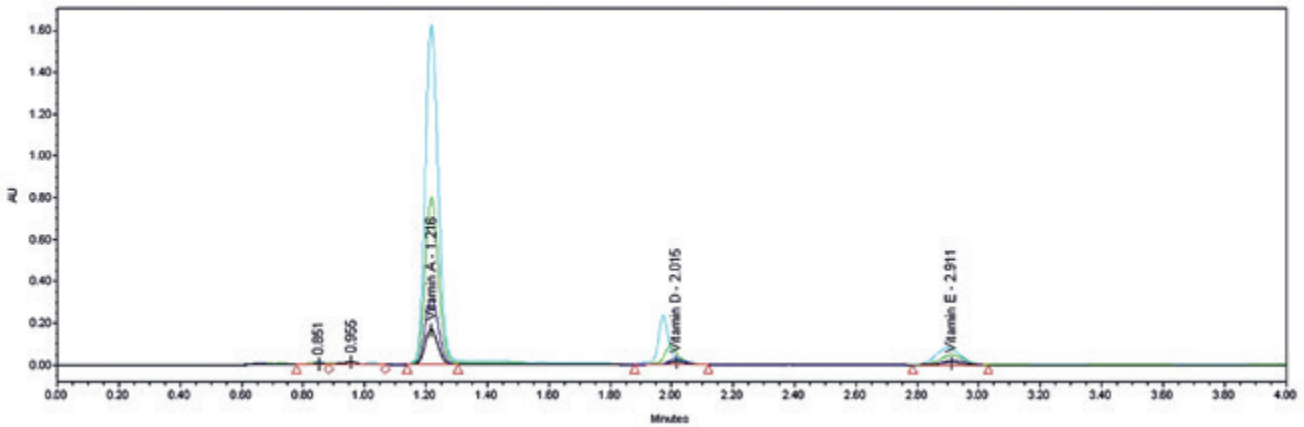


Рисунок. 1. Хроматограммы градуировочных растворов смеси витаминов А, D_3, Е

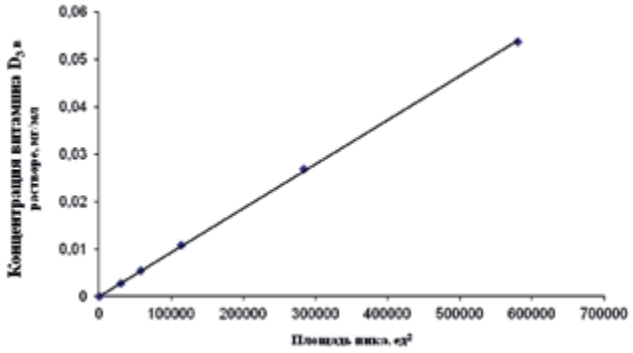


Рисунок 3. **Градуировочный график по растворам витамина D_3 в изопропаноле**

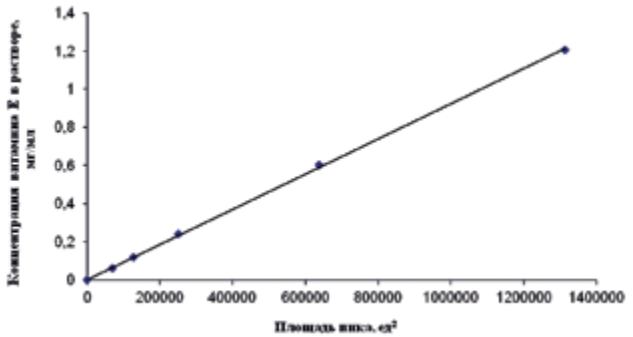


Рисунок 4. **Градуировочный график по растворам витамина Е в изопропаноле**

Попытка использования этой же методики для анализа премиксов успехом не увенчалась, а именно: было найдено, что в ходе анализа не происходит разделения пиков веществ, содержащихся в премиксе. На рисунке 5 представлена хроматограмма премикса «Мауэрвит», обработанного изопропанолом.

При анализе витаминного экстракта для премиксов, обработанного по методике, описанной в п. 1.4 раздела «Метериалы и методы», на хроматограмме регистрируются три четко разделяющихся пика, времена удерживания которых соответствуют временам удерживания витаминов А, D_3 и Е (рисунок 6). Из этого следует, что данная методика является пригодной для определения витаминов А, D_3, Е в составе витаминного экстракта, который используется для производства премиксов «Мауэрвит» и «Грандвитам», то есть фактически может применяться с целью входного контроля сырья.

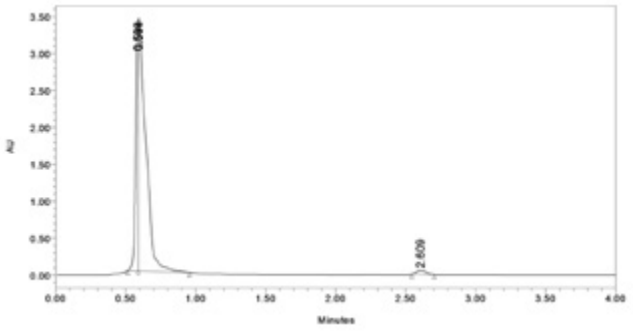


Рисунок 5. **Хроматограмма премикса «Мауэрвит», обработанного изопропанолом**

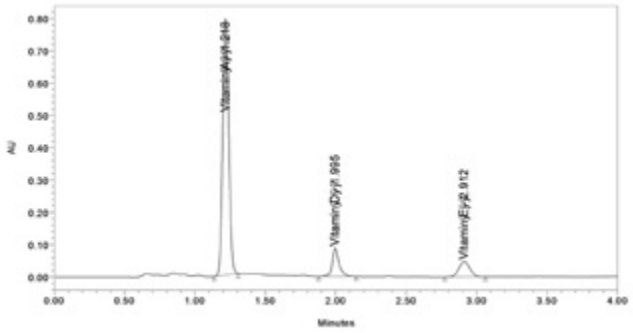


Рисунок 6. **Хроматограмма витаминного экстракта для премикса «Мауэрвит», обработанного изопропанолом**

Поскольку методика экстракции витаминов А, D_3, Е изопропанолом не дала удовлетворительных результатов, то на последующем этапе работы была опробована методика экстракции витаминов А, D_3, Е гексаном с проведением предварительной реакции гидролиза, которая приведена в ГОСТ Р 50928-96. Данную методику необходимо было оптимизировать для проведения количественного анализа витаминов в премиксах «Мауэрвит» и «Грандвитам» с использованием метода ультраВЭЖХ. Для этого нами был приготовлен и проанализирован исходный раствор витаминов А, D_3, Е в изопропаноле, приготовленный по методике, описанной в п. 2.1 раздела «Материалы и методы», и определены времена удерживания витаминов (представлены в таблице 6).

Таблица 6.

Уравнения градуировочных графиков и время удерживания витаминов А, D_3, Е в растворе после пробоподготовки

Название	Время удерживания, мин	Уравнение
Витамин А	0,945	y = 127199 · x – 3155
Витамин D_3	1,916	y = 219259 · x – 5274
Витамин Е	2,235	y = 232976 · x – 3180

На рисунке 7 представлена полученная хроматограмма исходных растворов витаминов А, D_3, Е в изопропаноле, прошедших пробоподготовку.

Для дальнейшего количественного определения содержания витаминов А, D_3, Е в премиксах были изучены градуировочные зависимости для данных витаминов. Для этого использовали градуировочные растворы, приготовленные по методике п. 2.3 раздела «Материалы и методы», вводилось 3 раза по 1 мкл.

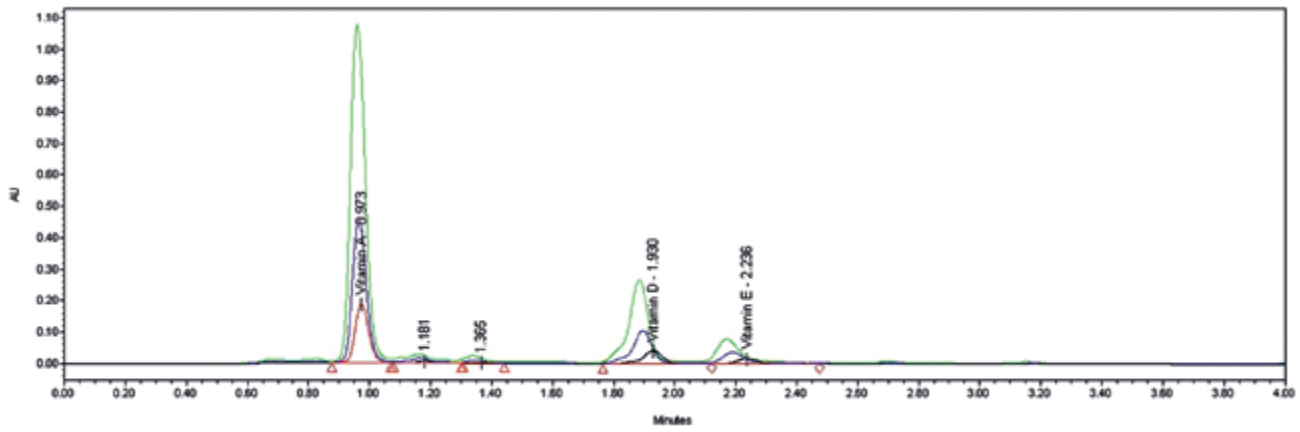


Рисунок 7. Хроматограмма исходных растворов витаминов А, D_3, Е, прошедших пробоподготовку

По полученным данным построили градуировочные графики (рисунки 8–10, уравнения представлены в таблице 6). Градуировочный график для витамина А линеен в диапазоне концентраций 0,05–0,2 мг/мл, для витамина D – 0,006–0,120 мг/мл, для витамина Е – 0,06–1,2 мг/мл.

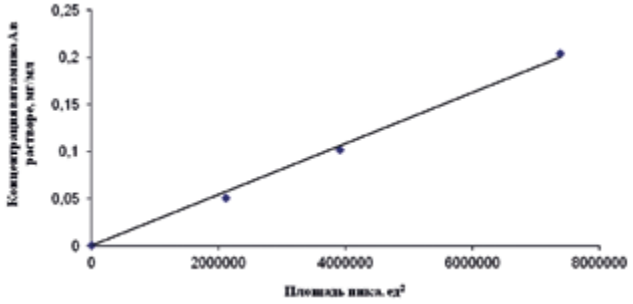


Рисунок 8. Градуировочный график по растворам витамина А в изопропаноле после пробоподготовки

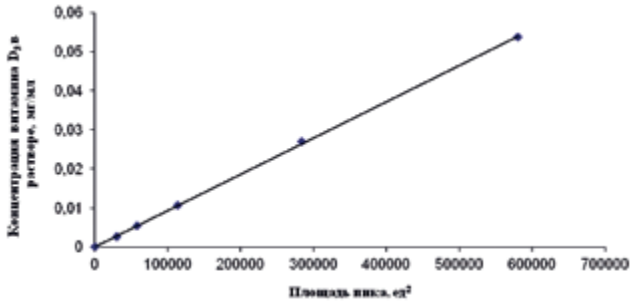


Рисунок 9. Градуировочный график по растворам витамина D_3 в изопропаноле после пробоподготовки

Таким образом, проведение пробоподготовки по данной методике не вносит каких-либо существенных изменений в линейный характер данных зависимостей, и данная методика может быть использована для проведения анализа витаминов А, D_3, Е в составе премиксов.

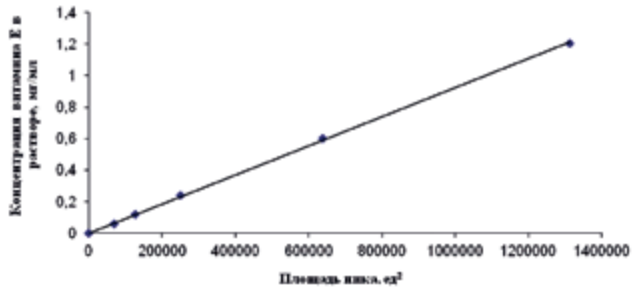


Рисунок 10. Градуировочный график по растворам витамина Е в изопропаноле после пробоподготовки

При проведении анализа премикса «Мауэрвит», приготовленного по методике, описанной в ГОСТ Р 50928-96, была получена хроматограмма, представленная на рисунке 11. Из полученной хроматограммы видно, что не происходит разделения пиков веществ, содержащихся в премиксе, и использовать данную методику без внесения существенных изменений для определения витаминов А, D_3, Е в премиксе не представляется возможным.

Нами был проанализирован состав премиксов с точки зрения выявления компонентов, способных затруднять проведение анализа данным методом, а

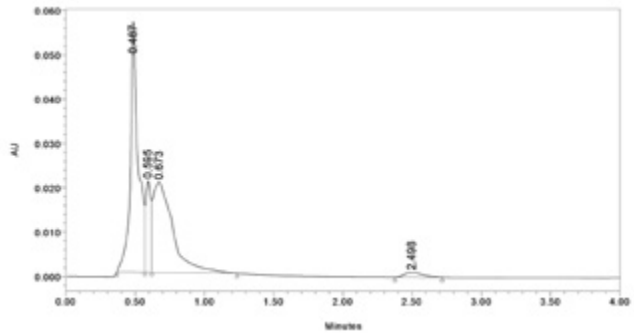


Рисунок 11. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», прошедшего пробоподготовку по ГОСТ Р 50928-96

именно: в составе анализируемых премиксов приветствуют такие компоненты, как витамины B_1, B_2, B_6, B_{12}, K_3, A, D_3, E, никотинамид, кальция пантетонат, метионин, L-треонин, L-лизин, L-триптофан, аскорбиновая кислота, твин-80, холин хлорид, монопропиленгликоль и бензоат натрия.

Очевидно, что проведение экстракции гексаном гарантирует отделение от всех водорастворимых сопутствующих соединений. Однако в составе премиксов присутствует твин-80, который представляет собой сложный эфир олеиновой кислоты **1** и сорбитола **2**. Очевидно, что данное соединение в щелочных условиях также подвергается гидролизу (реакция представлена на схеме 1). Вероятно, наблюдаемое отсутствие хроматографической селективности могло происходить по причине недостаточного для гидролиза всех компонентов премикса количества щелочи.

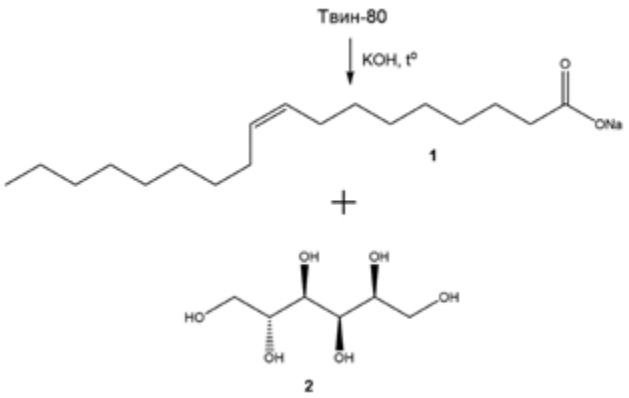


Схема 1

Экспериментально было установлено, что необходимая навеска щелочи для проведения реакции гидролиза составляет 5,0 г. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», прошедшего пробоподготовку по ГОСТ Р 50928-96 с использованием данной навески щелочи, представлена на рисунке 12. На данной хроматограмме присутствуют пики веществ, затрудняющих дальнейшее количественное определение витаминов A, D_3, E в премиксе «Мауэрвит».

Кроме этого, при проведении пробоподготовки было установлено, что после проведения реакции гидролиза на дне колбы образуется осадок, который представляет собой смесь солей жирных кислот, входящих в состав премикса. Было решено отфильтровать данный осадок и провести анализ фильтрата. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», прошедшего пробоподготовку и отфильтрованного после реакции гидролиза, представлена на рисунке 13.

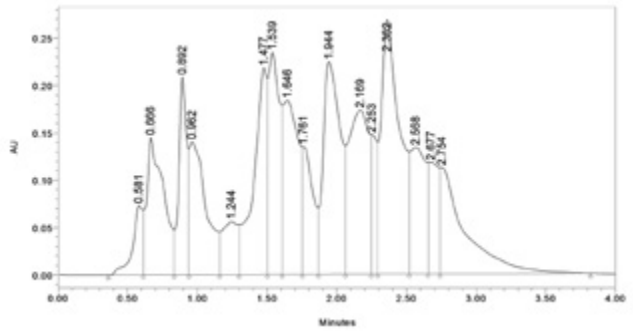


Рисунок 12. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», прошедшего пробоподготовку по ГОСТ Р 50928-96 с использованием большей навески щелочи

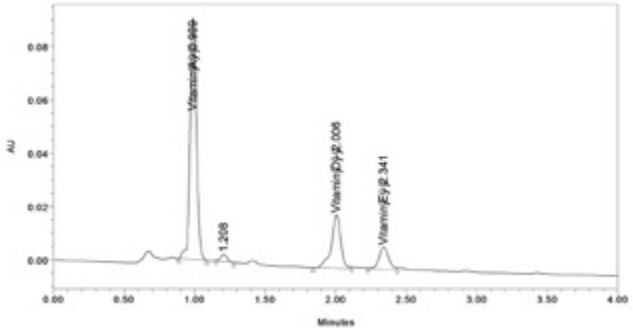


Рисунок 13. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», прошедшего пробоподготовку и отфильтрованного после реакции гидролиза

На хроматограмме регистрируются три пика (рисунок 13), времена удерживания которых соответствуют временам удерживания витаминов A, D_3 и E. Также на данной хроматограмме отсутствуют посторонние пики, затрудняющие проведение количественного анализа при проведении пробоподготовки без фильтрации. Для того чтобы проверить истинность полученных результатов, были проанализированы экстракт витаминов A, D_3, E для премиксов и сами премиксы, при этом была обнаружена высокая сходимость и воспроизводимость результатов, отклонение составляет не более 1%.

Для проверки пригодности вновь разработанная методика была протестирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность.

Для оценки специфичности методики нами был взят полуфабрикат премикса «Мауэрвит», не содержащий витаминов A, D_3, E, и обработан по методике, описанной в п. 2.4 раздела «Материалы и методы». На рисунке 14 представлена хроматограмма данного образца. На данной хроматограмме не регистрируются пики с временами удерживания, соответствующими витаминам A, D_3, E, что свидетельствует о высокой специфичности разработанной методики.

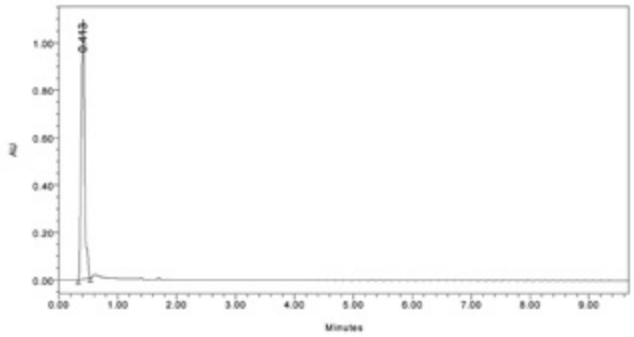


Рисунок 14. Хроматограмма премикса «Мауэрвит», не содержащего витаминов А, D_3, Е, прошедшего пробоподготовку согласно п. 2.4 экспериментальной части

Для оценки правильности и прецизионности была выполнена статистическая обработка результатов количественного определения витаминов А, D_3, Е по разработанной методике и определены ее основные метрологические характеристики [16]. Данные статистической обработки результатов количественного определения витаминов А, D_3, Е представлены в таблице 7.

Таблица 7.

Данные статистической обработки результатов количественного определения витаминов А, D_3, Е по разработанной методике

Метрологические характеристики	Витамин А	Витамин Е	Витамин D_3
среднее значение выборки $x_{ср}$, мг/мл	0,195982	0,601716	0,053211
стандартное отклонение среднего результата S_x, мг/мл	0,000230	0,003701	0,000228
значение доверительного интервала среднего результата определения Δx, мг/мл	0,000638	0,010274	0,000633
относительная ошибка среднего результата определения ε, %	0,32	1,71	1,19
значение критерия Стьюдента t	2,776	2,776	2,776

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами предложена удобная методика анализа содержания витаминов А, D_3 и Е в составе премиксов (методика испытана на примере премиксов «Мауэрвит» и «Грандвитам») методом ультраВЭЖХ. При этом в методику были внесены необходимые изменения относительно представленной ранее в ГОСТ Р 50928-96, учитывающие наличие в составе премиксов компонентов, затрудняющих проведение анализа (например, твин-80). Разработанная методика опробована с точки зрения специфичности, правильности и прецизионности, при этом показана ее применимость для анализа вышеуказанных витаминов в составе премикса. Кроме этого, продемонстрирована возможность использования более простой с точки зрения процедуры методики для анализа витаминного экстракта, используемого в качестве сырья для производства премиксов.

ЛИТЕРАТУРА

1. М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов. Общая технология микробиологических производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. 264 с.
2. Е.Ф. Иваненко. Биохимия витаминов. – Киев: Вища школа, 1970. 212 с.
3. Т.С. Морозкина, А.Г. Мойсеенок. Витамины: Краткое руководство для врачей и студентов мед., фармацевт. и биол. специальностей. – Минск: Асар, 2002. 114 с.
4. G.F. Combs, Jr. The Vitamins. Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Third Edition. – Burnugton: Elsevier Academic Press, 2008. 603 p.
5. Экспериментальная витаминология / Под ред. Ю.М. Островского. – Минск: Наука и техника, 1979. 551 с.
6. А.И. Лутцева, Л.Г. Маслов, В.И. Середенко. Методы контроля и стандартизации лекарственных препаратов, содержащих жирорастворимые витамины (обзор) // Хим.-фарм. журн. 2001. Т. 35. № 10. С. 41–45.
7. European Pharmacopoeia: Supplement. – Strasbourg: Council of Europe, 2008. 3905 p.
8. Е.В. Михеева, Л.С. Анисимова. Физико-химические методы определения витамина Е в различных объектах (обзор) // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2005. Т. 71. № 2. С. 3–9.
9. Е.В. Михеева, Л.С. Анисимова, Н.П. Пикула. Содержание витамина Е в поливитаминных препаратах // Фармация. 2004. № 5. С. 16–17.
10. Методика М 04-44-2006. Определение витаминов А, D и Е в премиксах и витаминных концентратах.
11. A.P. De Lechneer. Simultaneous detection of retinol and α-tocopherol in human serum by high performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 1979. № 162. P. 408–413.
12. F.J. Ruperez. Chromatographic analysis of α-tocopherol and related compounds in various matrices // J. Chromatogr. A. 2001. № 935. P. 45–69.
13. P. Salo-Väänänena, V. Ollilainena, P. Mattilab. Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction // Food Chemistry. 2000. V. 71. № 4. P. 535–543.
14. ГОСТ Р 50928-96. Премиксы. Методы определения витаминов А, D, Е.
15. Я. Яшин, А. Веденин, А. Яшин. ВЭЖХ и ультраВЭЖХ: состояние и перспективы // Аналитика. 2015. Вып. 2. С. 70–84.
16. ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность).

Международная выставка оборудования, сырья
и технологий для фармацевтического производства

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

pharmtech & ingredients

ufi Approved Event

Организатор
Organised by
+7 (499) 750-08-28
pharmtech@ite-expo.ru

pharmtech-expo.ru

УДК 543.544

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

А.В. Баклыков[1], А.А. Тумашов[1,2], С.К. Котовская[1,2], Е.Н. Уломский[1,2], Г.Л. Русинов[1,2], В.Л. Русинов[1,2], Д.С. Копчук[1,2]*, О.Н. Чупахин[1,2], В.Н. Чарушин[1,2]

Резюме. Разработана методика совместного определения аминотриазола, триазолопиримидинона и ниротриазолопиримидинона методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. Для достижения наилучших хроматографических характеристик предложено использовать колонку с привитой аминофазой Zorbax NH2 (Agilent Technologies, США). Возможность применения разработанной методики для осуществления технологического контроля 2-й стадии процесса получения препарата «Триазид» установлена по итогам проведения валидации.

Ключевые слова: аминотриазол, триазолопиримидинон, ниротриазолопиримидинон, Триазид, ВЭЖХ, валидация.

METHOD OF SIMANTENOUS DETERMINATION OF AMINOTRIAZOLE, TRIAZOLOPYRIMIDINONE AND NITROTRIAZOLOPIRIMIDINONE – SUBSTRATE AND SEMI-PRODUCTS OF SYNTHESIS OF DRUG «TRIAZID» BY HPLC METHOD

A.V. Baklykov[1], A.A. Tumashov[1,2], S.K. Kotovskaya[1,2], E.N. Ulomskiy[1,2], G.L. Rusinov[1,2], V.L. Rusinov[1,2], D.S. Kopchuk[1,2]*, O.N. Chupakhin[1,2], V.N. Charushin[1,2]

Abstract. A procedure for the simantenous determination of aminotriazole, triazolopyrimidinone and nirotriazolopyrimidinone was developed using the HPLC method with UV detection. To achieve the best chromatographic characteristics, it is proposed to use a column with a grafted aminophase Zorbax NH2 (Agilent Technologies, USA). The possibility of applying the developed methodology for the technological control of the second stage of the drug «Triazid» preparation is established following the results of the validation.

Keywords: aminotriazole, triazolopyrimidinone, nirotriazolopyrimidinone, triazide, HPLC, validation.

1 – ФГБУН Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, 620990, Россия, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской / Академическая, 22/20

2 – ФГБОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620002, Россия, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

1 – I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis UB of RAS, 22/20, S. Kovalevskaya / Akademicheskaya str., Yekaterinburg, 620990, Russia

2 – Ural Federal University named after the first president of Russia B.N. Yeltsin, 19, Mira str., Yekaterinburg, 620002, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: dkopchuk@mail.ru
Тел.: 8 (982) 643 07 77

ВВЕДЕНИЕ

Создание новых лекарственных средств, эффективных в отношении вирусных инфекций, в частности гриппа, является одной из наиболее актуальных и социально значимых задач, поскольку данное заболевание в период сезонных эпидемий поражает заметную часть населения планеты. В этом аспекте также необходимо отметить события последних лет, связанные с распространением птичьего и свиного гриппа, в результате чего важность усиления защиты населения от гриппа становится тем более очевидной. Все это указывает на острую необходимость создания новых противовирусных препаратов [1, 2].

В результате совместных исследований Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Уральского федерального университета им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, НИИ гриппа Минздрава России и ПАО «Отисифарм» разработан оригинальный противовирусный препарат «Триазид» (5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида L-аргининия моногидрат **1**), для которого в настоящее время проводятся клинические испытания [3]. В создании лекарственного средства важной составляющей наряду с эффективнос-

тью и безопасностью является технологичность процесса производства [4].

Процесс получения «Триазида» включает три химические стадии, которые представлены на рисунке 1.

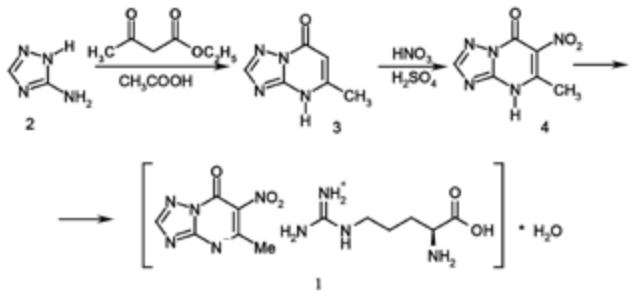


Рисунок 1. Схема стадий процесса получения «Триазида»

При организации производства любого лекарственного препарата, а также наработке его опытных партий для различных целей очевидной является необходимость аналитического контроля качества как собственно продукта, так и полупродуктов его синтеза. Ранее нами была предложена методика совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** методом ВЭЖХ [5]. В продолжение этой работы в данной статье нами выполнены разработка и валидация аналитической методики совместного определения аминотриазола **2,** триазолопиримидинона **3**, и нитротриазолопиримидинона **4** методом ВЭЖХ, то есть обеспечена возможность контроля качества полупродукта **4**, получаемого в рамках второй стадии синтеза препарата «Триазид». Целесообразность проведения полной оценки метрологических характеристик обусловлена дальнейшим применением разработанной методики при осуществлении контроля опытно-промышленного и промышленного производства препарата «Триазид».

В литературе ранее с целью определения аминотриазола **2** были описаны такие методы количественного анализа, как газохроматографические [6, 7], методы капиллярного электрофореза [8, 9], методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [10, 11]. Следует отметить, что определение аминотриазола **2** зачастую сопряжено со многими трудностями, и большинство методик предполагает проведение дополнительной процедуры дериватизации. При этом аналитических методик совместного определения аминотриазола **2**, триазолопиримидинона **3** и нитротриазолопиримидинона **4** в литературе не найдено.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали жидкостной хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором и автосамплером, снабженный колонкой Zorbax NH2 длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, размер частиц сорбента – 5 мкм (Agilent Technologies, США). Температура колонки – 25 °С. Режим элюирования – изократический. Скорость потока – 1,2 мл/мин. Детектирование осуществляли при следующих длинах волн: 206 нм – для аминотриазола **2**, 270 нм – для триазолопиримидинона **3** и 360 нм – для нитротриазолопиримидинона **4**. Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Жидкостной хроматограф Agilent 1200

В качестве элюента использовали ацетонитрил (HPLC-grade, Sigma-Aldrich, кат. No i10001, США) и буферный раствор 0,05 М ацетата аммония (Sigma-Aldrich, кат. No 240192, США) в соотношении 30:70.

Субстанция «Триазида» была синтезирована в Уральском федеральном университете им. первого Президента России Б.Н. Ельцина. Образцы готового препарата и полупродуктов были получены в технологической лаборатории Института органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН.

Все используемые субстанции растворяли в элюенте.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной задачей, которую необходимо было решить в процессе разработки методики определения полупродукта **4**, а также соединений **2** и **3**, являлся подбор оптимальных хроматографических условий

для эффективного разделения веществ, а именно условий элюирования, состава подвижной фазы и типа колонки.

Первоначально для проведения анализа и разделения исследуемых веществ была опробована ранее разработанная методика совместного определения аминотриазола **2** и триазолопиримидинона **3** [3], предполагающая использование в качестве элюента смеси ацетонитрила и буферного раствора 0,01 М ацетата аммония в 0,1% растворе уксусной кислоты в соотношении 30:70. Было установлено, что время выхода нитротриазолопиримидинона **4** при описанных условиях составляет 44,7 мин, а форма пика не отвечает необходимым критериям симметрии. В ходе варьирования соотношения ацетонитрил – буферный раствор было обнаружено, что время выхода нитротриазолопиримидинона **4** напрямую не зависит от элюирующей силы растворителя (для колонок с привитой аминофазой вода обладает большей элюирующей способностью, чем ацетонитрил [12]). Так, за счет увеличения содержания ацетонитрила в подвижной фазе происходило изменение pH в сторону более щелочной, что приводило к снижению времени удерживания нитротриазолопиримидинона **4**, но, в свою очередь, незначительно увеличивало время выхода триазолопиримидинона **3**. Таким образом, было принято решение об изменении состава подвижной фазы с заменой буферного раствора на более щелочной. Также необходимо учитывать, что при проведении технологического контроля удобно использовать унифицированные реактивы, поэтому при получении удовлетворительных результатов с ацетатом аммония замена его на другую соль нецелесообразна.

При выборе состава подвижной фазы были исследованы различные буферные растворы: 0,01 М ацетат аммония в 0,04% гидроксиде аммония (pH=9); 0,01 М ацетат аммония в 0,01% уксусной кислоте; 0,01 М ацетат аммония, в различных соотношениях с ацетонитрилом и метанолом. При этом лучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве элюента 0,05 М ацетата аммония в соотношении с ацетонитрилом.

Отдельно необходимо отметить, что аминотриазол **2** обладает низкой растворимостью в предлагаемой подвижной фазе, а использование муравьиной кислоты для увеличения его растворимости приводит к появлению на хроматограмме испытуемого образца ее пика, который не разрешается с пиком самого аминотриазола. Поэтому концентрация аминотриазола в пробе в полученной системе не может превышать 0,04 мг/мл, а использование данной методики для промежуточного контроля конверсии первой стадии процесса считается нецелесообразным.

Процедуру валидации разработанной методики осуществляли по следующим параметрам: линейность, правильность, специфичность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность [13].

Аналитическая область методики для аминотриазола **2** – от 1 до 10 мг/г, для триазолопиримидинона **3** – 1–20 мг/г, для нитротриазолопиримидинона **4** – 200–1000 мг/г.

Специфичность представляет собой способность достоверно определять анализируемое вещество в присутствии других компонентов и возможных примесей. Для подтверждения специфичности методики получены хроматограммы следующих растворов: нитротриазолопиримидинона **4** (основного определяемого вещества), триазолопиримидинона **3** (примеси), аминотриазола **2** (примеси) и матрицы. Время удерживания пика нитротриазолопиримидинона **4** составило около 4,4 мин, аминотриазола **2** – около 1,7 мин, триазолопиримидинона **3** – около 5,8 мин. На хроматограмме матрицы отсутствуют пики, препятствующие определению основного вещества и примесей в нем, что свидетельствует о возможности применения данной методики для определения исследуемых веществ (рисунок 2).

Линейность методики характеризуется наличием линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Для ее оценки использовали стандартные растворы аминотриазола **2,** триазолопиримидинона **3** и нитротриазолопиримиди-

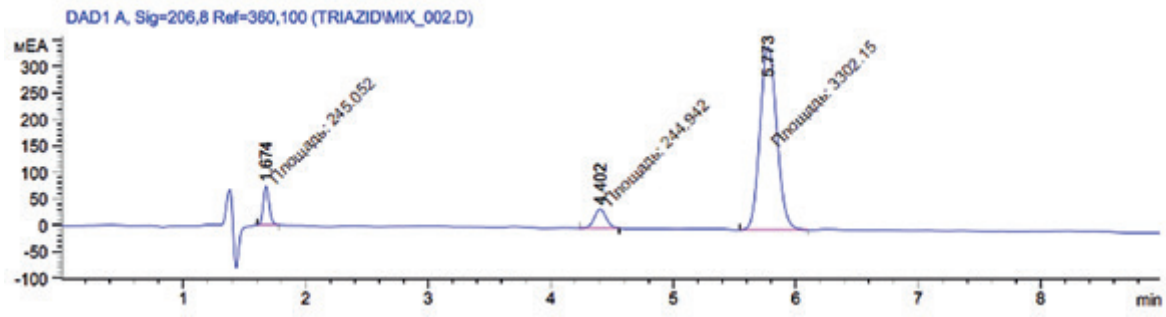


Рисунок 2. Хроматограмма совместного определения аминотриазола 2, триазолопиримидинона 3 и нитротриазолопиримидинона 4, 206 нм

нона **4** с номинальными концентрациями от 0,008 до 0,04 мг/мл, от 0,008 до 0,04 мг/мл и от 0,01 до 0,50 мг/мл соответственно (таблицы 1–3). Установлено, что графики зависимости имеют линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций и описываются уравнениями: y=45546x – 6,9354 – для аминотриазола (рисунок 3a), y=54761x – 5,9046 – для триазолопиримидинона (рисунок 3b) и y=6166,3x – 2,2687 – для нитротриазолопиримидинона (рисунок 3c), коэффициент корреляции во всех случаях близок к единице (0,99992, 0,99997 и 0,99999 соответственно).

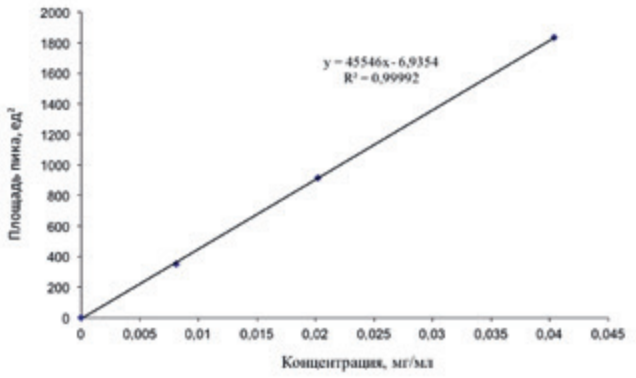


Рисунок 3a. **График зависимости концентрации от площади пика для аминотриазола 2**

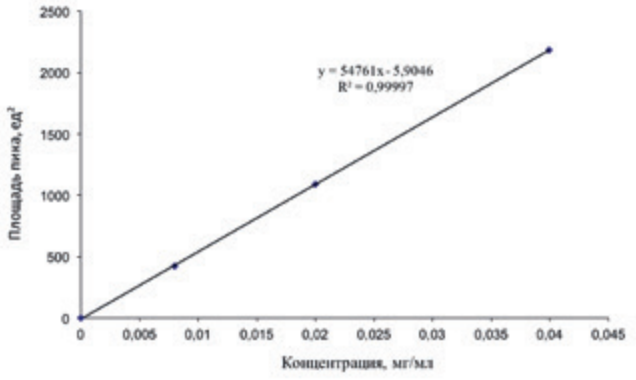


Рисунок 3b. **График зависимости концентрации от площади пика для триазолопиримидинона 3**

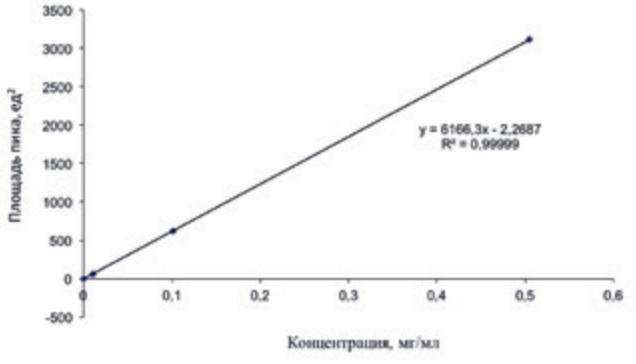


Рисунок 3c. **График зависимости концентрации от площади пика для нитротриазолопиримидинона 4**

Таблица 1.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации нитротриазолопиримидинона 4 от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед²			Среднее значение	СКО, %
	S_1	S_2	S_3		
0,010100	61	62	62	61,7	0,936
0,101000	620	614	613	615,7	0,615
0,505000	3113	3129	3096	3112,7	0,530

Таблица 2.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации триазолопиримидинона 3 от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед²			Среднее значение	СКО, %
	S_1	S_2	S_3		
0,007984	418	429	425	424,0	1,313
0,019960	1075	1101	1085	1087,0	1,207
0,039920	2189	2155	2201	2181,7	1,094

Таблица 3.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации аминотриазола 2 от площади пика

Концентрация, мг/мл	Площадь пика, ед²			Среднее значение	СКО, %
	S_1	S_2	S_3		
0,00808	342	361	350	351,0	2,718
0,0202	935	910	901	915,3	1,925
0,0404	1805	1857	1840	1834,0	1,446

Правильность характеризует близость результатов, получаемых с помощью данной методики, к истинному значению. Правильность методики устанавливали по результатам анализа методом добавок (таблица 4).

Предел количественного определения аминотриазола **2** составил 0,30 мкг/мл, триазолопиримидинона **3** – 0,15 мкг/мл, нитротриазолопиримидинона **4** – 1 мкг/мл.

Сходимость характеризует степень согласованности результатов измерений (испытаний), полученных одним и тем же методом на идентичных объектах испытаний, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования в пределах короткого промежутка времени. Коэффициент вариации параллельных определений для 6 измерений составил менее 1,5%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе проведенного исследования разработана оптимизированная методика совместного определения аминотриазола **2**, триазолопиримидинона **3** и нитротриазолопиримидинона **4** с по-

мощью метода ВЭЖХ. Методика проста в применении, не требует больших временных затрат и дополнительных процедур дериватизации с большим расходом реагентов, обладает высокой чувствительностью и позволяет определять содержание примеси исходных веществ до 0,01% от основного вещества.

Таблица 4.

Данные для оценки правильности методики

Введенное кол-во в образец, мг/мл	Результат, мг/мл	Процент восстановления, %	Среднее значение результатов, мг/мл	СКО, %	Коэффициент вариации
Нитротриазолопиримидинон					
0,0101	0,01001	99,11	0,01020	0,018	1,773
	0,01022	101,19			
	0,01037	102,67			
0,101	0,1019	100,89	0,1021	0,072	0,706
	0,1015	100,50			
	0,1029	101,88			
0,5050	0,5011	99,23	0,5023	0,139	0,276
	0,5038	99,76			
	0,5019	99,39			
Триазолопиримидинон					
0,00798	0,00797	99,85	0,00798	0,002	0,197
	0,00796	99,71			
	0,00799	100,10			
0,01996	0,02010	100,70	0,0201	0,015	0,729
	0,02021	101,25			
	0,01992	99,80			
0,03992	0,04030	100,95	0,0402	0,027	0,668
	0,04038	101,15			
	0,03988	99,90			
Аминотриазол					
0,00808	0,00810	100,25	0,00809	0,009	1,115
	0,00817	101,11			
	0,00799	98,90			
0,02020	0,01992	98,61	0,0200	0,013	0,661
	0,02017	99,85			
	0,01997	98,86			
0,04040	0,04021	99,53	0,0401	0,040	0,984
	0,04049	100,22			
	0,03971	98,29			

Проведена валидация разработанной аналитической методики, по результатам которой показана возможность ее применения для контроля второй стадии технологического процесса получения опытно-промышленных и промышленных партий препарата «Триазид». Данная методика была успешно применена для анализа опытных партий препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. О.И. Киселев Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. – СПб: Росток. 2012. 272 с.
2. Г.А. Артемьев. Разработка технологии производства субстанции противовирусного препарата «Триазавирин»: дис. … к.т.н. – Екатеринбург: УрФУ, ИОС УрО РАН, 2017. 157 с.
3. Патент РФ 2529487. 5-Метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинид l-аргинииния моногидрат / О.Н. Чупахин, В.Н. Чарушин, В.Л. Русинов, Е.Н. Уломский, С.К. Котовская, О.И. Киселев, Э.Г. Деева, К.В. Саватеев, С.С. Борисов. – № 2013116765; заявл. 15.04.2013; опубл. 27.09.2014.
4. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики».
5. А.В. Баклыков, А.А. Тумашов, С.К. Котовская, Е.Н. Уломский, Г.Л. Русинов, В.Л. Русинов, О.Н. Чупахин, В.Н. Чарушин. Методика совместного определения аминотриазола и триазолопиримидинона – субстрата и полупродукта синтеза лекарственного препарата «Триазид» – методом ВЭЖХ // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 2(19). С. 44–48.
6. J.M. van der Poll, M. Vink, J.K. Quirijns. Determination of amitrole in plant tissues and sandy soils by capillary gas chromatography with alkali flame ionization detection // Chromatographia. 1990. V. 30. P. 155–158.
7. M. Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, M. Moreno. Determination of 3-amino-1,2,4-triazole (amitrole) in environmental waters by capillary electrophoresis // Talanta. 2003. V. 59. P. 37-45.
8. S. Takeda, K. Fukushi, K. Chayama, Y. Nakayama, Y. Tanaka, S. Wakida. Simultaneous separation and on-line concentration of amitrole and benzimidazole pesticides by capillary electrophoresis with a volatile migration buffer applicable to mass spectrometric detection // J. of Chrom. A. 2004. V. 1051. P. 297–301.
9. B.V. Pepich, B. Prakash, M.M. Domino, T.A. Dattilio, D.J. Munch, E.K. Price. Development of U.S. EPA Method 527 for the Analysis of Selected Pesticides and Flame Retardants in the UCMR Surve // Environ. Sci. Technol. 2005. V. 39. P. 4996–5004.
10. M. Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, M. Moreno. Determination of 3-amino-1,2,4-triazole (amitrole) in environmental waters by capillary electrophoresis // Talanta. 2003. V. 59. P. 37–45.
11. S. Takeda, K. Fukushi, K. Chayama, Y. Nakayama, Y. Tanaka, S. Wakida. Simultaneous separation and on-line concentration of amitrole and benzimidazole pesticides by capillary electrophoresis with a volatile migration buffer applicable to mass spectrometric detection // J. of Chrom. A. 2004. V. 1051. P. 297–301.
12. J. Dugay, M.-C. Hennion. Evaluation of the performance of analytical procedures for the trace-level determination of aminotriazole in drinking waters // Trends in Anal. Chem. 1995. V. 14. P. 407–414.
13. Y. Sun, L. Luo, F. Wang, J. Li, Y. Cao. Ion-pairing high-performance liquid chromatography determination of amitrole in apple after solid-phase extraction and precolumn derivatization // Anal. and Bioanal. Chem. 2009. V. 395. P. 465–471.
14. С.Н. Сычев, В.А. Гаврилина Высокоэффективная жидкостная хроматография. – СПб.: Лань, 2013. 256 с.
15. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I.

Парофазный пробоотборник Agilent 7697A

Лучшее решение для анализа остаточных растворителей в фармацевтической промышленности

Для решения задачи контроля лекарственных препаратов Agilent предлагает серию статических парофазных пробоотборников 7697A (на 12 или 111 виал) в сочетании с различными системами газовой хроматографии.

Множество фармпредприятий в России успешно используют решения Agilent в своих лабораториях на протяжении долгих лет и отмечают качество, надежность и воспроизводимость полученных результатов.

Строгий контроль за содержанием остаточных растворителей описан в Государственной Фармакопее РФ:
Остаточные органические растворители – летучие растворители, которые используются или образуются на любой стадии производства фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ или лекарственного препарата и полностью не удаляются после завершения технологического процесса. Контролю на содержание органических растворителей подлежат фармацевтические субстанции и вспомогательные вещества, а также лекарственные препараты независимо от способа применения, если при их получении или очистке используются органические растворители, или они могут образовываться в процессе производства.
Определение содержания остаточных органических растворителей может быть осуществлено различными валидированными методиками. Наиболее часто для этих целей используется метод газовой хроматографии.
[Государственная Фармакопея РФ, XIII издание, том 1, с. 187-191]

Система газовой хромато-масс-спектрометрии Agilent 7890-5977 с парофазным пробоотборником 7697A

Перейдите по ссылкам ниже для ознакомления с методическими указаниями:

Анализ остаточных растворителей на ГХ с парофазным пробоотборником

Анализ остаточных растворителей на ГХ-МСД с парофазным пробоотборником

Pharmcontract group of companies

Ведущий химико-фармацевтический холдинг России

Телефон/факс: 8 800 700-96-46
(бесплатный звонок по России)

www.phct.ru info@phct.ru

Agilent
Trusted Answers

Дополнительная информация о Headspace 7697A:
www.agilent.com

This information is subject to change without notice

© Agilent Technologies, Inc. 2017

УДК 535.372; 615.453.6; 615.074

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНИБУТА В ТАБЛЕТИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

О.И. Лазовская[1], В.Н. Леонтьев[1]*, Е.В. Литвинова[2]

Резюме. Разработанная методика количественного определения фенибута в таблетированных лекарственных средствах основана на реакции дансилирования в щелочной среде (pH 9,18), приводящая к образованию флуоресцирующего производного с $\lambda_{исп}$=505 нм и $\lambda_{возб}$=335 нм. Подобраны оптимальные условия для полного протекания реакции: температура и время термостатирования (40 °С и 15 мин), мольное соотношение фенибута и дансилхлорида (1:1,4). Методика валидирована по показателям специфичности, линейности, прецизионности и правильности. График зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации фенибута в диапазоне 800–1200 нг/мл описывается уравнением регрессии y=0,1003x+1,4685 (*r*=0,9999). Предел обнаружения и предел количественного определения методики составили 29,55 и 89,54 нг/мл соответственно.

Ключевые слова: флуоресцентная спектроскопия, дансилхлорид, фенибут, таблетированное лекарственное средство, валидация.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SPECTROFLUORIMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF PHENIBUT IN TABLET DRUGS

O.I. Lazovskaya[1], V.N. Leontiev[1]*, E.V. Litvinova[2]

Abstract. The developed method for the quantitative determination of phenibut in tablet drugs is based on the dansylation reaction in an alkaline medium (pH 9.18). The reaction results in the formation of a fluorescent derivative with λ_{em}=505 nm and λ_{ex}=335 nm. Optimal conditions were selected to complete the reaction: temperature and time of thermostatting (40 °C and 15 min), molar ratio of phenibut and dansyl chloride (1:1.4). The method was validated in parameters of specificity, linearity, precision and accuracy. A plot of fluorescence intensity versus concentration of phenibut over the range of 800–1200 ng/ml is described by the regression equation y = 0.1003x+1.4685 (*r*=0.9999). The limit of detection and limit of quantification were 29.55 и 89.54 ng/ml respectively.

Keywords: fluorescence spectroscopy, dansyl chloride, phenibut, tablet drug, validation.

1 – Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет», 220006, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Свердлова, 13а

2 – РУП «Белмедпрепараты», 220007, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Фабрициуса, 30

1 – Belarusian State Technological University, 13a, Sverdlova str., Minsk, 220006, Republic of Belarus

2 – RUE «Belmedpreparaty», 30, Fabritsius str., Minsk, 220007, Republic of Belarus

* адресат для переписки:
E-mail: leontiev@belstu.by
Тел.: + 375 17 327 28 03

ВВЕДЕНИЕ

Фенибут (γ-амино-β-фенилмасляная кислота) – анксиолитическое и ноотропное средство, оказывающее транквилизирующее и психостимулирующее действие. Способствует снижению чувства тревоги, напряженности, беспокойства и страха, нормализует сон, повышает физическую и умственную работоспособность, улучшает память [1].

По химической структуре фенибут является фенильным производным нейромедиатора γ-аминомасляной кислоты [2]. В связи с наличием хирального β-углеродного атома у γ-амино-β-фенилмасляной кислоты существуют R- и S-энантиомеры. Субстанция фенибута, используемая для производства лекарственных средств, представляет собой рацемическую смесь. Причем R-изомер в 100 раз терапевтически более активен, чем S-изомер [3].

Известны следующие методы количественного определения фенибута в лекарственных средствах: прямое спектрофотометрическое измерение интенсивности поглощения электромагнитного излучения ароматическим хромофором при 257 нм [4], спектрофотометрический метод определения фенибута по продукту его реакции с нингидрином при 568 нм [5], метод капиллярного электрофореза [6], метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [7].

Самым высокочувствительным методом, позволяющим детектировать очень низкие концентрации веществ (10^{-6}–10^{-9} моль/л), является флуоресцентная спектроскопия [8]. Однако фенибут не имеет собственного флуорофора, поэто-

му его количественное определение возможно только по продуктам реакции с 5-(диметиламино)нафтален-1-сульфонилхлоридом (дансилхлорид) или 4-хлор-7-нитробензофуразаном. Эти соединения, взаимодействуя с первичными и вторичными аминами, образуют интенсивно флуоресцирующие продукты [9–12].

Цель данной работы – разработать и валидировать методику спектрофлуориметрического определения фенибута в таблетированных лекарственных средствах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Спектрофлуориметр FP-8500 (JASCO Corporation, Япония); жидкостной термостат Typ U8 (VEB MLW Prufgerate-Werk, Германия); аналитические весы AS 220/C/2/N (Radwag Wagi Elektroniczne, Польша).

Препараты и реактивы

Фенибута гидрохлорид (фенибут), субстанция-порошок, содержание фенибута 99,6% (Common Results Inc., Китай); лекарственное средство «Фенибут, таблетки 250 мг» (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь); дансилхлорид [х.ч., CAS № 605-65-2, Sigma Aldrich, США]; ацетон [х.ч., CAS № 67-64-1, Sigma Aldrich, США]; натрий тетраборат декагидрат [х.ч., CAS № 1303-96-4, Sigma Aldrich, США].

Испытуемый раствор фенибута готовили следующим образом. Из порошка 20 тщательно растертых таблеток отбирали 500 мг и растворяли в 50 мл дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, перемешивали в течение 10 мин и доводили объем тем же растворителем до метки. Полученную смесь фильтровали через двойной бумажный складчатый фильтр «синяя лента», отбрасывая первую порцию фильтрата. Затем 4 мл полученного фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем дистиллированной водой до метки и перемешивали. Отбирали 1 мл полученного раствора и помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем тем же растворителем до метки и перемешивали. Раствор использовали свежеприготовленным.

Растворы субстанции фенибута для построения калибровочного графика готовили следующим образом. Растворяли 250 мг субстанции фенибута в 50 мл дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводили объем тем же растворителем до метки и перемешивали. Аликвоту полученного раствора 4 мл помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем дистиллированной водой до метки и перемешивали. Затем, выполняя соответствующие разведения полученного раствора с концентрацией 0,1 мг/мл, готовили растворы субстанции фенибута с концентрациями 800, 900, 1000, 1100 и 1200 нг/мл.

Растворы дансилхлорида в ацетоне готовили исходя из 1,4-кратного мольного избытка реагента по отношению к фенибуту в испытуемом растворе, а при построении калибровочного графика – по отношению к фенибуту в соответствующих растворах субстанции. Растворы хранили в темном прохладном месте.

Боратный буферный раствор 0,01 М (pH 9,18) готовили, растворяя 3,81 г $Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$ дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 1000 мл [13].

Методика количественного определения

Испытуемый раствор фенибута объемом 1 мл помещали в мерную пробирку с притертой пробкой вместимостью 10 мл, добавляли 3 мл боратного буферного раствора, 1 мл раствора дансилхлорида и 1 мл ацетона. Быстро и тщательно перемешивали. Полученную смесь инкубировали в термостате при 40 °С в течение 15 мин. Затем измеряли интенсивность флуоресценции в максимуме полосы испускания при $\lambda_{исп}$=505 нм ($\lambda_{возб}$=335 нм) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см против холостой пробы. Содержание фенибута в лекарственном средстве рассчитывали по уравнению регрессии с учетом разведений.

Для построения калибровочного графика определяли интенсивность флуоресценции продукта реакции дансилирования фенибута в растворах субстанции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие фенибута с дансилхлоридом приводит к образованию флуоресцирующего производного по уравнению реакции (рисунок 1).

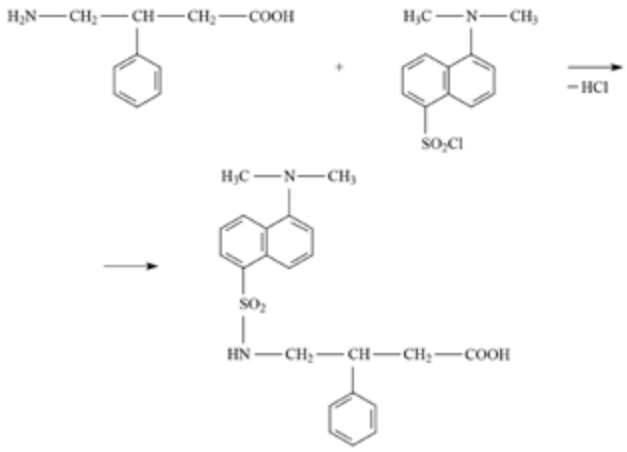


Рисунок 1. Уравнение реакции взаимодействия фенибута с дансилхлоридом

Спектры возбуждения и испускания флуоресцирующего продукта с максимумами при $\lambda_{возб}$=335 нм и при $\lambda_{исп}$=505 нм соответственно представлены на рисунке 2.

С целью определения условий полного протекания реакции было изучено влияние температуры и времени термостатирования, мольного соотношения фенибута и дансилхлорида.

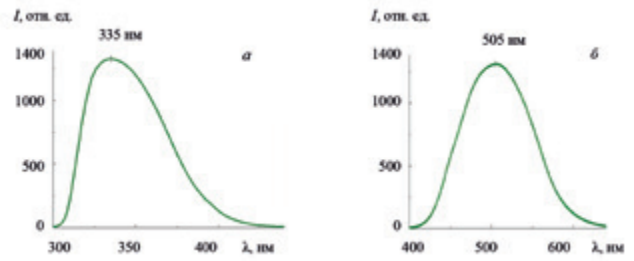


Рисунок 2. Спектры возбуждения (а) и испускания (б) флуоресцирующего продукта реакции фенибута с дансилхлоридом

Согласно [14] реакция дансилирования первичных и вторичных аминов протекает в водно-ацетоновой среде при pH 9–11, поэтому для исследований нами было выбрано значение pH в данном диапазоне: pH 9,18.

Влияние температуры и времени термостатирования на полноту реакции дансилирования изучали при 20–40 °С в течение 40 мин. Как видно из рисунка 3а, кинетические кривые при 20 и 25 °С не выходят на стационарную фазу, в то время как кинетические кривые при 30, 35 и 40 °С выходят на плато через 30, 20 и 10 мин соответственно. В связи с этим были выбраны наиболее оптимальные по температуре и рациональные по времени условия проведения реакции дансилирования: 40 °С и 15 мин.

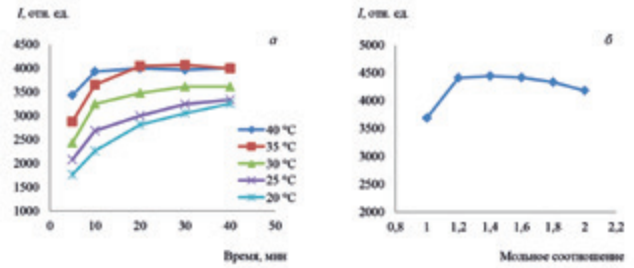


Рисунок 3. Влияние температуры и времени термостатирования (а), мольного соотношения реагентов (б) на реакцию дансилирования

Необходимое количество реагентов определяли, изменяя их мольное соотношение от 1:1 до 1:2, при этом 1,2–1,4-кратный избыток дансилхлорида являлся достаточным для того, чтобы весь фенибут вступил в реакцию (рисунок 3б). Для дальнейших исследований нами было выбрано мольное соотношение реагентов 1:1,4.

Валидацию разработанной методики количественного определения фенибута в лекарственном средстве с применением флуоресцентной спектроскопии проводили по следующим характеристикам: специфичность, линейность, прецизионность, правильность. Чтобы продемонстрировать высокую чувствительность методики, были исследованы такие валидационные параметры, как предел обнаружения и предел количественного определения [15]. Статистическую обработку полученных результатов выполняли с использованием программы Microsoft Office Excel 2010.

Специфичность методики определяли путем сравнения интенсивности флуоресценции испытуемого раствора фенибута и раствора плацебо при $\lambda_{исп}$=505 нм и $\lambda_{возб}$=335 нм. Установлено, что присутствие вспомогательных веществ не мешает определению фенибута в лекарственном средстве.

Для определения линейности использовали 5 растворов субстанции с концентрациями 80, 90, 100, 110 и 120% от номинального содержания фенибута, принятого за 100% (1000 нг/мл с учетом разведения). Установлено, что аналитическая область методики, находящаяся в диапазоне 800–1200 нг/мл, входит в пределы линейной зависимости и описывается уравнением регрессии y=0,1003x+1,4685 с коэффициентом корреляции *r*=0,9999; пересечение с осью Y составляет 1,44% отклика от номинальной концентрации (рисунок 4).

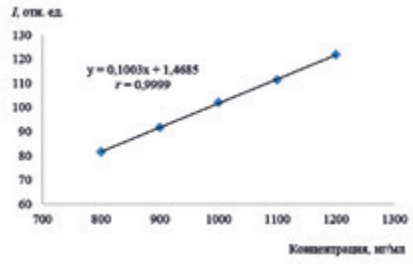


Рисунок 4. Калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации фенибута

Прецизионность методики оценивали на двух уровнях: повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость.

Статистическая обработка полученных результатов представлена в таблице 1.

Таблица 1.

Статистическая обработка результатов анализа (n=6, P=0,95)

Метрологический показатель	Прецизионность	
	Повторяемость	Внутрилабораторная воспроизводимость
Среднее значение, мг	251,10	252,07
Дисперсия S^2	11,32	12,54
Стандартное отклонение *S*	3,36	3,54
Относительное стандартное отклонение RSD, %	1,34	1,40
Доверительный интервал среднего значения Δ, мг	3,53	3,72
Относительная ошибка определения среднего значения, %	1,41	1,47

Разность наибольшего x_{max} и наименьшего x_{min} результатов испытаний не должна превышать значения предела повторяемости $L(P, m) \cdot S$, где $L(P, m)$ – фак-

тор, вычисленный по Пирсону при P=0,95 и m=2. Относительное стандартное отклонение RSD, полученное при оценке повторяемости, должно быть не более 2%, при оценке внутрилабораторной воспроизводимости – не более 3%.

Правильность методики определяли путем сравнения вычисленного значения критерия Стьюдента табличным $t_{таб}$:

$$t_{выч} = |\bar{x} - \mu| \sqrt{n}/S,$$

где μ – истинное значение содержания фенибута в лекарственном средстве.

Результаты валидационных испытаний методики количественного определения фенибута в лекарственном средстве представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты валидационных испытаний методики

Валидационный показатель и его критерий приемлемости	Полученное значение	Критическое значение
Специфичность: • компоненты плацебо не должны искажать результат	Соответствует	–
Линейность: • коэффициент корреляции r • пересечение с осью Y (%) отклика от номинальной концентрации	0,9999 1,44	≥0,99 ≤2
Повторяемость: • предел повторяемости: $(x_{max} - x_{min}) \leq 2,77 \cdot S$ • относительное стандартное отклонение RSD, %	8,1 1,34	≤9,32 ≤2
Внутрилабораторная воспроизводимость: • относительное стандартное отклонение RSD, %	1,40	≤3
Правильность: • критерий Стьюдента: $t_{выч} \leq t_{таб}$	0,8	≤ 2,57

Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) методики рассчитывали по следующим уравнениям:

$$ПО = 3,3 \cdot S_a/b,$$

$$ПКО = 10 \cdot S_a/b,$$

где S_a – стандартное отклонение свободного члена линейной зависимости; b – тангенс угла наклона калибровочной прямой.

Значения ПО и ПКО составили 29,55 нг/мл ($1,4 \cdot 10^{-7}$ моль/л) и 89,54 нг/мл ($4,2 \cdot 10^{-7}$ моль/л) соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена реакция взаимодействия фенибута с дансилхлоридом, приводящая к образованию флуоресцирующего производного с $\lambda_{исп}$=505 нм и $\lambda_{возб}$=335 нм. Подобраны оптимальные условия для полного протекания реакции дансилирования – температура и время термостатирования (40 °С и 15 мин), мольное соотношение фенибута и дансилхлорида (1:1,4).

Разработана методика спектрофлуориметрического определения фенибута в таблетированных лекарственных средствах. Проведены валидационные испытания, в ходе которых установлены специфичность, линейность, прецизионность и правильность методики. Показана высокая чувствительность предлагаемой методики: ПО=29,55 нг/мл, ПКО = 89,54 нг/мл.

Работа выполнена в рамках задания «Разработать научно-методические основы количественного определения действующих веществ в лекарственных средствах методами колебательной и флуоресцентной спектроскопии» подпрограммы «Фармакология и фармация» Государственной программы научных исследований «Химические технологии и материалы» на 2016–2020 годы (Республика Беларусь).

ЛИТЕРАТУРА

1. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2012. 1216 с.
2. I. Lapin. Phenibut (beta-phenyl-GABA): a tranquilizer and nootropic drug // CNS Drug Reviews. 2001. V. 7. № 3. P. 471–481.
3. M. Dambrova, L. Zvejniece, E. Liepinsh et al. Comparative pharmacological activity of optical isomers of phenibut // European Journal of Pharmacology. 2008. V. 583. № 1. P. 128–134.
4. L. Logoyda, D. Korobko, N. Zarivna et al. Development of methodology for the spectrophotometric determination of phenibut in drugs // 19th Dubai International Pharmaceuticals and Technologies Conference and Exhibition, March 10–12, 2014. – Dubai. 2014. P. 157.
5. Б.В. Боровский. Валидационная оценка спектрофотометрической методики количественного определения фенибута в таблетках по реакции с нингидрином // Научное обозрение. 2013. № 4. С. 222–225.
6. Ю.А. Полковникова, У.А. Тульская. Разработка методики количественного определения фенибута в микрокапсулах // Материалы V Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения», 6–7 декабря 2016 г. – Пятигорск. 2016. С. 66–68.
7. L. Logoyda, D. Korobko, N. Zarivna. Development of methodology for the determination of phenibut in medicines / 2nd Chemical Engineering and Chemical Technologies Conference, October 23–25, 2014. – Istanbul. 2014. P. 141–153.
8. Н.Л. Векшин. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров. – Пущино: Фотон-век, 2014. 188 с.
9. Z. Aydogmus, F. Sari, S.T. Ulu. Spectrofluorimetric determination of aliskiren in tablets and spiked human plasma through derivatization with dansyl chloride // Journal of Fluorescence. 2012. V. 22. № 2. P. 549–556.
10. E.S. Aktas, L. Ersoy, O. Sagirli. A new spectrofluorimetric method for the determination of lisinopril in tablets // IL Farmaco. 2003. V. 58. № 2. P. 165–168.
11. N. El-Enany, F. Belal, M. Rizk. Spectrofluorimetric determination of oxamniquine in dosage forms and spiked human plasma through derivatization with 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulphonyl chloride // Journal of Fluorescence. 2008. V. 18. № 2. P. 349–355.
12. G. Iskender, S. Atmaca. Spectrofluorimetric determination of nortriptyline hydrochloride with NBD-Cl in pharmaceutical dosage forms // Journal of Pharmacy of University of Marmara. 1986. V. 2. № 1. P. 69–76.
13. ГОСТ 8.135-2004. Государственная система обеспечения единства измерений. Стандарт-титры для приготовления буферных растворов – рабочих эталонов pH 2-го и 3-го разрядов. Технические и метрологические характеристики. Методы их определения. – М.: Стандартинформ, 2005. 12 с.
14. F. Garcia Sanchez, C. Cruces Blanco. Determination of the insecticide promecarb by fluorogenic labelling with dansyl chloride // Analyst. 1991. V. 116. № 8. P. 851–856.
15. А.А. Шеряков. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств. – Молодечно: Победа, 2012. 1220 с.

УДК 661.12; 661.143; 662.1/.4

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ТОКСИКАНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ РЕАГЕНТОВ

А.В. Соснов[1]*, М.И. Власов[1], С.В. Садовников[1], К.А. Руфанов[1], Ф.М. Семченко[1], А.А. Соснова[1], А.С. Радилов[2], Е.И. Савельева[2]

Резюме. Описано и систематизировано использование люминесцентных реагентов для определения токсикантов, включая отравляющие вещества, пестициды, продукты их деструкции и прекурсоры. На примере фосфорорганических токсикантов и продуктов их деструкции (ФОВ) показано, что чувствительность люминесцентных методов на основе органических комплексов лантаноидов (в первую очередь Eu^{3+}) находится на уровне наиболее совершенных инструментальных хроматографических и биохимических методов анализа с пределом определения на уровне единиц ppt, что позволяет определять супертоксиканты на уровне требований безопасности, время анализа – от нескольких секунд до 10 мин. Высокая селективность идентификации достигается за счет использования импринтированных материалов, модифицированных циклодекстринов, а также люминесцентных сенсорных матриц. Это является основой разработки новых технологий индикации следов токсикантов и продуктов их разложения, включая возможную технологию использования люминесцентных контрастных реагентов для увеличения чувствительности спектральных методов и дистанционного определения токсикантов. Показаны возможности разработки принципиально новых материалов для индивидуальных средств защиты, оборудования и мультифункциональных контактных поверхностей, обеспечивающих визуализацию и идентификацию токсикантов, а также каталитическую самодегазацию. Продемонстрирована взаимосвязь технологий обеспечения безопасности людей и окружающей среды на стыке аналитической химии, криминалистики, химической безопасности и фармацевтики.

Ключевые слова: люминесцентный реагент, лантаноид, токсикант, пестицид, продукт деструкции, предел определения, идентификация, химическая безопасность.

DETECTION OF TOXICANTS BASED ON LUMINESCENT REAGENTS

A.V. Sosnov[1]*, M.I. Vlasov[1], S.V. Sadovnikov[1], K.A. Rufanov[1], F.M. Semchenko[1], A.A. Sosnova[1], A.S. Radilov[2], E.I. Savelieva[2]

Abstract. Application of luminescent reagents for detection of toxicants including warfare agents, pesticides and their degradation products and precursors has been systematically reviewed. Methods of organophosphorus toxicants and products of their destruction (OP) detection based on lanthanide luminescent complexes (primarily Eu^{3+}) have the similar sensitivity as the most advanced instrumental chromatographic and biochemical assays with detection level in the range of several ppts that allows to determine supertoxicants at the safety requirements concentration levels and at appropriate analysis duration from a few seconds to 10 minutes. High selectivity of toxicants identification is achieved by means of imprinted materials, modified cyclodextrins and luminescent sensor arrays. This is the basis for development of new technologies for trace analysis of toxicants and their decomposition products, including possible technology of luminescent contrast agents' application to increase sensitivity of spectroscopic methods and remote determination of toxicants on the ground. Further possibilities to develop next generation materials for protective gear, equipment and multifunctional contact surfaces providing visualization and identification of toxicants and simultaneous catalytic self-decontamination is discussed. Relationship between technologies for improving safety and security at the crossroads of analytical chemistry of warfare agents, criminalistics, chemical safety and pharmaceutics has been demonstrated.

Keywords: luminescent reagent, lanthanide, warfare agent, pesticide, degradation product, detection limit, identification, chemical safety and security.

1 – ФГУП «Государственный завод медицинских препаратов» (ФГУП «ГосЗМП»), 111024, Россия, г. Москва, ш. Энтузиастов, д. 23

2 – ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» (ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России), 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, к. 93

1 – Federal State Unitary Enterprise «State Pharmaceutical Plant» (FSUE «GosZMP»), 23, sh. Entuziastov, Moscow, 111024, Russia

2 – Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical–Biological Agency of Russia, 93, v. Kuz'molovsky, Vsevolozhskii district, Leningrad region, 188663, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: andrey.sosnov@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время химическое оружие (ХО) относится к запрещенным видам вооружений, поэтому любые действия, противоречащие Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожении (Конвенция) [1], являются предметом международного расследования. Попытки расследования инцидентов с военным использованием токсичных веществ в Сирии [2] и других странах региона показали, что в настоящее время не существует оперативной, удобной и безопасной для персонала международных миссий по расследованию инцидентов технологии индикации и визуализации области распространения отравляющих веществ (ОВ) на местности и в усло-

виях урбанизированной (городской или любой плотно населенной) среды. Типовое расследование Организации по запрещению химического оружия (OPCW) происшествий с возможным применением ОВ основано на рутинном отборе и анализе большого количества проб с места инцидента и биомедицинских проб пострадавших с последующим их анализом [3, 4]. Расследование ставит целью установление факта наличия конкретного токсиканта и/или продуктов его трансформации, но не обеспечивает быстрого и надежного выяснения общей картины заражения и установления причин происшествия в целом. Поэтому разработка технологии оперативной визуализации общей картины и особенностей заражения, включая идентификацию токсиканта, оценку способа его применения и зон заражения, была бы востребована при расследовании случаев как военного, так и криминального использования ОВ, особенно в условиях вооруженных конфликтов, крайне затрудняющих планомерный отбор большого количества проб.

В настоящее время более 95% мировых запасов ОВ ликвидировано [5], процесс уничтожения объявленных запасов ХО заканчивается, поэтому наиболее вероятным сценарием можно считать именно диверсионное/террористическое использование ОВ, скрытно произведенное в относительно небольших количествах, а также возможные инциденты с затопленным и другим брошенным ОВ. Возможное количество токсикантов для проведения террористического акта может быть оценено как равное количеству обычно используемых для этого взрывчатых веществ. При этом результаты применения ОВ малопредсказуемы, поскольку опыт таких инцидентов ограничен, а результат зависит не только от факторов, связанных с поражающими свойствами использованного агента и его количеством. Так, например, синхронное использование в нескольких местах токийского метро достаточно мощного и эффективного в закрытых помещениях ОВ зарин в 1995 г. не привело к значительной летальности [6, 7], даже несмотря на выбор эффективного места для атаки и неготовность служб спасения. Количество наиболее эффективных нервно-паралитических фосфорорганических ОВ для применения в диверсионных и ограниченных военных целях на открытой местности должно быть значительным. Использование относительно небольших количеств мощных нервно-паралитических фосфорорганических ОВ, а также других типов ОВ с меньшей боевой эффективностью (например, удушающих, кожно-нарывных или психоактивных) в количестве до 1 тонны будет оказывать скорее демонстративный и психологический эффекты, но не будет иметь существенного военного значения. Это косвенно подтверждается положениями Конвенции о возможности производства до 1 т/год ОВ каждой из стран-участниц в целях, не противоречащих Конвенции [1].

В целом криминально используемые летальные ОВ могут быть весьма разнообразными. При кустарном производстве с большей степенью вероятности основные прекурсоры и вспомогательные вещества будут выбраны по двум основным критериям – известность в технической литературе и доступность реагентов. Вполне вероятно ожидать использования веществ, отличных от ранее производимых ОВ, что в свою очередь влечет увеличение разнообразия возможных прекурсоров. В качестве косвенного примера использования наиболее доступных прекурсоров в кустарных методах синтеза ОВ можно привести обнаружение уротропина во многих пробах зарина, примененного в Сирии [8, 9]. Данный доступный и недорогой амин, вероятно, используется в качестве акцептора фтористого водорода на последней стадии синтеза.

Разнообразие описанных в литературе высокотоксичных агентов, в первую очередь нервно-паралитических фосфорорганических веществ (ФОВ), ставит как задачу универсальной индикации (с последующей идентификацией) наиболее опасных агентов в случае их неожиданного применения, так и задачи, связанные с превентивным обнаружением подозрительных манипуляций с токсикантами, а также тщательным расследованием даже небольших инцидентов. Так, своевременное расследование инцидента в г. Мацумото в 1994 г. [10] могло бы предотвратить химическую атаку в токийском метро в 1995 г.

АКТУАЛЬНОСТЬ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ ИНДИКАЦИИ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ НА ОСНОВЕ КОНТРАСТНЫХ АГЕНТОВ

Технология быстрой индикации, визуализации области заражения и идентификации типа агентов (в первую очередь наиболее летальных, нервно-паралитических) весьма актуальна как для проведения защитных и следственных действий, так и для обнаружения запрещенных работ с контролируемыми токсичными веществами (производство, попытка модификации промышленных продуктов, перевозка, хранение, подготовка к использованию и др.), в том числе при проведении международных инспекций и расследований силами Fact Finding Mission (FFM) [9], а также национальных расследований террористических угроз и инцидентов.

Вывод OPCW, сделанный более чем через 10 дней после инцидента 4 апреля 2017 г. в Khan Shaykhun Сирийской Арабской Республики [9], не содержит однозначного подтверждения использования именно зарина, поскольку к этому моменту был выполнен анализ только биомедицинских проб пострадавших, которые содержали только продукты биодеструкции, предположительно, зарина. Отбор проб на месте инцидента OPCW FFM не проводился. Соответственно, не был и не мог быть определен способ применения токсиканта.

Этот пример свидетельствует о необходимости дополнительной разработки методологии оперативного установления факта использования ОВ и визуализации области заражения, пригодной для использования в районах боевых действий с учетом требований безопасности персонала FFM. Методология быстрой индикации и визуализации зоны заражения в идеале должна не только определять тип или подтип агента [например, нервно-паралитические ФОВ G или V-типа (рисунок 1)], но и позволять сделать выводы о техническом средстве его применения по характерным картинам заражения местности токсикантом и продуктами его деструкции. Характер и соотношение продуктов деструкции, например соотношение продуктов терморазпада и гидролиза, а также формы точечных областей заражения (в результате воздействия боеприпасов) позволят идентифицировать тип применения, а в идеале – вид и мощность боеприпасов.

Эпоха запасов штатных химических боеприпасов заканчивается [5], однако развитие технологий и доступность информации ведет как к расширению возможностей для создания более эффективных средств применения, так и к увеличению разнообразия выбора токсичных агентов. Серьезным прецедентом является сам факт нарушения Конвенции – производство и/или использование даже относительно небольших количеств ОВ, имеющее не столько военное значение, сколько политические последствия для страны или организации – нарушителя. Поэтому актуально совершенствование технологий, применимых при расследовании инцидентов с использованием ОВ и других токсикантов, в том числе и для выявления нарушителя Конвенции.

Описываемая в статье перспективная технология визуализации и идентификации на основе контрастных люминесцентных реагентов относится больше к области криминалистики, чем к области защиты от военного применения ОВ. Вероятно, поэтому данная технология не была ранее детально разработана как элемент системы химической защиты в период холодной войны, даже несмотря на наличие существенного научно-технического задела. С точки зрения международного сообщества, факты систематического скрытого диверсионного или террористического использования ОВ рассматриваются как вызов, что требует технологического решения в рамках верификационных задач Конвенции, поэтому в последние годы люминесцентная технология индикации и идентификации активно развивается, в том числе и в форме миниатюрных универсальных устройств первичной индикации ОВ.

Технология визуализации и идентификации типа токсичного агента также актуальна при создании улучшенных средств индивидуальной защиты, например перчаток, обладающих индикаторными свойствами. Это снизит вероятность неожиданного поражения (например, персонала служб быстрого реагирования, взрывотехников и других специалистов, действующих в условиях первичной неопределенности) при контакте с предметами и поверхностями, зараженными нелетучими и/или трудно определяемыми токсикантами с высокой трансдермальной токсичностью. Важным аспектом применения экспресс-индикации ОВ является предупреждение последствий инцидентов, связанных с контактом с затопленным или захороненным ХО. Следует отметить, что в передовых зарубежных исследованиях и разработках имеется тенденция к созданию средств индикации, встроенных в средства защиты, например перчатки, а также тенденция к интеграции средств индикации и/или средств защиты с элементами индикации со смартфоном [11].

Возможным техническим решением для перечисленных задач является разработка высокочувствительных и специфичных к целевым классам соединений (в первую очередь ФОВ) люминесцентных реагентов (контрастных агентов) и покрытий на их основе, изменяющих спектр и/или интенсивность поглощения и испускания излучения при взаимодействии с контролируемыми токсичными веществами и продуктами их деструкции. Наиболее актуальной представляется технология на основе комплексных и супрамолекулярных соединений лантаноидов, позволяющих оперативно определять ФОВ в концентрациях ниже опасных. Для оперативного анализа и визуализации значительной зоны заражения актуально создание бесконтактной технологии индикации, включающей распыление разбавленного раствора контрастного люминесцентного агента, последующую фиксацию и сравнительный анализ изображений поверхностей или местности в узких спектральных диапазонах. Некоторые подходы в рамках предлагаемой технологии на основе использования комплексов лантаноидов, вероятно, позволят создавать средства индивидуальной защиты и покрытия техники с возможностью самодегазации, то есть катализирующие разложение токсикантов.

ОПРЕДЕЛЯЕМЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ И ПРОДУКТЫ ИХ ДЕСТРУКЦИИ

Типы реально использованных и потенциальных ОВ подробно описаны в [12, 13]. Списки контролируемых соединений и их прекурсоры представлены в Приложении по химическим веществам Конвенции [1]. С одной стороны, списки ОВ Конвенции относятся только к токсикантам, когда-либо использованным, произведенным или разработанным для военного применения, но не охватывают всего химического разнообразия соединений, пригодных для массового поражения. С другой стороны, данные списки являются основным источником информации как для правоохранительных организаций, так, вероятно, и для потенциальных нарушителей Конвенции.

Большая часть фосфорорганических ОВ – ингибиторов ацетилхолинэстеразы (AChE), отобранных по критериям известности из литературы и просто-

ты получения, а также фосфорсодержащие продукты их гидролиза [12–16], биодеструкции и терморазложения [17] могут быть описаны двумя общими формулами, представленными на рисунке 1.

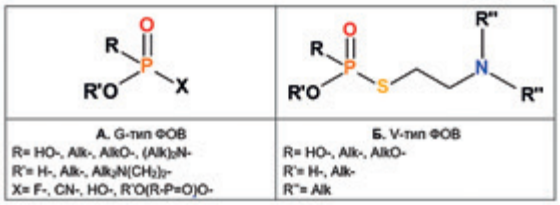


Рисунок 1. Обобщенные формулы фосфорорганических ОВ – мощных ингибиторов холинэстераз G- (A) и V- (B) типов и продуктов их распада [1, 12–17]

Различие между токсичными ФОВ G и V-типов состоит в наличии основного атома азота в составе «уходящей» группы. В случае веществ V-типа отщепляемая при ингибировании холинэстераз тиохолиновая группа обладает способностью ориентировать молекулу ингибитора в области активных центров холинэстераз [12, 13, 16]. При этом может несколько увеличиваться специфичность токсиканта к целевой синаптической ацетилхолинэстеразе (AChE) относительно других эстераз, выполняющих защитные функции. В раздел рисунка 1А (G-тип ФОВ) также включены токсиканты, которые в некоторых зарубежных публикациях относят к смешанному GV-подтипу ФОВ [12, 13, 16, 96], что не совсем обоснованно.

Проблему определения химических агентов и продуктов их деструкции можно проиллюстрировать на одном характерном ОВ, например зарине. Зарин не является наиболее мощным и эффективным с военной точки зрения, но в силу дешевизны, а также простоты получения и применения наиболее часто (по сравнению с другими реальными ОВ) использовался в различных инцидентах [12, 19]. Данное вещество производилось и использовалось как штатное ОВ в составе боеприпасов различных стран, а также как средство террора, с использованием весьма разнообразных технических средств, включая бинарные системы получения. Летучесть зарина (22 г/м^3 при 25 °C) приблизительно соответствует летучести воды, температура кипения 158 °C. Вещество достаточно термостабильно (температура начала разложения ~150 °C), неограниченно смешивается с водой, наиболее гидролитически нестабильно из всего ряда реально использованных фосфорорганических ОВ G-типа – фторангидридов кислот фосфора [20]. Зарин в отличие от других фосфорсодержащих ОВ крайне слабо сорбируется на различных материалах. Вещество эффективно в основном при ингаляционном воздействии. Физико-химические свойства зарина позволяют переводить его в парогазовое состояние любым известным простым способом – взрывом, термовозгонкой, выливом. При температуре выше 20 °C на открытой местности вещество быстро испаряется [18, 20]. Вероятно, именно нестойкость зарина на местности в условиях теплого климата делает его привлекательным для военного применения в урбанизированной среде: разрушения минимальны, дегазация не требуется, само вещество через несколько часов после применения определить сложно, что подтверждается результатами практических расследований последствий инцидентов, например в Khan Shaykhun 4.04.2017 [21, 22].

Разложение зарина при нагревании и гидролизе дает различные фосфорорганические вещества (рисунок 2):

- продукт термического разложения зарина – метилфторфосфонат [17, 23];
- продукт гидролиза и биодеградации – О-изопропилметилфосфонат [16, 24, 25].

Рисунок 2. Образование двух типов продуктов деструкции зарина

Оба фосфорорганических продукта деструкции – нелетучие гигроскопичные производные метилфосфоновой кислоты. По соотношению продуктов распада зарина можно различить методы его применения, даже при отсутствии фрагментов средства применения. Следует отметить, что результат анализа образцов, полученных OPCW FFM от «неправительственных организаций» с места инцидента в Khan Shaykhun 4.04.2017, не включает обнаружение продукта термического разложения зарина – метилфторфосфоната [22]. По одной из версий, в Khan Shaykhun имел место взрыв химического боеприпаса (или боеприпасов), что однако опровергается некоторыми исследованиями, например анализом Prof. Postol [26], который утверждает, что источник зарина был иной. При исследовании места взрыва отбор образцов должен был производиться сотрудниками OPCW FFM по утвержденной процедуре, однако FFM на месте инцидента не работала, поскольку это было опасно.

ОБОСНОВАНИЕ НЕОБХОДИМОГО УРОВНЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ТОКСИЧНЫХ ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ ИНЦИДЕНТОВ

Требования к чувствительности инструментальных методов анализа для задач химической безопасности обоснованы в публикациях [27–29]. Службы контроля нуждаются в аналитических методах, которые могут обнаруживать химические вещества вплоть

до уровней единиц на миллиард (ppb) для контроля отходов, чтобы соответствовать различным государственным нормам, касающимся классификации опасных отходов. Разработаны аналитические методы измерения содержания зарина (GB) и зомана (GD) на уровнях ppb, которые включают предварительное концентрирование относительно больших объемов (40–150 мкл) экстракта на картридже сорбента с последующей термической десорбцией и анализом с помощью газового хроматографа с пламенно-фотометрическим детектором. Сертифицированные пределы обнаружения (CRL), полученные с помощью этих методов, варьировались от 8,3 до 19 ppb для GB и от 1,8 до 5,3 ppb для GD. Пределы обнаружения (MDL), достигнутые с помощью этих методов, варьируются от 1,7 до 8,2 ppb для GB и от 0,39 до 1,2 ppb для GD. Таким образом, в качестве границы практической значимости технологии для задач контролирующих служб постулируется предел обнаружения ФОВ на уровне единиц ppb [27]. Для сравнения в таблице 1 приведены гигиенические нормативы РФ содержания фосфорорганических ОВ в объектах производственной и окружающей сред и отходах процессов уничтожения ХО [30].

ПДК ФОВ в почве районов размещения объектов уничтожения ХО находится на уровне 0,1 ppb. ПДК в материалах строительных конструкций составляет от 100 ppb. ПДК в отходах после сжигания составляет от 250 ppb. Данные показатели (от 0,1 до 250 ppb) можно принять в качестве нижней и верхней границы возможности идентификации химического объекта (в том числе и скрытого), производящего или использующего ФОВ.

ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ РЕАГЕНТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КОНТРАСТНЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ СЛЕДОВ ТОКСИКАНТОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ДЕСТРУКЦИИ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ

Использование контрастных агентов – эффективный метод увеличения чувствительности спектральных методов детектирования, а также идентификации химических и биологических соединений. Контрастные хемолюминесцентные агенты используются в криминалистике для визуализации места преступления

Таблица 1.

Гигиенические нормативы РФ содержания фосфорорганических ОВ в объектах производственной и окружающей сред и отходах [30]

Гигиенический норматив	Зарин	Зоман	Вещество типа Vx
ПДК в воздухе рабочей зоны, мг/м^3	$2{,}0\times10^{-5}$ ГН 2.2.5.2829-11	$1{,}0\times10^{-5}$ ГН 2.2.5.2728-10	$5{,}0\times10^{-6}$ ГН 2.2.5.1371-03
ПДК в воде водоемов, мг/л	$5{,}0\times10^{-5}$ ГН 2.1.5.2738-10	$5{,}0\times10^{-6}$ ГН 2.1.5. 2947-11	$2{,}0\times10^{-6}$ ГН 2.1.5.2036-05
ОБУВ в атмосферном воздухе, мг/м^3	$2{,}0\times10^{-7}$ ГН 2.1.6.2736-10	$1{,}0\times10^{-7}$ ГН 2.1.6.2737-10	$5{,}0\times10^{-8}$ ГН 2.1.6.2737-10
ПДК в атмосферном воздухе, мг/м^3	–	$5{,}0\times10^{-7}$ ГН 2.1.6.2157-07	–
ПДК в почве районов размещения объектов уничтожения ХО, мг/кг	$2{,}0\times10^{-4}$ ГН 2.1.7.2751-10	$1{,}0\times10^{-4}$ ГН 2.1.7.2751-10	$5{,}0\times10^{-5}$ ГН 2.1.7.2035-05
ПДУ загрязнения технологического оборудования, мг/дм^2	$1{,}0\times10^{-5}$ ГН 2.2.5.2945-11	$1{,}0\times10^{-6}$ ГН 2.2.5.2945-11	$2{,}0\times10^{-6}$ Рег. № 08-96
ПДУ загрязнения кожи, мг/см^2	$1{,}0\times10^{-6}$ ГН 2.2.5.2827-11	$1{,}0\times10^{-7}$ ГН 2.2.5.2827-11	$3{,}0\times10^{-8}$ ГН 2.2.5.2032-05
ПДУ загрязнения СИЗ, мг/см^2	$1{,}0\times10^{-6}$ ГН 2.2.5.2219-07	$1{,}0\times10^{-7}$ ГН 2.2.5.2219-07	$3{,}0\times10^{-8}$ ГН 2.2.5.2219-07
ПДУ загрязнения металлических отходов, мг/дм^2	$1{,}0\times10^{-4}$ ГН 2.1.7.2727-10	$1{,}0\times10^{-5}$ ГН 2.1.7.2727-10	–
ПДК в материалах строительных конструкций, мг/кг	0,4 ГН 2.1.7.2946-11	0,1 ГН 2.1.7.2946-11	–
ПДК в отходах после печей сжигания, мг/кг	0,5 на утверждении	0,25 на утверждении	–
АПВ в воздухе рабочей зоны, мг/м^3: 30 мин 1 час 2 часа 4 часа	$1{,}3\times10^{-1}$ $6{,}7\times10^{-2}$ $3{,}4\times10^{-2}$ $1{,}6\times10^{-2}$ ГН 2.2.5.2389-08	$9{,}6\times10^{-3}$ $4{,}7\times10^{-3}$ $3{,}3\times10^{-3}$ $1{,}5\times10^{-3}$ ГН 2.2.5.2388-08	$3{,}0\times10^{-4}$ $1{,}5\times10^{-4}$ $7{,}5\times10^{-5}$ $3{,}5\times10^{-5}$ ГН 2.2.5.2220-07
АПВ в атмосферном воздухе, мг/м^3: 1 час 4 часа 8 часов 24 часа	$8{,}0\times10^{-4}$ $2{,}0\times10^{-4}$ $1{,}0\times10^{-4}$ $3{,}3\times10^{-5}$ ГН 2.1.6.2658-10	$1{,}2\times10^{-4}$ $3{,}0\times10^{-5}$ $1{,}5\times10^{-5}$ $5{,}0\times10^{-6}$ ГН 2.1.6.2658-10	$1{,}6\times10^{-5}$ $4{,}1\times10^{-6}$ $2{,}0\times10^{-6}$ $6{,}6\times10^{-7}$ ГН 2.1.6.2658-10

на наличие, например крови и других биологических жидкостей [31]. Подход на основе увеличения чувствительности спектральных методов используется для анализа лекарств, в том числе и с применением микрочипов [32]. Использование контрастных агентов приводит к увеличению чувствительности методов и снижению предела обнаружения веществ в различных матрицах, включая биопробы. Разработаны технологии использования биолюминесцентных методов для детектирования токсичных веществ, включая нервно-паралитические вещества (ингибиторы AChE) из различных химических классов [33], имеются приборы для специфического детектирования химических и биологических агентов [34].

Описанные в литературе лабораторные химические люминесцентные методы обнаружения и идентификации ОВ обладают значительно более высокой чувствительностью по сравнению с близкими к ним по исполнению, широко распространенными колориметрическими методами, используемыми в составе штатных средств индикации, например индикаторными бумагами М8 и М9 и другими колориметрическими средствами индикации ОВ [35]. Общей полезной особенностью люминесцентных и колориметрических методов анализа является возможность использования бытовых устройств типа смартфона для сбора и обработки результатов тестирования [36], что в перспективе позволит автоматически обрабатывать данные, полученные с большого числа сенсорных устройств индивидуальных пользователей [37]. Продемонстрирована возможность использования бытового смартфона со вспышкой для определения наличия стабилизатора (вещества, обладающего слабой люминесценцией) в стандартном образце зарина, упакованного в пластиковую виалу со стеклянной вставкой, без вскрытия виалы [38]. В настоящее время на основе технологии SCiO Sensor производятся смартфоны с функцией спектрального анализа образцов Changhong H2 и смартфонсовместимый микроспектрометр – портативный сканер SCiO для бытового использования [39].

Люминесцентные реагенты, применимые для обнаружения ФОВ, можно разделить на два типа:

- вступающие в химическую реакцию с ФОВ с образованием новых соединений, проявляющих или резко усиливающих интенсивность люминесценции;
- образующие координационную (нековалентную) связь с ФОВ и/или продуктом его деструкции, что приводит как к усилению, так и к гашению люминесценции.

К первому типу относятся органические люминесцентные реагенты, например представленные на рисунках 3 и 4, обеспечивающие предел обнаружения ФОВ 100 ppb – 1 ppm, что примерно соответствует чувствительности колориметрических методов анализа.

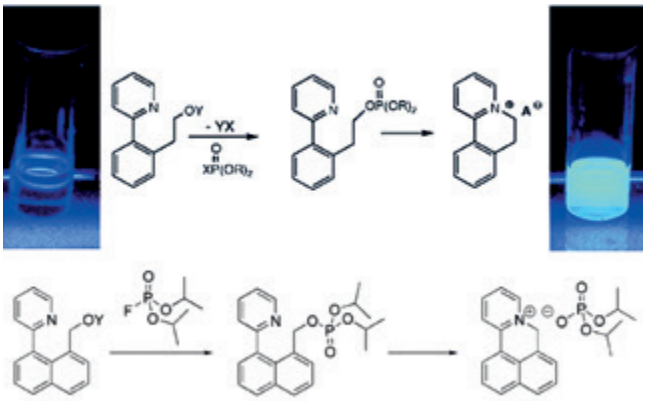


Рисунок 3. Функционирование простых молекулярных люминесцентных сенсоров при взаимодействии с O,O′-диизопропилфторфосфатом (ДФФ/DFP). Возникновение флуоресценции в течение 5 с после воздействия O,O′-диэтилхлорфосфата (DCP) и DFP [40]

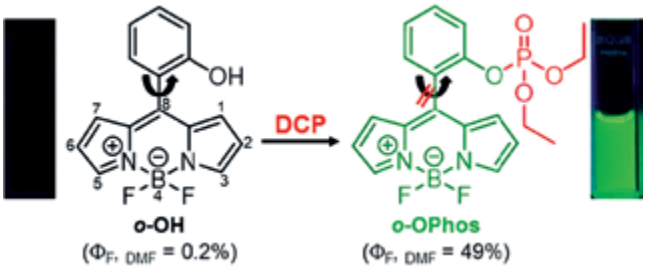


Рисунок 4. Молекулярный сенсор на основе блокирования вращения при взаимодействии с DCP [41]

Использование для анализа **люминофоров, образующих ковалентную связь с ФОВ**, имеет ряд существенных недостатков:

1) реагируют только на соединения, обладающие относительно высокой реакционной способностью, т.е. способностью отщеплять «уходящую» группу в процессе нуклеофильного замещения у атома фосфора, что обычно коррелирует с гидролитической нестабильностью ФОВ, тогда как высокая токсичность ФОВ обусловлена способностью к специфическому необратимому ингибированию фермента AChE в области нервных синапсов, что прямо не коррелирует со способностью к нуклеофильному замещению у атома фосфора;

2) чувствительность анализа на основе данных люминесцентных агентов находится на уровне лучших колориметрических методов определения, однако этого недостаточно для определения безопасных концентраций наиболее токсичных ФОВ;

3) метод, вероятно, непригоден для определения продуктов деструкции токсичных ФОВ, включая токсиканты типа EA 2192, т.е. S-[2-(N,N-диалкиламино)этил]метилтиофосфонаты и их аналоги, устойчивые к действию нуклеофильных агентов.

Наиболее практически интересными представителями люминесцентных соединений являются **реагенты, образующие нековалентные координационные связи с ФОВ, в основном органические комплексы катионов лантаноидов**. Их высокая чувствительность при обнаружении фосфорорганических веществ, содержащих фосфорильную группу P=O, например соединений общей формулы $R_3P=O$ (где R – органический заместитель, атом галогена, NC-, HO- и другие группы), обусловлена большим сродством связанных в комплекс ионов лантаноидов и ФОВ. Этот факт может быть использован разными способами.

Люминесценция координационных комплексов лантаноидов напрямую зависит от эффективности возбуждения под действием излучения УФ или видимой части спектра. Сами по себе ионы лантаноидов в незначительной степени способны поглощать излучение в этих диапазонах, проблема, однако, легко решается с привлечением групп, способных поглотить энергию и передать ее иону лантаноида. Такой эффект получил название «эффект антенны» (рисунок 5А). Он обеспечивает внутримолекулярный безызлучательный перенос энергии, поглощенной присутствующими, но не обязательно координированными непосредственно по иону лантаноида (рисунок 5Б) органическими или металлоорганическими (рисунок 5В) фрагментами [42–44].

Высокое сродство ионов лантаноидов к координационному нековалентному связыванию с фосфорильной группой (в том числе ионов лантаноидов, уже находящихся в координированном виде с фрагментами, обеспечивающими «эффект антенны»), обусловливает перестройку исходного люминесцентного комплекса, что в свою очередь приводит к существенному изменению его спектральных свойств (рисунок 6) при образовании стабильного конъюгата лантаноида с ФОВ. Это может быть зарегистрировано различными спектральными инструментальными методами. Показано, что высокой чувствительностью к нековалентному связыванию с фосфорильной группой обладают координационные и супрамолекулярные соединения на основе Eu^{3+} и Tb^{3+}, которые обладают люминесценцией в красной и зеленой областях соответственно [45], в том числе и в водных растворах [44, 46, 47].

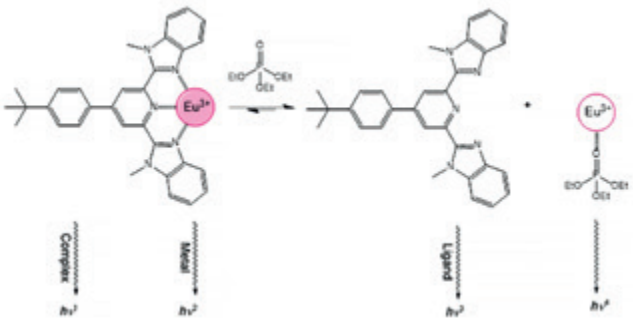


Рисунок 6. Иллюстрация изменения спектра испускания и снижения интенсивности люминесценции (в результате подавления «эффекта антенны») относительно исходного комплекса при связывании иона лантаноида (Eu^{3+}) с имитатором ОВ-триэтилфосфатом [48, модифицировано]

Высокая чувствительность спектра испускания комплексов лантаноидов к присутствию поглощающих ультрафиолетовое и видимое излучение лигандов с «эффектом антенны» позволяет использовать эти комплексы для анализа взаимодействия люминофоров с ОВ в условиях естественного освещения.

Материалы, содержащие коммерчески доступные комплексные соединения Eu^{3+}, например $Eu(TTA)_3Phen$ [49–50] на носителях, в том числе на силикагеле, позволяют детектировать пары диизопропилфторфосфата (ДФФ/DFP) в концентрации от 3 ppm [45]. Разработаны перспективные люминесцентные полимеры на основе комплексных соединений европия, например $Eu(TTA)_3Phen$ [51], BP-AN-MeBIP-Eu [52] и др. (рисунок 7).

Ионы лантаноидов, связанных в координационные комплексы, содержащие гидратные лиганды, обладают слабой люминесценцией, что связано со значительно более эффективным переносом энергии с иона лантаноида на эти лиганды с последующей диссипацией энергии за счет O-H-осцилляций на водородных связях.

Описано использование комплексов модифицированных циклодекстринов для определения фосфорорганических пестицидов, например комплекса пер-6-амино-бета-циклодекстрина с Eu^{3+} (Per-6-

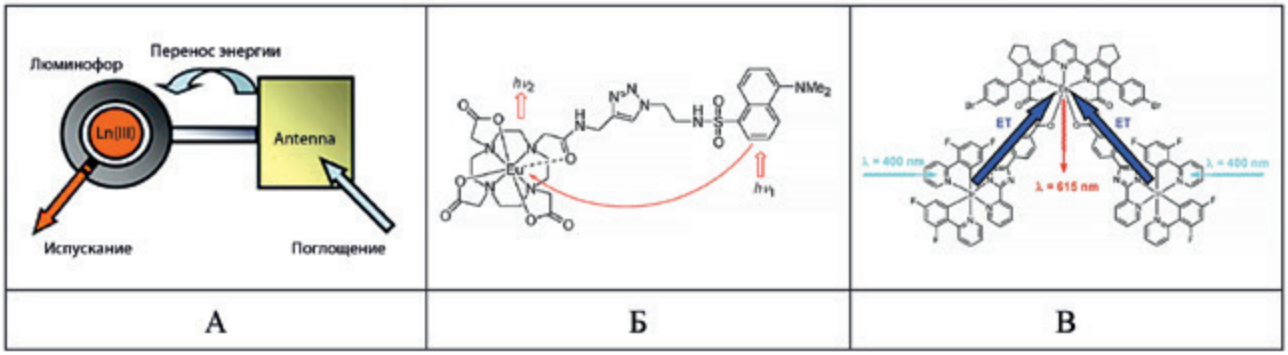


Рисунок. 5. Схема процесса непрямого переноса энергии в люминесцентных комплексах на основе катионов лантаноидов

Рисунок 7. Примеры люминесцентных реагентов на основе европия, используемых для обнаружения ФОВ в составе экспериментальных композиций на различных носителях

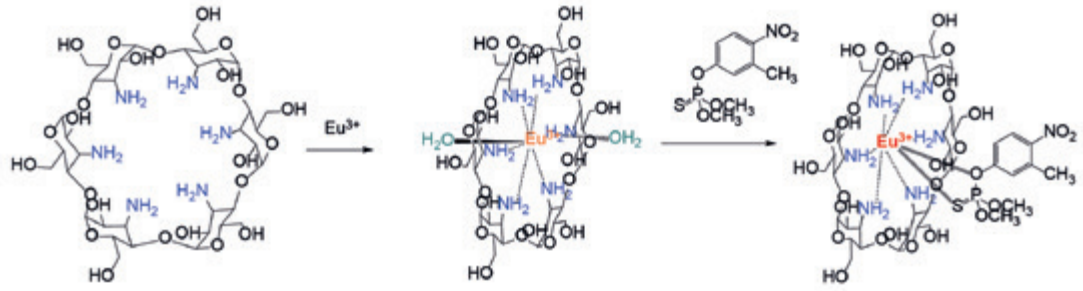


Рисунок 8. Механизм образования гидратированного комплекса Per-6-ABCD-Eu^{3+} и его взаимодействие с фенитротионом в воде, приводящее к резкому усилению люминесценции

ABCD-Eu^{3+}) для селективного определения (рисунок 8) пестицида фенитротиона с пределом обнаружения 10^{-12} М или ~300 ppq [53]. Фенитротион замещает гидратные лиганды, образуя стабильный координационный комплекс, обеспечивающий дополнительный перенос энергии за счет «эффекта антенны». Чувствительность данной тест-системы уменьшалась в ряду пестицидов фенитротион >>> хиналфос > метилпаратион > паратион > метилпараоксон > параоксон > фенхлофос > профенофос > малатион [53].

Различия одно- и двухцентрового молекулярного хелатирования ФОВ были продемонстрированы [54] при сравнительном спектральном исследовании продуктов связывания $[Ln(phen)_2(NO_3)_3(H_2O)_x]$, где phen=1,10-фенантролин и Ln=Eu^{3+}, x=3; Ln=Tb^{3+},

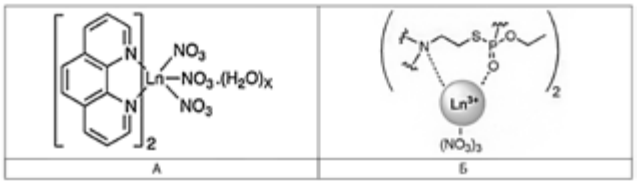


Рисунок 9. Взаимодействие гидратированного комплекса лантаноида и 1,10-фенантролина (А) с ФОВ вызывает гашение люминесценции при образовании именно двухцентрового связывания в комплексе ФОВ V-типа – лантаноид (Б) в результате подавления «эффекта антенны»

А. Комплекс лантаноидов и фенантролина: Ln=Eu^{3+}, x=3; Ln=Tb^{3+}, x=2
Б. Двухцентровое связывание ФОВ V-типа

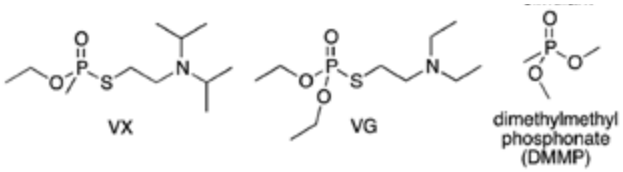


Рисунок 10. Вещества Vx и VG, а также имитатор O,O'-диметилметилфосфонат (DMMP), использованные для сравнительного изучения связывания ФОВ с комплексами лантаноидов и 1,10-фенантролина

x=2 (рисунок 9А), с ОВ Vx и VG, а также имитатором O,O-диметилметилфосфонатом (DMMP) – рисунок 10. В случае ФОВ V-типа (Vx и VG) взаимодействие с комплексами лантаноидов включает дополнительное нековалентное связывание с неподеленной парой электронов аминогруппы (рисунок 9Б), что эффективно хелатирует ион лантаноида и специфично гасит люминесценцию при связывании ФОВ V-типа в отличие от связывания DMMP [54].

Показана возможность использования комплексов типа $Eu(TTA)_3Phen$ на силикагеле для разложения ФОВ O,O-диизопропилфторфосфат (ДФФ/DFP) в присутствии молекул воды (рисунок 11).

Практически важным свойством комплексов на основе лантаноидов является возможность идентификации следов не только ОВ, но и продуктов их деструкции. Определение сорбированных на почве и на различных поверхностях продуктов деструкции ОВ через

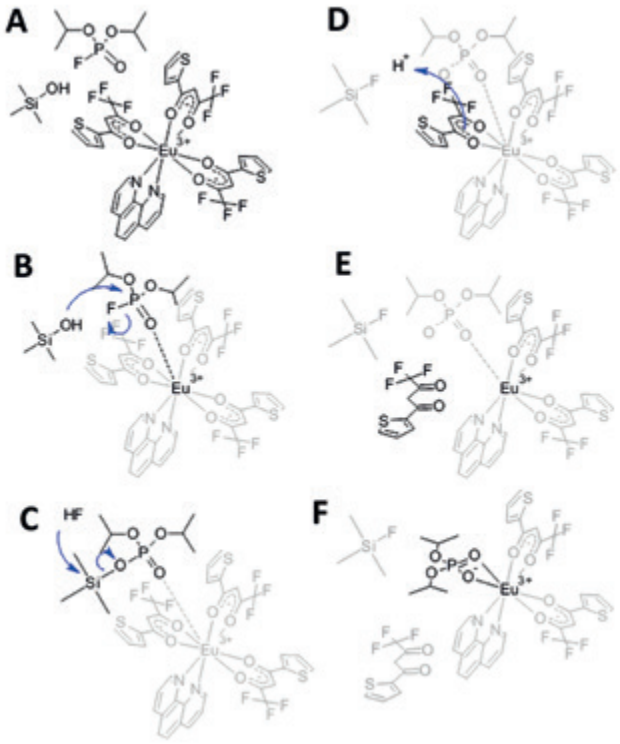


Рисунок 11. Быстрое каталитическое разложение ДФФ (DFP) в тонкой пленке диоксида кремния. Люминесцентный комплекс $Eu(TTA)_3Phen$ на основе катиона европия меняет свои спектральные свойства и катализирует разложение токсиканта [45]

несколько суток после заражения может являться ключевым преимуществом метода анализа на основе использования контрастного люминесцентного агента. Связывание продуктов деструкции фосфорсодержащих ОВ с некоторыми комплексами лантаноидов приводит к резкому увеличению интенсивности люминесценции. На рисунках 12 и 13 показаны схемы связывания стабильным гидратированным комплексом бета-дикетона и лантаноида (Eu^{3+}) продукта гидролиза зомана – пинаколилметилфосфоната (PMP), что приводит к изменению спектра и резкому увеличению интенсивности люминесценции (рисунок 14).

При образовании аддуктов с PMP наблюдается резкое увеличение интенсивности испускания. Пре-

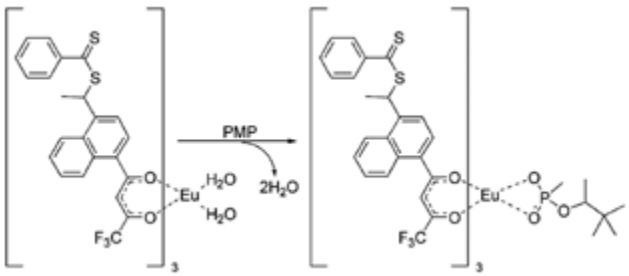


Рисунок 12. Схема связывания гидратированным комплексом бета-дикетона и лантаноида (Eu^{3+}) продукта гидролиза зомана (PMP), приводящего к изменению спектра и увеличению интенсивности люминесценции

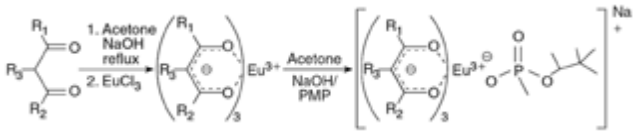


Рисунок 13. Синтез комплексов 1,3-дикетонов (R_1=4-винилфенил или 3,5-дивинилфенил, R_2=метил или фенил, R_3=H, аллил или 4-винилбензил) и их взаимодействие с продуктом гидролиза зомана PMP [55, 56]

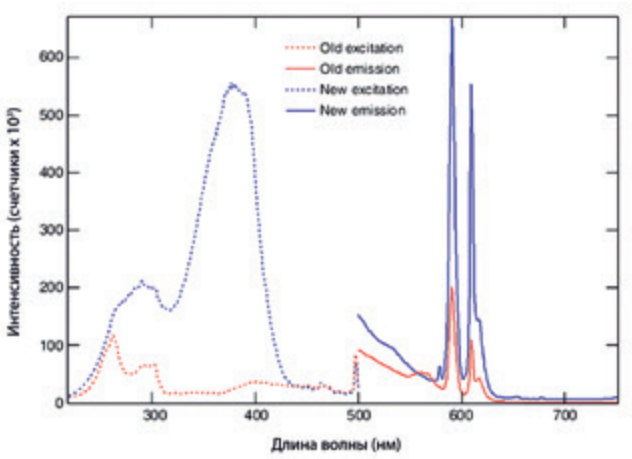


Рисунок 14. Сравнение спектров поглощения и испускания исходного комплекса (красным) и аддукта с PMP (синим) [55, 56]

дел обнаружения PMP оценивается на уровне единиц ppb [55, 56].

С целью увеличения селективности люминесцентной технологии идентификации, вплоть до идентификации отдельных соединений (как токсикантов, так и продуктов их деструкции), а также возможности ее использования в составе сенсорной технологии используется подход на основе растворимых, молекулярно импринтированных полимеров (МИП). С использованием полимеризации, в том числе и объемной реверсивной контролируемой радикальной полимеризации (Reversible addition-fragmentation chain transfer, RAFT-полимеризации), получены МИП с хорошей чувствительностью (пределы обнаружения ФОВ – в диапазоне единиц ppb) и очень высокой селективностью даже при определении соединений-аналогов. При этом полимеры должны обладать необходимой пористостью и кинетикой обмена. Растворимые МИП являются значительным шагом вперед в производстве «синтетических антител» – улучшенных химических датчиков или высокостабильных и эффективных люминесцентных пластиков [57]. Например, использование водорастворимого комплекса европия с метил-3,5-дивинилбензоатом (DVMB) – $Eu(DVMB)_3(NO_3)_3$ – в реакции с продуктом гидролиза зомана – PMP (рисунок 15) приводит к образованию $Eu(DVMB)_3PMP(NO_3)_2$, обладающего более интенсивным испусканием [58, 59].

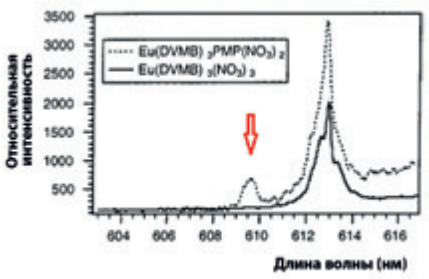


Рисунок 15. Различие спектров испускания исходного $Eu(DVMB)_3(NO_3)_3$ и образующегося в результате связывания PMP комплекса $Eu(DVMB)_3PMP(NO_3)_2$ [58]

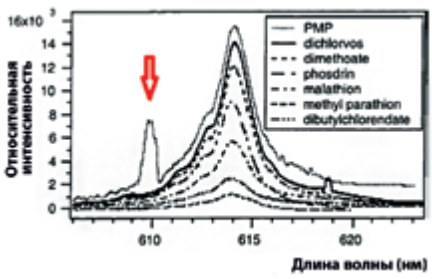


Рисунок 17. Сравнение спектров испускания PMP-селективного импринтированного материала после взаимодействия с PMP и различными пестицидами. Испускание в области 610 нм является уникальным именно для связывания PMP [58, 59]

Использование люминесцентного реагента $Eu(DVMB)_3(NO_3)_3$ с введением импринтирующего иона и полимеризацией (рисунок 16А) с последующим удалением импринтирующего иона азотной кислотой и промывкой от слабо связанных нитратов (рисунок 16Б) позволяет создать полимерный люминесцентный материал, высокоселективный к PMP [58, 59].

На рисунке 17 представлено сравнение спектров испускания импринтированного материала, связанного с PMP и фосфорсорганическими пестицидами, в том числе и рекомендованными для использования в качестве имитаторов ФОВ [15, 60]. Во всех случаях, кроме связывания PMP, испускание в области 610 нм отсутствует.

Использование данного импринтированного полимера позволяет определять PMP в воде на уровне 660 ppq для лабораторного инструментального исполнения анализа и на уровне 7 ppt для портативного приборного исполнения, то есть определяемая концентрация продукта гидролиза зомана в воде находится на уровне ~10^{-6} мг/л. Время анализа PMP в лабораторном и портативном исполнении составляет 8 мин [58, 59].

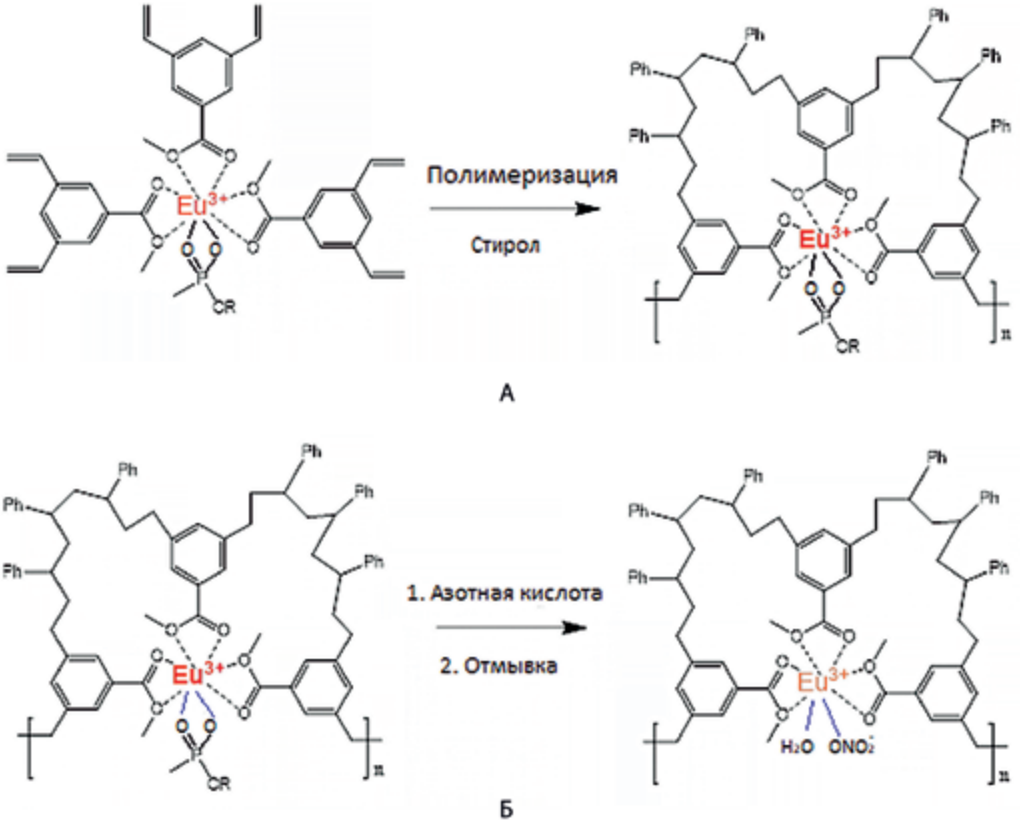


Рисунок 16. Стадии получения люминесцентного импринтированного полимерного материала, селективно изменяющего спектральные свойства при связывании с ионом PMP.

А. Получение импринтированного полимера
Б. Удаление импринтирующего иона (PMP) с получением PMP-селективного люминесцентного полимерного материала

Для сравнения:

- граница измерения массовой концентрации зомана в воде по ГХ-методике составляет $5x10^{-6}$ мг/л согласно МУК 4.1.011-2010 [61], время анализа составляет около часа;
- предел лабораторного обнаружения экологически безопасных концентраций наиболее токсичного ФОВ – вещества типа Vx (российского аналога вещества Vx) в воде биохимическим методом составляет 10^{-6} мг/л, т.е. 1 ppt согласно МУК 4.1.66-2004 [62]. Используемый биохимический метод позволяет определять только конкретное вещество, является чувствительным к примесям, долгим и весьма трудоемким.

Другим примером является определение наиболее мощных ФОВ – ингибиторов фермента бутирилхолинэстеразы (BuChE) *in vitro* биохимическим методом. Авторами данной статьи разработаны эффекторы клеточной холестеролэстеразы (регулятор динамики холестерина в живой клетке) [63], которые вследствие структурного подобия и способности мощно и селективно ингибировать BuChE *in vitro* и *in vivo* могут также использоваться в качестве малотоксичных имитаторов ФОВ G- и V-типов [64–67]. Показано, что данные вещества могут быть определены в воде методом Элмана с использованием BuChE на уровне 10^{-10} М [67], т.е. ~10^{-5} мг/л или 10 ppt.

Использование люминесцентных контрастных реагентов, вероятно, позволит не только упростить анализ, но и проводить прямое и быстрое определение некоторых типов нервно-паралитических ОВ, которые не могут быть обнаружены используемыми ферментативными и колориметрическими методами, например устойчивых к гидролизу слабых ингибиторов холинэстераз типа ЕА 2192 (крайне слабо ингибирующих холинэстеразы – биоловушки крови типа BuChE и PrChE, используемые для ферментативного анализа токсичных ФОВ) и их аналогов. Это высокотоксичные продукты деструкции веществ V-типа, образующиеся при значениях pH водного раствора 6–10, то есть близких к нейтральным [68]. Вещества относятся к V-типу ФОВ, имеют характерные особенности и самостоятельное значение, входят в список 1А Конвенции о запрещении ХО [1]. Определение веществ типа ЕА 2192 и монотиола (т.е. S-[2-(N,N-диалкиламино)этил] метилтиофосфонатов и их токсичных аналогов, рисунок 18) инструментальными хроматографическими методами требует сложной пробоподготовки, занимает несколько часов и трудно выполнимо в полевых условиях [69, 70]. Связывание данных веществ с комплексами лантаноидов не изучено. По аналогии с PMP можно предположить, что взаимодействие цвиттерионов – S-[2-(N,N-диалкиламино)этил]метилтиофосфонатов с комплексами лантаноидов и фенантролина будет приводить к усилению люминесценции в отличие от электронейтральных веществ V-типа (рисунок 9). В качестве имитаторов данных ФОВ можно предложить нетоксичное лекарственное вещество амифостин.

Таким образом, чувствительность люминесцентных методов обнаружения ФОВ и некоторых других веществ с использованием комплексов лантаноидов находится на уровне чувствительности современных лабораторных методов инструментального и ферментативного анализа (единицы ppt). При этом трудоемкость и время анализа существенно меньше.

Сравнение чувствительности люминесцентных методов с близкими по простоте использования и экспрессности колориметрическими методами детектирования ФОВ в виде изделий для полевого анализа показывает:

1. Чувствительность экспериментального лабораторного биохимического метода с использованием AChE и фотометрическим детектированием для определения веществ зарин и Vx составляет $5x10^{-9}$ М [71], то есть 10^{-4}–10^{-3} мг/л или 0,1–1 ppb. Это на два-три порядка ниже чувствительности люминесцентных методов на основе импринтированных полимеров [58, 59] и конъюгатов модифицированного циклодекстрина с лантаноидами [53], значительно более устойчивых к условиям окружающей среды, чем фермент AChE. Следует отметить, что ферментативные методы анализа весьма чувствительны к условиям эксперимента и наличию в анализируемой пробе посторонних соединений, например аминов.
2. Штатные колориметрические изделия НАТО [72], например химические индикаторные бумаги М8 и М9 (определения капель концентрированной композиции ОВ от 100 мкг) и М-272 Water Test Kit

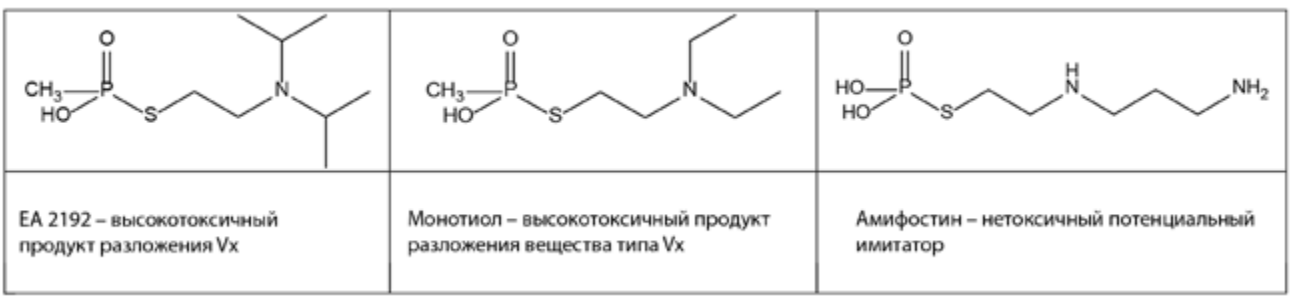


Рисунок 18. Высокотоксичные продукты разложения промышленных ФОВ V-типа и их возможный имитатор амифостин

с границей определения ФОВ в воде 0,02 мг/л, т.е. 20 ppb, обеспечивают чувствительность на 4 порядка ниже чувствительности люминесцентных изделий, т.е. принципиально уступают чувствительности люминесцентных методов.

Высокая селективность люминесцентных методов достигается за счет описанных выше технологий создания различных импринтированных материалов и использования модифицированных циклодекстринов [53], а также за счет использования различных люминесцентных сенсорных матриц [48, 73, 74]. Пример использования люминесцентных матриц для анализа фосфорсодержащих анионов (продукты гидролиза ОВ, гербицид и др.) представлен на рисунке 19.

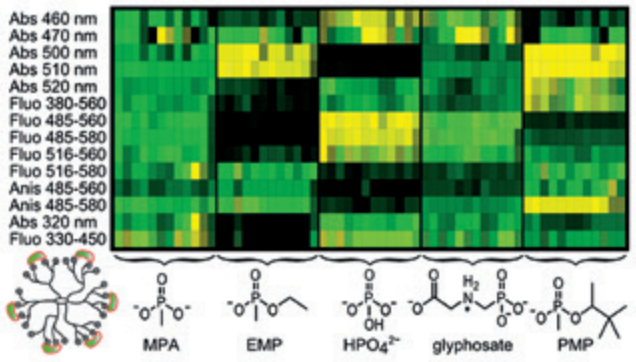


Рисунок 19. Люминесцентная матрица для анализа фосфорсодержащих анионов на основе коммерчески доступных люминофоров, привитых на дендример [74]

В работе [75] представлены тест-полоски, которые в сочетании с переносным флуоресцентным считывающим устройством или цифровой камерой могут быстро и выборочно обнаруживать химические боевые агенты табун, зарин и зоман и их имитаторы в газовой фазе. Полоски содержат зоны гибридного индикаторного материала, включающего флуоресцентный индикатор, ковалентно закрепленный в каналах пористых микрочастиц диоксида кремния. Реакция гашения флуоресценции обеспечивает обнаружение ОВ за несколько секунд.

В случае кустарных методов синтеза ОВ (как правило, на основе простого смешения реагентов и без последующей очистки) в образующейся смеси присутствуют существенные количества исходных реагентов и побочных продуктов синтеза. Полученные таким образом токсиканты менее стабильны и более разнообразны по составу, чем полученные промышленным способом. Колориметрические и ферментативные методы созданы для анализа штатных ОВ, входящих в состав боеприпасов промышленного изготовления. С одной стороны, данные методы не способны идентифицировать продукты распада ОВ (в том числе и высокотоксичные, например S-[2-(N,N-диалкиламино)этил] метилтиофосфонаты), с другой стороны, чувствительны к широкому спектру органических реагентов.

Мировые запасы ранее произведенных и детально изученных ОВ в ближайшие годы должны быть полностью ликвидированы, что делает маловероятным масштабное военное использование штатных ОВ, но не снимает проблему диверсионного, террористического и криминального использования токсикантов. Поэтому актуально создание средств индикации и идентификации, дополняющих или заменяющих (с увеличением чувствительности и расширением возможностей) простые и удобные колориметрические индикаторные средства, с учетом двух крайних прогнозов: расширения химического разнообразия используемых токсикантов и/или создания высокотехнологичных препаратов и изделий на основе супертоксикантов. С одной стороны, наблюдается тенденция использования весьма разнообразных ОВ кустарного изготовления в ходе локальных военных конфликтов, например в Сирии. С другой стороны, имеется угроза возможного создания высокотехнологичных препаратов и изделий с использованием наиболее эффективных ОВ и на основе современных фармтехнологий, в том числе затрудняющих определение ОВ. В качестве примера можно привести убийство Ким Чен Нама.

СРАВНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ОВ НА ПРИМЕРЕ ФОВ G-ТИПА

ФОВ G-типа, то есть токсичные ангидриды производных кислот фосфора, – мощные ингибиторы AChE (рисунок 1А), а также продукты их деструкции могут быть выбраны для сравнения чувствительности методов анализа, поскольку данный тип веществ наиболее часто использовался в различных инцидентах, универсален при применении и наиболее прост в получении. Чувствительность методов анализа ФОВ G-типа представлена в таблице 2. Следует отметить, что данные по исследованиям и разработкам с использованием реальных ОВ G-типа ограниченны, так как работы с подобными веществами могут проводиться только в специализированных лабораториях.

Из данных таблицы 2 видно, что среди практически используемых методов анализа ОВ лучшей чувствительностью обладают биохимические (ферментативные) методы (от 10 ppt), но анализ может быть выполнен только в лаборатории. Чувствительность более удобных для полевых условий и более быстрых ферментативно-колориметрических методов анализа (то есть биохимических методов анализа с использованием различных холинэстераз с фотометрическим детектированием) примерно на 2–3 порядка ниже (1–10 ppb).

Зарубежные промышленные люминесцентные сенсоры обеспечивают предел обнаружения фосфорорганических пестицидов до 1 ppm [35]. При этом описан пример экспериментального сенсора для определения фосфорорганических пестицидов с уникальным пределом детектирования ~300 ppq [53].

Таблица 2.

Сравнительная оценка чувствительности методов анализа ФОВ G-типа

Метод анализа ФОВ	Чувствительность метода анализа для ФОВ G-типа	Возможность определения продуктов деструкции ФОВ	Ссылки
Химические колориметрические методы анализа	~100 ppb	Не определяются	72
Биохимические (ферментативные) портативные колориметрические методы и средства анализа	1–10 ppb	Не определяются	71
Лабораторные ферментативные методы анализа мощных ингибиторов холинэстераз (требуется пробоподготовка)	~10 ppt	Не определяются	62, 66, 67, 76
Портативный люминесцентный анализ, в том числе на основе селективных молекулярно импринтированных полимеров	от 7 ppt	Определяются	58, 59
Лабораторный люминесцентный анализ, в том числе на основе селективных молекулярно импринтированных полимеров	от 0,7 ppt	Определяются	58, 59, 77–79
Портативные носимые газоанализаторы и хроматографы	1–10 ppb	Не определяются	80–82
Стационарные лабораторные ГХ/ПФД-, ГХ/МС-методы для контроля ОВ и отходов (требуется пробоподготовка)	100–500 ppt 1 ppb (для продуктов деструкции)	Для определения продуктов деструкции требуется химическая модификация пробы	27–29, 61, 83
Стационарные лабораторные LC/MS-методы для определения ФОВ и продуктов деструкции (требуется пробоподготовка)	1 ppb	Определяются	84

Использование предлагаемых к разработке люминесцентных соединений на основе лантаноидов, например производных европия на полимерной или циклодекстриновой матрицах, позволяет добиться предела обнаружения органофосфатов от 1 ppt до десятков ppb в зависимости от исполнения. В работе [79] определен предел обнаружения ОВ G-типа с использованием комплексов различных лантаноидов (Dy^{III}, Tb^{III} и Eu^{III}) на уровне 6 ppb.

Минимальные значения предела обнаружения ФОВ люминесцентными методами находятся на уровне сотен ppq (сотни на квадриллион или ~10^{-7} мг/л). Это превышает чувствительность подавляющего большинства методов детектирования ОВ, используемых в составе полевых инструментальных средств и методов обнаружения и идентификации ОВ. Это является предпосылкой создания на основе люминесцентных методов анализа еще более чувствительных методик и изделий. Для сравнения на уровне приборов наиболее низким пределом обнаружения летучих ФОВ G-типа (на уровне единиц ppb) обладают носимые детекторы APD 2000 (Advanced Portable chemical agent Detector) [80], AP2C(e) Vapor and Liquid Agent Detector, APACC Chemical Control Alarm Portable Apparatus, ppbRae [81], а также переносные газовые хроматографы Hapsite®, Voyager Portable Gas Chromatograph, CMS200 [81, 82].

Наиболее высокой чувствительностью к летучим ФОВ обладает метод газовой хроматографии с пламенно-фотометрическим детектором (ГХ/ПФД) – ~100 ppt [27–29, 61, 83]. Чувствительность ГХ/МС-методов детектирования на один-два порядка ниже, но может быть увеличена за счет усложнения и удорожания оборудования. Увеличение чувствительности хроматографических методов в целом достигается за счет концентрирования проб, что требует извлечения вещества из матрицы и проведения пробоподготовки. Определение продуктов деструкции ФОВ ГХ-методами возможно, но требует химической модификации анализируемой пробы [27–29]. Стационарные лабораторные ВЭЖХ/МС-методы для определения ФОВ и продуктов их деструкции демонстрируют чувствительность на уровне единиц ppb [84].

КАТАЛИЗ НУКЛЕОФИЛЬНОГО ЗАМЕЩЕНИЯ У АТОМА ФОСФОРА ЛАНТАНОИДАМИ

Каталитические количества соединений лантаноидов способны значительно увеличивать скорость реакции нуклеофильного замещения у атома фосфора для фосфатов, фосфонатов, тиолофых эфиров фосфорной и фосфоновой кислот. Использование в качестве катализатора трифторметилсульфоната лантана ($La(OTf)_3$, где OTf=–$OS(O)_2CF_3$), приводит к мощному увеличению скорости метанолиза ФОВ [85]. Изучение каталитической активности комплекса трехвалентного лантана с 1,5,9-триазациклододеканом демонстрирует увеличение скорости метанолиза O,O′-диэтил-S-(4-нитро)фенилтиофосфата почти на 7 порядков. При использовании метоксипроизводных лантаноидов (La^{3+}, Sm^{3+}, Eu^{3+}, Yb^{3+}) наблюдается ускорение метанолиза более чем на 4 порядка [86]. Производные лантана общей формулы $La_2(OCH_3)x$ были подробно изучены в качестве средств деконтаминации ФОВ [85–92]. Предполагаемый каталитический механизм метанолиза представлен на рисунке 20.

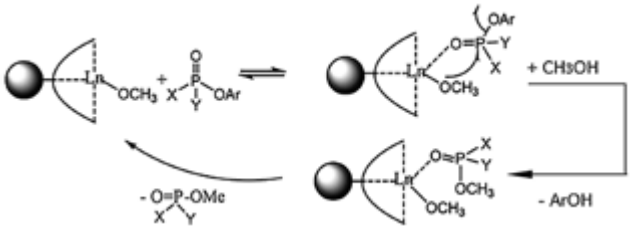


Рисунок 20. Возможный механизм лантаноидкатализируемого метанолиза ФОВ [86, модифицировано]

Недостатком использования алкоголятов лантана в качестве катализатора разложения ФОВ (кроме их высокой стоимости) является необходимость применения безводных спиртов в качестве нуклеофилов. Использование комплексных соединений катионов лантаноидов в качестве катализатора позволяет использовать воду в качестве нуклеофильного дегазирующего агента [45].

Имеются отечественные дегазирующие средства ИПП-10 и ИПП-11 на основе разработанной в СССР в начале 1980-х годов водной полидегазирующей рецептуры «Ланглик» ИПП (ТУ-6-02-3-287-84) на основе нитрата лантана [93]. Рецептура люминесцентными свойствами не обладает, количественных данных по ее каталитической активности в отношении ОВ в литературе нет. Показано, что рецептура «Ланглик» обладает бактерицидным действием и может быть использована для лечения инфицированных ран [94, 95].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Люминесцентные реагенты и материалы на их основе могут быть использованы для создания контрастных агентов, резко увеличивающих чувствительность спектральных методов анализа токсикантов. Наиболее выраженный эффект дает использование комплексных соединений лантаноидов, в первую очередь соединений Eu^{3+}, для анализа фосфорорганических средств защиты растений и токсикантов, продуктов их деструкции и прекурсоров. Это является основой разработки нового поколения средств индикации наиболее опасных ОВ G- и V-типов [96] и продуктов их разложения.

Предел обнаружения наиболее опасных фосфорорганических токсикантов нервно-паралитического действия и продуктов их деструкции с использованием люминесцентных реагентов находится на уровне наиболее совершенных инструментальных лабораторных хроматографических и биохимических методов, то есть единиц ppt. Минимальные значения предела обнаружения ФОВ люминесцентными методами находятся на уровне сотен ppq (~10^{-7} мг/л). Таким образом, предел чувствительности люминесцентных методов позволяет проводить индикацию ФОВ на уровне требований безопасности. Технология позволяет создавать миниатюрные универсальные сигнализаторы и анализаторы. Основные текущие зарубежные разработки в данном направлении ориентированы на создание портативных средств индикации и идентификации ОВ, например модернизация химического многоканального детектора Black Canary™ для использования люминесцентных картриджей [96].

Импринтированные полимерные материалы и модифицированные циклодекстрины на основе лантаноидов (главным образом Eu^{3+}), а также использование люминесцентных сенсорных матриц на основе различных соединений лантаноидов обеспечивают сочетание высокой чувствительности и высокой селективности обнаружения ФОВ. Модификации технологии позволяют идентифицировать подтипы ФОВ токсикантов (как известные, так и вероятные) и пестицидов, а также продукты их деструкции. Возможна разработка тест-систем, различающих близкие структурные аналоги ФОВ. Время проведения анализов с использованием люминесцентных реагентов – от нескольких секунд до 10 мин.

На основе описанных разработок возможно создание технологии обнаружения и визуализации зоны заражения ОВ путем сравнительного спектрального анализа различных поверхностей и матриц, предварительно обработанных раствором контрастного люминесцентного реагента. Использование контрастных реагентов возможно в процессе расследования происшествий с использованием токсичных агентов в военных и криминальных целях, обнаружения незаконного производства и других скрытых манипуляций с токсикантами и прекурсорами, в том числе для разработки технологии дистанционного обнаружения и визуализации области распространения токсикантов в зонах катастроф и военных конфликтов без взятия проб, что безопасно и удобно для проводящего расследование персонала.

Возможна разработка принципиально новых материалов покрытий средств защиты людей, оборудования, а также мультифункциональных контактных поверхностей в урбанизированной среде, способных не только к визуализации и идентификации токсикантов, но и к каталитической самодегазации.

Подход на основе контрастных люминесцентных реагентов позволит создать комплекс изделий и технологий для обеспечения химической безопасности в условиях урбанизированной среды с минимальным участием персонала, в том числе простые тест-системы и люминесцентные сенсорные матрицы, совместимые с бытовыми устройствами анализа, обработки, визуализации и передачи информации типа смартфонов. Аналитические и криминалистические технологии с использованием смартфонов открывают новые возможности для мобильной и портативной индикации [97, 98], обеспечивают оперативное получение информации и оценку чрезвычайных ситуаций в реальном времени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожении. Официальный документ ООН и ОПСW. Редакция от 29.07.2005. URL: https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/CWC/CWC_ru.pdf (дата обращения 04.09.2017).
2. Timeline of Syrian Chemical Weapons Activity, 2012-2017. ACA 2017. URL: https://www.armscontrol.org/factsheets/Timeline-of-Syrian-Chemical-Weapons-Activity (дата обращения 04.09.2017).
3. E. Dearing, C. Flood. Sampling and analysis relevant to the implementation of the chemical weapons convention. 2015. OPCW Laboratory. – Rijswijk, The Netherlands: OPCW Laboratory. 2015. URL: https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/Science_Technology/Sampling_and_Analysis_-_LAB.pdf (дата обращения 04.09.2017).
4. N. Grigoriu, G. Epure, R. Ginghina, D. Mosteanu. An overview of the opcw's programme for biomedical samples analysis // International conference knowledge-based organization. Conference proceedings. 2015. V. XXI, № 3. URL: https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/kbo.2015.21.issue-3/kbo-2015-0138/kbo-2015-0138.pdf (дата обращения 04.09.2017).
5. OPCW AT 20. 20th anniversary of the entry into force of the Chemical Weapons Convention. URL: https://20years.opcw.org/ (дата обращения 09.06.2017).
6. A.T. Tu. Overview of Sarin Terrorist Attacks in Japan // ACS Symposium Series. 1999. V. 745. P. 304–317.
7. Chemical terrorism: horrors in Tokyo subway and Matsumoto City / Ed. by A.T. Tu. – Fort Collins: Alaken, 2002. 240 p.
8. OPCW Fact-Finding Mission Reports. Syria and the OPCW. OPCW. URL: https://www.opcw.org/special-sections/syria/fact-finding-mission-reports/ (дата обращения 04.09.2017).
9. OPCW Director-General Shares Incontrovertible Laboratory Results Concluding Exposure to Sarin. OPCW. 19.04.2017. URL: https://www.opcw.org/news/article/opcw-director-general-shares-incontrovertible-laboratory-results-concluding-exposure-to-sarin/ (дата обращения 04.09.2017).
10. A.T. Tu. Toxicological and chemical aspects of sarin terrorism in japan in 1994 and 1995 // Toxin Reviews. 2007. V. 26. P. 231–274.
11. R.K. Mishra, L.J. Hubble, A. Martín et. al. Wearable Flexible and Stretchable Glove Biosensor for On-Site Detection of Organophosphorus Chemical Threats // ACS Sens. 2017. V. 2(4). P. 553–561.
12. Handbook of toxicology of chemical warfare agents. 2nd ed. by R.C. Gupta. – Elsevier. 2015. 1184 p.
13. J. Bajgar. Laboratory Diagnosis of Organophosphates/Nerve Agent Poisoning // Klin. Biochem. Metab. 2005. V. 13 (34). № 1. P. 40–47.
14. Chemical Warfare Agents. Chemistry, Pharmacology, Toxicology, and Therapeutics / Ed. by J.A. Romano, Jr. – NY: CRC Press. Taylor & Francis Group, 2008. 723 p.
15. Y.J. Jang, K. Kim, O.G. Tsay, D.A. Atwood, D.G. Churchill. Destruction and Detection of Chemical Warfare Agents // Chem. Rev. 2015. V. 115(24). P. 1–76.
16. E. Halámek, Z. Kobliha. Potenciální bojové chemické látky // Chem. Listy. 2011. V. 105. P. 323-333.
17. M.D. Crenshaw. Methylphosphonofluoridic Acid A Thermal Degradation Product Of Some Nerve Agents. Report. 2002. Battelle Memorial Institute Columbus. Ohio. URL: www.dtic.mil/get-tr-doc/pdf?AD=ADA436023 (дата обращения 04.09.2017).
18. T.E. McKone, B.M. Huey, E. Downing, L.M. Duffy. Editors Strategies to Protect the Health of Deployed U.S. Forces. Detecting, Characterizing, and Documenting Exposures. – Washington, D.C.: National academy press, 2000. 272 p.
19. Sarin // Wikipedia. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Sarin (дата обращения 04.09.2017).
20. Sarin. NIOSH emergency response card. URL: http://cs.erplan.net/WMD/ChemFiles/Links/ChemicalAgents/Niosh/SarinNiosh.htm (дата обращения 04.09.2017).
21. Note by the technical secretariat. Status update of the opcw fact-finding mission in Syria regarding a reported incident in Khan Shaykhun, 4 April 2017. OPCW Technical Secretariat. S/1497/2017. 12.04.2017.
22. Note by the technical secretariat report of the OPCW Fact-finding mission in Syria regarding an alleged incident in Khan Shaykhun, Syrian Arab Republic. April 2017. OPCW Technical Secretariat. S/1510/2017. 29.06.2017.
23. R.W. Baier, S.W. Weller. Catalytic and Thermal Decomposition of Isopropyl Methyl Fluorophosphonate // I&EC. Proc. Des. Develop. 1967. V. 6. P. 380–385.
24. L.L. Swaim, R.C. Johnson, Y. Zhou, C. Sandlin, J.R. Barr. Quantification of Organophosphorus Nerve Agent Metabolites Using a Reduced-Volume, High-Throughput Sample Processing Format and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry // Journal of Analytical Toxicology. 2008. V. 32(9). P. 774-777.
25. E.I. Hamelin, N.D. Schulze, R.L. Shaner, R.M. Coleman, R.J. Lawrence, B.S. Crow, E.M. Jakubowski, R.C. Johnson. Quantitation of five organophosphorus nerve agent metabolites in serum using hydrophilic interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry // Anal Bioanal Chem. 2014. V. 406(21). P. 5195–5202.
26. T. Postol. Khan Sheikhoun, Syria: The Nerve Agent Attack that Did Not Occur. Analysis of the Times and Locations of Critical Events in the Alleged Nerve Agent Attack at 7 AM on April 4, 2017 in Khan Sheikhoun, Syria. Global Research. 19.04.2017. URL: http://www.globalresearch.ca/khan-sheikhoun-syria-the-nerve-agent-attack-that-did-not-occur/5585818; http://www.ibtimes.co.uk/mit-expert-claims-latest-chemical-weapons-attack-syria-was-staged-1617267 (дата обращения 04.09.2017).
27. H.J. O'Neill, K.L. Brubaker, J.F. Schneider, L.F. Sytsma, T.A. Kimmell. Development of an analytical methodology for sarin (GB) and soman (GD) in various military-related wastes // J Chromatogr A. 2002. V. 12(962(1-2)). P. 183–95.
28. M. Hamel, J. Hamoniaux, L. Rocha, S. Normand. Ppb detection of Sarin surrogate in liquid solutions // Proc. of SPIE. 2013.V. 8710. USACHPPM Technical Guide 230: Chemical Exposure Guidelines for Deployed Military Personnel. 2006. URL: http://chppm (дата обращения 04.09.2017).
29. R.A. Potyrailo, C. Surman, N. Nagraj et. al. Materials and Transducers Toward Selective Wireless Gas. Sensing // Chem. Rev. 2011. V. 111. P. 7315–7354.
30. Н.Г. Британов. Гигиенические аспекты перепрофилирования или ликвидации объектов по хранению и уничтожению химического оружия: дисс. ... д.м.н. – Волгоград. 2014. URL: http://www.volgmed.ru/uploads/dsovet/thesis/6-605-britanov_nikolaj_grigorevich.pdf (дата обращения 04.09.2017).
31. P. Khan, D. Idrees, M.A. Moxley. Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses // Biochem Biotechnol. 2014. V. 173(2). P. 333–355.
32. Y.S. Suh, M. Kamruzzaman, A.-M. Alam. Chemiluminescence determination of moxifloxacin in pharmaceutical and biological samples based on its enhancing effect of the luminol–ferricyanide system using a microfluidic chip // Luminescence. 2014. V. 29(3). P. 248–253.
33. M.J. Corey. Coupled Bioluminescent Assays: Methods, Evaluations, and

Applications. – NY: John Wiley & Sons, 2008. 308 p.

34. S. Ripp, P. Jegier, C. Johnson, S. Moser, S. Islam, G. Sayler. Bioluminescent bioreporter assays for targeted detection of chemical and biological agents // Proc. of SPIE. 2008. V. 6945. URL: https://www.researchgate.net/profile/Steven_Ripp/publication/252199541_Bioluminescent_bioreporter_assays_for_targeted_detection_of_chemical_and_biological_agents/links/00b4953722abfcd2fb000000/Bioluminescent-bioreporter-assays-for-targeted-detection-of-chemical-and-biological-agents.pdf?origin=publication_detail (дата обращения 04.09.2017).

35. S.L. Fox, K.A. Daum, C.J. Miller, M.M. Cortez. Emergency First Responders' Experience With Colorimetric Detection Methods. Report. U.S. Department of Homeland Security. 2007. URL: http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.517.2914&rep=rep1&type=pdf (дата обращения 04.09.2017).

36. M.J. Kangas, R.M. Burksb, J. Atwatera, R.M. Lukowicza, P. Williamsc, A.E. Holmes. Colorimetric Sensor Arrays for the Detection and Identification of Chemical Weapons and Explosives // Critical reviews in analytical chemistry. 2017. V. 47. № 2. P. 138–153.

37. P. Emanuel. Biological & Chemical Sensors for Emerging Applications. Opening keynote presentation. Biological & Chemical Sensors for Emerging Applications. December 6-7, 2016.

38. А.В. Соснов, Б.С. Пункевич, С.В. Садовников, Ф.М. Семченко. Разработка и выпуск стандартных образцов контролируемых биологически активных веществ ограниченного использования // Доклад на II-й Международной научной конференции «Стандартные образцы в измерениях и технологиях». Екатеринбург, 2015. URL: https://www.researchgate.net/publication/315457651_Development_and_production_of_reference_standards_of_controlled_high-potent_biologically_active_substances (дата обращения 04.09.2017).

39. Pocket-sized micro spectrometer URL: https://www.consumerphysics.com/business/technology/ (дата обращения 04.09.2017).

40. S.-W. Zhang, T. Swager. Fluorescent Detection of Chemical Warfare Agents: Functional Group Specific Ratiometric Chemosensors // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 3420–3421.

41. Tae-Il, K. Shubhra, B. Maity, J. Bouffard, Y. Kim. Molecular Rotors for the Detection of Chemical Warfare Agent Simulants // Anal. Chem. 2016. V. 88(18). P. 9259–9263.

42. J.R. Schwierking, L.W. Menzel, E.R. Menzel. Organophosphate Nerve Agent Detection with Europium Complexes // The Scientific World Journal. 2004. V. 4. P. 948–955.

43. J.C. Bunzli, C. Piguet. Lanthanide-containing molecular and supramolecular polymetallic functional assemblies // Chem. Rev. 2002. V. 102 (6). P. 1897–1928.

44. G.H. Dennison, M.R. Sambrook, M.R. Johnston. VX and VG chemical warfare agents bidentate complexation with lanthanide ions // Chem. Commun. 2014. V. 50. P. 195–197.

45. J. Como. A Europium Complex Doped Silica Sol-Gel Thin Film for Detection of Trace Organophosphate Vapor: PhD Dissertation. – Texas: Tech University, 2010. URL: https://ttu-ir.tdl.org/ttu-ir/bitstream/handle/2346/ETD-TTU-2010-12-1123/COMO-DISSERTATION.pdf?sequence=1 (дата обращения 04.09.2017).

46. S. Quici, G. Marzanni, M. Cavazzini et al. Highly Luminescent Eu^{3+} and Tb^{3+} Macrocyclic Complexes Bearing an Appended Phenanthroline Chromophore // Inorganic Chemistry. 2002. V. 41(10). P. 2777–2784.

47. D. Knapton, M. Burnworth, S.J. Rowan, C. Weder, Fluorescent Organometallic Sensors for the Detection of Chemical-Warfare-Agent Mimics // Angew. Chem. Int. Ed. 2006. V. 45. P. 5825–5829.

48. M. Burnworth, S.J. Rowan, C. Weder. Fluorescent Sensors for the Detection of Chemical Warfare Agents // Chem. Eur. J. 2007. V. 13. P. 7828–7836.

49. E.R. Menzel, L.W. Menzel, J.R. Schwierking. Rapid fluorophosphate nerve agent detection with lanthanides // Talanta, 2005. V. 67. P. 383–387.

50. Patent WO 2006076430 A1. Nerve agent detection method and device / E.R. Menzel; Texas Tech University. 2005.

51. S. Zhao, L. Zhang, W. Li, L. Li. Preparation and Fluorescent Property of Eu(TTA)3Phen Incorporated in Polycarbonate Resin // Polymer Journal. 2006. V. 38(6). P. 523–526.

52. H.-X. Zhang, R.-B. Wei, C.-Z. Chen, X.-L. Tuo, X.-G. Wang. A novel fluorescent epoxy resin for organophosphate pesticide detection // Chinese Chemical Letters. 2015. V. 26. P. 39–42.

53. K. Kanagaraj, A. Affrose, S. Sivakolunthu, K. Pitchumani. Highly selective fluorescent sensing of fenitrothion using per-6-amino-beta-cyclodextrin:Eu(III) complex // Biosensors and Bioelectronics. 2012. V. 35. P. 452–455.

54. G.H. Dennison, M.R. Sambrook, M.R. Johnston. VX and VG chemical warfare agents bidentate complexation with lanthanide ions // Chem. Commun. 2014. V. 50. P. 195–197.

55. J.W. Boyd, G.P. Cobb, G.E. Southard, G.M. Murray. Development of Molecularly Imprinted Polymer Sensors for Chemical Warfare Agents // Johns Hopkins Apl. Technical Digest. 2004. V. 25(1). P. 44–49.

56. G.M. Murray. Molecularly imprinted polymer solution anion sensor. 2003. WO 2003034043 A2 The Johns Hopkins University.

57. A. Verma, G.M. Murray. A Path to Soluble Molecularly Imprinted Polymers // J. Funct. Biomater. 2012. V. 3. P. 1–22.

58. A.L. Jenkins, O. Manuel Uy, G.M. Murray. Polymer-Based Lanthanide Luminescent Sensor for Detection of the Hydrolysis Product of the Nerve Agent Soman in Water // Anal. Chem. 1999. V. 71. P. 373–378.

59. Patent US 20120164027 A1. Polymer Based Lanthanide Luminescent Sensors for the Detection of Organophosphorus Compounds / G.M. Murray, O.M. Uy, A.L. Jenkins. 2012.

60. S.L. Bartelt-Hunt, D.R.U. Knappe, M.A. Barlaz. A Review of Chemical Warfare Agent Simulants for the Study of Environmental Behavior // Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 2008. V. 38(2). P. 112–136.

61. МУК 4.1.011-2010. Методические указания по методам контроля. Методика выполнения измерений массовой концентрации зомана в пробах водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования методом газовой хроматографии (утв. заместителем руководителя ФМБА России 18.05.2010).

62. МУК 4.1.66-2004. Методика измерений массовой концентрации Vx в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования биохимическим методом. ФГУП «УНИИМ» – ГНМЦ. 2004. Свидетельство №224.01.17.209/2004.

63. S.V. Sadovnikov, A.V. Sosnov, E.A. Fokin et. al. Investigation of Antiatherosclerotic Properties of Selective BuChE Inhibitors // XIVth International Conference on Phosphorus Chemistry (ICPC-14, Cincinnati, USA). 1998. P. 226.

64. Патент РФ 2041878. N,N-диалкиламидофтор-о-(транс-2-замещенные циклоалкил)фосфаты / С.В. Садовников, А.В. Соснов, Е.А. Фокин и др. – Заявл. 30.07.93; опубл. 20.08.95. URL: http://www.freepatent.ru/patents/2041878.

65. Патент РФ 2102398. N-(2-диизопропилоксифосфорилтиоэтил)-n-(замещенные бензил)-n,n-диалкиламмоний, пиперидиний или морфолиний галогениды / М.А. Кочетков, С.В. Садовников, А.В. Соснов, Е.А. Фокин и др. – Заявл. 11.11.96; опубл. 20.01.98. URL: http://www.freepatent.ru/patents/2102398 (дата обращения 04.09.2017)..

66. K.A. Anikienko, S.V. Sadovnikov, A.V. Sosnov, E.A. Fokin et. al. Selective butyrylcholinesterase inhibitors among dialkylphosphoramidofluoridates // Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements. 2006. V. 130(1). P. 115–129.

67. K.A. Anikienko, S.V. Sadovnikov, A.V. Sosnov et. al. Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors as Model Substances // The 7th International Symposium on Protection against Chemical and Biological Warfare Agents. – Stockholm, Sweden. 2001.

68. Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment / Ed. By Timothy T. Marrs. – NY: John Wiley & Sons, 2007. 750 p.

69. I.N. Stan'kov, I.D. Derevyagina, V.B. Kondrat'ev, V.B. Sitnikov, S.V. Sadovnikov, S.N. Mylova. Gas-Chromatographic Determination of Trace S-[2-(N,N-Diethylamino)ethyl]Methylphosphonothioic Acid in Water // Journal of Analytical Chemistry. 2008. V. 63(7). P. 668–673.

70. S.V. Sadovnikov, I.N. Stan'kov, I.D. Derevyagina, A.V. Sosnov. Development of samples preparation scheme for detection of S-[2-(N,N-diethylamino)ethyl] methylthiophosphonate trace amounts in a water environment // 33rd AMOP Technical Seminar on Environmental Contamination and Response. Canada. 2010.

71. M. Pohankaa, J. Zdarova Karasovab, K. Kucaa, J. Pikulac, O. Holasb, J. Korabecnyb, J. Cabal. Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and VX // Talanta. 2010. V. 81. P. 621–624.

72. Chemical and Biological Terrorism: Research and Development to Improve Civilian Medical Response / Committee on R&D Needs for Improving Civilian Medical Response to Chemical and Biological Terrorism Incidents. – Washington (DC): National Academies Press, 1999. 304 p.

73. B. Díaz de Gren et. al. Fluorescent Discrimination between Traces of Chemical Warfare Agents and Their Mimics // J. Am. Chem. Soc. 2014. V. 136. P. 4125–4128.

74. Y. Liu, M. Bonizzoni. A Supramolecular Sensing Array for Qualitative and Quantitative Analysis of Organophosphates in Water // J. Am. Chem. Soc. 2014. V. 136. P. 14223–14229.

75. E. Climent, M. Biyikal, K. Gawlitza, T. Dropa, M. Urban, A.M. Costero, R. Martnez, K. Rurack. A Rapid and Sensitive Strip-Based Quick Test for Nerve Agents Tabun, Sarin, and Soman Using BODIPY-Modified Silica Materials // Chem. Eur. J. 2016. V. 22. P. 1–6.

76. E.T. Gainullina, K.V. Kondratyev, S.B. Ryzhikov, V.F. Taranchenko. Fluorescent Method for Evaluation of Cholinesterase Inhibitors // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2006. V. 142(6). P. 751–752.

77. S. Royo, R. Martınez-Manez et. al. Chromogenic and fluorogenic reagents for chemical warfare nerve agents' detection // Chem. Commun. 2007. V. 46 P. 4839–4847.

78. G.E. Southard, K.A. Van Houten et. al. Luminescent sensing of organophosphates using europium(III) containing imprinted polymers prepared by RAFT polymerization // Anal Chim Acta. 2007. V. 9 (581/2). P. 202–207.

79. R. Shunmugam, G.N. Tew. Terpyridine–Lanthanide Complexes Respond to Fluorophosphate Containing Nerve Gas G-Agent Surrogates // Chem. Eur. J. 2008. V. 14. P. 5409–5412.

80. R. Sferopoulos. A Review of Chemical Warfare Agent (CWA) Detector Technologies and Commercial-Off-The-Shelf Items. Human Protection and Performance Division DSTO. Defence Science and Technology Organisation. 2009.

81. A.A. Fatah, R.D. Arcilesi, J.C. Peterson, C.H. Lattin, C.Y. Wells, J.A. McClintock. Guide for the Selection of Chemical Detection Equipment for Emergency First Responders. 3rd edition. Office of Law Enforcement Standards. National Institute of Standards and Technology. 2007.

82. B.M. Gandhi. Chemical Detectors in Defence. A Guide Book. – NeoBioMed Services. 2017.

83. МУК 4.1.012-2010. Методические указания по методам контроля. Методика выполнения измерений массовой концентрации зарина в пробах водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования методом газовой хроматографии (утв. заместителем руководителя ФМБА России 18.05.2010).

84. I.A. Rodina, A.V. Brauna, I.A. Anan'eva, O.A. Shpiguna, E.I. Savel'eva, I.V. Rybal'chenko, S.L. Bolotov, G.M. Rodchenkov. Detection of nerve agent markers by liquid chromatography-mass spectrometry // Journal of Analytical Chemistry. 2011. V. 66. № 14. P. 1417–1422.

85. J.S. Tsang, A.A. Neverov, R.S. Brown. Billion-fold Acceleration of the Methanolysis of Paraoxon Promoted by $La(OTf)_3$ in Methanol // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125(25). P. 7602–7607.

86. T. Andrea, A.A. Neverov, R.S. Brown. Efficient Methanolytic Cleavage of Phosphate, Phosphonate, and Phosphonothioate Esters Promoted by Solid Supported Lanthanide Ions // Ind. Eng. Chem. Res. 2010. V. 49(15). P 7027–7033.

87. B.B. Dhar, D.R. Edwards, R.S. Brown. A Study of the Kinetics of La^{3+}-Promoted Methanolysis of S-Aryl Methylphosphonothioates: Possible Methodology for Decontamination of EA 2192, the Toxic Byproduct of VX Hydrolysis // Inorg. Chem. 2011. V. 50. P. 3071–3077.

88. Л.К. Густылева, Н.С. Хлебникова, Е.И. Савельева, А.С. Радилов. Анализ химического состава продуктов разложения российского вещества vx в условиях каталитического метанализа // Аналитика и контроль. 2013. Т. 17(2). С. 190–195.

89. V. Blinov, K. Volchek, W. Kuang, C.E. Brown, A. Bhalerao. Two-Stage Decontamination of Organophosphorus Compounds on Sensitive Equipment Materials // Ind. Eng. Chem. Res. 2013. V. 52. P. 1405–1413.

90. V. Blinov, K. Volchek, W. Kuang, A. Bhalerao, C.E. Brown. Decontamination of Paraoxon and Parathion on Sensitive Equipment Materials by Catalytic Methanolysis // Ind. Eng. Chem. Res. 2014. V. 53. P. 13856–13861.

91. Patent US 8722956 B2. Kit for decomposing organophosphorus compounds / R.S. Brown, A.A. Neverov, J.S.W. Tsang. – 2014.

92. D.R. Edwards, R.S. Brown. Development of metal-ion containing catalysts for the decomposition of phosphorothioate esters // Biochimica et Biophysica Acta. 2013. V. 1834. P. 433–442.

93. ИПП-11. URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%9F%D0%9F-11 (дата обращения 04.09.2017).

94. Патент РФ № 2050849. Средство для лечения гнойных ран / В.Р. Рембовский, А.Б. Слободской, В.И. Сериков и др. 1995. URL: http://ru-patent.info/20/50-54/2050849.html (дата обращения 04.09.2017).

95. Patent WO 2007027118 A1. Dermatological composition / V.S. Polyakov, A.P. Gorshkov, N.A. Vorotyagina. – 2005.

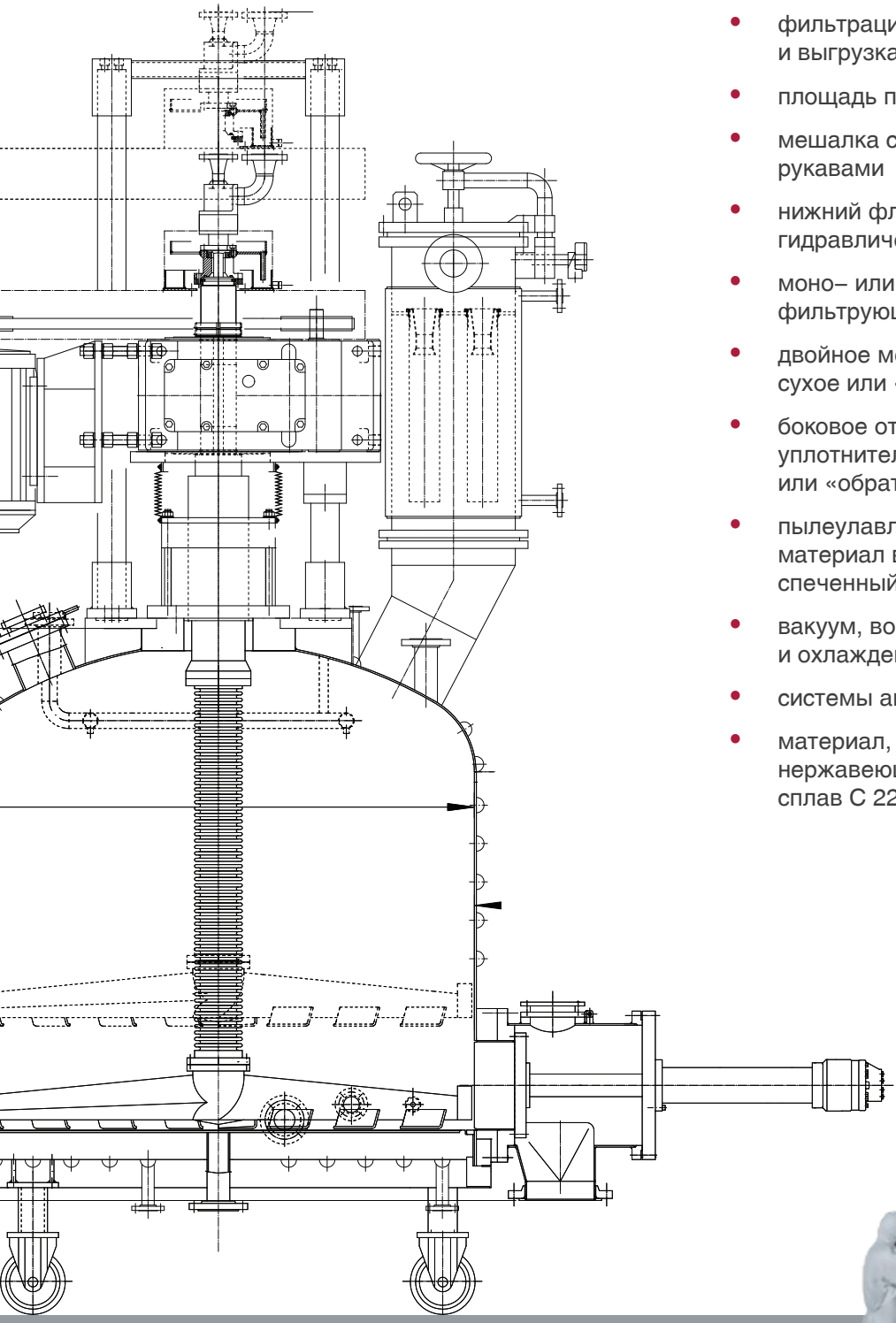
96. G.H. Dennison, C.G. Bochet, C. Curty et. al. The foundations for selective, sensitive and rapid next generation detection of v-series chemical warfare agents with trivalent lanthanide based systems // 12th International Symposium on Protection against Chemical and Biological Warfare Agents. Stockholm, Sweden. 2016.

97. A.W. Fountain III. Trends and future challenges for the cbrne detection. Plenary lecture Detection and On-Site Analysis // 12th International Symposium on Protection against Chemical and Biological Warfare Agents. Stockholm, Sweden. 2016.

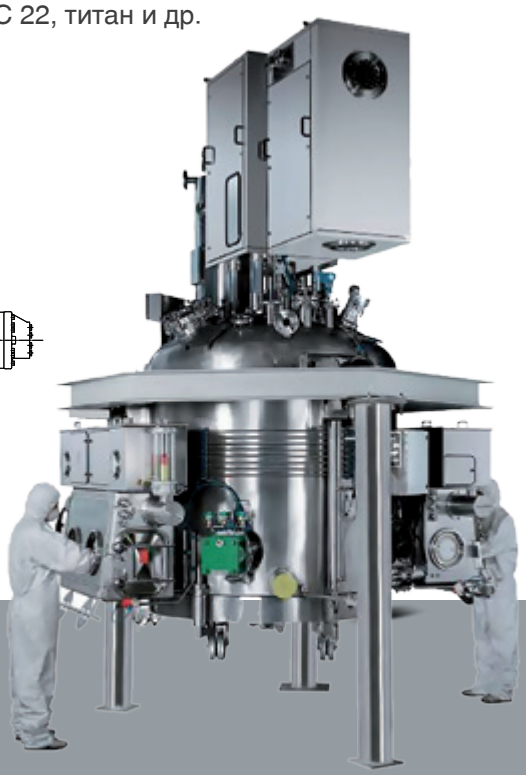
98. Report of the scientific advisory board's workshop on emerging technologies. OPCW Twenty-Sixth Session. OPCW. 2017.

3V TECH
DATASHEET

ФИЛЬТР–СУШИЛКА
Filtrodry FEP/SD



- фильтрация под давлением, вакуумная сушка и выгрузка продукта
- площадь поверхности фильтра до 16 м2
- мешалка с прямыми или «S»–образными рукавами
- нижний фланец с С–образными зажимами или гидравлическим байонетным затвором
- моно– или многослойный спеченный фильтрующий материал
- двойное механическое уплотнение: мокрое, сухое или «отрывное»
- боковое отверстие для слива с уплотнительным кольцом, «металл – металл» или «обратное» уплотнение
- пылеулавливающий фильтрационный материал в Gore–Tex или многослойный спеченный металл
- вакуум, восстановление растворителя, нагрев и охлаждение, системы инертизации
- системы автоматизации ПЛК
- материал, контактирующий с продуктом: нержавеющая сталь 316 L, SAF 2205, уран B6, сплав C 22, титан и др.



Доступные технологические
решения от итальянского бренда
с более, чем полувековой историей теперь и в России!

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 615.076

ОБОСНОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВ ИЗУЧЕНИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КАК ИСТОЧНИКА СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ЖИРОВОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

С.Ю. Фабричный[1], А.А. Семин[2]*, И.А. Наркевич[3]

Резюме. В настоящее время ключевой проблемой в сфере лекарственного обеспечения населения Российской Федерации является недостаток доступных и качественных лекарственных средств отечественного производства для лечения заболеваний, связанных с нарушениями жирового и углеводного обменов. В то же время наблюдается рост интереса в высокоразвитых странах к лекарственным препаратам на основе природных соединений. Авторы поставили задачу оценить перспективы рынка лекарственных средств на основе природных соединений для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов и шансы России на этом рынке, в том числе на основе анализа распределения патентных документов в получении биологически активных веществ тремя способами: биосинтез, химический синтез и выделение из природных соединений.

Ключевые слова: лекарственные средства, природные соединения, жировой и углеводный обмен, химический синтез, биосинтез.

SUBSTANTIATION OF THE PROSPECTS FOR STUDYING NATURAL COMPOUNDS AS A SOURCE OF DRUG DEVELOPMENT FOR THE CORRECTION OF FAT AND CARBOHYDRATE METABOLISM

S.Yu. Fabrichniy[1], A.A. Semin[2]*, I.A. Narkevich[3]

Abstract. Currently, the key problem in the field of drug provision for the population of the Russian Federation is the lack of affordable and high-quality domestic drugs for the treatment of diseases associated with violations of fat and carbohydrate metabolism. At the same time, highly developed countries have increased interest to drugs based on natural compounds. Authors set the task to assess the prospects of the drugs' market that based on natural compounds to correct violations of fat and carbohydrate metabolism and the chances of Russia in this market, including on the basis of the analysis of the distribution of patent documents in obtaining biologically active substances in three ways: biosynthesis, chemical synthesis, isolation from natural compounds.

Keywords: drugs, natural compounds, fat and carbohydrate metabolism, chemical synthesis, biosynthesis.

1 – Совет Федерации Федерального Собрания Российской Федерации, 103426, Россия, г. Москва, ул. Большая Дмитровка, д. 26; коллегия Федеральной службы по интеллектуальной собственности

2 – Министерство образования и науки Российской Федерации, 125993, Россия, г. Москва, ул. Тверская, д. 11

3 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – Council of Federation of the Russian Federal Assembly, 26, Bolshaya Dmitrovka str., Moscow, 103426, Russia; Collegium of the Federal Service for Intellectual Property

2 – Ministry of Education and Science of the Russian Federation, 11, Tverskaya str., Moscow, 125993, Russia

3 – St. Petersburg Chemical-Pharmaceutical Academy of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 14A, Prof. Popova str., St. Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: semin-aa@mon.gov.ru

СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА В СФЕРЕ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ ЖИРОВОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНОВ

В настоящее время наблюдается неуклонное увеличение частоты заболеваний, в основе которых лежат ассоциированные нарушения углеводного и жирового обменов (метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа, ожирение, дислипидемия, неалкогольная жировая болезнь печени).

Так, по данным Всемирной организации здравоохранения, численность больных сахарным диабетом (далее – СД) в мире за последние 10 лет увеличилась более чем в 2 раза и в настоящее время составляет 422 млн человек. Более 80% смертей от диабета происходят в странах с низким и средним уровнем дохода. К 2030 году диабет станет седьмой причиной смерти во всем мире [1].

В Российской Федерации, как и во всех странах мира, отмечается значимый рост распрост-

раненности СД. По данным федерального регистра СД, в РФ на окончание 2016 г. на диспансерном учете состояло 4,35 млн человек (3,0% населения), из них 92% (4 млн) – СД 2 типа, 6% (255 тыс.) – СД 1 типа и 2% (75 тыс.) – другие типы СД, при среднем росте заболеваемости на 5,6% в год. Однако эти данные недооценивают реальное количество пациентов, поскольку учитывают только выявленные и зарегистрированные случаи заболевания [2]. Так, результаты масштабного российского эпидемиологического исследования (NATION) подтверждают, что диагностируется лишь 50% случаев СД 2 типа. Таким образом, предполагаемая численность пациентов с СД в РФ может составить не менее 8–9 млн человек (около 6% населения), что представляет чрезвычайную угрозу для долгосрочной перспективы [3].

Распространенность метаболического синдрома (МС) составляет 20–40% населения развитых стран [4]. В нашей стране 40% населения имеют 2 компонента МС, 10,7% – 3 и более его составляющих [5]. Он чаще встречается у лиц среднего и старшего возраста (30–40%). Сердечно-сосудистая заболеваемость и смертность у людей с метаболическим синдромом существенно выше, чем без него. Наличие МС в 3–6 раз повышает риск развития как СД 2 типа, так и артериальной гипертензии (АГ). МС ассоциируется с субклиническим поражением жизненно важных органов. Это проявляется в снижении фильтрационной функции почек, микроальбуминурии, повышении жесткости артерий, гипертрофии миокарда левого желудочка, диастолической дисфункции, увеличении размеров полости левого желудочка, утолщении стенки сонной артерии, причем многие из этих нарушений проявляются независимо от наличия АГ. В то же время эти изменения являются обратимыми, то есть при соответствующем лечении можно добиться исчезновения или по крайней мере уменьшения выраженности основных проявлений МС. В настоящее время МС рассматривается в качестве предиктора развития атеросклероза, неалкогольной жировой болезни печени и СД 2 типа [6].

Формирование инсулинорезистентности, равно как и ожирения, сопровождается пропорциональным ростом специфических поражений печени в виде неалкогольной жировой болезни печени. По данным последних исследований, распространенность этой болезни в виде стеатоза может составлять в популяции свыше 25% (в некоторых регионах и более 50%), а неалкогольного стеатогепатита – до 5% [7]. По данным российского исследования DIREG 2, у 37,3% пациентов, обратившихся за помощью к терапевту, обнаружена неалкогольная жировая болезнь печени (в то время как в 2007 г. она составила 27,0%; прирост более 10%), в результате чего она заняла первое место среди заболеваний печени – 71,6% [8]. У таких больных повышен риск возникновения патологии со стороны сердца и сосудов, что подтверждается многочисленными исследованиями в этой области. Исходом развития стеатоза печени почти в половине случаев является цирроз органа, а примерно в 5% возникает гепатоцеллюлярная карцинома [9].

Круг лекарственных препаратов, способных оказывать определенное влияние на эти патологические процессы, известен, однако в большинстве случаев их эффективная фармакотерапия до настоящего времени не разработана. В силу этого создание новых высокоэффективных и безопасных препаратов, способных оказывать профилактическое и лечебное воздействие, для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов является актуальным. Анализ результатов по поиску средств лечения вышеперечисленных нозологических состояний среди анорексигенов, средств лечения ожирения, коррекции дислипидемии, антидиабетических и антистеатозных средств свидетельствуют о росте патентной активности в исследуемой области, при этом наибольшее количество патентных документов приходится на МПК A61P 3/10 «Лекарственные средства для лечения нарушения обмена веществ: для лечения гипергликемии, например антидиабетические средства» (рисунки 1–2). В ТОП-3 стран входят США, Китай и Индия, а компанией-лидером является Novartis AG (Швейцария).

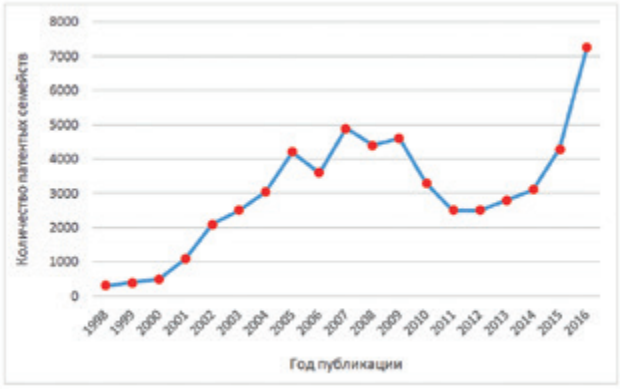


Рисунок 1. Распределение патентных документов в области коррекции нарушений жирового и углеводного обменов по годам публикации (по данным Derwent Innovation)

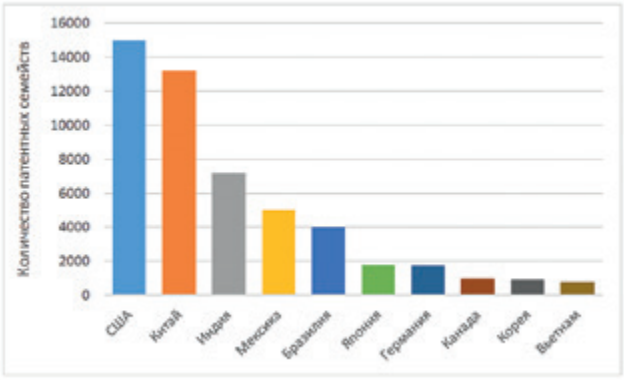


Рисунок 2. Распределение патентных документов в области коррекции нарушений жирового и углеводного обменов по странам публикации (по данным Derwent Innovation)

АНАЛИЗ ПЕРСПЕКТИВ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Анализ патентной активности в мире проводился по трем способам получения биологически активных веществ (БАВ): химический синтез, биотехнологический синтез и получение на основе растительного сырья.

В результате обнаружено, что в настоящее время наблюдается спад патентной активности по получению БАВ с помощью химического синтеза, начавшийся после 2003 года (рисунок 3). Это свидетельствует о насыщении рынка данными технологиями.

Рисунок 3. Распределение патентных документов в области химического синтеза БАВ по годам публикации (по данным Derwent Innovation)

В ТОП-3 стран входят США, Китай и Германия, а компанией-лидером является Genetic Engineering Technology, Inc. (США) (рисунок 4). Объем российского рынка в 2015 г. составил в стоимостном выражении более 245 млрд руб. (по данным IMS Healths).

Несмотря на устойчивый интерес к биотехнологиям в фармацевтике, в настоящее время общий тренд развития указывает на то, что возможности для роста будут исчерпаны через несколько лет. В частности, спад патентной активности по этому направлению наблюдается с 2003 года (рисунки 5, 6). Объем российского рынка в 2015 г. составил в стоимостном выражении более 64,2 млрд руб. (по данным IMS Healths).

В ТОП-3 стран входят Австралия, Мексика и США, а компанией лидером также является Genetic Engineering Technology, Inc. (США) (рисунок 6).

Анализ получения БАВ из растительного сырья был проведен по двум группам ключевых слов: 1) лекарственные средства на основе природных соединений (Herbal exstract, Herbal medicines и др.); 2) лекарственные средства на основе природных соединений для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов [Herbal…metabolic syndrome,

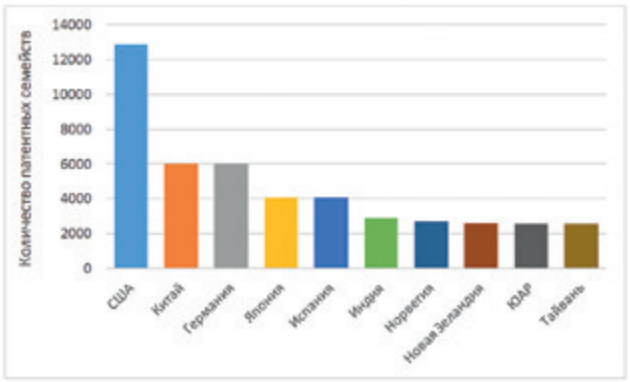


Рисунок 4. Распределение по странам публикации патентных документов в области химического синтеза БАВ (по данным Derwent Innovation)

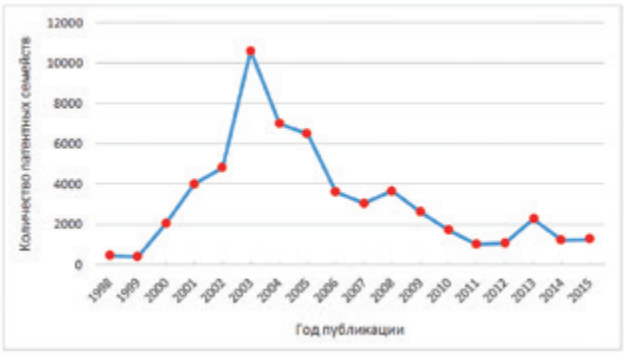


Рисунок 5. Распределение патентных документов в области биотехнологического синтеза БАВ по годам публикации (по данным Derwent Innovation)

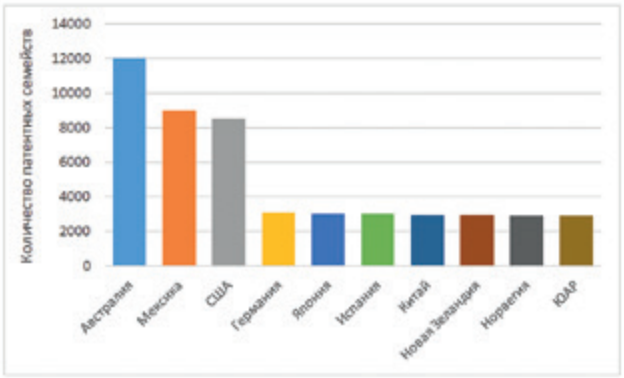


Рисунок 6. Распределение патентных документов в области биотехнологического синтеза БАВ по странам публикации (по данным Derwent Innovation)

Herbal…diabetes, Herbal…liver, Herbal…atherosclerosis, Herbal nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), Herbal nonalcoholic steatohepatits (NASH) и др.].

Данная группа патентных документов демонстрировала рост на протяжении всего анализируемого периода, однако наиболее существенное увеличение стало наблюдаться с 2012 г. (рисунок 7). Доминирую-

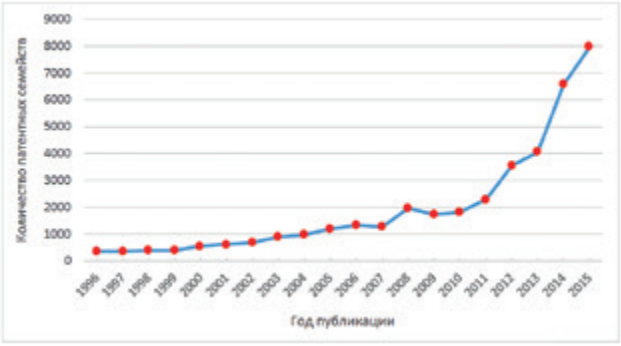


Рисунок 7. Распределение патентных документов на лекарственные средства на основе природных соединений по годам публикации (по данным Ordit)

щее положение занимает Китай, где количество полученных патентных документов многократно превышает этот показатель в остальных старнах и наблюдается быстрый рост их количества внутри самой страны, особенно в последние годы (рисунки 8, 9).

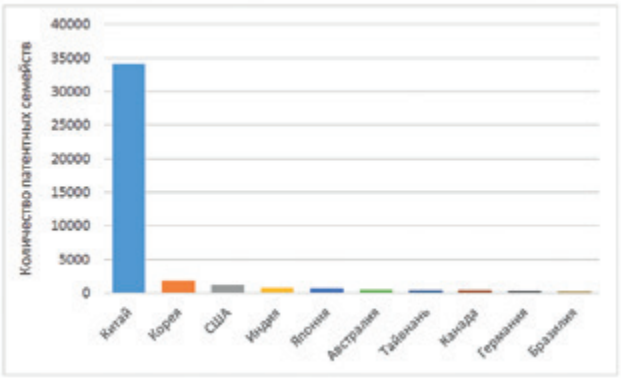


Рисунок 8. Распределение патентных документов на лекарственные средства на основе природных соединений по странам публикации (по данным Ordit)

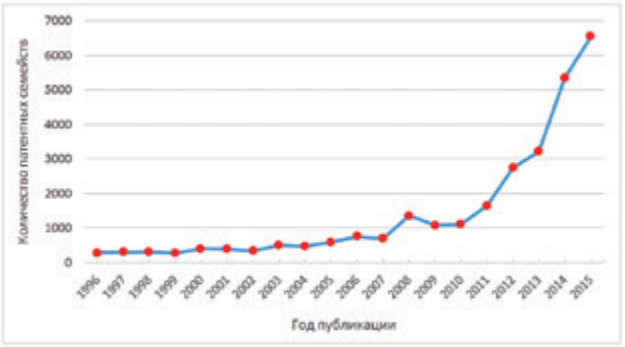


Рисунок 9. Распределение патентных документов на лекарственные средства на основе природных соединений по годам публикации в Китае (по данным Orbit)

Важно отметить, что значительное количество этих патентных документов приходится на группу «Лекарственные средства на основе природных соединений для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов» (рисунки 10, 11).

ТОП-5 компаний – правообладателей патентных документов по всем ключевым словам в совокупности приведен на рисунке 12, при этом все организации – из Китая.

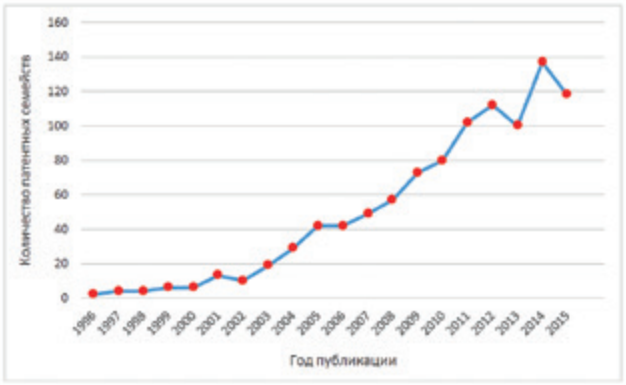


Рисунок 10. Распределение патентных документов на лекарственные средства на основе природных соединений для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов по годам публикации (по данным Orbit)

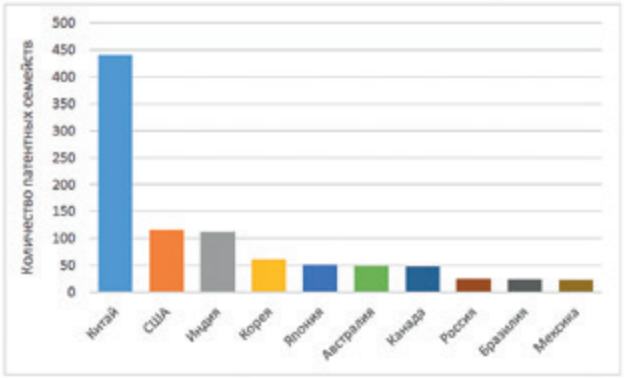


Рисунок 11. Распределение патентных документов на лекарственные средства на основе природных соединений для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов по странам публикации (по данным Orbit)

Для дальнейшего изучения перспектив рынка лекарственных средств на основе природных соединений для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов был проведен анализ сложившейся ситуации в России. Так, на рисунке 12 представлено распределение стран – заявителей патентных документов с приоритетом в России, а на рисунке 14 – ТОП-5 компаний-правообладателей.

Анализ представленных на рисунках 5–12 данных свидетельствует о росте количества патентных документов после 2008 г., при этом наблюдается повышенный интерес китайских компаний к фитофармацевтике в целом и к ЛС природного происхождения для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов в

Рисунок 12. ТОП-5 компаний по патентным документам в области лекарственных сред на основе природных соединений

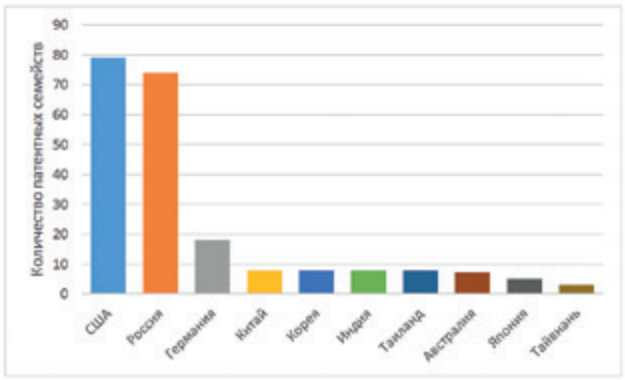


Рисунок 13. Распределение патентных документов в области лекарственных сред на основе природных соединений по приоритету в России

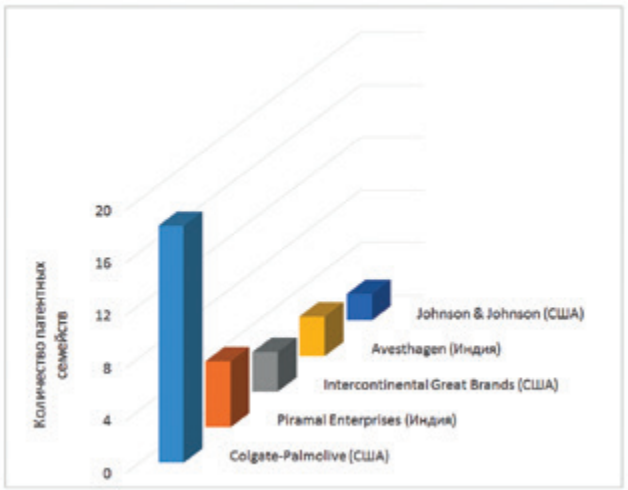


Рисунок 14. ТОП-5 компаний по патентным документам в области лекарственных сред на основе природных соединений в России

частности. Однако китайские компании не спешат выходить на российский рынок в отличие от США и Индии. Объем российского рынка в 2015 г. составил в стоимостном выражении более 9,3 млрд руб. (по данным IMS Healths).

ОЦЕНКА ШАНСОВ РОССИИ ЗАНЯТЬ МЕСТО НА РЫНКЕ

Представленные данные позволяют спрогнозировать, что рынок ЛС на основе природных соединений для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов находится в стадии «взрывного роста», и России важно оказаться здесь в числе лидеров и занять сегмент рынка.

Для этого сейчас есть все возможности: современная научная и производственная инфраструктура; широкий ассортимент лекарственных растений, произрастающих на территории Российской Федерации; компетенции и кадры для решения этого вопроса и др.

Кроме того, развитие современной лабораторной базы позволяет многократно увеличить шансы добыть искомое вещество по сравнению с периодом 10–20-летней давности.

Созданию новых активных фармацевтических субстанций будет способствовать применение современных методов хео- и биоинформатики, а также технологий тонкого химического синтеза с привлечением к данной работе созданных в рамках ФЦП «ФАРМА-2020» центров компетенций [10].

Сочетание сорбционно-хроматографических и мембранных методов выделения с методами тонкого органического синтеза позволит создать экономически выгодные промышленные технологии получения активных фармацевтических субстанций (рисунок 15).

Вхождение России в десятку стран по полученным патентам в исследуемой области подтверждает данные заявления (рисунки 11, 13).

Вопросы развития рынка технологий получения индивидуальных соединений растительного происхождения, сформулированные в виде проекта научно-технической программы Союзного государства были обсуждены на секции «Научно-техническое сотрудничество Российской Федерации и Республики Беларусь в сфере инновационной деятельности и высоких технологий», проведенной в рамках Четвертого форума регионов Беларуси и России.

Ввиду высокой социально-экономической значимости для Союзного государства участники обсуждения обратились к заинтересованным органам государственной власти Российской Федерации и Республики Беларусь совместно с Постоянным Комитетом Союзного государства с предложением содействовать скорейшему согласованию концепции научно-технической программы Союзного государства «Разработка высокоэффективных безопасных фармацевтических субстанций на основе индивидуальных природных соединений для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов», шифр «Метаболизм».

В качестве потенциальных потребителей результатов программы рассматриваются предприятия фармацевтической отрасли, а также предприятия пищевой и парфюмерно-косметической промышленности, профессиональные медицинские ассоциации,

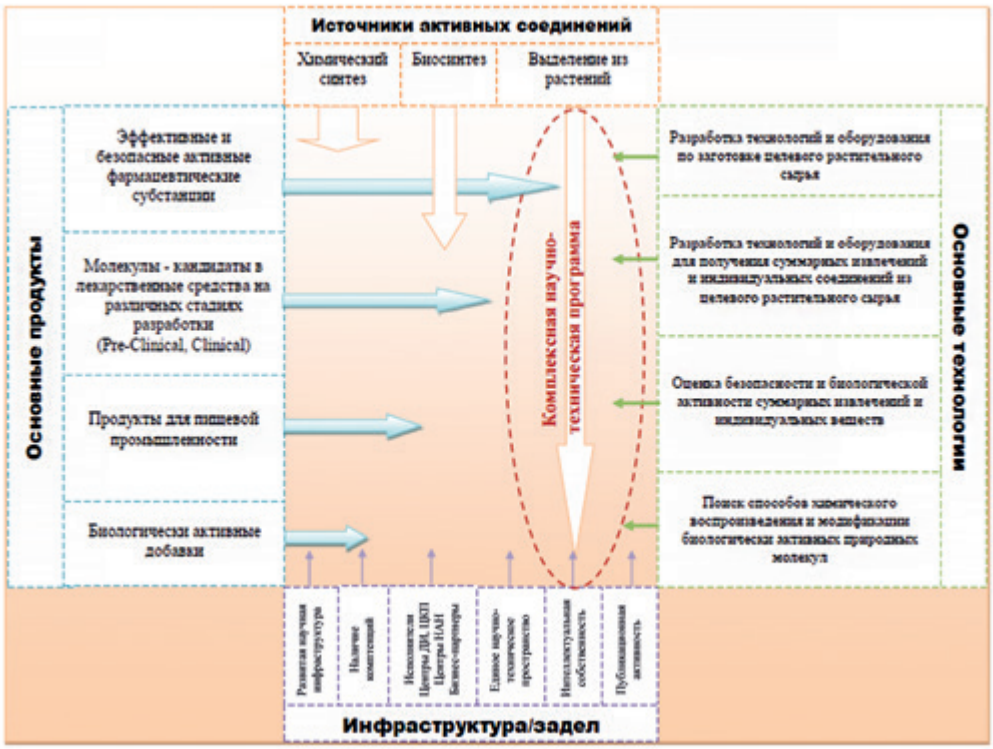


Рисунок 15. Матрица рынка лекарственных средств на основе природных соединений для коррекции нарушений жирового и углеводного обменов

активно участвующие в развитии рынка превентивной медицины.

Необходимость в подготовке ресурсной базы по выращиванию лекарственного растительного сырья приведет к созданию на новом технологическом уровне новой отрасли растениеводства. По оценкам Агентства стратегических инициатив, выращивание экологически чистых лекарственных растений и производство растительных лекарственных субстанций и естественных биорегуляторов на их основе (традиционных растительных лекарственных средств с исторически доказанной эффективностью и безопасностью) обладает огромным экспортным потенциалом, соизмеримым с экспортом вооружений и даже углеводородов (не менее 50–100 млрд долларов к 2035 году). В рамках реализации дорожной карты «Хелснет» Национальной технологической инициативы предполагается создать 25 агропарков и 300 тысяч фермерских хозяйств с численностью не менее одного миллиона рабочих мест в агрокомплексе России [11].

В случае государственной поддержки указанного направления фармацевтические компании стран-участников Союзного государства займут более активную позицию по формированию государственно-частных партнерств на этом перспективном рынке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глобальный доклад по диабету / Всемирная организация здравоохранения. 2016. 8 с.
2. И.И. Дедов, М.В. Шестакова, О.К. Викулова. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: Клинико-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета // Сахарный диабет. 2017. Т. 20. № 1. С. 13–41.
3. И.И. Дедов, М.В. Шестакова, Г.Р. Галстян. Распространенность сахарного диабета 2 типа у взрослого населения России (исследование NATION) // Сахарный диабет. 2016. Т. 19. № 2. С. 104–112.
4. S. O'Neill, L. O'Driscoll. Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies // Obes Rev. 2015. V. 16. № 1. P. 1–12.
5. Ю.П. Никитин, Г.Р. Казека, Г.И. Симонова. Распространенность компонентов метаболического синдрома X в неорганизованной городской популяции (эпидемическое исследование) // Кардиология. 2001. № 9. С. 37–40.
6. Ч. Сяоян, О.Ю. Киргизова. Метаболический синдром: некоторые итоги и перспективы решения проблемы // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2016. Т. 1. № 5. С. 187–194.
7. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease // J Hepatol. 2016. V. 64. № 6. P. 1388–1402.
8. В.Т. Ивашкин, О.М. Драпкина, И.В. Маев и др. Распространенность неалкогольной жировой болезни печени у пациентов амбулаторно-поликлинической практики в Российской Федерации: результаты исследования DIREG 2 // РЖГГК. 2015. № 6. С. 31–41.
9. В.Т. Ивашкин, М.В. Маевская, Ч.С. Павлов и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации // РЖГГК. 2016. № 2. С. 24–42.
10. А.А. Сёмин, И.А. Наркевич. Анализ деятельности центров по разработке лекарственных средств, создаваемых на базе образовательных организаций // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 2(19). С. 74–78.
11. План мероприятий (дорожная карта) «Хелснет» Национальной технологической инициативы. URL: http://www.nti2035.ru/markets/docs/DK_healthnet.pdf (дата обращения 10.09.2017).

УДК 615.273.53; 547.587.51; 615.322; 544.165

СИНТЕТИЧЕСКИЕ, КОВАЛЕНТНО КОМБИНИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 2-Н-1-БЕНЗОПИРАН-2-ОНА

А.З. Абышев[1], К.Б. Нгуен[1]*

Резюме. Кумарины (известные как производные 2Н-1-бензопиран-2-она или 2Н-хромен-2-она) в отличие от других групп гетероциклических соединений имеют более разнообразные структуры. Они представляют собой важный класс фармакологических агентов, обладающих целым рядом различных физиологических свойств, в том числе противоопухолевой, антиоксидантной, противовоспалительной, антиВИЧ-, антикоагулянтной, антибактериальной, аналгезирующей, сравнительной иммуномодуляцией. В последнее время кумарины привлекают внимание исследователей, работающих в различных областях науки. Очевидно, это связано с тем, что многие вещества из этого класса гетероциклических соединений оказались источником разработки высокоактивных лекарственных средств для лечения нескольких заболеваний. Многие из этих веществ представляют собой комбинированные (гибридные) молекулы, которые разработаны с использованием концепции молекулярной гибридизации и проявляют различные виды фармакологической активности. В этом обзоре основное внимание будет уделено последним достижениям в области исследования молекулярных и клеточных механизмах действия комбинированных производных кумарина, участвующих в отношениях между «структурой и активностью» (SAR) этих чрезвычайно интересных гетероциклических соединений.

Ключевые слова: кумарины, отношения между «структурой и активностью», противораковое, антиоксидантное, антикоагулянтное, противовоспалительное, противомикробное действие.

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

A.Z. Abyshev[1], C.B. Nguyen[1]*

Abstract. Coumarins (also known as 2H-1-benzopyran-2-one or 2H-chromen-2-one), in contrast to other groups of heterocyclic compounds, are of many different structures. They constitute an important class of pharmacological agents possessing a range of different physiological activities including anti-cancer, anti-oxidant, anti-inflammation, anti-HIV, anticoagulant, anti-bacterial, analgesic, comparative immune-modulation. Recently, coumarins have attracted intense research interest in various fields of science. Of great interest is the possibility that many substances from this class of heterocyclic compounds could be a source of the development of highly active drugs for the therapy of several diseases. Many of these agents are combined (hybrid) molecules, which are designed through concept of molecular hybridization and have shown multiple pharmacological activities. This review will focus on recent advances in the molecular and cellular mechanisms of the action of the combined coumarin derivatives involved in the relationship between the «structure and activity» ((SAR) of these highly interesting heterocyclic compounds.

Keywords: coumarins, structure-activity relationship, anti-cancer, anti-oxidant, anti-coagulant, anti-inflammation, anti-microorganism.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 93009, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg Chemical-Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of Russia, 14 A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: nguyencongbang.ru@gmail.com
Тел.: +7 (900) 621 81 68

ВВЕДЕНИЕ

Среди разнообразных гетероциклических соединений в практическом отношении весьма важными являются вещества ряда 2Н-1-бензопиран-2-она (кумарина) и его многочисленные природные и синтетические производные. Эти соединения, к которым в настоящее время привлечено внимание химиков, биохимиков, фармакологов и клиницистов, представляются интересными и перспективными для создания ряда новых, наиболее активных лечебных препаратов с ценным терапевтическим эффектом, особенно для лечения болезней сердечно-сосудистой системы, злокачественных опухолей и инфекционных заболеваний. Широкие фармакологические исследования указанной группы веществ начались сравнительно недавно, но уже сейчас препараты кумаринового ряда широко применяются в медицинской практике для лечения различных заболеваний [1]. Эти препараты, как правило, созданы на основе синтетических, ковалентно комбинированных производных кумарина или же модификаций имеющихся в них заместителей, либо введением в различные положения кумаринового ядра аминоалкильных, сложноэфирных и других радикалов [1–3]. Однако следует отметить, что многочисленные индивидуальные кумариновые производные пока не получили всесторонней фармакологической оценки.

Тем не менее существует немало доказательств того, что кумарины являются ведущими соединениями для разработки противовирусных препаратов против ВИЧ, антикоагулянтов непрямого действия, антагонистов ионов кальция и др. Описание прогресса в области открытия, изучения структур, а также зависимости «*структура – активность*» у кумаринов, например, с антиВИЧ-активностью – задача очень непростая. Однако следует установить взаимосвязь имеющихся результатов, которая поможет исследователям в процессе открытия и развития новых, более активных природных и синтетических соединений, а также создания на их основе новых высокоактивных лекарственных препаратов. Кроме того, вполне возможно модифицировать структуры многих природных кумаринов, то есть получить полусинтетические кумариновые производные ведущих соединений с антиВИЧ-активностью с целью разработки новых препаратов против СПИДа. При этом методы молекулярного моделирования могут быть потенциальным инструментом развития этого научного направления, поскольку они позволяют усовершенствовать методы создания, визуализации, анализа и хранения модели комплексных молекулярных систем, которые могут помочь интерпретировать отношения «*структура – активность*».

СИНТЕЗ КОВАЛЕНТНО КОМБИНИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Определенный теоретический и практический интерес представляет сочетанное применение ковалентно комбинированных иммунобиологических и химиопрепаратов, стимуляторов неспецифического иммунитета. Нами синтезировано более 150 таких новых соединений и изучена их противовирусная активность. Результаты этих исследований широко представлены в монографиях [1–5] и обзорных статьях [6–9].

На данном этапе исследований полученные экспериментальные данные показывают, что противовирусная активность таких комбинированных соединений, особенно их пролонгированных форм, превосходит активность известных противовирусных препаратов, таких как ацикловир, азидотимидин, ремантадин и др. Поэтому мы считаем, что интенсивный целенаправленный поиск новых высокоактивных противовирусных и других средств пролонгированного действия следует вести именно в этом направлении, так как в данном случае имеется возможность создания поливалентных химиотерапевтических препаратов, состоящих из нескольких комбинированных соединений с различными химиопрепаратами (например, ацикловиром, азидотимидином и другими нуклеиновыми основаниями) или же иммуномодуляторами, конъюгированными с соответствующими антителами и химиопрепаратами. Особое внимание при этом следует обратить на гидрофобно-гидрофильный характер исследуемых комбинированных соединений, поскольку, как показали наши исследования, наиболее активными в отношении различных заболеваний сердечно-сосудистой системы и вирусных инфекций оказались главным образом гидрофобные соединения [1–9].

Синтез таких ковалентно комбинированных соединений осуществляли в соответствующих условиях химических реакций либо при прямом взаимодействии исходных субстанций – производных кумарина с таковыми различных лекарственных препаратов, либо при использовании подходящих спейсеров для их конденсации. Строение синтезированных комбинированных соединений установлено с использованием современных физико-химических и спектральных методов [1–9]. Структуры некоторых из них представлены на рисунках 1 и 2.

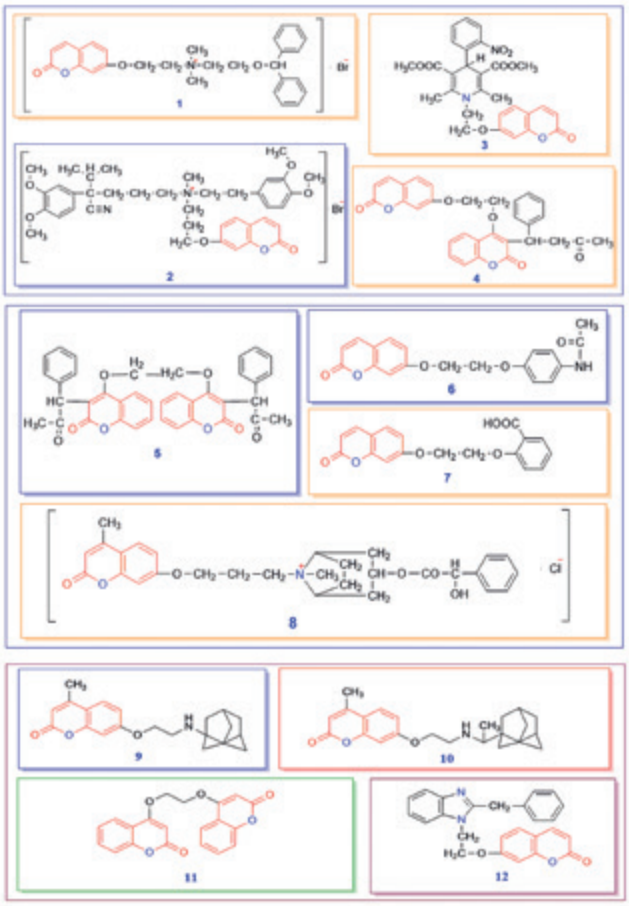


Рисунок 1. Комбинированные лекарственные субстанции:

1 – димедрол – 7-БЭК; 2 – верапамил – 7-БПК; 3 – нифедипин – 7-БЭК; 4 – варфарин – 7-БЭК; 5 – димер варфарина; 6 – парацетамол – 7-БЭК; 7 – салициловая кислота – 7-БЭК; 8 – гоматропин – 4-Ме-БПК; 9 – амантадин – 4-Ме-БЭК; 10 – ремантадин – 4-Ме-БЭК; 11 – димер 4-оксикумарина; 12 – дибазол – 7-БЭК

В настоящее время зарубежными авторами также синтезированы многочисленные комбинированные соединения, результаты широко представлены в мировой литературе [10–24]. В этих работах в основном рассматриваются результаты синтеза и изучения фар-

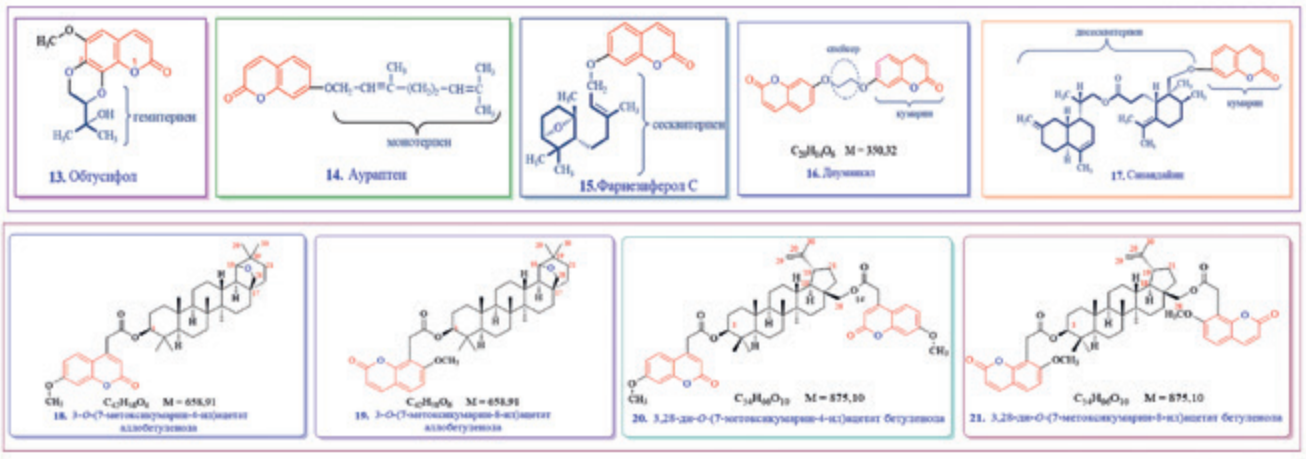


Рисунок 2. Структуры некоторых перспективных комбинированных соединений

макологических свойств димерных производных кумарина, особенно аналогов дикумарола, ковалентно комбинированных с различными гетероциклическими соединениями. Ниже представлены структуры некоторых из них, наиболее перспективных для специалистов в области экспериментальной и клинической фармакологии (рисунок 3, **22-54**).

При этом следует особенно подчеркнуть, что при комбинировании различных субстанций соответствующих лекарственных препаратов с производными кумарина полученные конъюгаты не только приобретают более выраженную пролонгированную фармакологическую активность, но и проявляют интенсивную флуоресценцию, что позволяет использовать

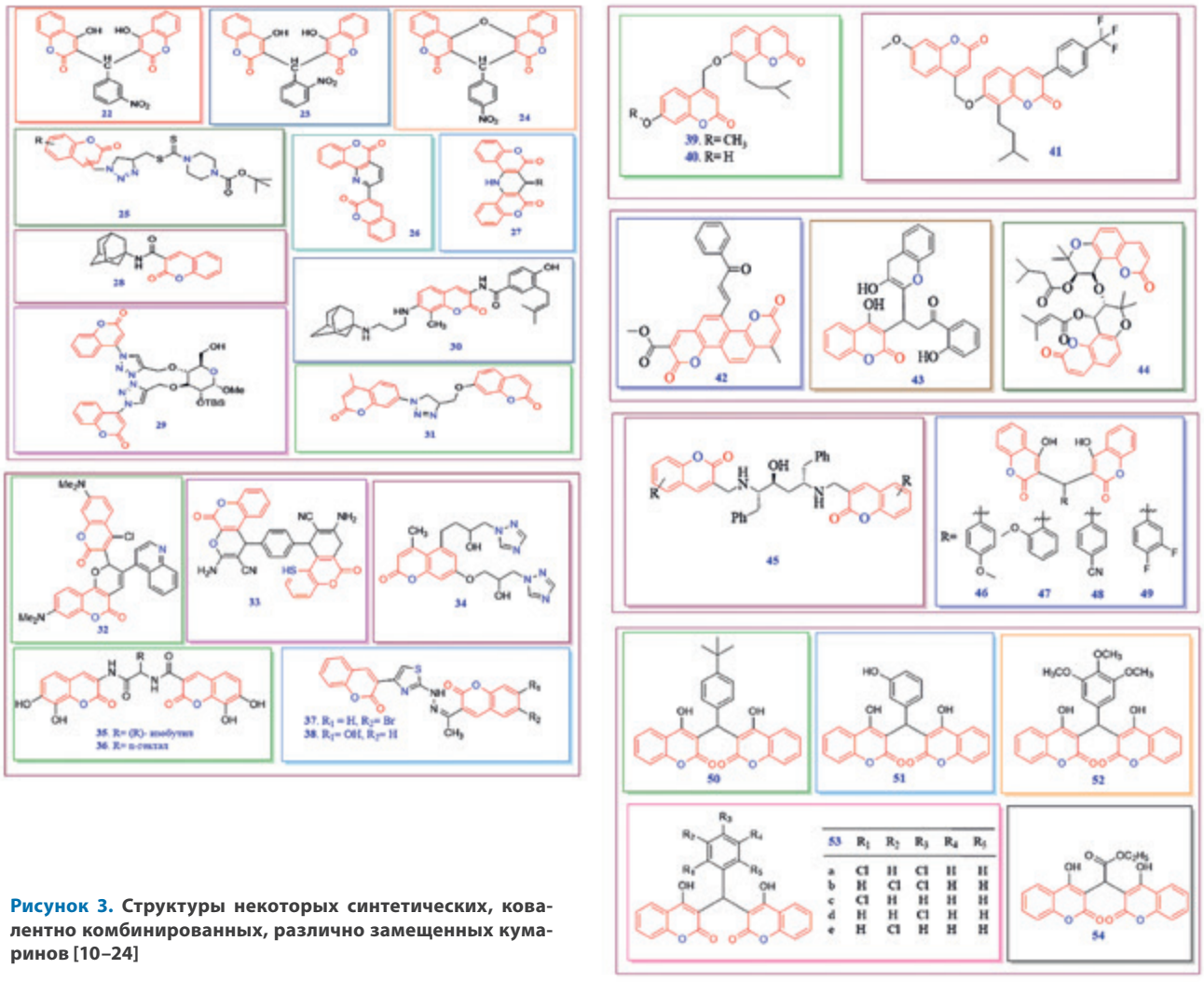


Рисунок 3. Структуры некоторых синтетических, ковалентно комбинированных, различно замещенных кумаринов [10–24]

это свойство не только для разработки высокочувствительных флуориметрических методов контроля их качества при производстве, но и для создания новых лечебно-профилактических препаратов и иммунобиологические диагностикумы для определения антигенов различных вирусов – гриппа, герпеса и ВИЧ – в биологических жидкостях. Это научное направление развивается нами в течение многих лет, полученные результаты обобщены в монографии **А.З. Абышева, Э.М. Агаева и А.А. Абдулла-заде «Природные и синтетические антигены»**, изданной в 2007 году [25].

СИНТЕЗ КОВАЛЕНТНО КОМБИНИРОВАННЫХ СУБСТРАТОВ

В настоящее время это новое научное направление в области синтеза и анализа конъюгированных (комбинированных) антигенов интенсивно развивается не только нами, но и многими научными центрами за рубежом и широко освещается в научной литературе. Ниже представляем некоторые результаты в качестве важной информации для специалистов, работающих в данной области.

Следует заметить, что совсем недавно в литературе освещались достаточно интересные работы по синтезу ковалентно комбинированных биологических субстратов. Например, в работе японских исследователей представлены результаты изучения фузариелина А [26] (**55**, FSA), обладающего антигрибковыми и антипролиферативными свойствами. Авторы проводили комбинирование с фузариелином А 7-N-диметил-3-карбоксикумарина, замещенного азидофенилом (**56**, CAFSA) (рисунки 4, 5).

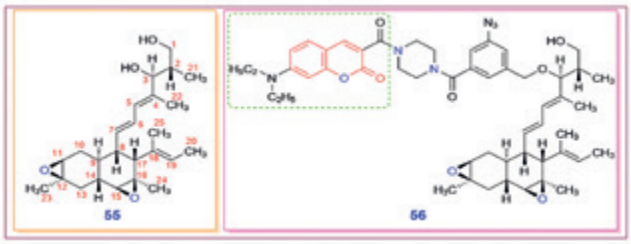


Рисунок 4. Структуры FSA (55) и CAFSA (57) [26]

В другой работе, посвященной исследованию ингибиторов протеазы ботулинического нейротоксина типа В (**59**), рассматривается вопрос о применении флуоресцентных свойств комбинированного соединения в анализе ферментных образцов легкой цепи ботулинического нейротоксина с целью отслеживания реакций, катализируемых данными ферментами [27]. Известно, что ботулинический нейротоксин состоит из двух цепей: тяжелой (100 кДа) и легкой (50 кДа).

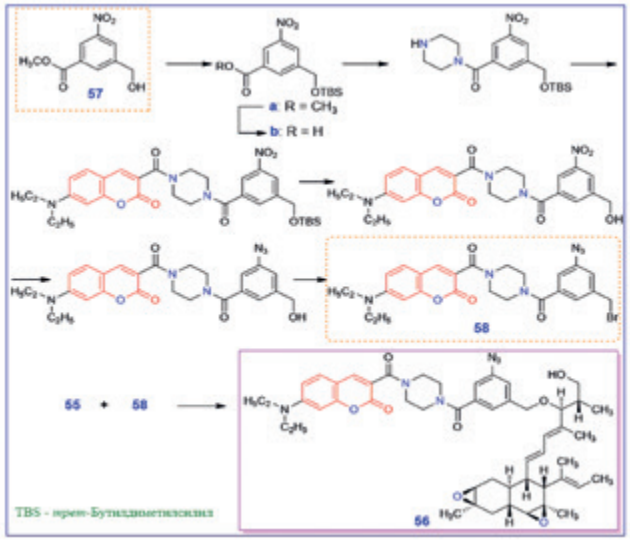


Рисунок 5. Синтез комбинированного CAFSA [26]

Ботулотоксин в виде высокомолекулярного комплекса малотоксичен и является прототоксином. В результате мягкого протеолиза, осуществляемого эндогенными протеазами, прототоксин распадается на два компонента: L-лёгкий и H-тяжёлый. L-компонент оказывает токсическое действие на клетку-мишень, проявляющееся в угнетении нервно-мышечной передачи, что является причиной интенсивного поиска ингибиторов эндогенных протеаз. H-компонент осуществляет прикрепление к рецептору клетки-мишени. Это исследование позволяет определить ингибиторы протеазы ботулинического нейротоксина и изучить их кинетические параметры (рисунок 6), что чрезвычайно важно при синтезе соответствующих ингибиторов.

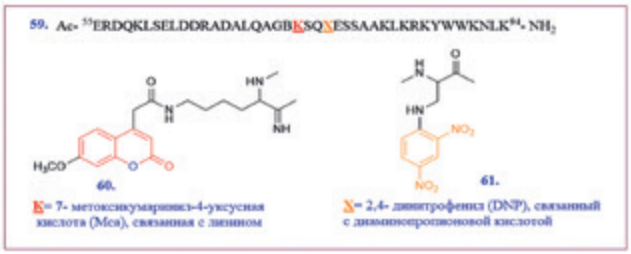


Рисунок 6. Структура синтетической легкой цепи протеазы (BoNT/B), комбинированной с 7-метокси-4-уксусной кислотой (60) и 2,4-динитрофенилом (61) [27]

Группа американских исследователей изучала сульфаниламиды в качестве ингибиторов карбоангидразы IX – фермента, преобладающего в опухолевых клетках [28]. Ими установлено, что активность фермента повышается в условиях гипоксии, что способствует ацидозу и дальнейшему прогрессированию рака. Полагают, что сульфаниламидные ингибиторы являются перспективными для противораковой терапии. Они накапливаются только в гипоксических

клетках, содержащих карбоангидразу IX. Поэтому для отслеживания связывания сульфаниламидных ингибиторов с гипоксическими клетками и проникновения через клеточную мембрану их метят флуоресцирующими реагентами – производными кумарина (**62**), флуоресцеина (**63**) и др. (рисунок 7) [29].

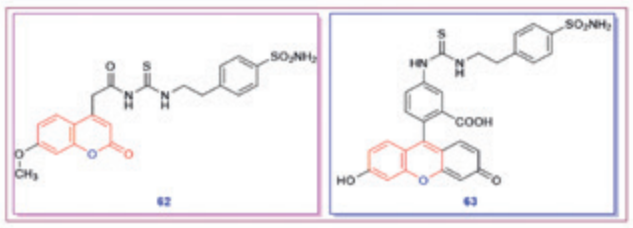


Рисунок 7. Структура субстрата сульфаниламида, комбинированного 7-метокси-4-уксусной кислотой и флуоресцеином [28]

Следующее исследование посвящено цитохрому P450 3A4 [29], важному представителю цитохромов P450, принимающему участие в метаболизме более 50% лекарственных препаратов. Комбинирование данного субстрата проведено с использованием других флуоресцентных реагентов, например диазафлавиновой группы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что при взаимодействии лекарственных веществ в организме происходит ингибирование каталитической активности цитохрома P450 3A4, что может приводить к серьезным токсическим эффектам. Поэтому при изучении новых лекарственных препаратов обязательно тестируют потенциал ингибирования цитохрома P450 *in vitro*. В настоящее время для этой цели создан новый метод исследования сродства лекарственного препарата к цитохрому P450 3A4 с применением деазафлавина. В приведенной в статье эксперименте тестостерон (**64**) пометили по 6-β-положению флуоресцирующей деазафлавиновой группой и показали, что при вытеснении флуоресцентного производного тестостерона из активного центра цитохрома P450 3A4 (**65**) исследуемым лекарственным препаратом [например, нифедипином (**66**)] можно производить измерение флуоресценции и оценивать химическое сродство цитохрома P450 к новому препарату **64-67** (рисунки 8, 9).

В наших многолетних исследованиях для комбинирования различных биологически важных низкомолекулярных лекарственных препаратов и биополимеров преимущественно используются производные кумарина. При этом применяются различные, специально разработанные для этой цели технологии синтеза и фотореакции. Последняя является включающим одну стадию информативным тестом при изучении

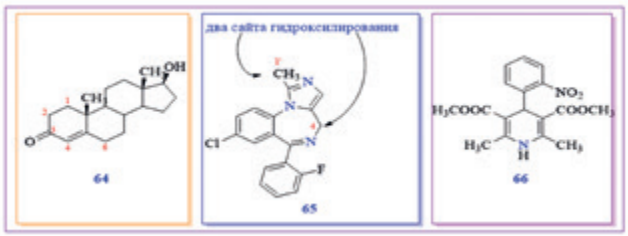


Рисунок 8. Модель субстрата CYP3A4 [29]

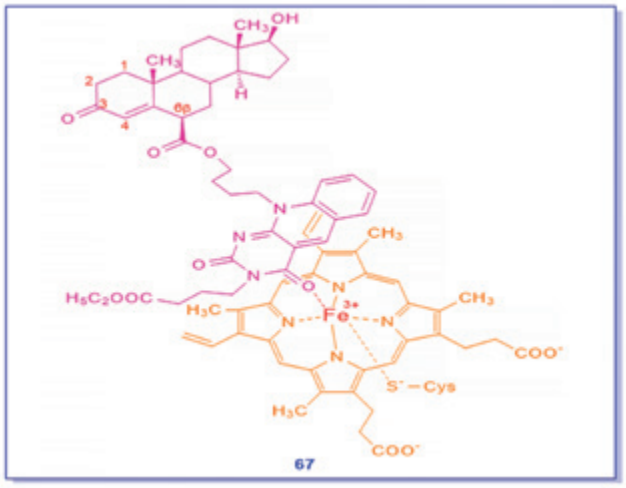


Рисунок 9. Структура соединения, образованного при комбинировании деазафлавина с гем-тиолатом ко-фактора CYP3A4 [29]

конформации и динамики взаимодействия макромолекул с низкомолекулярными соединениями [25] (рисунок 10) .

Другим путем одностадийного мечения биополимеров является присоединение через сульфогидрильные группы. Так, при использовании производных малеинимида последний избирательно присоединяется к сульфогидрильным группам белка, образуя ковалентную связь (рисунок 10), причем в некоторых случаях флуоресцентный реагент не обладает собственной флуоресценцией, а меченый продукт реакции приобретает способность флуоресцировать (см. схему синтеза **72** и **73** на рисунке 10). На рисунках 10 и 11 представлены структуры некоторых низкомолекулярных лекарственных веществ и биополимеров (рисунок 11), комбинированных с 7-(2'-бромэтокси)-кумарином (БЭК, **71**), 4-метил-7-(2'-бромэтокси)-кумарином (4-МБЭК, **74**) и 4-метил-7-(3'-хлорпропокси)-кумарином (4МХПК, **75**). Мечение различных иммуноглобулинов типа IgG – SH осуществлено 7-N-диэтил-3-малеимидил-кумарином (NДЭМК) (**80-82**).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из вышеизложенных данных вытекает, что мономерные кумарины и их комбинированные производные представляют собой группу высокоактивных

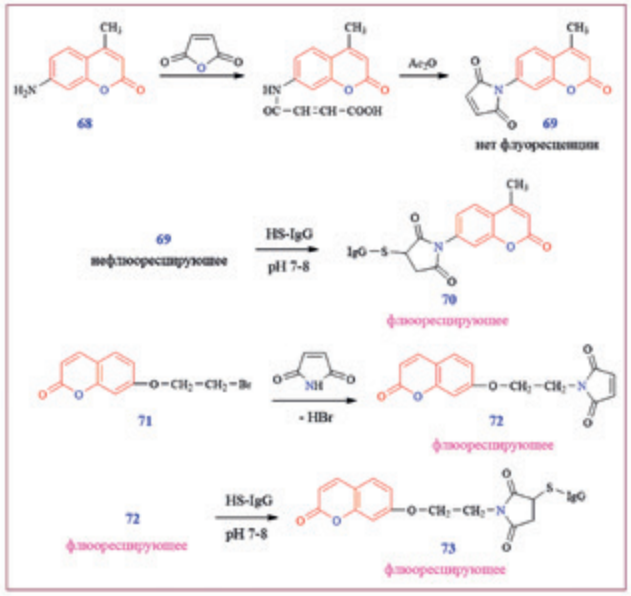


Рисунок 10. **Схема синтеза 7-(малеимидил) – 4-метилкумарина (ММК) (69), 7-(2'-малеимидил-этиленокси)-кумарина (МИЭК) (72) и их взаимодействия с сульфогидрильной группой белковых молекул (70, 73) [25]**

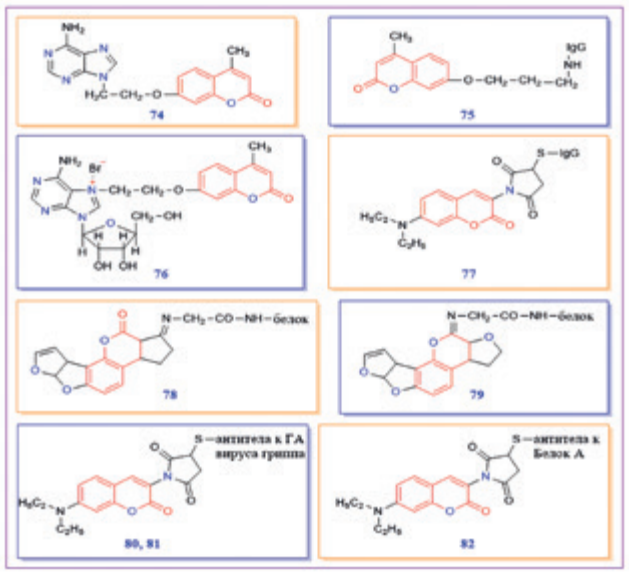


Рисунок 11. **Комбинированные биополимеры: 74 – аденил-4-МЭК, 75 – 4-МХПК-IgG, 76 – аденозил-4-МЭК, 77 – NДЭМК-IgG, 78 и 79 – афлатоксины-белок, 80 и 81 – NДЭМК – антитела к ГА вируса гриппа, продуценты – козы, ослы, 82 – NДЭМК – антитела к ГА вируса гриппа, продуценты – кролики, и NДЭМК –антитела к белку А [26]**

гетероциклических соединений, проявляющих разнонаправленные фармакологические свойства. По этой причине выделение и структурная характеристика производных кумарина вместе с развитием новых синтетических методов, а также их биологические свойства являются чрезвычайно интересной областью для большого числа исследователей, прежде всего химиков, биохимиков, фармакологов, клиницистов и практических врачей.

Поэтому изучение этой перспективной группы веществ и разработка новых синтетических стратегий является одним из важнейших научных направлений исследований при создании новых высокоактивных субстанций и их лекарственных форм.

Кроме того, еще более важно подчеркнуть, что метаболические исследования, связанные с биотрансформацией кумарина и его производных, на самом деле являются уникальной областью современной науки.

В течение многих лет нами были предприняты усилия по изучению многочисленных природных и синтетических производных кумарина с целью создания новых лекарственных препаратов изначально на основе простых кумаринов и их аналогов, а затем более сложных комбинированных форм. Неудивительно, что при этом возникало много вопросов, связанных с созданием новых соответствующих структур и их фармакологической активностью, то есть с взаимоотношениями **«структура-активность»**, на которые до сих пор нет соответствующего ответа. Тем не менее мы считаем необходимым продолжить поиск в этой области, особенно в части, относящейся к синтезу и анализу комбинированных лекарственных веществ.

Поэтому, исходя из результатов, изложенных в данной статье и в других обзорных статьях, опубликованных ранее, по общим фармакологическим и биохимическим свойствам ковалентно комбинированных соединений кумаринового ряда, мы можем заключить, что рассматриваемая группа веществ действительно является наиболее перспективной и высокоактивной и на ее основе возможно разрабатывать современные, избирательно действующие и безопасные лекарственные препараты.

Подтверждением вышеизложенного являются результаты проведенных нами обширных фундаментальных и прикладных исследований, подробно изложенные в многочисленных публикациях и монографиях, а для ряда наиболее высокоактивных комбинированных соединений [диуманкала, декурсинола, обтусифола, иммунокора, беказола, гетеровира-ГА (IgG-МИЭК), гетеровира-HBs (IGg-МИЭК) и др.], которые успешно прошли доклинические испытания, разработаны соответствующие лекарственные формы (таблетки, растворы и лиофилизаты) и нормативные документы (ФС, ФСП, лабораторные и промышленные регламенты производства, инструкции по медицинскому применению и др.), необходимые для клинических испытаний. Из них субстанция диуманкала, ее государственный стандартный образец и лекарственные формы («Диуманкал форте» и «Анкардин форте») в виде таблеток по 0,01 г одобрены Фармакологическим государственным комитетом Минздрава России как антиангинальные средства (протокол № 10 от 27.06.96),

успешно прошли клинические испытания в клиниках Санкт-Петербургского НИИ кардиологии имени В.А. Алмазова, Московского медицинского университета имени И.М. Сеченова, Волгоградского медицинского университета, Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, Санкт-Петербургского северо-западного медицинского университета имени И.И. Мечникова и приказом Министра здравоохранения Российской Федерации (приказ № 202 от 14.07.97) разрешены к применению в медицинской практике для лечения ишемической болезни сердца (ИБС) у взрослых. Результаты данных исследований защищены патентами Российской Федерации (патент России № 1836086 / А.З. Абышев, П.П. Денисенко, М.П. Пухов; патент России № 2155036 / А.З. Абышев, Г.И. Дьячук; патент России №2187303 / А.З. Абышев, Э.М. Агаев, О.В. Марищенко).

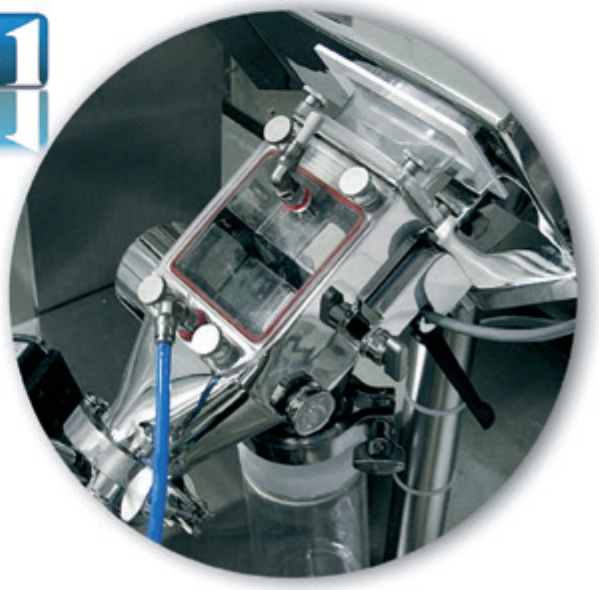
ЛИТЕРАТУРА

1. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, Р.А. Абышев. Природные и синтетические кумарины и флавоноиды. – Санкт-Петербург-Баку: Прима, 2014. 463 с.
2. А.З. Абышев, В.Х.Нгуен. Природные и синтетические тритерпеноиды. – Санкт-Петербург: Арт-Экспресс, 2015. 284 с.
3. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, Е.В. Семенов. Антагонисты ионов кальция нового поколения. – Баку.: АМУ, 2003. 236 с.
4. А. З Абышев, Э.М. Агаев, Ю. Б. Керимов, Химия и фармакология природных кумаринов. – Баку: Caspian Supplies, 2003. 112 с.
5. A.Z. Abyshev, E. M. Agayev, A.A. Abdulla-zade, A.B. Guseynov. The development of new cardiovascular, immunomodulating and antiviral drugs. – Baku: Uniprint, 2004. 46 p.
6. А.З. Абышев, Р.А Абышев., С.В. Гадзиковский, В.Х. Нгуен.В.А. Морозова. Противовирусная активность соединений кумаринового ряда. Ч. 1 // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2013. Т. 5. № 1. С. 34–41.
7. А.З. Абышев, Р.А. Абышев, С.В. Гадзиковский, В.Х. Нгуен, В.А. Морозова. Противовирусная активность соединений кумаринового ряда. Ч. 2 // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2013. Т. 5. № 2. С. 25–34.
8. А.З. Абышев, Р.А. Абышев., С.В. Гадзиковский, В.Х. Нгуен, В.А. Морозова. Современное состояние синтеза и исследования антиВИЧ-активности соединений ряда 2Н-1-бензопиран-2-она // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 33. № 1. С. 1–21.
9. A.Z. Abyshev, E.M. Agaev, E.A. Solodskaya, S.V. Gadzikovskiy, D.L. Nguyen, V.H. Nguyen. Synthesis and investigation of physical and chemical properties of diagnostic drugs labeled with fluorescent label of the 2H-1-benzopyran-2-one type // Azerbaijan Pharmaceutical and Pharmacotherapy Journal. 2012. V. 12. № 2. P. 11–19.
10. G.M. Fernanda, G.M. Joaqui'n et al. Coumarin heterocyclic derivatives: Chemical synthesis and pharmacological activity // Natural Product Reports. 2015. V. 32. № 10. P. 1472–1507.
11. N.M. Cuong et al. Paratrimerins A and B, Two New Dimeric Monoterpene-Linked Coumarin Glycosides from the Roots and Stems of *Paramignya trimera* // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 2015. V. 63. № 11. P. 945–949.
12. F. Borges et al. Simple Coumarins: Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry // Frontiers in Medicinal Chemistry. 2009. V. 4. P. 23–85.
13. A. Nocentini, F. Carta, M. Ceruso. Click-tailed coumarins with potent and selective inhibitory action against the tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2015. V. 23. № 21. P. 6955–6966
14. A. Nocentini, F. Carta et al. Synthesis and bioactive evaluation of a novel series of coumarinazoles // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2014. V. 24. № 15. P. 3605–3608.
15. J. Xu, J. Ai, S.Liu et al. Design and synthesis of 3,3′-biscoumarin-based c-Met inhibitors // Org. Biomol. Chem. 2014. V. 12. № 22. P. 3721–3734.
16. R. Gali, J. Banothu. One-pot multicomponent synthesis of indole incorporated thiazolylcoumarins and their antibacterial, anticancer and DNA cleavage studies // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2015. V. 25. № 1. P. 106–112.
17. O. Talhi, M. Schnekenburger et al. Bis (4-hydroxy-2H-chromen-2-one): Synthesis and effects on leukemic cell lines proliferation and NF-κB regulation // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2014. V. 22. № 11. P. 3008–3015.
18. Z. Huiping, S.J. Brian Blagg. Novobiocin analogues with second-generation noviose surrogates // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2013. V. 23. № 2. P. 552–557.
19. R. Vardanyan, V. Hruby. Synthesis of essential drugs. – Elsevier. 2006. P. 323–335.
20. J. Joubert, S. van Dyk. Synthesis and evaluation of fluorescent heterocyclic aminoadamantanes as multifunctional neuroprotective agents // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2011. V. 19. № 13. P. 3935–3944.
21. V.S. Koneni, K.j Manoj et.al. Synthesis and anti-inflammatory activity of novel biscoumarin–chalcone hybrids // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2011. V. 21. № 15. P. 4480–4484
22. L. You, R. An, X. Wang, Y. Li. Discovery of novel osthole derivatives as potential anti-breast cancer treatment // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2010. V. 20. № 24. P. 7426–7428.
23. H.Y. Zhou, F.Q. Dong et al. Antitumor Activities of Biscoumarin and Dihydropyran Derivatives // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2016 V. 26. № 16. P. 3876–3880.
24. P. Santhosh et.al. Advances in Structure and Activity Relationship of Coumarin Derivatives. – San Diego: Academic Press, 2016. 182 p.
25. А.З. Абышев, Э.М. Агаев, А.А. Абдулла-заде. Природные и синтетические антигены. – Баку: Verje, 2007. 344с.
26. N.T. Salzameda, J.T. Barbieri, K.D. Janda. Identification of binding proteins of fusarielin A as actin and tubulin // Chem. Pharm. Bull. 2010. V. 58. № 1. P. 129–134.
27. N.T. Salzameda, J.T. Barbieri, K.D. Janda. Synthetic substrate for application in both high and low throughput assays for botulinum neurotoxin B protease inhibitors // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009. V. 19. P. 5848–5850.
28. A. Cecchi, A. Hulikova, J. Pastorek. Carbonic anhydrase inhibitors. Design of fluorescent sulfonamides as probes of tumor-associated carbonic anhydrase IX that inhibit isozyme IX-mediated acidification of hypoxic tumors // J. Med. Chem. 2005. V. 48. № 15. P. 4834–4841.
29. A. Clougnet, C. Stoessel, W.D. Woggon. Design and synthesis of a new fluorescent probe for cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003. V. 13. P. 3643–3645.

Металлодетекторы
для фармацевтического применения

CEIA

CEIA THS 21 series



THS/PH21N-DT

Пылезащищенное исполнение транзитной части и системы выгрузки позволяют предотвратить попадание частиц продукта в окружающую среду

Основные преимущества

- Достоверные результаты
- Высокая скорость анализа
- Не требует обслуживания
- Различные конфигурации
- Соответствует требованиям FDA 21 CFR Part 11
  - ☑ Сохранность данных
  - ☑ Подлинность данных
  - ☑ Единообразие измерений
- Дизайн и конструкция соответствуют требованиям GMP и FDA 21 CFR Parts 210 и 211

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 615.31

СИНТЕЗ И СТРОЕНИЕ НЕКОТОРЫХ N-АРИЛБЕНЗАМИДИНОВ

Е.В. Куваева[1]*, Д.А. Колесник[1], Г.В. Ксенофонтова[1], Т.Л. Семакова[1], И.П. Яковлев[1]

Резюме. Изучена реакция бензонитрила с некоторыми ариламинами. Установлено, что строение ариламинов влияет на выход N-арилбензамидинов и возможность их получения, что подтверждено квантово-химическими расчетами. Реакция бензонитрила с ариламинами является термодинамически контролируемой реакцией. Максимальные выходы продукта были получены при t=180 °С. Строение синтезированных соединений доказано с помощью современных физико-химических методов анализа: ^{1}H-ЯМР-, ^{13}C-ЯМР-, ^{15}N-HCQS-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа (РСА).

Ключевые слова: бензонитрил, ариламины, N-арилбензамидины, ЯМР-спектроскопия, рентгеноструктурный анализ, квантово-химические расчеты.

SYNTHESIS AND STRUCTURE OF SOME N-ARYLBENZAMIDINES

E.V. Kuvaeva[1]*, D.A. Kolesnik[1], G.V. Ksenofontova[1], T.L. Semakova[1], I.P. Yakovlev[1]

Abstract. The reaction of benzonitrile with some arylamines was studied. It was found that the structure of arylamines affects the yield of N-arylbenzamidines and the possibility of their obtainment, which was confirmed by quantum-chemical calculations. The reaction of benzonitrile with arylamines is thermodynamically controlled. Maximal yield of product was obtained at t=180 °С. The structure of synthesized compounds was proved by means of modern physicochemical methods of analysis: NMR ^{1}H-, ^{13}C-, ^{15}N-spectroscopy, X-ray diffraction analysis (RSA).

Keywords: benzonitrile, arylamines, N-arylbenzamidines, NMR spectroscopy, X-ray diffraction analysis, quantum-chemical calculations.

1 – ФГОУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России (ФГОУ ВО СПХФА Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – St. Petersburg Chemical-Pharmaceutical Academy of the Ministry of Healthcare of Russia, 14 A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Амидины обладают высокой биологической активностью. Амидиновый фрагмент (обычно в составе гетероцикла) входит в структуру многих лекарственных препаратов, например нафтизина, галазолина, фентоламина, хлордиазепоксида. Амидиновые основания часто используются как дезинфицирующие средства. Также известно, что структурные аналоги циклических амидинов обладают противопротозойной, антидепрессантной и антигипертензивной активностью. В то же время методы получения амидинов, известные из литературы, не носят систематического характера, а результаты изучения их строения, на наш взгляд, нельзя считать строго обоснованными, что является несомненным пробелом в изучении этой интересной группы органических соединений, тем более что многие из них являются исходными соединениями в синтезе гетероциклических соединений. Поэтому разработка эффективных методов получения таких соединений и изучение их строения стало целью нашей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали бензонитрил (CAS № 100-47-0, Sigma-Aldrich), анилин (ч.д.а., ЗАО «Вектон», Россия), 2-броманилин (ч., ЗАО «Вектон», Россия), 3-броманилин (ч., ЗАО «Вектон», Россия), 4-броманилин (ч., ЗАО «Вектон», Россия), 3-нитроанилин (ч., ЗАО «Вектон», Россия), 4-нитроанилин (ч.д.а., ЗАО «Вектон», Россия), 4-метоксианилин (ч.д.а., ЗАО «Вектон», Россия), 2-метиланилин (ч., ЗАО «Вектон», Россия), 3-метиланилин (ИМП, ЗАО «Вектон», Россия), 4-метиланилин (ч.д.а., ЗАО «Вектон», Россия).

Спектры ^{1}H-ЯМР, ^{13}C-ЯМР, ^{15}N-HSQC растворов веществ в ДМСО-d_6 записывали на спектрометре Bruker AM-400 (400 МГц) (США).

Монокристальный рентгено-структурный анализ (РСА) осуществляли на дифрактометре Bruker SMART 1000 CCD (MoK_{α}-излучение) (США). Кристаллы соединений, прозрачные бесцветные иголки, были выращены из этанольного раствора путем медленного испарения при 18–20 °С.

Теплота образования веществ была рассчитана полуэмпирическими методами AM1, PM3, MNDO, MINDO/3 с помощью пакета программ GAMESS. Заряды атомов азота в ариламинах были рассчитаны полуэмпирическими методами AM1, RM1, MNDO с помощью пакета программ GAMESS.

Методика

К смеси 0,34 моль ариламина (II а-к) и 0,33 моль бензонитрила (I а) при перемешивании в течение 20 мин прибавляли 0,34 моль безводного $AlCl_3$. Смесь нагревали в течение 30 мин до 200 °С и в расплавленном состоянии медленно выливали в 1,2%-й раствор HCl. К полученной реакционной массе прибавляли 10,0 г активированного угля, полученную суспензию отфильтровывали. Фильтрат приливали к 15,5%-му раствору NaOH. Выпавший осадок отфильтровывали, сушили и перекристаллизовывали из бензола. Выход – 53–90%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

N-арилбензамидины (III а-к) были получены нами взаимодействием ариламинов (II а-к) с бензонитрилом (I а) в присутствии безводного алюминия хлорида (рисунок 1) [1, 2].

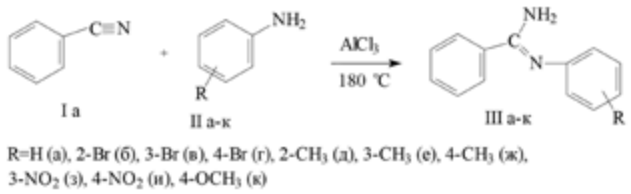


Рисунок 1. Синтез *N*-арилбензамидинов

Было установлено, что электронодонорные заместители в кольце ариламина повышают выход продуктов на 20–30%, что, возможно, связано с увеличением нуклеофильности соответствующих аминов. Введение электроноакцепторных заместителей приводит к снижению выхода продуктов на 30–40%.

Наличие нитрогруппы в *о*-положении настолько понижает реакционную способность амина, что ожидаемый амидин получить не удается. Этот факт хорошо коррелируется с результатами квантово-химических расчетов, выполненных полуэмпирическими методами AM1, MNDO, RM1, которые показывают, что нитрогруппа, особенно в положении 2, приводит к понижению отрицательного заряда на атоме азота, а следовательно, и уменьшению нуклеофильности ариламинов (таблица 1).

Нами было установлено, что минимальная температура, при которой возможно получение монозамещенных *N*-арилбензамидинов (III а-к), составляет 150 °С. Максимальные выходы продуктов были получены при температуре 180 °С.

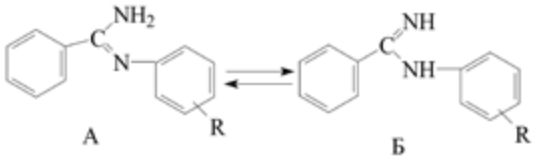
Таблица 1.

Заряды на атоме азота (NH_2-группы) в ариламинах (III а-к)

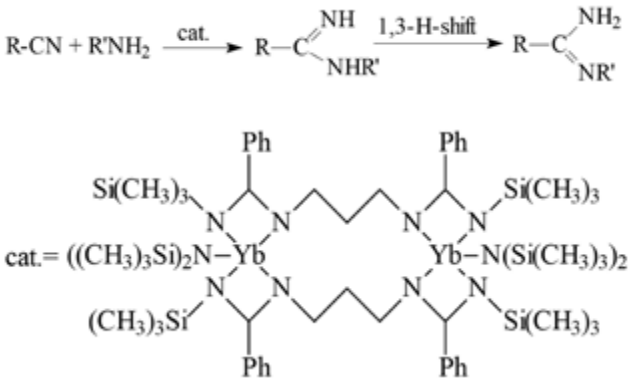
№ соед.	R	Заряды на атоме азота		
		AM1	MNDO	RM1
III а	H	–0,412	–0,381	–0,491
III	2-NO_2	–0,371	–0,340	–0,454
III з	3-NO_2	–0,402	–0,371	–0,482
III и	4-NO_2	–0,386	–0,356	–0,467
III б	2-Br	–0,401	–0,230	–0,476
III в	3-Br	–0,407	–0,375	–0,483
III г	4-Br	–0,407	–0,373	–0,484
III д	2-CH_3	–0,411	–0,231	–0,489
III е	3-CH_3	–0,413	–0,382	–0,492
III ж	4-CH_3	–0,412	–0,379	–0,491
III к	4-OCH_3	–0,416	–0,221	–0,495

Строение N-арилбензамидинов

Для синтезированных *N*-арилбензамидинов теоретически возможно существование двух таутомерных форм (А, Б).



Авторы работ [3, 4] отдают предпочтение таутомеру Б, однако без достаточных, на наш взгляд, оснований. Для превращения таутомера Б в таутомер А используется катализатор сложного строения [3].



Строение *N*-арилбензамидинов (III а-к) нами доказано методами ^{1}H-ЯМР-, ^{13}C-ЯМР-, ^{15}N-HCQS-спектроскопии, а также с помощью РСА.

Спектры ^{1}H-ЯМР *N*-арилбензамидинов (III а-к) в ДМСО-d_6 характеризуются наличием резонансных сигналов протонов ароматических колец (~6,63–8,14 м.д.), сигналов в области ~2,10–2,30 м.д. (CH_3-Ar) в спектрах соединений (III д-ж), протонов группы OCH_3 при 3,30 м.д. (III к), а также уширенного сигнала в области ~5,88–6,73 м.д. протонов группы NH_2 полученных соединений.

На рисунке 2 представлен спектр ^{1}H-ЯМР *N*-4-метилфенил-бензамидина (III ж) в ДМСО-d_6. Наличие одного уширенного сигнала при 6,20 м.д. с интегральной интенсивностью ~2H позволяет говорить о том, что это соединение в растворе ДМСО-d_6 имеет преобладающую таутомерную форму А.

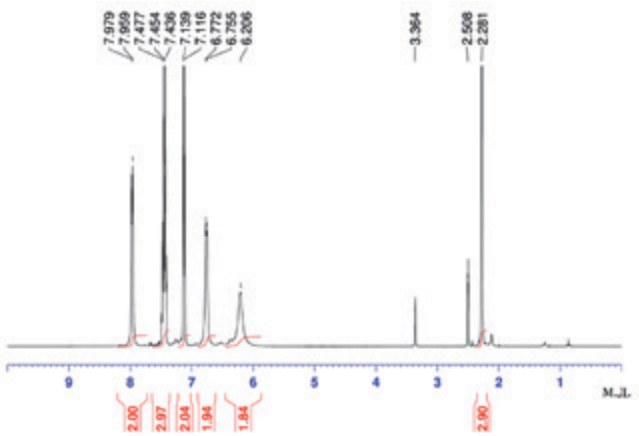


Рисунок 2. Спектр ^{1}H-ЯМР раствора N-4-метилфенилбензамидина (III ж) в ДМСО-d_6

Данные двумерной корреляционной спектроскопии ^{15}*N*-HSQC (HSQC – Heteronuclear Single Quantum Correlation), показывающие прямые корреляции атомов азота со связанными с ними протонами, также свидетельствуют о том, что соединения (III а-к) существуют в основном в таутомерной форме А.

В спектре ^{15}*N*-HSQC *N*-4-метилфенилбензамидина (III ж) виден всего один корреляционный пик между сигналом атома азота ^{15}*N* и сигналом связанных с ним протонов (рисунок 3).

В спектрах ^{13}C-ЯМР соединений (III а-к), помимо сигналов атомов углерода бензольных колец в области ~114,07–151,78 м.д. и сигналов углерода метильных и метоксигрупп (~17,02 и 55,59 м.д.) в слабом поле при ~151,15–155,45 м.д., наблюдается сигнал атомов углерода группы –C=N.

Спектр ^{13}C-ЯМР соединения (III ж) в ДМСО-d_6 представлен на рисунке 4.

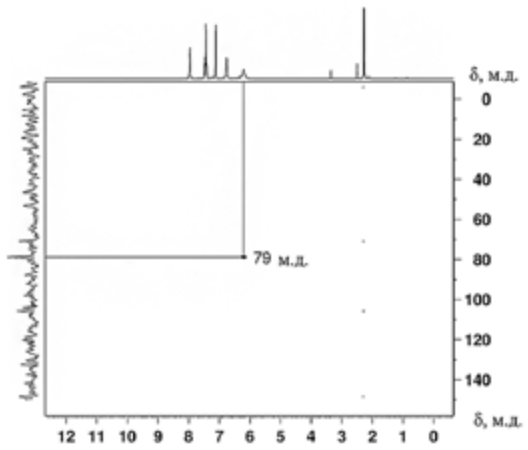


Рисунок 3. Спектр ^{15}N-HSQC раствора N-4-метилфенилбензамидина (III ж) в ДМСО-d_6

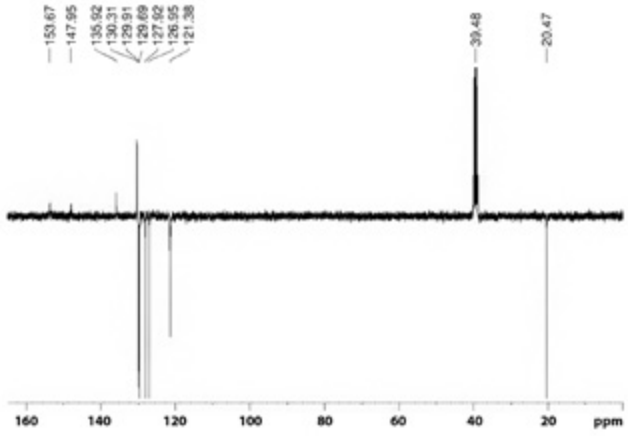


Рисунок 4. Спектр ^{13}C-ЯМР раствора N-4-метилфенилбензамидина (III ж) в ДМСО-d_6

Строение полученных *N*-арилбензамидинов (III а-к) в кристаллическом состоянии было однозначно доказано монокристальным рентгеноструктурным анализом (рисунки 4, 5), который показал, что *N*-арилбензамидины (III а-к) существуют в *N*-арилиминно-аминной таутомерной форме (А).

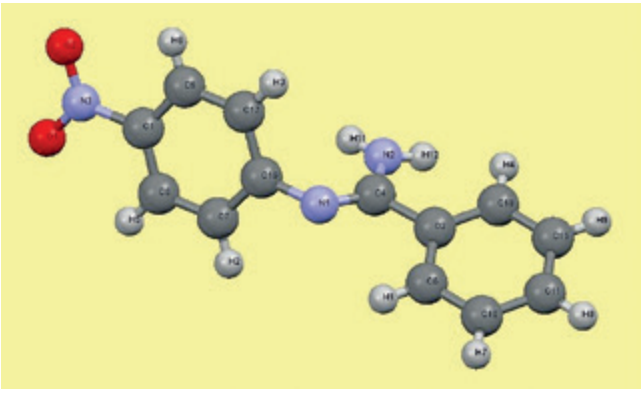


Рисунок 5. Молекулярное строение N-4-нитрофенилбензамидина (III и)

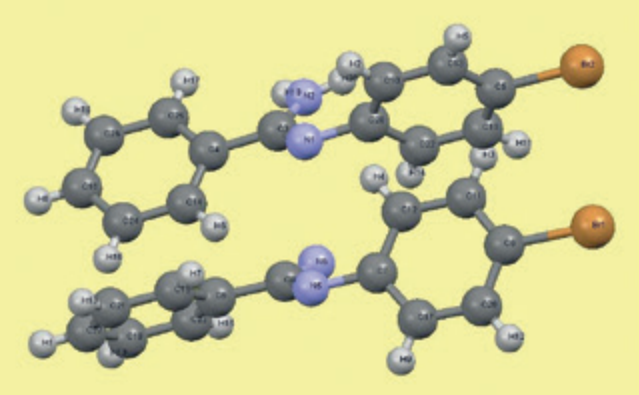


Рисунок 6. Молекулярное строение N-4-бромфенилбензамидина (III г)

Одним из критериев выбора существования N-арилбензамидинов в таутомерной форме А в газовой фазе может служить теплота образования соответствующих таутомеров, которая была рассчитана полуэмпирическими методами AM1, PM3, MNDO, MINDO/3 с помощью пакета программ GAMESS для молекул, находящихся в вакууме при °К (таблица 2).

Таблица 2.

Теплота образования N-арилбензамидинов (III а, д) в вакууме при °К

	Теплота образования кДж/моль			
№ соединение	AM1	PM3	MNDO	MINDO/3
III (а)-А N-фенилбензамидин	79,58	73,55	80,48	61,32
III (а)-Б N-фенилбензамидин	83,20	74,91	85,64	66,67
III (д)-А N-4-нитрофенилбензамидин	81,04	62,94	94,76	41,52
III (д)-Б N-4-нитрофенилбензамидин	85,36	64,76	100,98	47,03

Согласно проведенным расчетам наиболее предпочтительной, энергетически более устойчивой является таутомерная форма А. Теплота образования таутомера А меньше на величину ~4 кДж/моль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами установлено, что возможность и направление реакции бензонитрила с ариламинами определяется электронной природой заместителя в молекулах последних и является термодинамически контролируемой реакцией, позволяющей получать *N*-арилбензамидины с максимальным выходом при t=180 °C.

По данным ^{1}H-ЯМР-, ^{13}C-ЯМР-, ^{15}N-HSQC-спектрам, РСА *N*-арилбензамидины существуют в *N*-арилиминоаминной 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. 48. 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. J. Wang, F. Xu, T. Cai, Q. Shen. Addition of Amines to Nitriles Catalyzed by Ytterbium Amides: An Efficient One-Step Synthesis of Monosubstituted N-Arylamidines // Organic Lett. 2008. № 10(3). P. 445–448.
4. L. Zhou, Y. Zhang. Low-Valent Titanium Induced Reductive Coupling of Nitriles with Nitro Compound // Synthetic Communications. 1998. № 28(17). P. 3249–3262.

УДК 547.458

ОСОБЕННОСТИ КИСЛОТНОГО ГИДРОЛИЗА АМИДА КАРБОКСИЭТИЛАЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Т.И. Тарадейко[1]*, М.В. Сидорова[1], С.Н. Галашева[1], А.А. Иозеп[1]

Резюме. Изучен кислотный гидролиз амида карбоксиэтилальгиновой кислоты, который приводит к уменьшению амидных групп в полисахариде или к образованию незамещенной альгиновой кислоты. Определено влияние температуры реакции, характеристик исходного амида и наличия азотистой кислоты в реакционной массе на результаты реакции.

Ключевые слова: альгиновая кислота, амид карбоксиэтилальгиновой кислоты, карбоксиэтилальгиновая кислота, кислотный гидролиз, полимераналогичная реакция.

THE FEATURES OF ACID HYDROLYSIS OF AMIDE OF CARBOXYETHYL ALGINIC ACID

T.I. Taradeyko[1]*, M.V. Sidorova[1], S.N. Galasheva[1], A.A. Iozep[1]

Abstract. The acid hydrolysis of amide of carboxyethyl alginic acid was studied. The influence of reaction's temperature, characteristics of mother amide and presence of nitrous acid in the reacting mass to the results of the reaction.

Keywords: alginic acid, amide of carboxyethyl alginic acid, carboxyethyl alginic acid, acid hydrolysis, polymeranalogous reaction.

1 – ФГОУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России (ФГОУ ВО СПХФА Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – St. Petersburg Chemical-Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of Russia, 14 A, Prof. Popova str., St. Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: tania91@bk.ru

ВВЕДЕНИЕ

Конструирование полимерных лекарств позволяет совершенствовать уже известные лекарственные препараты и создавать новые средства пролонгированного действия с низкой токсичностью. В этих целях широко используются природные полисахариды, среди которых большой интерес представляют альгиновая кислота и её соли, проявляющие в той или иной мере иммуномодулирующую, противоопухолевую, противовирусную, антимикробную и другие виды биологической активности. Они также обладают способностью к набуханию и гелеобразованию, образованию вязких растворов, стабилизации водных и водно-жировых растворов. Благодаря своим ценным свойствам альгиновая кислота и её соли нашли применение в фармацевтической, медицинской, пищевой и других отраслях промышленности. Однако низкая растворимость альгиновой кислоты в воде и водных кислотах затрудняет синтез, стандартизацию и биологические испытания ее производных.

Введение карбоксильных групп в молекулу полисахарида повышает его растворимость в воде, а также влияет на физико-химические и биологические свойства. Например, на основе карбоксиметилальгиновой кислоты синтезированы растворимые в воде полимеры, обладающие биологической активностью [1]. Однако сведения о карбоксиэтилированной альгиновой кислоте в литературе отсутствуют. Поэтому задачей нашего исследования была разработка методики получения карбоксиэтилальгиновой кислоты (КЭАК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали альгиновую кислоту (CAS № 9005-32-7, Acrosorganics, 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 кондуктометрического титрования использовали лабораторный кондуктометр «АНИОН-4120» (сертификат Госстандарта RU.C.31.060.A № 25048, ООО НПП «Инфраспак-Аналит», Россия).

Алкилирование альгиновой кислоты в водном растворе щелочи

2 г альгиновой кислоты **1** (рисунок 1) растворяли в водном растворе гидроксида натрия с концентрацией 3–7%. К раствору добавляли от 4,8 до 8,0 г акриламида (6–10 молей в расчете на 1 моль-звено полисахарида). Реакционную массу перемешивали при 40 °С в течение 4 ч. Далее реакционную массу подкисляли уксусной кислотой до pH 8, продукт реакции 2 осаждали 5–7-кратным объемным избытком этанола. Осадок растирали в этиловом спирте, фильтровали, промывали спиртом и сушили в вакууме (20–25 мм рт. ст.) при 61 °С в течение 2 ч. Выход составил 73–84% от теоретического.

Алкилирование альгиновой кислоты в диоксане

2 г альгиновой кислоты **1** (рисунок 1) суспендировали в диоксане и термостатировали при 40 °С. Затем к полученной суспензии добавляли 20% раствор тетраметиламмония гидроксида и воду. Смесь перемешивали в течение 10–15 мин при 40 °С до полной гомогенизации. Затем прибавляли 4,8–8,0 г акриламида (6–10 молей в расчете на 1 моль-звено полисахарида) и реакционную массу перемешивали в течение 5 ч. По окончании выдержки реакционную массу подщелачивали 1 н. раствором гидроксида натрия до pH 12. Продукт реакции осаждали этанолом и отстаивали. Спирт декантировали, осадок промывали этанолом, затем растворяли в дистиллированной воде, отфильтровывали от частиц нерастворенного вещества и пропускали через колонку с катионитом КУ-2-8 для получения H^+-формы аминокарбонилэтилальгиновой кислоты. Полученный элюат упаривали досуха, остаток растирали и сушили в вакууме при 61 °С в течение 2 ч. Полученную кислоту растворяли в 0,1 н. растворе гидроксида натрия до pH 12, осаждали этанолом и отстаивали. Спирт декантировали, осадок соли 3 промывали этанолом, центрифугировали, затем сушили в вакууме при 61 °С в течение 2 ч.

Кислотный гидролиз амидов карбоксиэтилальгиновой кислоты

100 мг амида карбоксиэтилальгиновой кислоты **2, 3** (рисунок 1) гидролизовали в 0,5 мл 2,5 н. водного раствора трихлоруксусной (ТХУ) кислоты с добавлением 2,3 мл 0,5 н. водного раствора нитрита натрия при 0 °С 30 мин, затем для завершения реакции смесь нагревали 10 мин при 40–90 °С. Реакционную массу охлаждали до комнатной температуры, нейтрализовали щелочью до pH 8-9 и продукт 4 осаждали этанолом. Осадок промывали этанолом, центрифугировали, затем сушили в вакууме при 61 °С в течение 2 ч. Вместо минеральной кислоты использовали трихлоруксусную, так как образующийся трихлорацетат натрия при осаждении поликислоты спиртом не выпадает в осадок. Для более полного гидролиза амидных групп описанную операцию проводили несколько раз без выделения продукта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Природные карбоновые кислоты часто синтезируют гидролизом их нитрилов, амидов, сложных эфиров. Единственным известным производным карбоксиэтилальгиновой кислоты является амид, который достаточно легко получается алкилированием альгиновой кислоты (АК) акриламидом в воде и в среде диоксана [3], поэтому мы использовали его для синтеза кислоты (рисунок 1).

Образцы амидов, полученные в воде и в среде диоксана, отличаются не только по содержанию аминокарбонилэтильных и карбоксиэтильных групп, но и по некоторым физико-химическим свойствам, поэтому при гидролизе амидов КЭАК мы обращали внимание на особенности их поведения в ходе реакции.

Омыление амидов до карбоновых кислот происходит в присутствии как кислотных, так и основных катализаторов. Так, в синтезе карбоксиэтилдекстрана авторы [4] выдерживали соответствующий амид в 0,5–4 н. водном растворе NaOH в течение 5–7 суток при 17–20 °С. Кроме этого, они предложили получать карбоксиэтилдекстран алкилированием декстрана акриламидом в водных растворах NaOH (6–10%), увеличивая время реакции до полного исчезновения амидных групп в продукте. Однако первый метод очень длительный и сопровождается существенной степенью отщепления заместителей от полисахарида, а при использовании второго образуется продукт с низким содержанием карбоксиэтильных групп. Вследствие этого была разработана методика кислотного гидролиза амидов карбоксиэтилдекстрана в присутствии азоти-

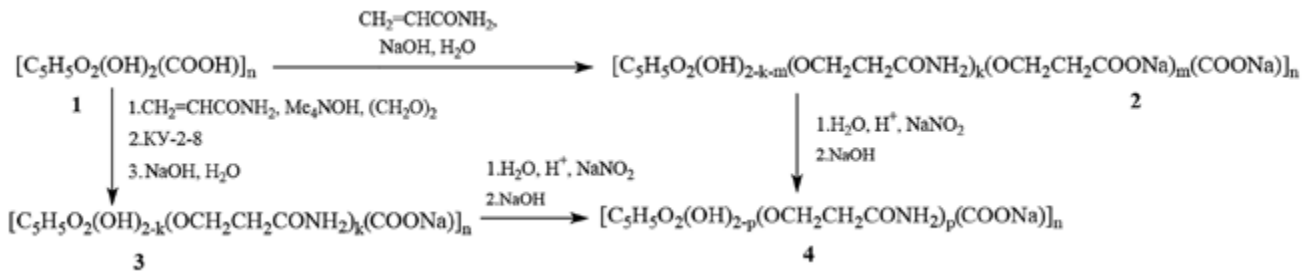


Рисунок 1. **Схема химической модификации альгиновой кислоты**

стой кислоты [5], которая значительно сократила время реакции.

Полиуроновые кислоты значительно более устойчивы в водных растворах кислот, чем нейтральные полисахариды, поэтому для синтеза карбоксиэтилальгиновой кислоты мы в первую очередь изучили кислотный гидролиз амида КЭАК по методике, предложенной для амида карбоксиэтилдекстрана [5].

В ИК-спектрах полученных образцов модифицированной альгиновой кислоты **4** наблюдаются полосы поглощения при 1580 и 1618–1620 $см^{-1}$, что соответствует ν (COO^-) карбоксиэтильной группы и уроновых кислот соответственно, а также полосы поглощения при 1660–1670 $см^{-1}$, характерные для валентных колебаний ν (C=O) «амид I». При этом, как и ожидалось, интенсивность полос поглощения «амид I» уменьшается, однако полосы поглощения карбоксиэтильной группы по сравнению с ИК-спектрами исходного амида неожиданно также уменьшаются до полного исчезновения.

Число амидных групп в полисахаридных образцах рассчитывали по количеству азота, определенного методом с использованием реактива Несслера [6], а карбоксильных групп – по результатам кондуктометрического титрования.

Полученные образцы характеризовали степенью аминокарбонилэтилирования $C_{акэ}$, карбоксиэтилирования $C_{кэ}$ (число амидных групп и карбоксиэтильных групп соответственно, приходящихся на мономерно полисахарида) и общей степенью замещения ($C_{общ}=C_{акэ}+C_{кэ}$), а процесс гидролиза – степенью элиминирования (отщепления) (C_E, %) заместителей в полисахариде, которую рассчитывали по формуле $C_E=(C_{3_0} - C_{общ})/C_{3_0} \cdot 100$, где C_{3_0} – степень замещения исходного образца амида.

Таблица 1.

Результаты гидролиза амида карбоксиэтилальгиновой кислоты ($C_{акэ}$=0,85, $C_{кэ}$=0,55, C_{3_0}=1,40) смесью трихлоруксусной и азотистой кислот

Температура нагрева	Количество операций	Характеристика продукта			
		$C_{акэ}$, моль/моль	$C_{кэ}$, моль/моль	$C_{общ}$, моль/моль	C_E, %
90	1	0,07	0,40	0,47	66,4
	3	-	0,08	0,08	94,3
40	1	0,25	0,27	0,52	62,9
	2	0,17	0,35	0,52	62,9
	3	0,16	0,23	0,39	72,1

Уже однократная обработка амида КМАК азотистой кислотой в кислой среде с нагреванием реакционной массы до 90 °С снижает количество амидных групп в полимере до 8% от первоначального содержания, а последующие позволяют их полностью удалить. Однако при этом, оказалось, что отщепляются и карбоксиэтильные группы, их число уменьшается после первой обработки почти на 30%, а после третьей отщепляются практически все заместители альгиновой кислоты (C_E=94%) (таблица 1).

Как оказалось, в кислой среде элиминирование заместителей (аминокарбонилэтильных и карбоксиэтильных групп) в альгиновой кислоте идет легче, чем в декстране. В одинаковых условиях степень элиминирования их в альгиновой кислоте достигает 94%, а в декстране не превышает 8% [5].

В связи с этим температура нагрева реакционной массы была снижена до 40 °С. При этом после третьей обработки в образце остается 19% амидных групп (степень элиминирования 72%), а число карбоксиэтильных групп в альгиновой кислоте по сравнению с содержанием их в исходном амиде снизилось примерно на 60%.

Для дальнейшего уменьшения степени элиминирования реакцию проводили при 0 °С в течение 2,5 ч без последующего нагревания. Как оказалось, и в таких условиях количество амидных групп снижается на 45–78%, но карбоксиэтильные группы в продуктах гидролиза не обнаружены.

Рассматривая динамику процесса, можно предположить, что в продуктах алкилирования АК акриламидом имеются разные по реакционной способности заместители (таблица 2). В условиях кислотного гидролиза наиболее активные из них реагируют за 30 мин и общее содержание амидных групп уменьшается на 65% в образцах, полученных в водной щелочи, и на 44% – в диоксане. В обоих случаях содержание амидных групп в полисахариде уменьшается примерно до 0,4 моль на мономерно. При этом идет как гидролиз амидов до карбоновых кислот, и это подтверждается появлением карбоксильных групп в образцах, не содержащих их, так и отщепление. В дальнейшем активность оставшихся аминокарбонилэтильных групп в полимере резко понижается и число их уменьшается примерно на 20% в час в полисахаридных образцах, полученных в водной щелочи, и с значительно меньшей скоростью – в образцах, полученных в диоксане. Можно также предположить, что в кислых средах отщепление акриловой кислоты от полиуронида идет быстрее, чем гидролиз акриламида, так как через 60–90 мин выдержки карбоксиэтильные группы в АК не обнаруживаются.

Для доказательства разной реакционной способности заместителей альгиновой кислоты мы удалили активные аминокарбонилэтильные группы частичным гидролизом (смесь ТХУ- и азотистой кислот, 1 ч, 0 °С), выделили и проанализировали продукт и провели повторную обработку полученного образца ($C_{акэ}$=0,39, $C_{кэ}$=0) смесью ТХУ- и азотистой кислот при

0 °С. Как и предполагалось, в этих условиях амиды практически не реагировали на действие кислот, и полисахаридные образцы сохраняли свои характеристики 1,5 ч.

Таблица 2.

Влияние времени гидролиза амида карбоксиэтилальгиновой кислоты смесью ТХУ- и азотистой кислоты на характеристику продуктов реакции

Время, мин	*$C_{акэ}$, в		$C_{кэ}$, моль/моль	$C_{общ}$, моль/моль	C_E, %
	моль/моль	% от исходного значения			
амидв					
0	1,15	–	0,32	1,47	–
30	0,40	34,8(65)	0,18	0,58	60,5
60	0,36	31,3(10)	0	0,36	75,5
90	0,33	28,7(10)	0	0,33	77,6
120	0,29	25,2(12)	0	0,29	80,3
150	0,25	21,7(14)	0	0,25	83,0
амидд					
0	0,71	–	0	0,71	–
30	0,40	56,3(44)	0,19	0,59	16,9
60	0,38	53,5(5)	0,15	0,53	25,4
90	0,37	52,1(3)	0	0,36	49,3
120	0,37	52,1 (0)	0	0,36	49,3
150	0,37	52,1(0)	0	0,39	45,1

Примечание: *в скобках указано уменьшение $C_{акэ}$ в % по сравнению с предыдущим значением $C_{акэ}$.

Для определения роли азотистой кислоты в кислотном гидролизе амида КЭАК мы изучили влияние времени выдержки его в растворе ТХУ-кислоты на характеристику продуктов реакции (таблица 3). Оказалось, что результаты гидролиза в присутствии азотистой кислоты и без нее похожи, за одним исключением. Как и в присутствии азотистой кислоты, аминокарбонилэтильные группы АК делятся на активные и малоактивные. При этом скорость отщепления акриловой кислоты при отсутствии азотистой значительно ниже, и карбоксиэтильные группы сохраняются в полисахариде более 2 ч, при этом их количество в АК сначала увеличивается (при гидролизе активных амидов), а затем постепенно уменьшается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при гидролизе амида карбоксиэтилальгиновой кислоты в кислой среде акриловая кислота легче отщепляется от АК, чем акриламид, поэтому происходит в основном уменьшение амидных групп в полисахариде или образование незамещенной альгиновой кислоты. Азотистая кислота ускоряет кислотный гидролиз амида карбоксиэтилальгиновой кислоты, а также отщепление акриловой кислоты от полисахарида.

Амиды КЭАК, независимо от метода синтеза имеют разные по реакционной способности заместители. В кислой среде часть аминокарбонилэтильных и карбоксиэтильных групп отщепляется от полисахарида в 3–5 и более раз быстрее, чем остальные заместители.

Таблица 3.

Влияние времени гидролиза амида карбоксиэтилальгиновой кислоты раствором ТХУ-кислоты на характеристику продуктов реакции

Время, мин	*Сакэ, в		$C_{кэ}$, моль/моль	$C_{общ}$, моль/моль	C_E, %
	моль/моль	% от исходного значения			
амидв					
0	1,15	–	0,32	1,47	–
30	0,50	43,5(56)	0,62	1,12	23,8
60	0,44	38,3(12)	0,53	0,97	34,0
90	0,39	33,9(11)	0,28	0,67	54,4
120	0,35	30,4(10)	0,24	0,59	59,9
амидд					
0	0,71	–	0	0,71	–
30	0,46	64,8(35)	0,20	0,66	7,0
60	0,44	62,0 (4)	0,14	0,58	18,3
90	0,39	54,9(11)	0,11	0,50	29,6
120	0,36	50,7 (8)	0,10	0,46	35,2

Примечание: *в скобках указано уменьшение $C_{акэ}$ в % по сравнению с предыдущим значением $C_{акэ}$.

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. 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.
4. А.А. Иозеп, Н.К. Бессонова, Б.В. Пассет. Синтез карбоксиэтилдекстрана // Ж. прикл. химии. 1998. Т. 71. № 2. С. 320–323.
5. А.А. Иозеп, Д.В. Соколенко. Химическая модификация микробных полисахаридов, или гликанов. – СПб.: Менделеев, 2004. 72 с.
6. С. Сиггиа, Г.Дж. Ханна. Количественный органический анализ по функциональным группам. – М.: Химия, 1983. 672 с.

УДК 66.091.2

СИНТЕЗ БЕНДАМУСТИНА ГИДРОХЛОРИДА В ПРОТОЧНОМ МИКРОРЕАКТОРЕ

А. Молдавский[1,2]*, А.М. Юраков[1,2], М.Б. Супургибеков[1], П.И. Елагин[1], Б.Ю. Лалаев[2], И.А. Фридман[2]

Резюме. Исследована возможность и перспективы проведения стадии хлорирования в схеме синтеза бендамустина гидрохлорида. Показаны преимущества и перспективы ведения процесса в проточном микрореакторе. Подобраны условия ведения процесса в проточном микрореакторе, при которых реакция хлорирования идёт с меньшим содержанием побочных продуктов и более высоким выходом.

Ключевые слова: проточный микрореактор, хлорирование, бендамустина гидрохлорид.

SYNTHESIS OF BENDAMUSTINE HYDROCHLORIDE IN FLOW MICROREACTOR

A. Moldavsky[1,2]*, A.M. Yurakov[1,2], M.B. Supurghibekov[1], P.I. Elagin[1], B.Yu. Lalaev[2], I.A. Fridman[2]

Abstract. The possibility and prospects of carrying out the chlorination step in the scheme for the synthesis of bendamustine hydrochloride were investigated. The advantages and prospects of the process in the flow microreactor are shown. The conditions for conducting the process in the flow microreactor under which the chlorination reaction proceeds with a lower content of by-products and a higher yield are chosen.

Keywords: flow microreactor, sulfochlorination, bendamustine hydrochloride.

1 – ЗАО «Биокад», 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Фронтовая, д. 3

2 – ФГОУ ВО «Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия» Минздрава России (ФГОУ ВО СПХФА Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – CJSC Biocad, 3, Frontovaya str., pos. Strelna, St. Petersburg, 198515, Russia

2 – St. Petersburg Chemical-Pharmaceutical Academy of the Ministry of Healthcare of Russia, 14 A, Prof. Popova str., St. Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: moldavsky@biocad.ru
Тел.: 8 (812) 380 49 33, доб. 378

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности в мире. По данным Всемирной организации здравоохранения, за 2015 год от онкологических заболеваний в мире умерло 8,8 млн человек. По прогнозам, за ближайшие 20 лет число заболевших может увеличиться на 70% [1].

В связи с такой неутешительной динамикой в фармацевтической отрасли особо остро стоит вопрос разработки доступных и эффективных подходов к своевременному производству препаратов для лечения онкологических заболеваний.

Одним из основных цитостатических противоопухолевых препаратов алкилирующего типа действия является бендамустин – производное бис(2-хлорэтил)амина. Впервые препарат был получен в Германской Демократической Республике в 1963 году. Его синтез был описан в патенте [2] В. Ожеговски и Д. Кребса, одной из ключевых стадий которого является стадия получения хлорпроизводного II (этилового эфира 4-[5-[*бис*(2-хлорэтил)амино]-1-метилбензимидазол-2-ил] бутановой кислоты) из молекулы диола I (этилового эфира 4-[5-[*бис*(2-гидроксиэтил)амино]-1-метилбензимидазол-2-ил]бутановой кислоты) (рисунок 1).

В оригинальной статье стадию хлорирования диола авторы проводят в среде хлороформа восьмикратным избытком тионила хлорида. Реакционную массу перемешивают в течение часа при охлаждении на бане со льдом, затем выдерживают при комнатной температуре в течение трёх часов, при этом выход целевого продукта достигает 38,5%.

В последующих публикациях описывается возможность ведения данного процесса с помощью применения в качестве хлорирующих агентов хлорокиси фосфора, хлористого сульфурила, хлорида фосфора (V) [3], а также тионила хлорида, но в других условиях.

Изменение и оптимизация условий ведения реакции позволили повысить выход и уменьшить расход реактивов. Однако во всех методиках избыток хлорирующих агентов превышает 2 эк-

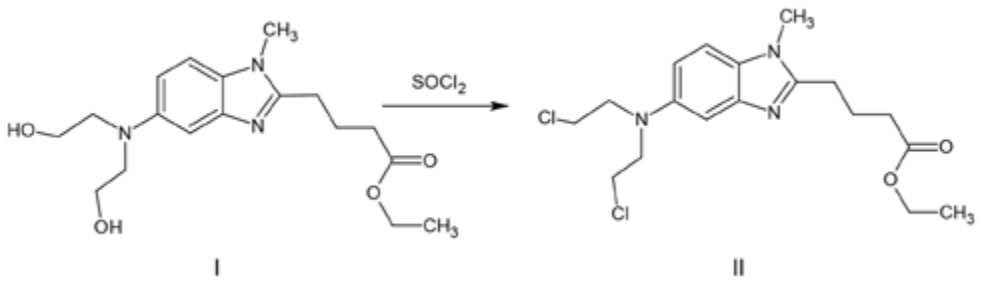


Рисунок 1. **Стадия хлорирования**

вивалента диола, при этом реакцию проводят в течение достаточно длительного времени, которое может достигать 16 ч, как описано в патенте US 8987469 [6], а максимальный выход по стадии достигает не более 85%, за исключением методики, описанной в патенте US 8481751 [4].

Достаточно высокий выход даёт применение в качестве хлорирующего агента оксалилхлорида [8]. Выход достигает 93% при избытке в 1,3–1,6 эквивалентов. Реакцию ведут в диметилформамиде в течение 14 ч [4].

Использование больших избытков активных хлорирующих реагентов, длительность ведения реакции, значительное количество побочных продуктов, выделение кислых газов в результате реакции затрудняют возможность масштабирования данной стадии. Большинство авторов говорят о небольших загрузках, не пригодных для промышленной наработки субстанции, которые ограничиваются объёмами порядка 1–3 л.

Ранее в компании «Биокад» проводились собственные исследования по оптимизации этой стадии и была отработана методика хлорирования диола в дихлорметане с добавлением в качестве катализатора 0,5 эквивалента пиридина. Реакция протекает через образование полупродукта хлорирования (II a) (рисунок 2).

В данной методике 200,0 г (0,582 моль) диола и 23,0 г (0,291 моль, 0,5 eq) пиридина растворяют в 800 мл дихлорметана. Перемешивают при нагревании до полного растворения. Раствор диола прикапывается к раствору тионилхлорида (152,4 г, 1,281 моль, 1,1 eq) в 400 мл дихлорметана, заранее охлаждённого до 0 °C. Реакцию ведут в течение 3 ч при температуре 37,5 °C.

Выход целевого продукта составляет порядка 90%. Однако он не всегда пригоден для дальнейшего использования в производстве без дополнительной очистки. В большинстве случаев целевой продукт содержит слишком большое количество трудноотделимых примесей и отправляется на стадию перекристаллизации, в результате которой также теряется и часть полупродукта.

Нами впервые была проведена реакция хлорирования диола (I) в проточном микрореакторе тионилхлоридом. Основываясь на отработанной методике для ёмкостного реактора, на первом этапе основной целью было ускорение реакции, снижение количества трудноотделимых примесей и повышение выхода. Достижение поставленных целей на оборудовании данного типа может быть реализовано за счёт возможности ведения процесса в условиях, которые практически не достижимы на емкостном оборудовании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данном исследовании использовались следующие реактивы:

	Формула	CAS	Mw	Производитель
Исходный материал HO-Bend-Et	$C_{18}H_{27}N_3O_4$	3543-74-6	343,43	Scientia Pharma
Тионилхлорид ($SOCl_2$)	$SOCl_2$	7719-09-7	118,97	Acros, pure 99,5%
Пиридин (Py)	C_5H_5N	110-86-1	79,10	Abcr
Триэтиламин (TEA)	$C_6H_{15}N$	121-44-8	101,19	
Дихлорметан (DCM)	CH_2Cl_2	75-09-2		Acros

Исследования проводились на реакторной системе производства фирмы Corning. Реакционная зона включает 5 микроструктурированных пластин из кварцевого стекла, каждая объёмом 8,2–9 мл. Ей предшествует плата подготовки реактива, в которой раствор нагревается до заданной необходимой температуры. После неё следуют платы для охлаждения реакцион-

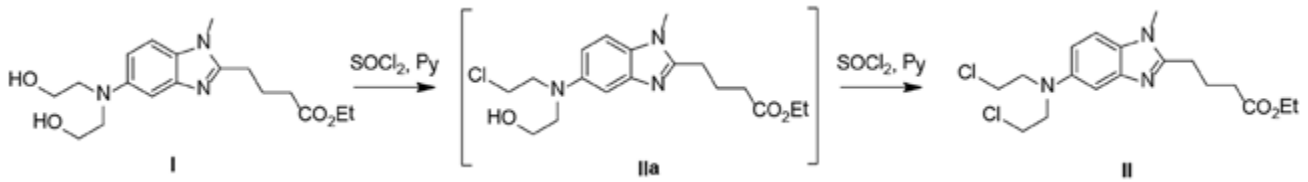


Рисунок 2. **Химическая схема реакции хлорирования**

ной массы. Общий объём системы составляет 126 мл. Пластины соединены последовательно. Пластины для выдержки чередуются с пластинами для перемешивания реакционной массы. Реактор снабжён двумя шестерёнчатыми насосами HNP 15588, способными выдерживать перепады давления до 60 бар, с массовым расходомером и регулятором Bronkhorst. Ротор насоса выполнен из оксида циркония, остальные детали – из сплава C22. Насосы приводятся в движение бесщёточными двигателями повышенной динамической точности.

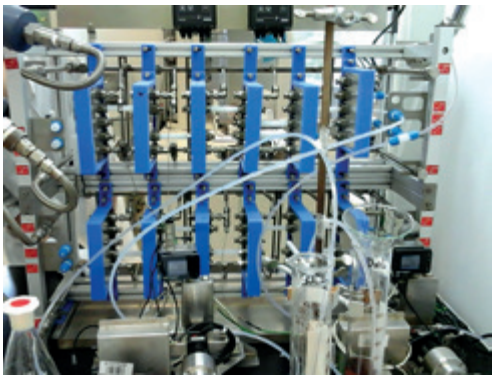


Фото 1. **Проточный микрореактор. Общий вид установки**

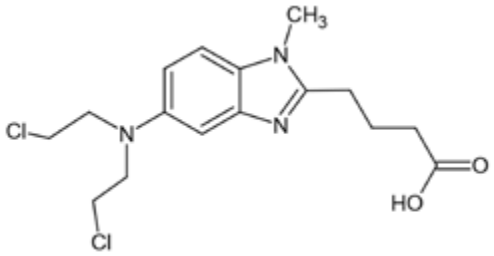
Фото 2. **Дозирующие насосы**

Анализ состава реакционной массы проводился методом ВЭЖХ. Также в качестве экспресс-метода была использована тонкослойная хроматография в системе этилацетат – метанол (9:1). Результаты ТСХ помогали вносить коррективы в ведение экспериментов «на месте».

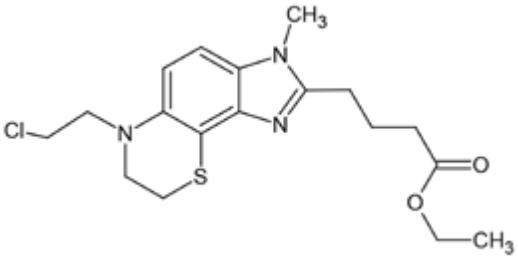
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основными трудноотделимыми примесями в нашем процессе являются вещества, близкие по строению к целевому продукту, которые являются продуктами гидролиза, а также циклизации:

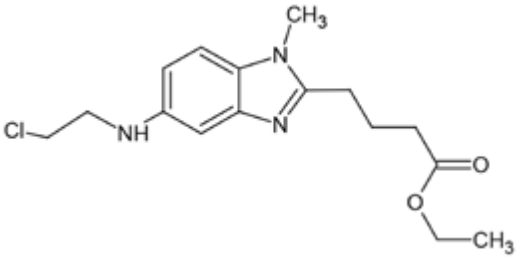
Примесь A



Примесь B



Примесь C



Содержание примеси B определяет пригодность продукта реакции хлорирования для использования его в производстве на следующих стадиях. Содержание примеси не должно превышать 0,4%. При превышении нормы необходимо проводить очистку по методике, разработанной в отделе синтеза АО «Биокад», описанной ниже. Из реакционной массы выделяют эфир: реакционную массу охлаждают до 10 °C, затем прибавляют раствор триэтиламина в гексане. При этом наблюдается выпадение осадка, реакционная масса сильно густеет. Смесь нагревают до 20 °C, фильтруют на фильтре Шота, промывают 4 раза этилацетатом. Осадок сушат на воздухе. Маточный раствор упаривают в вакууме при 45 °C.

Маслообразный остаток черного цвета растворяют в этилацетате, прибавляют силикагель 63/200 и перемешивают при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 30 мин. Фильтруют на фильтре Шота, промывают 4 раза этилацетатом. Растворитель упаривают в вакууме при 45 °C. К остатку прибавляют гексан и перемешивают на магнитной мешалке до выпадения осадка, затем снова упаривают в вакууме при 45 °C.

К полученному сырому полупродукту в реакторе прибавляют смесь гексан – этилацетат в соотношении 3 к 2 и барботируют азотом без перемешивания в течение 30 мин, после нагревают до 65 °С до полного растворения осадка. Охлаждают до 20 °С в течение 3 ч. Осадок фильтруют на фильтре Шота, промывают смесью гексан – этилацетат в соотношении 3 к 1, сушат в вакууме до постоянной массы. Маточный раствор упаривают

Результаты процесса в емкостном реакторе представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Состав реакционной массы. Опыты в емкостном реакторе

№	Полупродукт, %	Примесь А, %	Примесь В, %	Примесь С, %	Продукт, %
1	0,46	0	1,50	0,40	89,70
2	1,27	0	1,06	1,12	83,52

Из таблицы видно, что предел содержания примеси В превышается более чем в 2,5 раза. Также присутствует полупродукт реакции, что говорит о недостаточной глубине протекания реакции в емкостном оборудовании.

Нами было решено провести несколько серий экспериментов в проточном реакторе, которые показали бы перспективность переноса стадии хлорирования в проточный реактор. Первые две серии экспериментов были установочными. Для начала мы спрогнозировали варианты условий, в которых реакция могла бы пойти наиболее оптимально, с учётом режима движения, времени пребывания реакционной массы в реакторе, температуры и давления.

Для реакции были приготовлены растворы реактивов (таблицы 2).

Результаты экспериментов показали, что наиболее эффективными являются параметры, описываемые последней серией экспериментов (таблица 3). Это температура порядка 100–120 °С, давление в пределах 10–15 бар и скорость потока 40 мл/мин.

Эти результаты стали основой для следующей серии экспериментов, направленной на уточнение подобранных параметров реакции. Было также решено проверить влияние избытка тионила хлорида на выход и чистоту продукта.

Таблица 3.

Результаты первых двух серий экспериментов

№	Полупродукт, %	Примесь А, %	Примесь В, %	Примесь С, %	Продукт, %	Параметры процесса			Избыток $SOCl_2$, eq
						T, °C	Объёмный расход, мл/мин.	P, бар	
1.1	13,27	0,23	7,78	1,02	66,83	80	30	2	1,1
1.2	19,10	1,16	0,00	2,74	61,60	80	60	10	1,1
1.3	47,17	0,00	0,00	0,00	45,09	120	60	10	1,1
1.4	39,62	0,22	1,51	0,00	48,00	120	30	11	1,1
1.5	27,21	0,34	0,00	0,00	52,93	145	30	16	1,1
2.1	21,08	0,36	1,02	0,00	53,58	80	40	3	1,1
2.2	23,74	0,74	1,11	0,00	50,7	100	80	10	1,1
2.3	14,74	0,00	0,18	0,00	79,88	120	40	10	1,1
2.4	12,79	0,00	0,31	0,00	82,81	120	40	10	1,1
2.5	14,93	0,00	0,27	0,00	80,33	120	80	13	1,1

Варьирование избытка одного реагента в проточных реакторах возможно за счёт регулирования скоростей потока. Так, например, устанавливая различные скорости на насосах, можно добиваться довольно широкого диапазона избытков реактива при использовании одних и тех же растворов с постоянными концентрациями. При этом суммарный расход на выходе из реактора оставили постоянным – 40 мл/мин. При проведении серии экспериментов в качестве экспресс-метода анализа реакционной массы использовали тонкослойную хроматографию в системе этилацетат – метанол (9:1).

В третьей серии экспериментов суммарный расход реакционной массы поддерживался постоянным, а избыток тионилхлорида обеспечивался изменением соотношения скоростей насосов, подающих 1-й и 2-й растворы.

Как видно из таблицы 5, наиболее оптимальными оказались условия, подобранные в экспериментах 3.4 и 3.5. Повышение избытка тионилхлорида смещает ход реакции в сторону побочных продуктов, а повышение температуры и давления приводит к увеличению конверсии.

Таблица 2.

Состав растворов реактивов

Опыт 1	Name	Manufacture	Vol, мл	m, г	mol	eq
Раствор 1.	Starting material HO-Bend-Et	Scientia Pharma	2500	161	0,4685	
	Py	Abcr		18,53	0,2343	0,5
Раствор 2.	$SOCl_2$	Acros, pure 99,5%	1250	122,6	1,031	1,1(2,2)
Опыт 2	Name	*Manufacture*	*Vol* (DCM*), мл	m, г	mol	eq
Раствор 1.	Starting material HO-Bend-Et	Scientia Pharma	1250	131	0,3814	
	Py	Abcr		15,09	0,1907	0,5
Раствор 2.	$SOCl_2$	Acros, pure 99,5%	1250	99,83	0,839	1,1(2,2)

Таблица 4.

Растворы для третьей серии экспериментов

Опыт 3	Name	Manufacture	Vol (DCM*), мл	m, г	mol	eq
Раствор 1.	Starting material HO-Bend-Et	Scientia Pharma	1250	131	0,3814	
	Py	Abcr		15,09	0,1907	0,5
Раствор 2.	$SOCl_2$	Acros, pure 99,5%	1250	99,83	0,839	1,1(2,2)

Таблица 5.

Результаты уточняющего эксперимента. Выходы по реакции

№	Полупродукт, %	Примесь A, %	Примесь B, %	Примесь C, %	Продукт, %	Параметры процесса			Избыток $SOCl_2$, eq
						T, °C	Объёмный расход, мл/мин.	P, бар	
3.1	7,80	0,00	0,37	0,00	88,85	100	40	10	1,1
3.2	0,94	0,00	3,51	0,00	91,42	100	40	11	1,375
3.3	0,00	0,00	7,64	0,34	84,91	100	40	11	1,65
3.4	4,93	0,00	0,00	0,00	92,99	120	40	15	1,1
3.5	0,00	0,00	1,34	0,00	92,29	120	40	15	1,375
3.6	0,00	0,00	6,44	0,00	85,48	120	40	13	1,65

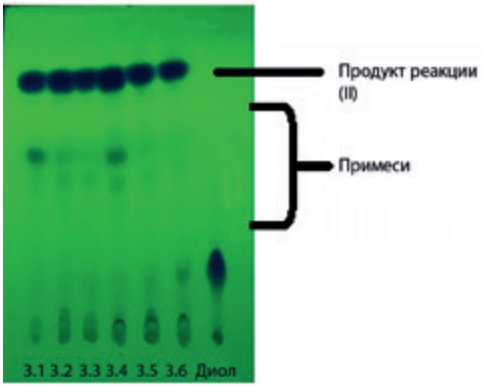


Фото 3. Результаты ТСХ в третьей серии экспериментов

Оптимальное значение объёмного расхода оказалось равным 40 мл/мин. Снижение скорости потока влечёт за собой снижение конверсии, так как падает турбулентность потока, за счёт которой происходит перемешивание реагентов. Повышение скорости потока приводит к уменьшению времени пребывания, что влечёт за собой недостаточную глубину протекания реакции. Об этом свидетельствует высокое содержание полупродукта реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На данном этапе применение проточного реактора в процессе хлорирования показало целый ряд преимуществ данного типа оборудования перед классическими емкостными реакторами.

В первую очередь мы говорим об интенсификации и повышении безопасности сложного, довольно «грязно» протекающего процесса. В случае ведения процесса в наиболее оптимальных параметрах мы имеем увеличение конверсии по целевому продукту порядка 5%. При этом вполне реальными являются перспективы получения конечного продукта хлорирования с уровнем трудноотделимой примеси B ниже критического предела в 0,4% без дополнительной очистки силикагелем.

Что касается интенсификации, то уже сейчас можно говорить об увеличении производительности процесса более чем в 3 раза по сравнению с емкостными реакторами.

В дальнейшем можно говорить о повышении конверсии и чистоты конечного продукта стадии за счёт уточнения условий ведения реакции. Также на данном этапе мы видим перспективы проведения всех стадий синтеза бендамустина в одном проточном реакторе. Использование непрерывной технологии производства предполагает такую возможность. Для этого необходимо лишь в плату смешения, стоящую после основной реакционной зоны, обеспечить ввод реактивов, участвующих в реакциях на следующих стадиях.

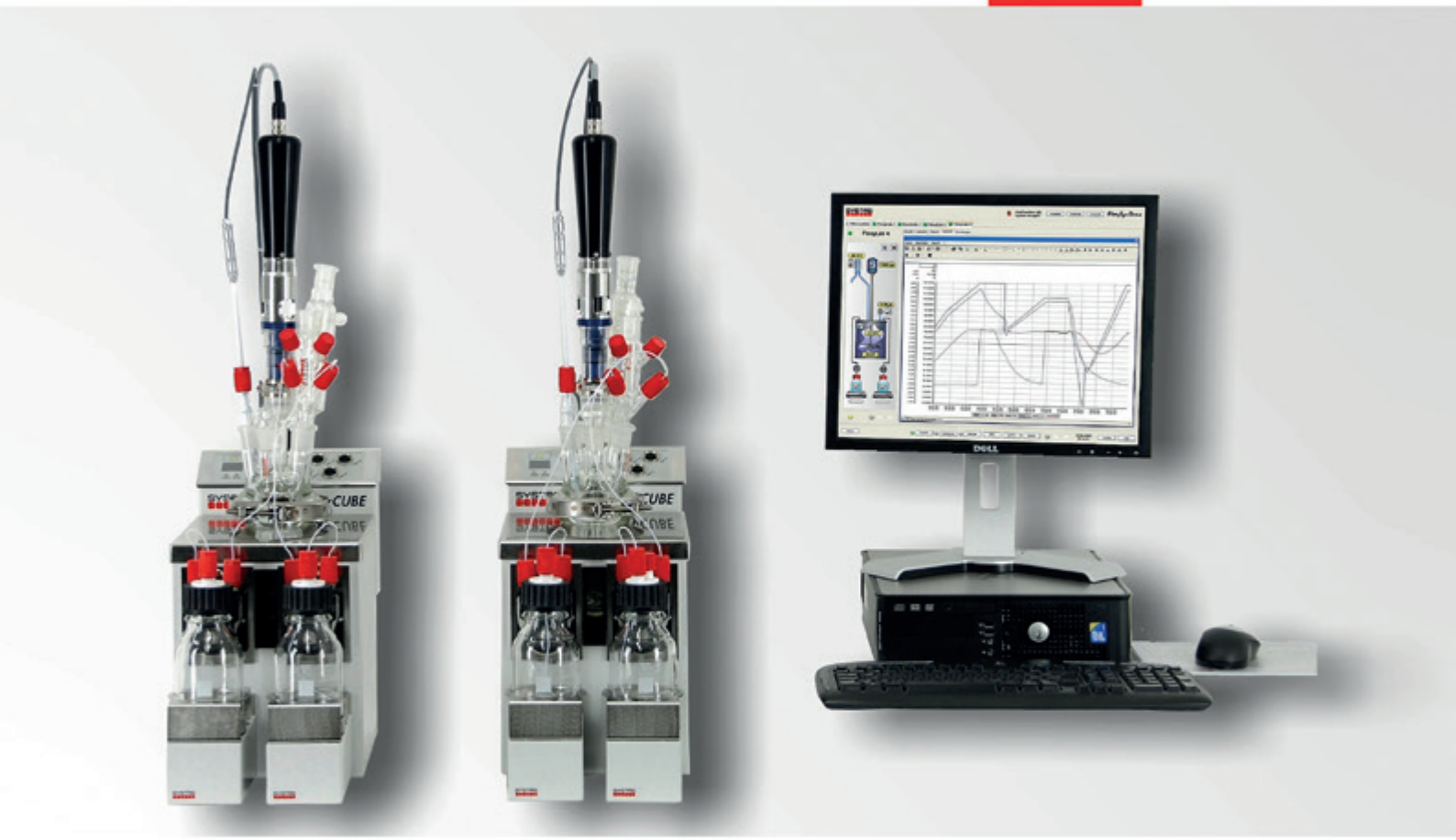
ЛИТЕРАТУРА

1. Рак. Информационный бюллетень. Февраль 2017 г. // Центр СМИ Всемирной организации здравоохранения. URL: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/ru/ (дата обращения 05.10.2017).
2. W. Ozegowski, D. Krebs. ω-[Bis-(β-chlorathyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-propion-bzw. Buttersauren als potentielle Cytostatika // J Prakt Chem. 1963. 20. P. 178–186.
3. Patent WO2013/046223 A1. An improved process for the preparation of bendamustine hydrochloride / B.B. Mishra, N. Shambhubhai Kachhadia, V.S. Tomar, S. Lahiri. – 04.04.2013.
4. Патент US 8481751 B2. 09.07.2013. Process for the production of bendamustine alkyl ester, bendamustine, and derivatives thereof / K. Groh, H. Rauter, D. Born. – 09.07.2013.
5. Patent US 20140121384 A1. Process for bendamustine hydrochloride / B.P. Reddy, K.R. Reedy, D.M. Reddy, B.V. Krishna. – 01.05.2014.
6. Patent US 8987469 B2. Process for the preparation of bendamustine / M. Frey, D.-D. Walther. – 24.03.2015.
7. Patent EP2834215 A1. Process for making bendamustine / P. Bartos, P. Benovsky, J. Barth. – 11.02.2015.
8. Патент RU 2505533 C2. Method of Obtaining Alkyl Ester Of Bendsmustine, Bendamustine, And Its Derivatives / G. Kaj, R. Khol Ger, B. Dirk. – 27.01.2014.

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

УДК 615.324; 532.132

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКОЙ ВЯЗКОСТИ ИНЪЕКЦИОННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА НАТРИЯ

К.Р. Савельева[1]*, Л.В. Персанова[1], В.Н. Шестаков[1], С.В. Поляков[1]

Резюме. В статье представлены данные по разработке методики определения характеристической вязкости инъекционного препарата на основе хондроитина сульфата натрия. В качестве растворителя для устранения полиэлектролитного набухания был использован 0,2 М раствор натрия хлорида. Расчет приведенной вязкости испытуемых растворов был произведен в концентрационном диапазоне хондроитина сульфата 4,5–20 мг/мл. Значение характеристической вязкости, определенной для каждого из испытуемых препаратов, находилось в интервале 0,03–0,042 м^3/кг.

Ключевые слова: хондроитина сульфат, лекарственный препарат, раствор для внутримышечного введения, приведенная вязкость, характеристическая вязкость.

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF INTRINSIC VISCOSITY OF INJECTABLE DRUG WITH CHONDROITIN SULFATE

K.R. Saveleva[1]*, L.V. Pesanova[1], V.N. Shestakov[1], S.V. Poliyakov[1]

Abstract. The article presents data on the development of a technique for determination of intrinsic viscosity of injectable drug with chondroitin sodium sulfate. A 0.2 M solution of sodium chloride was use as a solvent to eliminate polyelectrolyte swelling. The calculated viscosity of the test solutions was determinate in the concentration range of chondroitin sulfate 4.5–20 mg /ml. The value of the intrinsic viscosity, determined for each of the tested preparations, was in the range 0.03–0.042 m^3/kg.

Keywords: chondroitin sulfate, drug, intramuscular solution, reduced viscosity, intrinsic viscosity.

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации, 109044, Россия, г. Москва, Лавров переулок, д. 6

1 – State Institute of Drugs and Good Practices of the Ministry of Industry and Trade of Russian Federation, 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: saveleva@gilsinp.ru
Тел.: 8 (495) 676 43 60, доб. 2-28

ВВЕДЕНИЕ

Хондроитина сульфат (ХС) – это высокомолекулярный гетерополисахарид, который относится к группе гликозаминогликанов, линейных неразветвленных полимеров. Линейная цепь построена из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и сульфатированного N-ацетил-D-галактозамина, которые попарно соединены β-1,3-гликозидными связями и образуют дисахаридные фрагменты; последние, в свою очередь, соединены β-1,4-гликозидными связями (рисунок 1) [1].

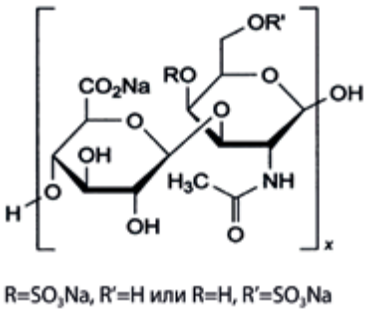


Рисунок 1. Общая химическая структура хондроитина сульфата натрия [2]

Подобное строение молекулы хондроитина сульфата обуславливает ее полианионные свойства и участие в процессах транспорта воды, аминокислот и липидов в аваскулярных участках хряща. Длинные цепи ХС, входящие в состав экстрацеллюлярного матрикса, определяют важнейшие биомеханические свойства хрящевой ткани. Уникальные особенности этой молекулы и легли в основу идеи применения ХС при остеоартрите (ОА). Хондроитина сульфат – структурный модулятор, который не только синтезируется организмом, но также после введения встраивается в структуры хрящевой ткани, стимулируя ее синтез и ингибируя деструкцию. Его своевременное назначение и регулярное использование обеспечи-

вают торможение, стабилизацию и профилактику развития деструктивных процессов в суставе [3].

В настоящее время инъекционные лекарственные препараты на основе хондроитина сульфата натрия получили широкое распространение на отечественном фармацевтическом рынке. Качество готового лекарственного препарата напрямую зависит от качества субстанции. От значения молекулярной массы субстанции хондроитина сульфата зависит его вязкость и, как следствие, степень болезненности инъекций, возникновение уплотнений и геморрагий в месте инъекций и в редких случаях инфильтратов [4]. Вискозиметрия является одним из наиболее доступных и информативных методов исследования растворов полимеров. На основе экспериментальных данных можно определить молекулярные характеристики макромолекул. Для определения молекулярной массы и качества растворителя используется характеристическая вязкость, которая определяется из начального наклона концентрационной зависимости удельной вязкости [5]. Характеристической вязкостью называют предельное значение отношения удельной вязкости к концентрации раствора при концентрации, стремящейся к нулю. Данную величину определяют путем графической экстраполяции значений отношения приведенной вязкости к концентрации, полученных для нескольких концентраций, к оси ординат.

Водные растворы ионизированных макромолекул хондроитина сульфата имеют аномальную зависимость приведенной вязкости от концентрации раствора: их приведенная вязкость растет с уменьшением концентрации полиэлектролита, что делает невозможным определение характеристической вязкости раствора полиэлектролита. Возрастание приведенной вязкости водного раствора полиэлектролита при разбавлении вызвано так называемым полиэлектролитным набуханием, то есть увеличением объема и линейных размеров макромолекулярных клубков из-за усиления электростатического отталкивания одноименно заряженных звеньев цепи.

Полиэлектролитное набухание устраняется либо в присутствии избытка нейтрального низкомолекулярного электролита, либо при поддерживании постоянной ионной силы в растворе в ходе разбавления. Тогда концентрация компенсирующих противоионов в молекулярных клубках не изменяется при разбавлении и полиэлектролит ведет себя в растворе как незаряженный полимер.

Для получения прямолинейной зависимости приведенной вязкости от концентрации водный раствор полиэлектролита разбавляли растворами соли разных концентраций. Ионная сила раствора в ходе разбавления остается постоянной, а подобранная концентрация низкомолекулярного электролита в точности равняется ионной силе исходного раствора полиэлектролита [6].

Целью настоящего исследования является разработка методики определения характеристической вязкости лекарственных препаратов на основе хондроитина сульфата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы инъекционные препараты на основе хондроитина сульфата: «Мукосат», раствор для внутримышечного введения, 100 мг/мл, 2 мл (ООО «Диамед-Фарма»); «Хондрогард», раствор для внутримышечного введения, 100 мг/мл, 2 мл (ЗАО «ФармФирма «Сотекс», серия 170317, годен до 03.2020); «Драстоп», раствор для внутримышечного введения, 100 мг/мл, 2 мл («Уорлд Медицин Лимитед», Великобритания, производитель К.О. «Ромфарм Компани С.Р.Л.», Румыния, серия 1701941, годен до 03.2020). Составы препаратов приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Состав лекарственных препаратов на основе хондроитина сульфата

Компонент	Масса, мг (Объем, мл)		
	«Мукосат»	«Хондрогард»	«Драстоп»
Хондроитина сульфат	200 мг	200 мг	200 мг
Бензиловый спирт	18 мг	18 мг	24 мг
1% раствор натрия гидроксида или 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты	до pH 6,0-7,5	до pH 6,0-7,5	до pH 6,5-6,8
Натрия метабисульфит	–	2,0 мг	–
Вода для инъекций	до 2,0 мл	до 2,0 мл	до 2,0 мл

В ходе работы использованы следующие реактивы: натрия хлорид (99,5%, Panreac, Испания, кат. № 131659), цетилпиридиния хлорид (≥99%, C9002, Sigma-Aldrich, США, кат. № 6004-24-6); стандартный образец Европейской Фармакопеи хондроитина сульфата натрия № Y0000280, серия 2.0, идентификационный номер 003U61; мембранный фильтр диаметром 33 мм типа Millex-HA с размером пор 0,45 мм.

Аппаратура: весы аналитические неавтоматического действия Secura 225D-10RU (класс точности специальный – I по ГОСТ OIML R 76-1-2009, Sartorius, Германия); титратор автоматический T 50 в комплекте с фототродом DP5 (Mettler Toledo, Швейцария); капиллярный вискозиметр (внутренний диаметр капилляра 0,54 мм); секундомер «Агат» СОСпр-2б-2-000.

Экспериментальная часть

1. *Приготовление растворов для количественного определения хондроитина сульфата натрия в лекарственных препаратах.*

Весы аналитические неавтоматического действия Secura 225D-10RU (Sartorius, Германия)

Стандартный раствор хондроитина сульфата натрия. 0,025 г (точная навеска) стандартного образца хондроитина сульфата натрия (предварительно высушенного при температуре 105 °С в течение 4 ч) помещают в мерную колбу объемом 25 мл, растворяют в воде, раствор доводят до метки тем же растворителем, фильтруют через мембранный фильтр типа Millex-HA с размером пор 0,45 мкм или аналогичный. 2,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, раствор доводят до метки водой.

Испытуемый раствор. 1 мл препарата помещают в мерную колбу объемом 100 мл, разбавляют водой, доводят объем раствора до метки тем же растворителем. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр типа Millex-HA с размером пор 0,45 мкм или аналогичный. 2,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл и доводят объем раствора до метки водой.

Раствор титранта. 0,5 г цетилпиридиния хлорида моногидрата помещают в мерную колбу объемом 500 мл, растворяют в воде, доводят до метки тем же растворителем.

2. *Методика проведения титрования.*

По 50 мл стандартного и испытуемого растворов были оттитрованы раствором титранта цетилпиридиния хлорида. Для определения конечной точки титрования использовали автотитратор, снабженный фототродом с длиной волны в видимой области 520 нм.

3. *Приготовление растворов для определения характеристической вязкости*

Раствор натрия хлорида. 1,7 натрия хлорида помещают в мерную колбу объемом 1 л, растворяют в 950 мл воды, доводят объем раствора водой до метки, перемешивают. Перед использованием раствор фильтруют через мембранный фильтр на основе смешанных эфиров целлюлозы типа Millex-HA или аналогичного качества с диаметром пор не более 0,45 мкм. Срок годности – 2 недели при хранении в холодильнике.

Испытуемый раствор 1. 20 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл раствора натрия хлорида, доводят объем до метки тем же растворителем. Раствор перемешивают при комнатной температуре и фильтруют через мембранный фильтр на основе смешанных эфиров целлюлозы типа Millex-HA или аналогичного качества с диаметром пор не более 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

Испытуемый раствор 2. К 15 мл испытуемого раствора 1 прибавляют 5 мл раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают.

Испытуемый раствор 3. К 12,5 мл испытуемого раствора 1 прибавляют 7,5 мл раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают.

Испытуемый раствор 4. К 10 мл испытуемого раствора 1 прибавляют 10 мл раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают.

Испытуемый раствора 5. К 5 мл испытуемого раствора 1 прибавляют 15 мл раствора натрия хлорида, тщательно перемешивают.

4. *Методика проведения испытания*

В колено трубки вискозиметра наливают объем жидкости, равный 20 мл. Вискозиметр помещают в вертикальном положении в водяной термостат с температурой 25±0,1 °С, удерживая его в этом положении не менее 30 мин для установления температурного равновесия. Измеряют время истечения испытуемых растворов и натрия хлорида с точностью до 0,2 с [7]. Время истечения испытуемой жидкости определяют как среднее не менее чем трех измерений.

Концентрацию испытуемого раствора в мг/мл рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{V \cdot X \cdot a}{100}.$$

Значение приведенной вязкости ($м^3/кг$) рассчитывали по формуле:

$$\eta_{прив} = \frac{(\tau - \tau_0) \cdot 100}{\tau_0 \cdot V \cdot X \cdot a},$$

где τ – время истечения испытуемого раствора в секундах; τ_0 – время истечения раствора натрия хлорида в секундах; V – объем препарата в миллилитрах; а – коэффициент, учитывающий разведение, равный 0,75 для испытуемого раствора 2, 0,625 – для испытуемого раствора 3, 0,5 – для испытуемого раствора 4, 0,25 – для испытуемого раствора 5; X – содержание хондроитина сульфата в лекарственном препарате в мг/мл.

Строят график зависимости приведенной вязкости от концентрации хондроитина сульфата. Точка пересечения полученной прямой с осью ординат (при нулевой концентрации) дает величину характеристической вязкости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение количественного содержания хондроитина сульфата натрия в исследуемых препаратах было проведено для точного построения графика зависимости приведенной вязкости от концентрации лекарственного препарата. Определение количественного содержания хондроитина сульфата в испытуемых инъекционных препаратах было проведено методом турбидиметрического титрования раствором цетилпиридиний хлорида. Добавление цетилпиридиния хлорида к раствору хондроитина сульфата приводит к образованию нерастворимой ионной пары с сульфатной группировкой. Получившийся продукт образует преципитаты в растворе, что ведет к возрастанию мутности, которая может быть измерена с помощью фототрода при 520 нм, погруженного в раствор образца. Результаты турбидиметрического титрования представлены в таблице 2. Стандартные и испытуемые растворы были приготовлены в шести повторениях.

Таблица 2.

Результаты турбидиметрического титрования

№ п/п	Объем титранта, пошедший на титрование, мл			
	Стандартный образец	«Мукосат»	«Хондрогард»	«Драстоп»
1	3,922	3,993	4,005	3,863
2	3,937	4,016	3,990	3,611
3	3,907	3,992	4,105	3,882
4	4,015	3,975	3,961	3,696
5	3,982	4,105	4,086	3,735
6	4,064	4,061	3,866	3,792
Среднее	3,971	4,024	4,002	3,763
Содержание хондроитина сульфата, мг/мл		99,5	99,0	93,1

Для получения прямолинейной зависимости приведенной вязкости от концентрации лекарственные препараты для внутримышечного введения на основе хондроитина сульфата разбавляли раствором натрия хлорида. Ионная сила раствора в ходе разбавления остается постоянной, а подобранная концентрация низкомолекулярного электролита в точности равняется ионной силе исходного раствора полиэлектролита. На основании методики определения характеристической вязкости субстанции хондроитина сульфата натрия [2] в качестве низкомолекулярного электролита для подавления полиэлектролитного набухания был использован 0,2 М раствор натрия хлорида. Среднее время истечения раствора натрия хлорида составило 76,3 с.

Результаты расчета среднего времени истечения испытуемых растворов препарата «Мукосат» и рассчитанные значения приведенной вязкости представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Результаты расчета приведенной вязкости препарата «Мукосат»

Препарата «Мукосат» раствор для внутримышечного введения 100 мг/мл					
Испытуемый раствор	1	2	3	4	5
Концентрация, мг/мл	19,9	14,925	12,44	9,95	4,975
Среднее время истечения	139,3	120,7	112,3	104,0	89,0
Вязкость приведенная, $м^3/кг$	0,0415	0,0389	0,0378	0,0364	0,0333

На основании вышеприведенных результатов был получен график зависимости приведенной вязкости от концентрации препарата «Мукосат», который представлен на рисунке 2.

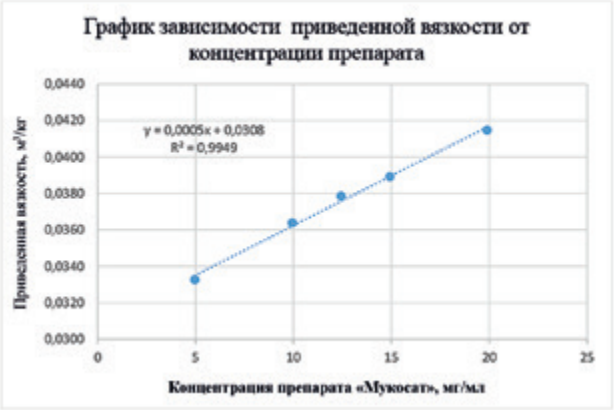


Рисунок 2. График зависимости приведенной вязкости ($м^3/кг$) от концентрации препарата «Мукосат» (мг/мл)

Характеристической вязкостью является величина свободного коэффициента уравнения прямолинейной зависимости приведенной вязкости от концентрации препарата. Характеристическая вязкость исследуемого препарата «Мукосат» равна 0,0308 $м^3/кг$.

Результаты расчета среднего времени истечения испытуемых растворов препарата «Хондрогард» и рассчитанные значения приведенной вязкости представлены в таблице 4.

На основании вышеприведенных результатов был получен график зависимости приведенной вязкости от концентрации препарата «Хондрогард», который представлен на рисунке 3.

Характеристической вязкостью является величина свободного коэффициента уравнения прямо-

линейной зависимости приведенной вязкости от концентрации препарата. Характеристическая вязкость исследуемого препарата «Хондрогард» равна 0,0331 м^3/кг.

Таблица 4.

Результаты расчета приведенной вязкости препарата «Хондрогард»

Препарата «Хондрогард» раствор для внутримышечного введения 100 мг/мл					
Испытуемый раствор	1	2	3	4	5
Концентрация, мг/мл	19,8	14,85	12,375	9,9	4,95
Среднее время истечение	142,47	122,73	113,97	105,17	89,87
Вязкость приведенная, м^3/кг	0,0438	0,0409	0,0398	0,0382	0,0357

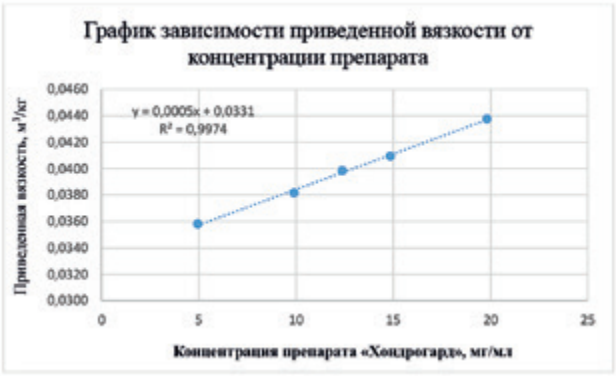


Рисунок 3. График зависимости приведенной вязкости от концентрации (мг/мл) для препарата «Хондрогард»

Результаты расчета среднего времени истечения испытуемых растворов препарата «Драстоп» и рассчитанные значения приведенной вязкости представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Результаты расчета приведенной вязкости препарата «Драстоп»

Препарата «Драстоп» раствор для внутримышечного введения 100 мг/мл					
Испытуемый раствор	1	2	3	4	5
Концентрация, мг/мл	18,62	13,965	11,638	9,310	4,655
Среднее время истечение	145,47	126,30	116,87	108,27	91,63
Вязкость приведенная, м^3/кг	0,0486	0,0469	0,0456	0,0449	0,0431

На основании вышеприведенных результатов был получен график зависимости приведенной вязкости от концентрации препарата «Драстоп», который представлен на рисунке 4.

Характеристической вязкостью является величина свободного коэффициента уравнения прямолинейной зависимости приведенной вязкости от

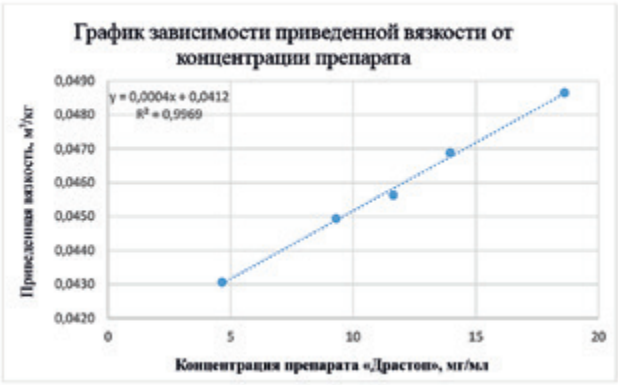


Рисунок 4. График зависимости приведенной вязкости от концентрации (мг/мл) для препарата «Драстоп»

концентрации препарата. Характеристическая вязкость исследуемого препарата «Драстоп» равна 0,0412 м^3/кг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования была доказана возможность определения характеристической вязкости для инъекционных препаратов на основе хондроитина сульфата для внутримышечного введения. Была доказана возможность применения 0,2 М раствора натрия хлорида в качестве растворителя для устранения полиэлектролитного набухания, которое исключает возможность определения характеристической вязкости водных растворов препарата. Была получена прямолинейная зависимость приведенной вязкости от концентрации лекарственного препарата в концентрационных диапазонах от 4,5 до 20 мг/мл с использованием в качестве растворителя раствора натрия хлорида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.С. Северин. Биохимия: Учебник / Под ред Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2003. 779 с.
2. Европейская Фармакопея 8.0. URL: http://www.fptl.ru/biblioteka/farmakopei/evropeyskaya-farmakopeya_8_vol-2.pdf (дата обращения 10.10.2017).
3. Т.Н. Шкарина. Анализ и стандартизация хондроитина сульфата натрия: автореф. дис. ... к.фарм.н. – М.: НЦЭСМП, 2009.
4. Патент РФ 2612014. Средство для лечения артрологических заболеваний / В.Н. Шестаков, Л.В. Персанова, К.Р. Савельева, Т.Ю. Андреевичева. – Бюл. № 7, 2017.
5. О.В. Борисов, Е.Б. Жулина, А.А. Полоцкий, А.А Даринский, И.М. Неелов. Основы физики макромолекул: Учебное пособие. – СПб: Университет ИТМО, 2015. 74 с.
6. А.Д Антипина. Методические разработки к практическим работам по полиэлектролитам: Учебное пособие. – М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1988. – 56.
7. ОФС.1.2.1.0015.15. Вязкость // Государственная фармакопея РФ. XIII изд.

BECKMAN COULTER

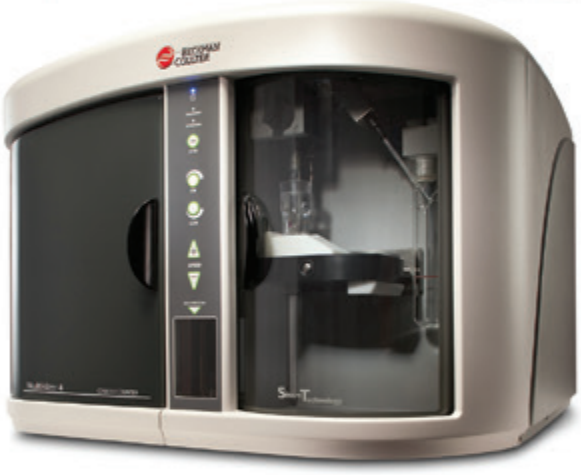
Анализаторы Beckman Coulter Life Sciences для подсчета и характеризации частиц и клеток

Анализатор размера и количества частиц и клеток методом Культера

Multisizer 4e

Расширенные возможности анализа:

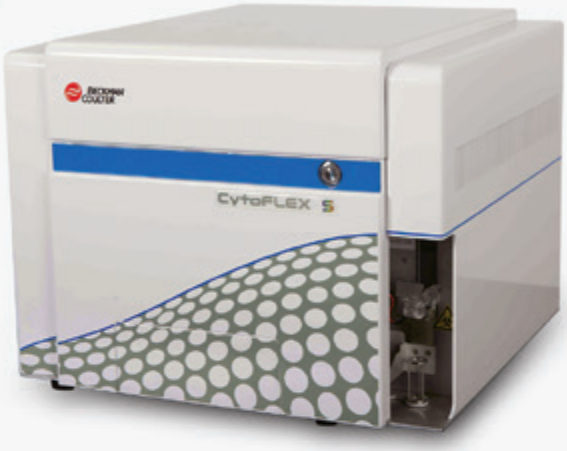
- диапазон размеров частиц: 0,2 – 1 600 мкм
- диапазон измерения: 2 – 80% от размера апертуры
- динамический диапазон: 1 : 40 (диаметр), 1 : 64 000 (объем)



Анализатор размеров частиц методом лазерной дифракции

LS 13 320

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



Анализатор жизнеспособности клеток

Vi-CELL XR

Подсчет количества концентрации, скорости роста и времени удвоения биомассы

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

Проточный цитометр CytoFLEX

Гидродинамическая фокусировка

Скорость сбора данных 30 000 событий в секунду:

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

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

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

УДК 616.98; 578.824.11

РАЗРАБОТКА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ПРЕДПРИЯТИЯ (СОП) СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ

Е.Г. Абрамова[1]*, О.А. Лобовикова[1], И.В. Шульгина[1], А.В. Комиссаров[1,2], Л.В. Савицкая[1], С.В. Генералов[1], М.В. Галкина[1], Ю.К. Гаврилова[1], А.В. Кочкин[1], А.К. Никифоров[1,2]**

Резюме. В статье представлены данные по разработке стандартного образца предприятия (СОП) для определения специфической активности гетерологичного антирабического иммуноглобулина в реакции нейтрализации на белых мышах. Приведены результаты аттестации СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина относительно первого и второго международных стандартных образцов иммуноглобулина человеческого против бешенства. СОП внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях и в отделе биологического и технологического контроля, и используется при проведении выпускающего контроля качества препарата антирабического иммуноглобулина коммерческих серий.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, международный стандартный образец, стандартный образец предприятия, специфическая активность.

DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL SAMPLE TO ASSESS SPECIFIC ACTIVITY OF ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN OBTAINED FROM EQUINE BLOOD SERUM

E.G. Abramova[1]*, O.A. Lobovikova[1], I.V. Shul'gina[1], A.V. Komissarov[1,2], L.V. Savitskaya[1], S.V. Generalov[1], M.V. Galkina[1], Yu.K. Gavrilova[1], A.V. Kochkin[1], A.K. Nikiforov[1,2]**

Abstract. The paper contains the data on the development of quality control sample (QCS) for determination of specific activity of heterologous anti-rabies immunoglobulin in neutralization test on white mice. Given are the results on QCS attestation in reference to international standard samples of human immunoglobulin against rabies. The quality control sample is put on the register of QCSs approved for application in experimental-production subdivisions and in the department of biological and technical control. It is deployed for final quality control of anti-rabies immunoglobulin preparation in commercial batches.

Keywords: anti-rabies immunoglobulin, international reference sample, quality control sample, specific activity.

1 – ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

2 – ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», 410012, Россия, г. Саратов, Театральная пл., д. 1

1 – Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian

2 – Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, 1, Theatrical Square, Saratov, 410012, Russian

* адресат для переписки:
E-mail: rusrapi@microbe.ru
Тел.: (845) 26 21 31

** адресат для переписки:
E-mail: rector@sgau.ru
Тел.: (8452) 23 32 92

ВВЕДЕНИЕ

При контроле качества иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) важную роль играют стандартные образцы (СО), вопросы разработки которых весьма актуальны в последние десятилетия в связи с повышением требований к качеству лекарственных препаратов, выпускаемых в Российской Федерации [1]. К высоковостребованным в российском здравоохранении ИЛП относится иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади (АИГ) производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», применяемый для постэкспозиционной профилактики бешенства у людей при укусах больными или подозрительными на бешенство животными [2]. Одним из важнейших показателей качества гетерологичного АИГ является специфическая активность, определяемая в реакции биологической нейтрализации (РН) вируса бешенства на белых мышах [3]. Неотъ-

емлемой частью контроля специфической активности препарата является использование стандартного образца специфической активности иммуноглобулина. Отсутствие в настоящее время фармакопейного СО (ранее – отраслевого СО) специфической активности АИГ диктует необходимость наличия на предприятии – производителе лекарственного средства международного стандартного образца (МСО) иммуноглобулина человеческого против бешенства либо стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности, аттестованного против указанного международного стандарта ВОЗ [4]. В связи с тем, что ВОЗ рекомендует использовать первичные международные СО в основном для установления значений аттестуемых характеристик вторичных стандартных образцов, а не для рутинного лабораторного контроля, требующего большого количества референтного материала [5], исследования по разработке стандартного образца предприятия специфической активности АИГ являются актуальными.

Согласно классификации стандартных образцов, приведенной в статье Р.А. Волковой и соавторов [6], стандартным образцом предприятия или рабочим стандартным образцом является стандартный образец, утвержденный руководителем предприятия в установленном порядке и применяемый в соответствии с нормативными документами предприятия. СОП активности антирабического иммуноглобулина, аттестованный против международного стандарта ВОЗ, предназначен для определения специфической активности гетерологичного АИГ в реакции биологической нейтрализации на белых мышах при проведении выпускающего контроля качества препарата коммерческих серий.

Целью настоящей работы явились разработка и оценка метрологических характеристик СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили образцы кандидата в СОП специфической активности АИГ. Кандидат для изготовления рабочего стандарта представлял собой специфический иммуноглобулин, полученный из сыворотки крови лошади, иммунизированной рабическим антигеном на основе фиксированного вируса бешенства производственного штамма «Москва 3253». Для осаждения гамма-глобулина иммунную сыворотку фракционировали риванол-спиртовым методом в соответствии с промышленным регламентом на производство иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций. Физико-химические и биологические показатели кандидата в СОП специфической активности АИГ отвечали требованиям фармакопейной статьи предприятия ФСП Р N002639/01-250210 на антирабический иммуноглобулин. Аттестацию СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина проводили в соответствии с ФСП Р N002639/01-250210, раздел «Специфическая активность». Специфическую активность СОП определяли в РН фиксированного вируса бешенства на белых мышах одновременно с определением активности международного образца специфической активности иммуноглобулина против бешенства. В качестве образцов сравнения использовали первый международный стандартный образец антирабического иммуноглобулина: WHO, 1st International Standard for rabies immunoglobulin (WHO International laboratory of Biological standards, Институт сывороток, Копенгаген, Дания) с активностью 59 МЕ в ампуле; второй международный стандартный образец иммуноглобулина человеческого против бешенства: WHO, 2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human [Национальный институт биологической стандартизации и контроля (NIBSC), Великобритания, NIBSC-код: RAI] с активностью 30 МЕ в ампуле. Анализ результатов и расчет титра иммуноглобулина проводили по методу Reed и Muench [7]. Активность препарата СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического, выраженную в международных единицах (МЕ), рассчитывали по формуле:

$$У = \frac{A}{B} \times n,$$

где *У* – активность СОП (в МЕ); *А* – обратная величина титра СОП; *В* – обратная величина титра международного стандарта; *n* – активность международного стандарта (в МЕ).

Для постановки биологической РН вируса бешенства при определении активности СОП были использованы белые мыши (*Mus musculus*) обоего пола линии BALB/c массой 11±1 г (питомник ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), прошедшие контроль генетической стандартности лабораторных животных инбредных линий. Экспериментальные животные содержались в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [8], и приказом № 199н от 01 апреля 2016 г. «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» [9].

Для изготовления СОП очищенный и стерильный раствор иммуноглобулина разливали по 1 мл в ампулы объемом 2 мл (SCHOTT, Германия) при получении СОП в жидкой форме либо по 1 мл во флаконы объемом 3 мл (SCHOTT, Германия) для последующей лиофилизации при изготовлении СОП в форме лиофилизата. Для получения СОП активности АИГ в форме лиофилизата применяли метод лиофильного

Сублимационная установка EPSILON 2-6D (Martin Christ)

высушивания с использованием современной сублимационной установки EPSILON 2-6D (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия) производительностью до 6 кг/24 ч и температурой конденсора –85 °С. В качестве стабилизатора был использован глицин (pure, pharma grade, PanReac AppliChem) в концентрации 2,25±0,25%. Определение потери в массе при высушивании (ПМВ) для лиофилизированных образцов СОП осуществляли согласно ОФС «Потеря в массе при высушивании» [10]. Лиофилизаты растворяли в 1 мл воды для инъекций и определяли время растворения.

Определение стерильности СОП АИГ проводили методом прямого посева согласно ФСП Р N002639/01-250210 «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций».

Для оценки истинного значения специфической активности при аттестации СОП активности антирабического иммуноглобулина использовали среднее арифметическое исследуемой выборки в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» и ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» [11, 12].

Для установления срока годности оценивали стабильность СОП активности антирабического иммуноглобулина в долгосрочных испытаниях при хранении в условиях, соответствующих требованиям санитарных правил СП 3.3.2.3332-16 [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изготовлении СОП специфической активности были учтены требования нормативной документации на иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади.

Для получения рабочего стандартного образца в форме лиофилизата были отработаны условия лиофильного высушивания жидкого антирабического иммуноглобулина на сублимационной установке Epsilon 2-6D, наиболее подходящей для лиофилизации небольших партий препарата. Экспериментальным путем были отработаны следующие оптимальные параметры лиофильного высушивания АИГ в дозировке 1 мл: температура замораживания с учетом ранее определенной эвтектической температуры [14] – минус 38±1 °С; скорость замораживания – 6,5±0,1 °С/ч; продолжительность замораживания 2±1 ч; рабочий вакуум – 7±3 Па; температура нагрева плиты сублиматора – 30±1 °С; скорость повышения температуры при сублимации – 3,0±0,5 °С/ч; продолжительность сублимации – 8±1 ч; конечная температура материала при десорбции – 25±1 °С; продолжительность десорбции – 3±1 ч.

Лиофилизат представлял собой хорошо сформированную таблетку белого цвета, показатель потери в массе при высушивании составил 1,09±0,03%, обеспечив хорошую растворимость препарата в течение 1,0±0,2 мин.

Всего в период с 2010 года по настоящее время было приготовлено и аттестовано 3 серии СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина. Исследования образцов указанных серий по показателю «стерильность», потенциально влияющему на значение и стабильность аттестуемой характеристики, выявили стерильность полученных СОП. Аттестация СОП активности АИГ предусматривала установление аттестуемой характеристики разрабатываемого стандартного образца. Аттестуемой метрологической характеристикой СОП являлась специфическая активность в международных единицах (МЕ) в ампуле/флаконе. Результаты исследований по аттестации образцов СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина относительно международных стандартов ВОЗ представлены в таблице 1.

Как следует из приведенных в таблице 1 данных, аттестуемая характеристика СОП активности антирабического иммуноглобулина серии 32-01-11 имела значение 177,33±13,89 МЕ/мл, для СОП серии 32-02-14 и СОП серии 32-03-15 – соответственно 192,10±13,45 и 198,67±16,62 МЕ/мл. Данные таблицы свидетельствуют о соответствии полученных характеристик требованиям нормативной документации на антирабический иммуноглобулин, согласно которой специфическая ак-

Таблица 1.

Результаты определения специфической активности кандидатов в СОП активности антирабического иммуноглобулина в реакции нейтрализации на белых мышах с использованием международных стандартов ВОЗ

Серия СОП	Дата опыта	Титр активности стандарта ВОЗ	Активность стандарта ВОЗ, МЕ/амп.	Титр активности СОП	Активность СОП, МЕ/мл	Аттестованное значение СОП, МЕ/мл ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$)
32-01-11	28.10.10-10.11.10	1:1503	59	1:4391	172	177,33±13,89
				1:5084	200	
				1:4888	176	
	19.11.10-01.12.10	1:1260	59	1:4000	187	
				1:3274	153	
				1:4375	205	
	09.12.10-22.12.10	1:1000	59	1:2828	167	
				1:2639	155	
				1:3076	181	
32-02-14	29.11.13-13.12.13	1:278	30	1:2000	216	192,10±13,45
				1:1741	188	
	13.12.13-27.12.13	1:616	30	1:3563	174	
				1:3364	164	
	17.01.14- 31.01.14	1:590	30	1:3408	173	
				1:3562	181	
				1:4000	203	
	07.02.14-21.02.14	1:500	30	1:3585	215	
				1:3497	210	
				1:3281	197	
32-03-15	13.03.15-27.03.15	1:1300	59	1:4000	182	198,67±16,62
				1:4491	200	
				1:4393	199	
	10.04.15-24.04.15	1:1455	59	1:5040	204	
				1:4709	191	
				1:5769	234	
	22.05.15-05.06.15	1:2000	59	1:5270	156	
				1:7199	212	
				1:7126	210	

тивность препарата должна иметь значение не менее 150 МЕ/мл.

Стабильность СОП по показателю «специфическая активность» в процессе хранения подтверждена в долгосрочных испытаниях в течение предполагаемого срока годности (2 года) с использованием образцов СОП серии 32-01-11 (таблица 2). Определение специфической активности СОП проводили на момент получения и через 2 года 1 месяц хранения. Как следует из данных таблицы 2, значение специфической активности СОП на момент получения составляло 177,33±13,89 МЕ/мл. После хранения СОП в течение 2-х лет и 1 месяца величина аттестуемого показателя СОП по результатам трех последовательных тестов составила 173, 185 и 175 МЕ/мл, что доказывает стабильность СОП активности антирабического иммуноглобулина по показателю «специфическая активность» в процессе хранения в течение срока годности (2 года).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате исследований разработан СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина, аттестованный с применением

Таблица 2.

Исследование стабильности СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина в долгосрочных испытаниях

Серия СОП	Дата выпуска	Срок годности	Дата опыта	Активность СОП, МЕ/мл	Титр СОП/титр международного стандарта
32-01-11	02.2011	02.2013	28.10.10-22.12.10	177,33±13,89	1:4391/1:1503
					1:5084/1:1503
					1:4888/1:1503
					1:4000/1:1260
					1:3274/1:1260
					1:4375/1:1260
					1:2828/1:1000
					1:2639/1:1000
					1:3076/1:1000
			01.03.13-15.03.13	177,67±4,55	1:2884/1:500
					1:3078/1:500
					1:2924/1:500

международного стандартного образца иммуноглобулина человеческого против бешенства. СОП предназначен для оценки специфической активности антирабического иммуноглобулина коммерческих серий. В долгосрочных испытаниях установлен срок годности рабочего стандартного образца – 2 года. СОП активности АИГ утвержден ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора и внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях и в отделе биологического и технологического контроля. По результатам исследований внесены изменения № 4 в фармакопейную статью предприятия ФСП Р N002639/01–250210 на антирабический иммуноглобулин от 09.02.2016 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.Н. Миронов, А.А. Мовсесянц, В.П. Бондарев, Н.А. Озерецковский, Л.Ф. Шимчук. Актуальные вопросы по разработке стандартов качества иммунобиологических лекарственных препаратов // Ведомости НЦЭСМП. 2013. № 2. С. 57–59.
2. А.А. Мовсесянц, А.Ю. Бутырский, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир, Е.Л. Постнова, А.В. Мухачева. К вопросу о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015. № 5(84). С. 85–89.
3. Laboratory techniques in rabies / Ed. by F.X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski. 4th ed. – Geneva: WHO, 1996. 469 p.
4. ФС.3.3.1.0038.15. Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3. – М.: ФЭМБ, 2015. С. 1126–1137.
5. Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards // WHO Expert Committee on Biological Standardization. Technical report series 932. – Geneva, Switzerland: WHO, 2004. P. 73–132.
6. Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина, В.И. Климов, Е.И. Саканян, Ю.В. Олефир, В.А. Меркулов, А.А. Мовсесянц, В.П. Бондарев, И.В. Борисевич, Д.В. Шведов Актуальные вопросы стандартных образцов в сфере обращения биологических лекарственных средств // Биопрепараты. 2016. Т. 16. № 4. С. 229–237.
7. Методы лабораторных исследований по бешенству. 3-е изд. / Под ред. М.М. Каплан, Н. Копровски. – Женева: ВОЗ, 1975. 360 с.
8. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Серии европейских договоров – № 123. URL: https://rm.coe.int/168007a6a8 (дата обращения 29.06.2017).
9. Правила надлежащей лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01 апреля 2016 г. URL: http://depr.mos.ru/upload_local/iblock/fd4/fd4ba77acfb4fee7094a6c681e97c02e/prikaz_minzdrava_rossii_ot_1_aprelya_2016_g._n_199n.pdf (дата обращения 28.06.2017).
10. ОФС.1.2.1.0010.15. Потеря в массе при высушивании // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. С. 557–559.
11. ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» // Государственная фармакопея СССР. XI издание. Вып. 1. Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. С. 199–251.
12. ОФС.1.1.0014.15. Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. – М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. С. 265–315.
13. СП 3.3.2.3332-16. Условия транспортирования и хранения иммунобиологических лекарственных препаратов // Санитарно-эпидемиологические правила. – М. 2016. 19 с.
14. Н.Н. Кочкалова, А.К. Никифоров, Н.Г. Манин, Е.Г. Абрамова. Определение эвтектической температуры и исследование тепловых параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина методами электропроводности и дифференциальной сканирующей калориметрии // Биотехнология. 2011. № 5. С. 80–84.

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)
www.phct.ru

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

УДК 604.2; 571.27; 615.076.7

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ КЛЕТОК ХОЗЯИНА (CHO) МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В БЕЛКЕ АДАЛИМУМАБ

П.М. Исайкина[1]*, В.П. Долгова[2], А.Д. Аскретков[1], Н.В. Орлова[2]**

Резюме. Наличие белков клеток хозяина (HCP) из CHO-клеток в конечном продукте чревато рядом негативных последствий, в связи с этим для получения продукта надлежащего качества необходимо обеспечивать тщательную очистку целевых белков от HCP. Таким образом, при разработке технологии получения готового белкового продукта стоит задача по снижению загрязнения HCP до минимальных уровней. Проведено сравнение наборов иммуноферментного анализа 2-го и 3-го поколения Cygnus technologies для количественной оценки белков клеток хозяина (CHO) в субстанции моноклонального антитела – адалимумаб. В ходе исследования было выяснено, что набор 2-го поколения не показывает истинный уровень белков клеток хозяина, занижая результат. В связи с этим возникает необходимость подтвердить валидность метода определения содержания белков клеток хозяина (CHO) набором 3-го поколения в субстанции адалимумаба по следующим аналитическим характеристикам: тест пригодности системы, специфичность, предел обнаружения, нижний предел измерения, верхний предел измерения, правильность, повторяемость, воспроизводимость, надежность.

Ключевые слова: адалимумаб, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ (ELISA), белки клеток хозяина (CHO), валидация[1].

QUANTITATIVE DETERMINATION OF OF HOST CELL PROTEINS (CHO) BY THE METHOD OF ENZYME IMMUNOASSAY IN THE PROTEIN ADALIMUMAB

P.M. Isaykina[1]*, V.P. Dolgova[2], A.D. Ascretcov[1], N.S. Orlova[2]**

Abstract. is necessary to ensure thorough purification of the target proteins, since the presence of host cell proteins (HCP) from CHO cells in the final product is fraught with a number of negative consequences. Thus, it is has to reduce the contamination of HCP to minimum levels. A comparison of the immunoenzymatic assays of the second and third generations of Cygnus technologies for the quantification of host cell proteins (CHO) in a monoclonal antibody adalimumab was done. It was found that a kit of the 2nd generation does not show the true level of the host cell proteins, underestimating the result. In this connection, it becomes necessary to confirm the validity of the method for determining the total quantity of host cell proteins (CHO) by a set of 3rd generation in adalimumab substance according to the following analytical characteristics: system suitability test, specificity, limit of detection , limit of quantitation , hook capacity, precision.

Keywords: adalimumab, monoclonal antibodies, enzyme immunoassay, host cell proteins (CHO), ELISA, validation.

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

2 ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» («ГосНИИгенетика»), 117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

1 – Moscow Technological University (Institute of fine chemical technologies), 86/3, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

2 – Scientific Center of Russian Federation Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 1, 1st Dorozhniy proezd, Moscow, 117545, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: isaykina94@yandex.ru
Тел.: +7 (495) 246 05 55, добавочный 8-01

** **адресат для переписки:**
E-mail: orlova.chemist@gmail.com
Тел.: +7 (495) 315 37 47

ВВЕДЕНИЕ

Адалимумаб представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело, полученное путем экспрессии в клетках яичника китайского хомячка, причем пептидная последовательность данного белка идентична иммуноглобулину G1 человека. Адалимумаб селективно связывается с фактором некроза опухоли (ФНОα) и нейтрализует его биологические функции за счет блокады взаимодействия с поверхностными клеточными рецепторами к ФНОα [1].

[1]Список сокращений: ИФА (ELISA) – иммуноферментный анализ; CHO (Chinese hamster ovary) – клетки яичников китайского хомячка; RSD (Relative standard deviation) – относительное стандартное отклонение; ppm (parts per million) – частей на миллион, единица измерения концентрации (в нашем случае: 1 ppm = 1 нг/мг); FDA (Food and Drug Administration) – агентство министерства здравоохранения и социальных служб США, один из федеральных исполнительных департаментов; HCP(Host cell proteins) – белки клеток хозяина; АДМБ – адалимумаб.

Получение белка включает очистку белка из культуральной жидкости, содержащей много других белков, включая белки клеток хозяина, липиды и остатки клеток. Из-за наличия большого количества альбумина HCP имеют сходство с иммуноглобулином как по заряду, так и по свойствам [2]. Для очистки такого рода белков применяют аффинную хроматографию, основанную на взаимодействии антиген – антитело. В качестве сорбента зачастую используют сефарозную матрицу с пришитым к ней ковалентной связью белком А, так как иммуноглобулины G имеют высокое сродство к белку А [3]. Но часто HCP захватываются вместе с целевыми белками. Это обусловлено различными взаимодействиями моноклональных антител с белками клеток хозяина, а также сходством свойств целевого белка и некоторых видов HCP [4]. Хотя уровень белков клеток хозяина в лекарственных средствах не регламентирован ни одной из фармакопей, FDA рекомендует снизить их уровень от 1 до 100 ppm [5]. Многие биотехнологические компании используют этот диапазон в качестве ориентира для разработки процесса и спецификаций. Важно обеспечить адекватный мониторинг белков клеток хозяина на всех этапах очистки, а также при поиске оптимально методики очистки. Так как HCP индуцируют иммунные ответы у пациентов, влияют на эффективность связывания моноклональных антител путем блокирования эпитопного сайта антитела [6], кроме того, могут потенциально влиять на качество и стабильность продукта путем образования нежелательных вариантов продукта из-за ферментативной активности отдельных видов HCP, таких как протеаза и дисульфидредуктазы [7]. Точное измерение HCP имеет решающее значение для оценки качества продукта, определения технических характеристик продукта и для разработки или модификации производственного процесса. Поэтому на всех этапах очистки необходимо контролировать эффективность очистки моноклонального антитела от белков клеток хозяина.

Сложность измерения уровня белков клеток хозяина заключается в (1) низких уровнях остаточных HCP, которые находятся совместно с большим избытком белка-продукта; (2) HCP представлены в виде различных видов и анализ должен измерять все эти виды; (3) популяция видов HCP может изменяться во время процесса. В настоящее время существует ограниченное число аналитических методов для выявления, идентификации и количественного определения HCP. Целесообразно выбрать правильную технологию контроля для конкретного биопроцесса, также важно понимать преимущества и ограничения каждого метода, чтобы можно было разработать оптимальную стратегию для конкретного биопроцесса. Для мониторинга уровня HCP часто используют методы ИФА (ELISA) и вестерн-блоттинг. Также для разделения и визуализации используют электрофорез в полиакриламидном геле с различными способами окрашивания. Чувствительность электрофореза в полиакриламидном геле зависит от способа окраски [8]. Например, чувствительность кумасси синего находится в диапазоне 0,05–0,1 мг/полосу, тогда как окрашивание серебром и Сипро рубиновым могут иметь чувствительность 1–5 нг/полосу. Однако чувствительность окрашивания серебром зависит от сульфгидрильной и карбоксильной групп в белке, за счет этого серебро теряет свою чувствительность. С помощью Сипро оранжевого и рубинового можно определить белки клеток хозяина до пикограммов благодаря флуоресценции. Одним из главных недостатков всех методов окрашивания является отсутствие специфичности, то есть присутствие рекомбинантного белка в избытке может закрывать некоторые полосы HCP, находящиеся в меньшинстве. Также методы окраски требуют определенного уровня отношения сигнала к шуму, а огромный избыток основной полосы и ее деградированных форм может затруднить идентификации меньших объектов, таких как HCP, присутствующие в следовых количествах.

Вестерн-блоттинг является методом, в котором электрофоретически разделенные белки в геле переносят на мембрану с помощью электрического заряда, после чего белки могут быть детектированы с помощью меченых специфических антител. Этот метод является чувствительным и специфичным. Образцы, содержащие интересующий белок, сначала разделяются либо одномерными, либо двумерными гелями и переносятся на поливинилиденфторидную или нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану сначала блокируют бычьим сывороточным альбумином или другими белками, которые будут занимать сайты связывания белка на мембране, первичные антитела, выращенные против HCP, инкубируются с мембраной и образуют комплексы с HCP на мембране. Комплекс HCP-антител может быть обнаружен либо путем непосредственной маркировки первичного антитела с помощью фермента, такого как пероксидаза хрена (HRP), или косвенно мечеными вторичными антителами, которые специфически распознают первичные [9]. Тем не менее следует отметить, что IgG, полученные из CHO или NS0, и HCP очень гомологичны. В связи с этим трудно устранить перекрестную реакцию вторичного антитела к человеческим IgG, делающую вестерн-блот нечувствительным и неспецифическим, поэтому вестерн-блоттинг является скорее качественным методом. Таким образом, данному методу не хватает специфичности и чувствительности для обнаружения белков клеток хозяина, к тому же он не позволяет точно количественно оценить содержание белков [10].

В настоящий момент метод иммуноферментного анализа ELISA повсеместно используется для количественной оценки HCP. Также следует отметить, что чувствительность ИФА 100-кратно превышает вестерн-блоттинг, поэтому HCP обычно количественно определяют с использованием иммунологических анализов, таких как последовательный двухсайтный иммуноферментный анализ (ELISA). Тем не менее разработка и проверка этих анализов представляют не-

которую сложность в основном из-за большого разнообразия возможных HCP в продуктах [11]. В данном анализе обычно используют поликлональные антитела, полученные иммунизацией животных типичными антигенами HCP. Эти антигены обычно собирают из культуральной жидкости и затем выращивают в таких же условиях, как и при получении целевого белка [12–14]. Поэтому часто используют коммерческие наборы для количественной оценки белков клеток хозяина с целью увеличения воспроизводимости метода, причем использование таких наборов делает метод менее времязатратным [15]. Однако в различных наборах антитела к белкам клеток хозяина CHO получают разными путями, например в наборе Cygnus #CM015 их получают из клеточного лизата, тогда как в наборе от того же производителя с каталожным номером #F550 антитела выделяют из кондиционированной культуральной жидкости. Это обуславливает видовое различие получаемых антител к белкам клеток хозяина в разных наборах. Поэтому под каждый продукт следует подбирать определенный набор и соответственно требуется валидация выбранного набора под конкретный целевой белок [16].

В связи с этим была поставлена задача протестировать коммерческие наборы для определения белков клеток хозяина для того, чтобы обеспечить достоверные результаты и сделать анализ менее времязатратным.

Цель работы заключается в оценке наборов разных поколений для количественной оценки содержания белков клеток хозяина в белке адалимумаб и последующей валидации процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коммерческие наборы ELISA*:* Cygnus CHO HCP ELISA с каталожными номерами #CM015 и #F550.

Обрудование:

1. Планшетный спектрофотометр Tecan Infiniti 2000 Pro (Австрия).
2. Встряхиватель IKA Lab dancer (Германия).
3. Шейкер-инкубатор ELMI Sky Line ST-3L (Латвия).
4. Дозатор 8-канальный Eppendorf Research.
5. Дозаторы 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл, 5 мл Eppendorf Research.

Приготовление растворов

Образец субстанции адалимумаба разводили водой до концентрации 1; 0,5; 0,4; 0,25 мг/мл. Оригинальный препарат адалимумаба «Хумира» («Веттер Фарма-Фертигунг ГмбХ и Ко.КГ», Германия, номер серии 50064XD02, срок годности 02.2017) доводили водой до концентрации 0,4 мг/мл.

Встряхиватель IKA Lab dancer (Германия)

Затем готовили спайк-образцы:

1) 520 мкл стандартного калибровочного образца 100 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с концентрацией 1 мг/мл;
2) 520 мкл стандартного калибровочного образца 100 нг/мл + 120 мкл образца «Хумиры» с концентрацией 1 мг/мл;
3) 520 мкл стандартного калибровочного образца 40 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с концентрацией 1 мг/мл;
4) 520 мкл стандартного калибровочного образца 40 нг/мл + 120 мкл образца «Хумиры» с концентрацией 1 мг/мл[1].

В наборе Cygnus #CM015 стандартные образцы представлены белками клеток хозяина CHO, полученными из культуральной жидкости с консервацией, в концентрациях: 0; 0,7; 2; 8; 25; 75; 200 нг/мл. В наборе Cygnus #F550 стандартные образцы: 0; 1; 3; 12; 40 и 100 нг/мл.

Буфер для отмывки [Wash Concentrate (20 X), #F004] разводили в 20 раз.

Принцип метода и проведение анализа

Образцы, содержащие белки CHO, реагируют с иммобилизированными антителами, которыми покрыты лунки в плашке. После промывки фермент пероксидазы хрена, меченной антителами к антиCHO, реагирует с последовательным формированием сэндвич-комплекса «антитело на твердой фазе – белок CHO – фермент, меченный антителом». Затем плашка с лунками промывается для удаления всех непрореагировавших компонентов. Далее добавляется субстрат тетраметилбензидин (TMB), который вступает в реакцию. Ко-

[1]Для коммерческого набора Cygnus #CM015 спайк-образцы готовятся предварительным разбавлением водой стандартного образца 200 нг/мл до 100 нг/мл.

личество гидролизированного субстрата считывается на микропланшетном ридере и прямо пропорционально присутствующему в смеси количеству белков CHO.

Перед началом процедуры необходимо выдержать все реагенты при комнатной температуре в течение 15–30 мин.

Процедура на наборе Cygnus #F550:

Для каждого анализируемого образца необходимы две лунки. В каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл коньюгата (Anti-CHO: HPR Conjugate, #F551). В лунку планшета добавляли по 50 мкл стандартов (CHO HCP Standards, #F553) и образцов согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ст. **100 нг/мл**	Ст. 100 нг/мл	Адалимумаб 0,25 нг/мл	Адалимумаб 0,25 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
B	Ст. **40 нг/мл**	Ст. 40 нг/мл	«Хумира» 0,4 нг/мл	«Хумира» 0,4 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
C	Ст. **12 нг/мл**	Ст. **12 нг/мл**	Адалимумаб 0,4 нг/мл	Адалимумаб 0,4 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
D	Ст. **3 нг/мл**	Ст. **3 нг/мл**	Спайк-образец 1	Спайк-образец 1	*	*	*	*	*	*	*	*
E	Ст. **1 нг/мл**	Ст. **1 нг/мл**	Спайк-образец 2	Спайк-образец 2	*	*	*	*	*	*	*	*
F	Ст. **0 нг/мл**	Ст. **0 нг/мл**	Спайк-образец 3	Спайк-образец 3	*	*	*	*	*	*	*	*
G	Адалимумаб 1 нг/мл	Адалимумаб 1 нг/мл	Спайк-образец 4	Спайк-образец 4	*	*	*	*	*	*	*	*
H	Адалимумаб 0,5 нг/мл	Адалимумаб 0,5 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Инкубировали планшет на инкубаторе-шейкере в течение 120 мин со скоростью перемешивания 400 об/мин при температуре +24±4 °C. Разводили концентрированный буфер для отмывки [Wash Concentrate (20 X), #F004] в 20 раз. Выливали все содержимое из планшета. В каждую лунку планшета добавляли 8-канальным дозатором по 300 мкл разведенного буфера для отмывки. Снова выливали все содержимое из планшета. Буфер не должен находиться в лунках дольше нескольких секунд. Повторяли промывку буфером еще 4 раза. В каждую лунку планшета 8-канальным дозатором добавляли по 100 мкл раствора субстрата (TMB Substrate, #F005). Недопустимо пересыхание лунок перед внесением субстрата. Затем инкубировали планшет в темноте без перемешивания в течение 30 мин при температуре +24±4 °C. В каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл раствора стоп-реагента (Stop solution #F006). Измеряли оптическую плотность в лунках планшета на анализаторе СФ при длине волны 450 нм. В качестве референсной длины волны использовали 650 нм.

Процедура на Cygnus #CM015:

Для каждого анализируемого образца необходимы две лунки. Стандартный образец 200 нг/мл не предназначен для построения калибровочной кривой, его использовали для спайк-образцов или же для контроля самого набора. В лунку планшета добавляли по 100 мкл стандартов (CHO HCP Standards, #CM015) и образцов согласно следующей схеме:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ст. **75 нг/мл**	Ст. **75 нг/мл**	Адалимумаб 0,25 нг/мл	Адалимумаб 0,25 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
B	Ст. **25 нг/мл**	Ст. **25 нг/мл**	«Хумира» 0,4 нг/мл	«Хумира» 0,4 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
C	Ст. **8 нг/мл**	Ст. **8 нг/мл**	Адалимумаб 0,4 нг/мл	Адалимумаб 0,4 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*
D	Ст. **2 нг/мл**	Ст. **2 нг/мл**	Спайк-образец 1	Спайк-образец 1	*	*	*	*	*	*	*	*
E	Ст. **0,7 нг/мл**	Ст. **0,7 нг/мл**	Спайк-образец 2	Спайк-образец 2	*	*	*	*	*	*	*	*
F	Ст. **0 нг/мл**	Ст. **0 нг/мл**	Спайк-образец 3	Спайк-образец 3	*	*	*	*	*	*	*	*
G	Адалимумаб 1 нг/мл	Адалимумаб 1 нг/мл	Спайк-образец 4	Спайк-образец 4	*	*	*	*	*	*	*	*
H	Адалимумаб 0,5 нг/мл	Адалимумаб 0,5 нг/мл	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Инкубировали планшет на инкубаторе-шейкере в течение 60 мин со скоростью перемешивания 180 об/мин при температуре +24±4 °С. Разводили концентрированный буфер для отмывки [Wash Concentrate (20 X), #F004] в 20 раз. Выливали все содержимое из планшета и просушивали планшет постукиваниями о бумажную салфетку. В каждую лунку планшета добавляли по 300 мкл разведенного буфера для отмывки. Выливали все содержимое из планшета. Переворачивали планшет вверх дном на салфетку бумажную и интенсивно стучали 1–2 раза. Буфер не должен находиться в лунках дольше нескольких секунд. Повторяли промывку буфером еще 1–2 раза. В каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл коньюгата (Anti-CHO: HPR Conjugate, #F148). Инкубировали планшет на инкубаторе-шейкере в течение 120 мин со скоростью перемешивания 180 об/мин при температуре +24±4 °С. Выливали все содержимое из планшета и просушивали планшет способами, описанными ранее. В каждую лунку планшета добавляли по 300 мкл разведенного буфера для отмывки. Снова выливали все содержимое из планшета. Повторяли промывку буфером еще 4 раза. В каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл раствора субстрата (TMB Substrate, #F005). Недопустимо пересыхание лунок перед внесением субстрата. Инкубировали планшет в темноте без перемешивания в течение 30 мин при температуре +24±4 °С. В каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл раствора стоп-реагента (Stop solution #F006). Измеряли оптическую плотность в лунках планшета на анализаторе СФ при длине волны 450 нм. В качестве референсной длины волны использовали 650 нм. Строили калибровочный график и определяли содержание белков клеток хозяина в образцах с помощью MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных данных выяснено, что набор Gygnus #CM015 не может использоваться для определения HCP CHO для контроля очистки белка адалимумаб, так как набор показывает заниженные содержания HCP, что говорит о плохом отклике ситемы. Результаты количественного определения для наборов второго и третьего поколения представлены в таблице 1.

Таким образом, исходя из полученных данных, целесообразно провести валидацию коммерческого набора Cygnus #F550.

Валидация методики количественного определения белков клеток хозяина на коммерческом наборе Cygnus #F550

Валидация проводилась с целью подтверждения адекватности метода определения содержания белков клеток хозяина (CHO) в субстанции адалимумаба по следующим аналитическим характеристикам: тест пригодности системы, специфичность, предел обнаружения, нижний предел измерения, верхний предел измерения, правильность, повторяемость, воспроизводимость, надежность [17]. При проведении валидационных испытаний используются образцы, указанные в таблице 2.

Тест пригодности системы

При проведении валидации использовались критерии приемлемости, рекомендованные производителем. Результаты представлены в таблице 3.

Вывод: Критерии приемлемости, установленные производителем, соблюдаются.

Нижний предел обнаружения

Предел обнаружения определен в инструкции производителя к набору как концентрация белков CHO, соответствующая сигналу с нулевым стандартом + 2 стандартных отклонения.

Таблица 1.

Результаты количественного определения HCP CHO коммерческими наборами

Образец	Расчетная концентрация HCP CHO, нг/мл		Концентрация HCP CHO, определенная Cygnus #F550		Концентрация HCP CHO, определенная Cygnus #CM015		Recovery = 100* Сэксп/Стеор Cygnus #F550	Recovery = 100* Сэксп/Стеор Cygnus #CM015
	Cygnus #F550	Cygnus #CM015	нг/мл	нг/мкг	нг/мл	нг/мкг		
Адалимумаб 1 мг/мл	–	–	81,914	0,082	6,589	0,007	–	–
Адалимумаб 0,5 мг/мл	–	–	43,037	0,086	2,491	0,005	–	–
Адалимумаб 0,4 мг/мл	–	–	33,603	0,084	2,786	0,007	–	–
Адалимумаб 0,25 мг/мл	–-	–	20,589	0,082	1,498	0,006	–	–
«Хумира» 0,4 мг/мл	не более 0,2 нг/мкг белка		16,461	0,033	0,398	0,001	–	–
Спайк-образец 1	96,609	82,484	98,721	–	50,874	–	102,19	61,68
Спайк-образец 2	84,38	81,325	85,011	–	49,143	–	100,75	60,043
Спайк-образец 3	47,859	33,736	48,522	–	21,152	–	101,95	62,70
Спайк-образец 4	22,775	32,575	21,218	–	20,008	–	93,16	61,421

Таблица 2.

Образцы, используемые для валидации набора Cygnus #F550

№ п/п	ID образца	Принцип приготовления
1	Стандарт 100 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 100 нг/мл
2	Стандарт 40 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 40 нг/мл
3	Стандарт 12 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 12 нг/мл
4	Стандарт 3 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 3 нг/мл
5	Стандарт 1 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 1 нг/мл
6	Стандарт 0 нг/мл	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 0 нг/мл
7	SP1	Буферный раствор: 6,65 г маннитола; 0,653 г моногидрата лимонной кислоты; 0,174 г натрия цитрата дигидрата; 0,776 г натрия гидрофосфата дигидрата; 0,430 г натрия дигидрофосфата дигидрата; 3,083 г натрия хлорида; 0,55 мл полисорбата-80. pH – 4,9-5,2.
8	SP2	Готовый стандарт из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 100 нг/мл
9	SP3	Образец SP2, разведенный образцом SP1 до концентрации 40 нг/мл по схеме: 200 мкл (SP2) + 300мкл (SP1)
10	SP4	Образец SP3, разведенный образцом SP1 до концентрации 12 нг/мл по схеме: 150 мкл (SP3) + 350мкл (SP1)
11	SP5	Образец SP4, разведенный образцом SP1 до концентрации 3 нг/мл по схеме: 100 мкл (SP4) + 300мкл (SP1)
12	SP6	Образец SP5, разведенный образцом SP1 до концентрации 1 нг/мл по схеме: 100 мкл (SP5) + 200мкл (SP1)
13	SP7	Образец субстанции АДМБ, разведенный буферным раствором в 70 раз (до концентрации АДМБ 1 мг/мл) по схеме: a) 50 мкл субстанции АДМБ + 450 мкл образца SP1 b) 100 мкл субстанции АДМБ (a) + 600 мкл образца SP1
14	SP8	Образец SP7, разведенный буферным раствором в 2 раза (до концентрации АДМБ 0,5 мг/мл) по схеме: 250 мкл образца SP7 + 250 мкл образца SP1
15	SP9	Образец SP8, разведенный буферным раствором в 2 раза (до концентрации АДМБ 0,25 мг/мл) по схеме: 250 мкл образца SP8 + 250 мкл образца SP1
16	SP10	Оригинальный препарат «Хумира» (с концентрацией АДМБ 0,4 мг/мл)
17	SP11	КЖ CHO DG44 пустых клеток белков CHO, разведенных с помощью образца SP1 до концентрации, белков CHO с=80 нг/мл
18	SP12	Образец SP11, разведенный до концентрации 60 нг/мл по белкам CHO образцом SP1 по схеме: 750 мкл образца SP11 + 250 мкл образца SP1
19	SP13	Образец SP12, разведенный до концентрации 30 нг/мл по белкам CHO образцом SP1 по схеме: 250 мкл образца SP12 + 250 мкл образца SP1
20	SP14	КЖ CHO DG44 пустых клеток белков CHO, разведенных с помощью воды очищенной до концентрации белков CHO с=80 нг/мл
21	SP15	Образец SP14, разведенный до концентрации 60 нг/мл по белкам CHO водой очищенной по схеме: 750 мкл образца SP14 + 250 мкл воды очищенной
22	SP16	Образец SP15, разведенный до концентрации 30 нг/мл по белкам CHO водой очищенной по схеме: 250 мкл образца SP15 + 250 мкл воды очищенной
23	SP17	Спайк-образец с концентрацией 97 нг/мл по белкам CHO, приготовленный по схеме: 520 мкл готового стандарта из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 100 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с с=1 мг/мл
24	SP18	Спайк-образец с концентрацией 48,19 нг/мл по белкам CHO, приготовленный по схеме: 520 мкл готового стандарта из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 40 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с с=1 мг/мл
25	SP19	Спайк-образец с концентрацией 25,43 нг/мл по белкам CHO, приготовленный по схеме: 520 мкл готового стандарта из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 12 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с с=1 мг/мл
26	SP20	Спайк-образец с концентрацией 18,11 нг/мл по белкам CHO, приготовленный по схеме: 520 мкл готового стандарта из иммуноферментного набора для определения клеток хозяина CHO с содержанием клеток хозяина 3 нг/мл + 120 мкл образца субстанции АДМБ с=1 мг/мл
27	SP21	Субстанция АДМБ, разведенная до концентрации 0,4 мг/мл образцом SP1
28	SP22	Субстанция АДМБ, разведенная до концентрации 0,4 мг/мл водой очищенной

Таблица 3.

Результаты определения пригодности системы

Параметр	Спецификация	Результат	Удовлетворяет спецификации, да/нет
Оптическая плотность стандарта 100 нг/мл	≥1,000	1,035	ДА
Оптическая плотность стандарта 0 нг/мл	<0,300	0,0903	ДА

Для установления предела обнаружения проводят одну аналитическую сессию, в которой на одной плашке измеряют оптическую плотность 10 повторов 0 стандарта. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4.

Нижний предел обнаружения

Наименование образца	OD_i	Среднее значение, $OD_0 = \frac{\sum OD_i}{10}$	Стандартное отклонение $SD_0 = \sqrt{\frac{\sum (OD_i - OD_0)}{9}}$	Предел обнаружения $OD=OD_0+2SD_0$
Стандарт 0 нг/мл	0,087	0,090	0,00608	0,097
	0,094			
	0,091			
	0,089			
	0,086			
	0,095			
	0,091			
	0,091			
	0,088			
	0,095			

Оптическая плотность предела обнаружения метода должна быть ниже оптической плотности стандарта 1 нг/мл.

Вывод: Оптическая плотность предела обнаружения составила 0,097 ед. О.П. Оптическая плотность стандарта 1 нг/мл составила 0,109 ед. О.П.

Оптическая плотность предела обнаружения ниже оптической плотности стандарта 1 нг/мл. Предел обнаружения метода установлен.

Нижний предел измерения

Нижний предел измерения определяется из оптических плотностей стандартов, наносимых для построения калибровки при проведении специфичности в 3 сессиях. Полученные данные сведены в таблицу 5.

Таблица 5.

Нижний предел измерения

Конц. станд., нг/мл	Сессия 1	Сессия 2	Сессия 3	Среднее значение, $OD_{ср} = \frac{\sum OD_i}{2}$	Стандартное отклонение, SD $SD = \sqrt{\frac{\sum (OD_i - OD_{ср})^2}{n-1}}$	RSD, % $RSD = \frac{SD}{OD_{ср}} \cdot 100\%$
100	1,035	1,080	1,190	1,102	0,080	7,238
40	0,416	0,510	0,490	0,471	0,048	10,273
12	0,181	0,260	0,230	0,204	0,025	12,130
3	0,125	0,130	0,120	0,125	0,005	4,000
1	0,109	0,100	0,096	0,102	0,007	6,549
0	0,091	0,088	0,083	0,087	0,004	4,628

Требование: Предел обнаружения – концентрация белков CHO, соответствующая сигналу с нулевым стандартом + 2 стандартных отклонения.

Согласно данным производителя, предел измерения составляет не менее 1 нг/мл, при этом RSD для данной концентрации должно быть не более 20%.

Вывод: По результатам 3 аналитических сессий наименьшей значимой концентрации стандарта, для которой RSD≤20 %, является 1 нг/мл.

Верхний предел измерения (хук-эффект)

Верхним пределом измерения является концентрация 100 нг белков CHO / мл, выше которой начинает проявляться хук-эффект: если концентрация образца превышает верхний предел измерения, то при постановке анализа концентрация белков CHO в таком образце может получиться ниже верхнего стандарта 100 нг/мл. Чтобы избежать такого эффекта, образцы разбавляют.

Специфичность

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов [17].

Специфичность определяли с помощью следующих образцов.

- Образец SP1 (матрикс) – подтверждение отсутствия влияния буферного раствора на результаты анализа. *Критерий приемлемости:* оптическая плотность ниже предела обнаружения.
- Образцы SP2-SP6 – приготовление калибровочных растворов самостоятельно из стокового (коммерческого) калибровочного раствора с концентрацией белков клетки CHO 100 нг/мл. Подтверждение отсутствия влияния альбумина на результаты анализа. *Критерий приемлемости:* Recovery для образцов SP2-SP6 и стандартов 40 нг/мл – 1 нг/мл соответственно менее 15%.
- SP7-SP9 – измерение белков клеток CHO в реальном образце субстанции адалимумаба. *Критерий приемлемости:* RSD для образцов менее 15%.
- SP10 – измерение белков клеток CHO в оригинальном препарате адалимумаба. *Критерий приемлемости:* содержание белков клеток-хозяина должно удовлетворять фармакопейной статье предприятия – не более 0,2 нг/мкг белка.
- SP11-SP13 – подтверждение специфичности набора относительно белков клеток CHO, использующихся при производстве адалимумаба (пробоподготовка проводится с использованием образца SP1). *Критерий приемлемости:* Recovery для групп образцов SP11-SP13 и SP14-SP16 менее 15%.

- SP14-SP16 – подтверждение специфичности набора относительно белков клеток CHO, использующихся при производстве адалимумаба (пробоподготовка проводится с использованием воды очищенной). *Критерий приемлемости:* Recovery для групп образцов SP11-SP13 и SP14-SP16 менее 15%.
- SP21-SP22 – сравнение растворителей. Подтверждение отсутствия влияния растворителей на результаты анализа (необходимо для дальнейшего выбора раствора для разведения образцов в рутинных анализах). *Критерий приемлемости:* Recovery для образцов SP21-SP22[1] менее 15%.

Результаты расчетов представлены в таблицах 6–8.

Таблица 6.

Расчет Recovery для образцов SP2-SP6

Наименование образца	$OD_{измер}$	$OD_{теор}$[1]	Recovery, %
SP2	1,026	1,035	100,877
SP3	0,442	0,416	94,118
SP4	0,185	0,181	97,838
SP5	0,114	0,125	109,649
SP6	0,100	0,109	109,000

Примечание: [1]В качестве $OD_{теор}$ взяты значения $OD_{сред}$, полученные для калибровочных стандартов при постановке рассматриваемой сессии.

Таблица 7.

Расчет Recovery для образцов SP11-SP13 и SP14-SP16

Наименование образца	$C_{измер}$, нг/мл	$C_{теор}$, нг/мл	Recovery, %
SP11	81,583	80	98,060
SP12	65,749	60	91,256
SP13	29,860	30	100,469
SP14	99,700	80	80,241
SP15	92,918	60	64,573
SP16	48,310	30	62,099

Таблица 8.

Расчет Recovery для образцов SP21-22

Наименование образца	$C_{измер}$	$C_{теор}$[1]	Recovery, %
SP22	0,082	0,083	101,220

Примечание: [1]В качестве $C_{теор}$ было взято значение концентрации, полученное для образца SP21 в нг/мкг.

[1]Полное описание образцов представлено в таблице 2.

Выводы:

Поскольку OD образца SP1 ниже предела обнаружения, то можно считать, что буфер не влияет на результаты анализа.

Recovery для образцов SP2-SP6 составляет 100±9,65% что входит в диапазон 100±15%, что подтверждает отсутствие влияния альбумина на результаты анализа.

При измерении белков клеток хозяина в субстанции адалимумаба (SP7-SP9) была установлена их концентрация 0,083 нг/мкг. Измерение проводилось для 3-х различных концентраций адалимумаба, полученное значение концентраций имеет RSD≤15%, что отвечает требованиям производителя тест-системы.

При измерении белков клеток хозяина в оригинальном препарате «Хумира» (SP10) была установлена их концентрация 0,033 нг/мкг.

Recovery для образцов SP11-SP13 составляет 100±8,74% что входит в диапазон 100±15%, что подтверждает специфичность набора относительно белков клеток CHO, использующихся при производстве адалимумаба, при их пробоподготовке с использованием образца SP1 (буферного раствора).

Recovery для образцов SP14-SP16 составляет 100±37,9% что не входит в диапазон 100±15%, что показывает отсутствие специфичности набора относительно белков клеток CHO, использующихся при производстве адалимумаба, при их пробоподготовке с использованием воды очищенной. Вода очищенная не подходит в качестве растворителя.

Recovery образцов SP21-SP22 составляет 100±1,22, то есть входит в диапазон 100±15%, что подтверждает отсутствие влияния вида растворителя на результаты анализа. Но при большом содержании клеток белка хозяина в образце вода не подходит в качестве растворителя. Следовательно, разводить образцы субстанции адалимумаба следует только буферным раствором.

Правильность

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное [15].

Правильность считается установленной, если Recovery находится в диапазоне 80–120%. Полученные данные сведены в таблицу 9.

Таблица 9.

Результаты определения правильности

Наименование образца	OD1	OD2	$OD_{сред}$	С клеток CHO, нг/мл	Recovery = 100* $C_{эксп}/C_{теор}$
SP17	0,983	0,962	0,973	97,721	100,743
SP18	0,487	0,500	0,493	49,522	102,764
SP19	0,299	0,275	0,287	25,194	99,072
SP20	0,255	0,235	0,245	19,886	109,807

Вывод. Правильность установлена, так как Recovery находится в диапазоне 99,072–109,807%, что соответствует установленным требованиям и находится в диапазоне 80–120%.

Точность: повторяемость

В соответствии с данными производителя, приведенными в инструкции производителя по валидации и в инструкции производителя по использованию набора, значение RSD увеличивается с уменьшением концентрации калибровочного стандарта. В соответствии с данными производителя наиболее критичными являются значения повторяемости для стандартов с меньшей концентрацией. Поэтому для установления повторяемости будут проведены испытания стандарта 3 нг/мл (нижняя концентрация из диапазона значений, исследованных производителем). Всего для установления повторяемости необходимо проведение 1 аналитической сессии: 20 повторов стандарта 3 нг/мл на одной плашке. Необходимое требование: RSD ≤15% для стандарта 3 нг/мл. Результаты измерений представлены в таблице 10.

Вывод. RSD для 20 повторов стандарта 3 нг/мг составило 9,448%, что не превышает установленные производителем тест-системы 15%.

Точность: промежуточная прецизионность

Для подтверждения данного значения проводится анализ субстанции адалимумаба (разными людьми) в трёх повторностях и анализ стандарта с концентрацией 3 нг/мл (разными людьми) также в трёх повторностях.

RSD рассчитывают для каждой группы (три повторности, выполненные одним человеком) и затем общее для трёх групп (три группы, выполненные разными людьми) как для образца субстанции, так и для образца стандарта.

Критерии приемлемости: RSD < 15%. Полученные данные и расчеты по ним представлены в таблице 11.

Вывод. Промежуточная прецизионность установлена, так как выполнен критерий приемлемости RSD≤15%.

Таблица 10.

Подтверждение повторяемости

Наименование образца	OD_i	Среднее значение, $OD_3 = \frac{\sum OD_i}{20}$	Стандартное отклонение $SD_3 = \sqrt{\frac{\sum (OD_i - OD_3)^2}{19}}$	Относительное стандартное отклонение $RSD = \frac{SD_3 \times 100}{OD_3}$
Стандарт 3 нг/мл	0,138	0,127	0,012	9,448%
	0,113			
	0,118			
	0,110			
	0,166			
	0,111			
	0,118			
	0,132			
	0,124			
	0,126			
	0,130			
	0,128			
	0,121			
	0,130			
	0,133			
	0,133			
	0,122			
	0,120			
	0,131			
	0,128			

Таблица 11.

Точность: промежуточная прецизионность

Образец	OD 1	OD 2	OD 3	Среднее значение, $X_{ср} = \frac{\sum X_i}{3}$	Стандартное отклонение, SD $SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{ср})^2}{n-1}}$	RSD, % $RSD = \frac{SD}{X_{ср}} \cdot 100\%$
SP10	0,217	0,232	0,224	0,224	0,0075	3,351
Стандарт 3 нг/мл	0,120	0,122	0,121	0,121	0,001	0,826

Установление надежности метода

Всего проведены 2 аналитические сессии на наборах с разным сроком годности. Анализ проводился для образца SP22. Результаты представлены в таблице 12. *Требование*: RSD полученных результатов между сессиями не должно составлять более 15%.

Вывод. Надежность метода установлена, так как RSD полученных результатов между сессиями составляет не более 15%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты валидационных испытаний методики определения остаточных белков клеток хозяина в субстанции адалимумаба методом иммуноферментного анализа показали соответствие показателей установленным требованиям и спецификациям, что позволяет считать методику валидной.

Таким образом, было показано, что набор от *Cygnus #F550* позволяет наиболее точно и адекватно оценивать количественное содержание белков клеток хозяина (CHO) в субстанции адалимумаба, в отличие от набора Gygnus #CM015. Также была продемонстрирована необходимость валидации коммерческих наборов ИФА и рассмотрены некоторые аспекты их валидации.

ЛИТЕРАТУРА

1. D. Ternant, E. Ducourau, P. Fuzibet et al. Pharmacokinetics and concentration–effect relationship of adalimumab in rheumatoid arthritis. Br. // J. Clin. Pharmacol. 2015. № 79(2). P. 286–297.
2. V.N. Sisodiya, J. Lequieu, M. Rodriguez et al. Studying host cell protein interactions with monoclonal antibodies using high throughput protein A chromatography // Biotechnology Journal. 2012. № 7(10). P. 1233-1241.
3. D. Ren, M.R. Darlucio, J.H. Chou. Development of a multi-product leached protein A assay for bioprocess samples containing recombinant human monoclonal antibodies // Journal of Immunological Methods. 2011. V. 366. P. 20–27.
4. S.X. Gao, Y. Zhang, K. Stansberry-Perkins et al. Fragmentation of a highly purified monoclonal antibody attributed to residual CHO cell protease activity // Biotechnol Bioeng. 2011. № 108(4). P. 977–982.
5. Partnership for Public Service. The state of the FDA workforce. – Washington, DC: Author, retrieved, 2017.
6. Y.H. Kao, D.P. Hewitt, M. Trexler-Schmidt et al. Mechanism of antibody reduction in cell culture production processes // Biotechnol Bioeng. 2010. № 107(4). P. 622–632.
7. M. Trexler-Schmidt, S. Sargis, J. Chiu. Identification and prevention of antibody disulfide bond reduction during cell culture manufacturing // Biotechnol Bioeng. 2010. № 106(3). P. 452–461.
8. K. Champion, H. Madden, J. Dougherty et al. Defining your product profile and maintaining control over it, part 2 // BioProcess Int. 2005. № 3(8). P. 52–57.
9. D.P. Speicher. Current protocols in protein science, Chapter 10, Section II. Electrophoretic separation of proteins. – Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2008. P. 10.2.1–10.5.1.
10. X. Wang, A.K. Hunter, N.M. Mozier. Host Cell Proteins in Biologics Development: Identification, Quantitation and Risk Assessment // Biotechnology and Bioengineering. 2015. № 103(3). P. 446–458.
11. N. Kochanowsk, G. Siriez, L. Mukankurayija et al. Host cell protein platform assay development for therapeutic mAb bioprocessing using mammalian cells // BioMed Central. 2015. № 9(9). P. 21.
12. J. Zhu-Shimoni, C. Yu, J. Nishihara, R.M. Wong et al. Host cell protein testing by ELISAs and the use of orthogonal methods // Biotechnol. Bioeng. 2014. № 111(12). P. 2367–2379.
13. Э.Э. Досадина, М.А. Кульметьева, О.Э. Дубовикова и т.д. Синтез и исследование свойств комплекса протеиназ, иммобилизованных на полисахаридных носителях, для медицинского использования // Бутлеровские сообщения. 2016. Т. 46. № 6. С. 1–10.
14. А.Н. Агафонова, Ю.А. Лейкин. Получение и обнаружение антител различных модификаций // Бутлеровские сообщения. 2016. Т. 46. № 6. С. 24–27.
15. D. Ahluwalia, H. Dhillon, T. Slaney. Identification of a host cell protein impurity in therapeutic protein // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2017. V. 141. P. 32–38.
16. Cygnus Technologies. URL: https://cygnustechnologies.com (дата обращения 10.09.2017).
17. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная Фармакопея РФ XIII изд. Т. 1. – М. 2015.

УДК 579.63

НОВЫЙ ПОДХОД К ДЕЗИНФЕКЦИИ ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ (МИКРОБИОЛОГИЧЕКИЕ АСПЕКТЫ)

Н.П. Сачивкина[1]*

Резюме. Проведены микробиологические исследования эффективности обеззараживания поверхностей субмикронным аэрозолем йодида калия, полученным при работе устройства «генератор морского воздуха «Аэройод». В качестве тест-культур использовали бактерии рода *Staphylococcus*. Эффективность деконтаминации составила 35±5%.

Ключевые слова: дезинфекция, чистые помещения, генератор морского воздуха «Аэройод», калиевая соль иодоводородной кислоты, бактерии рода *Staphylococcus*.

A NEW APPROACH TO DISINFECTION OF CLEANROOMS (MICROBIOLOGICALLY ASPECTS)

N.P. Sachivkina[1]*

Abstract. Microbiological studies conducted the effectiveness of surfaces decontamination by using potassium iodide submicron aerosol, made by the device Generator of sea air «Aeroiodine». We used bacteria of the genus *Staphylococcus* as the test cultures. The effectiveness of decontamination was 35±5%.

Keywords: disinfection, cleanrooms, generator, marine air «Aeroiodine», KI, bacteria of the genus *Staphylococcus*.

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

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

* адресат для переписки:
E-mail: sachivkina@yandex.ru
Тел.: 8 (495) 434 37 00

ВВЕДЕНИЕ

Чистые помещения широко применяются в медицине и фармацевтической промышленности. Особое внимание уделяют требованиям к чистоте воздушной среды, так как чаще всего микроорганизмы проникают в продукты при их производстве воздушным путём. Санитарная обработка чистых зон имеет особое значение, на всех стадиях производства необходимо применять меры, сводящие к минимуму микробную контаминацию [1].

В статье рассматривается новый подход к дезинфекции помещений с помощью субмикронного аэрозоля йодида калия.

Очиститель воздуха – устройство «генератор морского воздуха «Аэройод» (далее йодогенератор) – представляет собой комплексный прибор, предназначенный для обогащения воздуха положительно и отрицательно заряженными субмикронными аэрозольными частицами йодида калия. Клиническими исследованиями доказаны стерилизующие свойства воздуха в помещениях, где работают данные приборы, так как аэрозоли йодистого калия подавляют жизнедеятельность микроорганизмов, находящихся в воздухе [2].

На базе кафедры микробиологии и вирусологии медицинского факультета Российского университета дружбы народов были проведены санитарно-микробиологические исследования эффективности обеззараживания поверхностей субмикронным аэрозолем йодида калия.

Цель работы – установить влияние йодогенератора на чистоту воздушной среды помещения, и в частности на концентрацию бактерий в воздухе и на поверхности различных предметов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Испытания проходили в закрытом стеклянном боксе, имеющем следующие размеры: ширина – 3 м, длина – 2 м, высота – 2,9 м.

В качестве тест-культур использовали бактерии рода *Staphylococcus*, музейные и клинические штаммы с заранее известными характеристиками. Для культивирования данных штаммов использовали стеклянные чашки Петри стандартного размера 7 см в диаметре, залитые солевым

агаром. Посевы культур стафилококка осуществляли «газоном» с помощью стерильного шпателя, доводя концентрацию бактерий до 10^3 КОЕ на 1 чашку. Для этого из пробирки 10 мл с концентрацией микробных клеток 10^5, приготовленных по оптическому стандарту мутности, брали градуированной пипеткой 0,1 мл и переносили на плотную питательную среду. Такая концентрация бактерий на 1 чашку является максимально допустимой, так как на следующий день из каждой клетки развивается колония, которая разрастается, и уже через двое суток подсчитать количество бактерий невозможно. К тому же действительная обсемененность рабочих поверхностей в производственных помещениях, медицинских учреждениях или любых других местах гораздо ниже этих показателей. Сравнение условий эксперимента с допустимыми показателями по СанПиН показывает, что эксперимент проводился в существенно более жестких условиях [3, 4].

Опыт проводили в четырех вариантах. Первый вариант (ЙГ): чашки с посевами помещали рядом с йодогенератором на определенное количество времени. Второй вариант (ЙГ+УФ, прямые лучи): повторяли опыт с использованием ультрафиолетовой лампы, то есть обработка посевов шла и прямыми лучами ультрафиолета, и парами из йодогенератора. Третий вариант (ЙГ + УФ, непрямые лучи): опыт с использованием ультрафиолетовой лампы и йодогенератора, но уже прямые лучи от УФ-лампы не попадали на чашки, поскольку посевы были прикрыты щитом. Четвертый вариант (УФ): для сравнения оставляли открытые чашки со стафилококками только рядом с включенной УФ-лампой без обработки парами из йодогенератора. В качестве контроля чашки с посевами сразу ставили в термостат без обработки йодогенератором и УФ-лампой. Посевы выдерживали в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Подсчитывали количество выросших колоний.

В ходе эксперимента были поставлены следующие задачи:

1. Основной опыт – выбор времени экспозиции открытых чашек рядом с приборами до получения достоверной разницы между контролем и опытом. В качестве тест-культуры использовали *Staphylococcus aureus* (музейный штамм).
2. Определение времени работы прибора до открытия чашек с целью накопления паров KI в воздухе помещения для основного опыта.
3. Влияние увеличения времени экспозиции открытых чашек рядом с йодогенератором.
4. Определение воздействия аэрозольных частиц йодида калия на разные штаммы стафилококков. Для выполнения задачи проводили эксперимент с разными культурами из коллекции кафедры микробиологии и вирусологии:
   - золотистым стафилококком (*Staphylococcus aureus*), музейный штамм;
   - эпидермальным стафилококком (*Staphylococcus epidermidis*), музейный штамм;
   - сапрофитным стафилококком (*Staphylococcus saprophyticus*), музейный штамм;
   - клиническим метициллинустойчивым штаммом золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*).

Эффективность приборов (Е) рассчитывали по процентной разности КОЕ в контроле (К) и опыте (О):

$$E = K(\%) - O(\%).$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения времени экспозиции открытых чашек Петри рядом с йодогенератором для получения «видимого» результата до начала эксперимента поместили прибор в бокс и включили на сутки. За это время в воздухе бокса накопились положительно и отрицательно заряженные субмикронные аэрозольные частицы KI [4]. УФ-лампа заранее не включалась. Полученные результаты представлены в таблице 1. Эффективность прибора (Е) при 3-часовой экспозиции работы йодогенератора составила 35±5%.

Таблица 1.

Бактерицидный мониторинг работы устройства «йодогенератор для очистки и дезинфекции поверхностей»

Время	Контроль, КОЕ	ЙГ, КОЕ	УФ, КОЕ	ЙГ+УФ, непрямые лучи, КОЕ	ЙГ+УФ, прямые лучи, КОЕ
1 ч	1000±20	1000±20	900±20	1000±20	900±20
2 ч	1000±20	1000±20	750±20	1000±20	700±20
3 ч	1000±20	600±20	650±20	600±20	560±20

Как видно из приведенных результатов исследования, при установке чашек с ростом рядом с аппаратом йодогенератора происходит достоверное снижение количества жизнеспособных КОЕ стафилококка при определенных условиях. Выяснено, что количество КОЕ бактерий не должно превышать 1000 на 1 чашку стандартного размера (диаметр дна – 7 см). При большей концентрации бактериостатическое действие не проявляется и/или бактерии образуют сплошной «газон», при котором их подсчет становится невозможным. Количество бактерий снижается на 35±5% при такой обработке в течение 3 ч непрерывной работы.

Таблица 2.

Эффективность дезинфекции помещения с помощью субмикронного аэрозоля йодида калия

Время работы прибора до открытия чашек Петри	1 ч	2 ч	3 ч	4 ч	5 ч	6 ч	7 ч	8 ч
КОЕ на чашках после эксперимента	1000±20	1000±20	980±20	600±20	600±20	600±20	600±20	600±20

В основном опыте, как уже было отмечено, йодогенератор включали за 24 ч. Для применения прибора на производстве целесообразным было изучить скорость накопления паров йодида калия в воздухе помещения, необходимого для дезинфекции.

Для определения эффективного времени работы прибора до открытия чашек с целью накопления паров KI в воздухе помещения прибор включали на разное количество часов (таблица 2). Далее оставляли чашки Петри открытыми на 3 ч рядом с йодогенератором. Результаты увеличения времени экспозиции открытых чашек рядом с йодогенератором представлены в таблице 3.

Эффективность обеззараживания помещения (бокс площадью 6 м^2, объемом 17,4 м^3) с помощью генератора морского воздуха «Аэройд» отмечается после не менее 4 ч работы прибора. Экспериментально доказано, что проведение опыта через 1, 2, 3 ч после включения аппарата не давало результата и разницы между контрольными и опытными чашками не наблюдалось. Увеличение времени работы прибора до 6–8 ч до подстановки чашек не давало ещё большего эффекта, а снижение КОЕ оставалось на прежнем уровне – 35±5%. Аналогичные результаты мы получили при удлинении экспозиции открытых чашек рядом с йодогенератором: при увеличении времени экспозиции открытых чашек до 4, 5, 6 часов снижение роста жизнеспособных бактерий оставалось на прежнем уровне – 600±20 КОЕ.

Результаты определения воздействия аэрозольных частиц йодида калия на разные штаммы стафилококков приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Влияние йодогенератора на культуры стафилококка

Культура	Контроль	ЙГ
St. aureus, музейный штамм	1000±20	600±20
St. epidermidis, музейный штамм	1000±20	600±20
St.saprophyticus, музейный штамм	1000±20	600±20
St. aureus, клинический штамм	1000±20	600±20

Как видно из таблицы, применение йодогенератора способствовало снижению микробного загрязнения воздуха, одинаково воздействуя на исследуемые штаммы стафилококка вне зависимости от их отношения к антибиотикам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый подход к дезинфекции чистых помещений методом аэрозольного распыления йодида калия с помощью прибора «генератор морского воздуха «Аэройод». Проведенными микробиологическими исследованиями доказана эффективность обеззараживания помещений от бактерий рода *Staphylococcus* с помощью аэрозоля йодида калия, эффективность деконтаминации составила 35±5%.

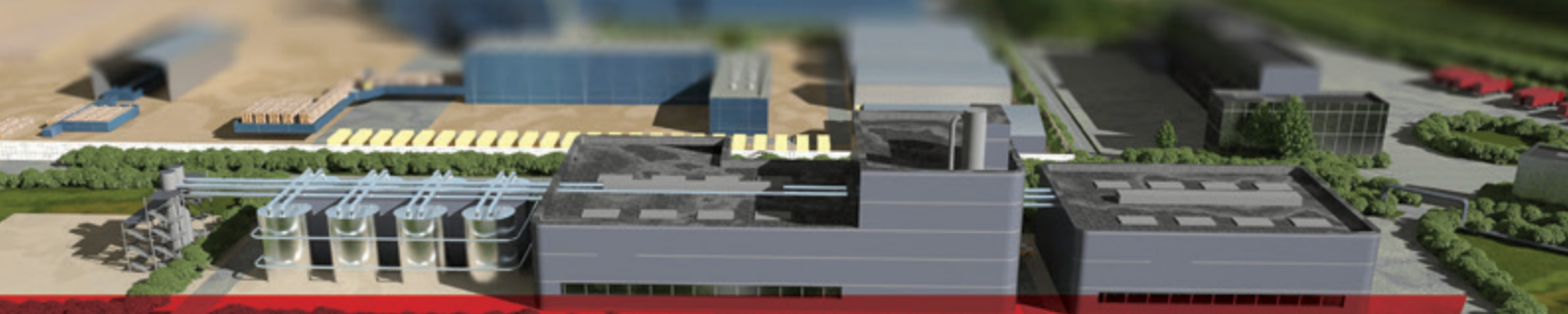
Установлено, что эффективность обеззараживания не зависит от наличия ультрафиолетового света, что свидетельствует об отсутствии необходимости наличия в воздухе окисленных форм йода.

Сравнение условий эксперимента с допустимыми значениями по СанПиН показывает, что эксперимент проводился в существенно более жестких условиях. Это открывает широкие перспективы для получения еще более высоких результатов по обеззараживанию поверхностей от патогенных микроорганизмов, а также по подбору более оптимальных и экономичных режимов работы йодогенератора.

Устройство «генератор морского воздуха «Аэройод» безопасно и для окружающей среды, и для людей, обладает бактерицидным действием и может быть рекомендовано для снижения микробного загрязнения воздуха и поверхностей в специализированных помещениях как в присутствии, так и в отсутствие людей в качестве заключительного звена в комплексе санитарно-гигиенических мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Комментарии к руководству Европейского союза по надлежащей практике производства лекарственных средств для человека и применения в ветеринарии. – М.: Перо, 2016. 496 с.
2. Устройство «генератор морского воздуха «Аэройод». URL: http://www.aeroiod.com/ (дата обращения 14.12.2016).
3. СанПиН 2.1.3.1375-03. Гигиенические требования к размещению, устройству, оборудованию и эксплуатации больниц, родильных домов и других лечебных стационаров.
4. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов.



«ФАРМКОНТРАКТ ИНЖИНИРИНГ»

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

ГЕНПОДРЯД

сертификат ИСО 9001-2011 (ISO 9001:2008)

ПОЛНЫЙ ЦИКЛ РАБОТ **«ПОД КЛЮЧ»** ОТ ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПЕЦИАЛИСТОВ

ПРОЕКТИРОВАНИЕ ОТ РАЗРАБОТКИ КОНЦЕПТУАЛЬНОГО РЕШЕНИЯ ДО ФОРМИРОВАНИЯ ПРОЕКТНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ РД

СТРОИТЕЛЬСТВО, ВКЛЮЧАЯ УПРАВЛЕНЧЕСКИЙ КОНСАЛТИНГ И ПЛАНИРОВАНИЕ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОЕКТОВ

ЧИСТЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ НА ОСНОВЕ СОБСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА ОГРАЖДАЮЩИХ КОНСТРУКЦИЙ

ВАЛИДАЦИЯ ОТ ПРОЕКТНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ DQ ДО ВАЛИДАЦИИ ПРОЦЕССА

ИНЖЕНЕРНЫЕ СИСТЕМЫ: АВТОМАТИЗАЦИЯ, ВЕНТИЛЯЦИЯ, КЛИМАТИЧЕСКИЕ, ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ КОММУНИКАЦИИ

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ СКЛАДЫ

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

Пергаев Михаил Анатольевич

Руководитель направления проектирование и строительство, инжиниринг

Фроленков Константин Александрович

Руководитель направления синтез субстанций

Лемперт Галина Витальевна

Главный технолог-проектировщик, руководитель проектного офиса в Санкт-Петербурге

ФАРМКОНТРАКТ ИНЖИНИРИНГ: ВМЕСТЕ МЫ СОЗДАЕМ БУДУЩЕЕ РОССИЙСКОЙ ФАРМАЦЕВТИКИ!

Лицензия на проведение работ с использованием сведений составляющих гостайну № 27688 от 20.01.2016
Свидетельство СРО № 4204.01-2017-7724838223-П-192 от 24.01.2017

Pharmcontract® group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

www.phct-engineering.ru

info@phct-engineering.ru

УДК 543.865/.867

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ОБЪЕКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО И СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ФАРМАЦИИ (ОБЗОР)

О.В. Тринеева[1]*

Резюме. Разработка новых и совершенствование существующих методов определения антиоксидантной активности – актуальная задача фармации, косметической и пищевой промышленностей. В настоящей работе проведена систематизация и анализ методов определения антиоксидантной активности, которые нашли наиболее широкое применение и описаны в отечественной литературе. Наиболее широко используются электрохимические и спектрофотометрические методы анализа. Сегодня не существует метода, который дал бы полную информацию о состоянии и взаимодействиях сложных систем, в которых образуются и вступают в реакции антиоксиданты. Нет также единого термина, который бы определял антиоксидантные свойства соединения. Все существующие методы определения антиоксидантной активности страдают теми или иными недостатками. Следует отметить объективную невозможность существования не то что единого метода, но даже возможности сравнения результатов, полученных разными методами. Поэтому каждый исследователь, исходя из своих целей и возможностей, выбирает готовый, создает новый, модифицирует уже известный метод или зачастую прибегает к исследованию антиоксидантной активности изучаемого объекта при помощи комплекса различных методов.

Ключевые слова: антиоксиданты, антиоксидантная активность, антирадикальная активность.

METHODS OF DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PLANT AND SYNTHETIC ORIGINS IN PHARMACY (REVIEW)

O.V. Trineeva[2]*

Abstract. The development of new and improvement of existing methods for determining antioxidant activity is an urgent task of pharmacy, cosmetic and food industries. In the present work, the systematization and analysis of methods for determining antioxidant activity have been carried out, which have found the widest application and are described in the domestic literature. The most widely used electro-chemical and spectrophotometric methods of analysis. Today there is no method that would give complete information about the state and interactions of complex systems in which antioxidants are formed and enter into the reaction. There is also no single term that would determine the antioxidant properties of the compound. All existing methods for determining antioxidant activity suffer from one or other of the following drawbacks. It should be noted the objective impossibility of existence is not that of a single method, but even the possibility of comparing the results obtained by different methods. Therefore, each researcher, based on his goals and capabilities, chooses the ready, creates a new one, modifies an already known method, or often resorts to the study of the antioxidant activity of the studied object using a set of different methods.

Keywords: antioxidants, antioxidant activity, antiradical activity.

1 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394006, Россия, г. Воронеж, Университетская пл., д. 1

1 – Voronezh State University, 1, Universitetskaya pl., Voronezh, 394006, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: trineevaov@mail.ru
Тел.: 8 (473) 253 07 89

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время не вызывает сомнений важная роль нарушений в регуляции свободнорадикальных процессов, происходящих в организме, что является одной из причин таких тяжелых патологий, как лучевая болезнь, атеросклероз, инфаркт миокарда, диабет, рак и ряд других заболеваний, возникновению и прогрессированию которых способствует действие неблагоприятных экологических факторов, а в ряде случаев – генетические аномалии. В живых клетках существует совершенная система антиоксидантной защиты, регулирующая процессы образования свободных радикалов (СР) и ограничивающая накопление в клетках как самих СР, так и токсичных продуктов их деятельности. Кумуляция СР в организме возрастает из-за снижения эффективности естественной антиоксидантной системы, вызванной воздействием радиации, УФ-облучения, курения, алкоголя, постоянных стрессов, некачественного питания. Против токсичных

эффектов свободных радикалов клетки используют различные механизмы защиты организма. Поэтому терапия с включением антиоксидантов (АО) находит все большее применение при лечении данных заболеваний. Одновременно расширяется выпуск фирменных антиоксидантных препаратов, включающих разнообразные компоненты природного или синтетического происхождения [1].

Последнее двадцатилетие ознаменовано повышенным вниманием как медицины, так и химической промышленности к продуктам переработки лекарственного растительного сырья (ЛРС), которое содержит богатый комплекс биологически активных веществ (БАВ), многие из которых проявляют АОА. Поиск, методы выделения и исследование перспективных природных источников веществ, обладающих антирадикальной активностью (АРА) и антиоксидантной активностью (АОА) наряду с разработкой доступных и экспрессных методов определения АОА в настоящее время является одной из актуальных задач современной медицины, фармации, косметологии и пищевой промышленности. Значительный вклад в развитие данного направления сделаны такими отечественными учеными, как Г.К. Будников, И.Ф. Абдулин, Х.З. Брайнина, В.Р. Хайруллина, Я.И. Яшин, Н.В. Храпко, Т.Г. Цюпко, В.В. Хасанов, А.А. Лапин, Т.В. Максимова, Н.В. Сизова и другие [2–21].

Целью настоящей работы является обобщение и систематизация методов определения АОА объектов растительного и синтетического происхождения фармацевтического назначения, описанных в отечественной литературе.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ АНТИОКСИДАНТАХ (АО)

Группа веществ, предотвращающих образование сильных окислителей *in vivo*, разнообразна. К ним относится SH-содержащая аминокислота цистеин, некоторые пептиды и белки (глутатион, альбумин), убихинон, аскорбиновая и мочевая кислоты, токоферолы, каротиноиды, флавоноиды и др. Определение АОА позволяет судить о возможной физиологической ценности исследуемых объектов. Определение содержания отдельных АО, как правило, недостаточно, поскольку в этом случае не учитываются процессы взаимного окисления/восстановления и влияние матрицы аналита [20].

Значительное количество природных АО фенольного класса, присутствующих в ЛРС, обусловливает их антиоксидантное действие. Содержание флавоноидов наряду с аскорбиновой кислотой и провитамином А является важнейшим показателем биологической ценности ЛРС. Существенным оказывается синергизм действия аскорбиновой кислоты с флавоноидами в регуляции окислительно-восстановительных процессов [22].

Связь структуры и АОА

В основе биологической активности природных АО лежат процессы торможения развивающегося радикального окисления тканевых липидов путём взаимодействия активных радикалов с биоантиоксидантами [23]. Примечательно, что величина АОА флавоноидов существенно снижается по мере уменьшения числа свободных фенольных гидроксильных групп в молекулах: кверцетин > рутин > лютеолин-7-глюкозид > апигенин > нарингенин > 7-гидроксифлавон [24–26]. Так, например, оценка АОА различных природных флавоноидов показала, что наибольшей АОА после теафлавина обладают кверцетин и цианидин. Гликозиды кверцетина имеют более низкую АОА, например рутин; наименьшей АОА среди этой группы веществ характеризуются флавоны и флавонгликозиды. Поэтому по количественному содержанию фенольных веществ в растительном сырье можно судить о его антиоксидантных свойствах [22].

Механизм действия АО

Установлено, что полифенолы, токоферолы, флавоноиды проявляют АОА. В теории радикального окисления различаются механизмы линейного обрыва радикальных цепей на ингибиторе и механизм ингибирования, который реализуется через создание комплексов активных радикалов с системами с сопряженными π-связями. По первому механизму взаимодействуют, например, пространственно экранированные фенолы, токоферолы; для этих ингибиторов характерен четкий период индукции. Второй механизм реализуется для природных смесей чаще, в том числе и для эфирных масел. Из присутствующих в них соединений, возможно, выступают в роли ингибитора второго типа хамазулен и нерил-метил-бутаноаты [7].

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АОА

Оценить общую АОА того или иного объекта можно с помощью ***интегральных методов***. В основе методов оценки общей АОА, как правило, лежат реакции взаимодействия с долгоживущими СР, которые служат прототипом СР, образующихся в живой клетке. Обеспечивая получение информации об АОА того или иного образца, такие методы имеют ряд особенностей, которые ограничивают возможности их применения. А именно, анализ проходит в несколько стадий и занимает довольно продолжительное время, аналитический сигнал необходимо регистрировать с помощью дорогостоящих оборудования и реактивов. Кроме того, получаемая информация не является прямой [20].

Методы исследования общей АОА различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способа измерения окисленного соединения. Эти методы дают широкий набор результатов, которые нельзя использовать по отдельности, – они должны быть интерпретированы с осторожностью. По

способам регистрации проявляемой АОА можно разделить методы на волюмометрические, фотометрические, хемилюминесцентные, флуоресцентные, электрохимические и ряд более специфических. Обычно используется протекающая по радикальному механизму модельная реакция (чаще всего – окисления) какого-либо индивидуального соединения, по влиянию на протекание которой и оценивается АОА индивидуального соединения или смеси. Кинетика контролируется либо по поглощению кислорода способами измерения объема, либо по изменению характеристик реакционной смеси – поглощения электромагнитного излучения, флуоресценции, люминесценции и т.д. В ряде случаев создаются условия для генерирования СР с постоянной скоростью добавлением инициаторов либо с химической генерацией радикалов в результате протекания контролируемого химического процесса (реакция Фентона) [10].

В разных методах определяются либо отдельные антиокислительные компоненты (например, витамин Е, аскорбиновая кислота и т.д.), либо общая АОА, что является более информативным. Общая АОА может быть установлена несколькими методами: по поглощению кислорода при перекисном липидном окислении, окислению кроцина, хемилюминесценции с люминолом, окислении R-фикоэритрина, чувствительности эритроцитов к гемолизу, восстанавливающей железо активности, генерировании липидных перекисей. Некоторые авторы измеряют активность антиокислительных ферментов, таких как аскорбатпероксидаза, глутатионредуктаза, дегидроаскорбатредуктаза и монодегидроаскорбатредуктаза. Все чаще выполняются ***сравнительные исследования***, когда измеренная одним из методов АОА сравнивается с влиянием соединения на протекание той или иной патологии. Так, авторы фракционировали компоненты зеленого чая, изучили активность фракций по методу DPPH и оценили их влияние на рост клеток рака желудка [10].

Титриметрические методы

Для первичной оценки АОА растительных объектов многие исследователи зачастую используют оригинальную методику, разработанную Т.В. Максимовой с соавторами, основанную на окислении веществ-антиоксидантов перманганатом калия в кислой среде [5]. В литературе опубликованы данные по результатам определения АОА перманганатометрическим методом водных и водно-спиртовых извлечений из таких видов ЛРС, как трава горца почечуйного, листья крапивы двудомной [27], плоды облепихи крушиновидной [28], рябины обыкновенной [29], а также некоторых масляных экстрактов [30] и многих других фармацевтических субстанций растительного происхождения [31]. Недостатком данной методики является то, что данный метод позволяет определить количественное содержание суммы всех веществ, обладающих АОА, в пересчете чаще всего на рутин, кверцетин, галловую и аскорбиновую кислоты, а также пирокатехин, но не дифференцировать их по группам [5].

Электрохимические (ЭХ) методы

Донорно-акцепторный характер реакции между АО и СР позволяет успешно применять ЭХ-методы для оценки АОА различных объектов. ЭХ-методы характеризуются высокой чувствительностью, быстротой процедуры анализа, относительно невысокой стоимостью оборудования и реактивов, а значит, и анализа в целом [20]. ЭХ-методы оценки АОА могут быть разделены на две группы. В части методов используется только ЭХ-регистрация какого-либо соединения, изменение концентрации которого косвенно связано с протеканием процессов окисления. Другая группа методов основана на непосредственном измерении окислительно-восстановительных потенциалов. Указывается, что эти параметры в целом коррелируют с АОА и могут быть использованы для ее оценки [10].

Амперометрический метод. Методом оценки АОА различных многокомпонентных смесей без их предварительного разделения является амперометрический метод, включающий подготовку проб анализируемого и стандартного веществ, их ЭХ-окисление в ячейке амперометрического детектора, усиление электрических сигналов, их регистрацию и расчёт АОА по предложенной математической зависимости [20]. Пример графического отображения выходного сигнала приведен на рисунке 1. Данный способ позволяет оценить суммарную АОА с высокой точностью и воспроизводимостью, используя простое и доступное оборудование [23, 31–34]. Так, для определения АОА антоциановых красителей, полученных из выжимок ягод черники, черной смородины, клюквы, ежевики и винограда, использован прибор «Цвет-Яуза-01-АА», который позволяет проводить прямые количественные измерения АОА. В качестве стандартного вещества обычно используют рутин, кверцетин, галловую или аскорбиновую кислоты или синтетический краситель кармуазин (Е-122) [35–44]. Измерения могут осуществляться в 3 режимах: при постоянном потенциале, при импульсных потенциалах и при сканировании потенциалов во всём диапазоне. Причём, варьируя полярность и величины приложенных потенциалов, можно определять не только суммарную АОА, но и активность отдельных классов соединений. При определении АОА амперометрический метод имеет ряд преимуществ. Без учёта пробоподготовки время отдельного определения занимает несколько минут; анализ (регистрация и обработка результатов) проходит в реальном времени; правильность и воспроизводимость анализа обеспечиваются точным дозированием веществ шестиходовым краном; ошибка определения не превышает 5%; предел обнаружения полифенолов и флавоноидов на уровне нано- и пикограммов. При таких малых концентрациях в условиях совместного присутствия

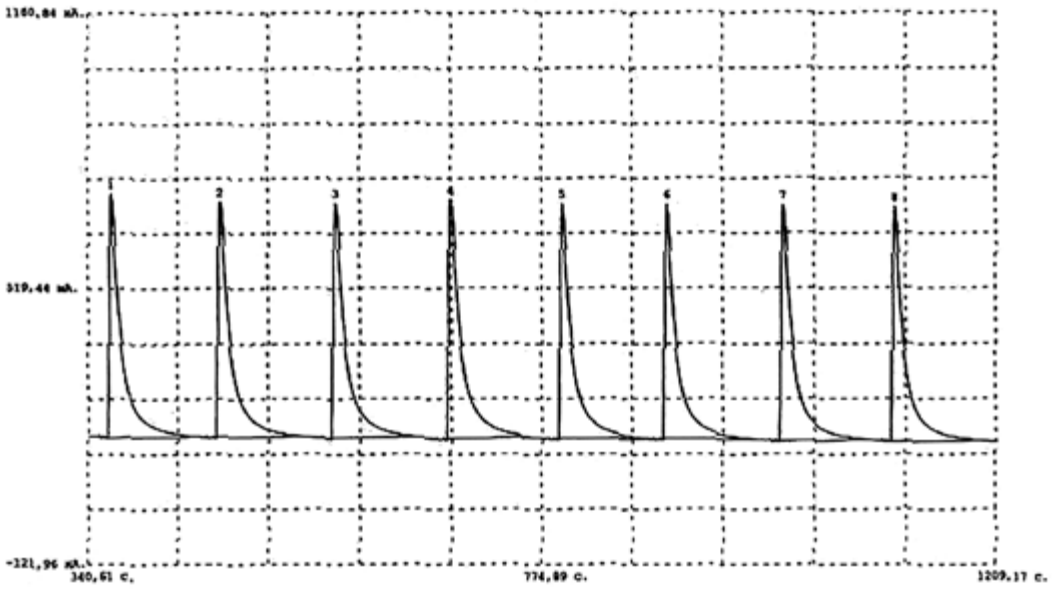


Рисунок 1. **Выходной сигнал, получаемый от раствора рутина с концентрацией 5 мг/дм³**

разных антиоксидантов снижается вероятность их взаимного влияния, в частности проявления синергизма. Идентификацию соединений можно проводить по вольтамперограмме, что иногда более информативно, чем УФ-спектры.

Метод кулонометрии. Для кулонометрического определения АОА экстрактов трав, соков ягод, плодов и овощей, различных чаев, настоев и напитков на основе природного растительного сырья, водных и водно-спиртовых извлечений чаги, бальзамов и настоек в качестве реагента предложен электрогенерированный бром [4, 45, 46]. ЭХ-окисление бромид-ионов на платиновом электроде в кислых средах может привести к образованию Br_3^-, Br_2, а также короткоживущих радикалов брома ($Br^{\cdot}_{эл.}$), адсорбированных на поверхности платинового электрода. Образующиеся при электроокислении соединения брома и сам бром легко вступают в радикальные и окислительно-восстановительные реакции, а также реакции электрофильного замещения и присоединения по кратным связям. Это позволяет охватить широкий круг БАВ различной структуры, обладающих антиоксидантными свойствами. Поэтому электрогенерированный бром можно предложить в качестве некоторого универсального реагента для оценки АОА индивидуальных соединений и их смесей [2]. Из флавоноидов изучена реакция брома с рутином (рисунок 2). Рутин количественно реагирует с бромом в соотношении 1:4. Найденные стехиометрические коэффициенты реакции строго воспроизводимы и позволяют количественно определять рутин. Аскорбиновая кислота количественно окисляется электрогенерированным бромом до дегидроаскорбиновой кислоты. Экспериментально установлено, что фолиевая кислота также реагирует с электрогенерированным бромом, однако стехиометрические коэффициенты этой реакции плохо воспроизводимы. Вместе с полифенолами в извлечениях из ЛРС присутствуют разнообразные, способные взаимодействовать с электрогенерированным бромом производные коричной кислоты – n-оксибензойная, ванилиновая, феруловая, n-кумаровая, кофейная, хлорогеновая. Экспериментально установлено, что растворимые сахара, щавелевая и лимонная кислоты с электрогенерированным бромом не реагируют и вклада в бромную антиоксидантную способность не вносят [2]. Однако в данном случае можно говорить лишь о некоторой эффективной величине АОА растительных настоев, поскольку выделение вклада каждого из составляющих смесь компонентов представляет чрезвычайно сложную задачу.

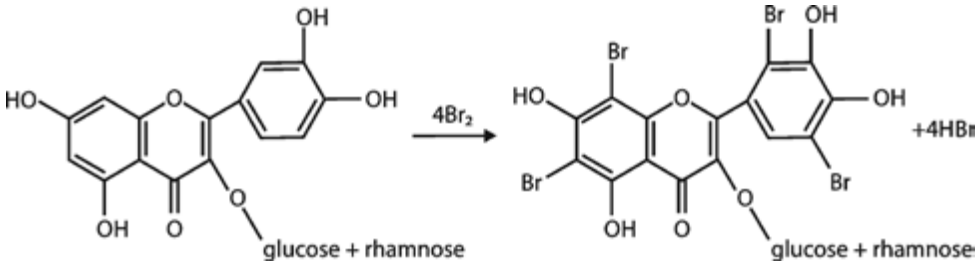


Рисунок 2. **Схема взаимодействия рутина с бромом**

В Казанском государственном университете также разработан ряд методов оценки АОА, основанных на кулонометрических измерениях с использованием электрогенерированного хлора [20].

Метод вольтамперометрии. В вольтамперометрическом методе в качестве модельной реакции используется процесс электровосстановления кислорода (рисунок 3) на ртутно-пленочном электроде, идущий по механизму, аналогичному восстановлению кислорода во многих объектах искусственного и природного происхождения [35, 47–49].

$$O_2 + e^- \leftrightarrow O_2'^- \quad (1)$$

$$O_2'^- + H' \leftrightarrow HO_2 \quad (2)$$

$$HO_2' + H' + e^- \leftrightarrow H_2O_2 \quad (3)$$

$$H_2O_2 + 2H' + 2e^- \leftrightarrow 2H_2O \quad (4)$$

Рисунок 3. Процесс электровосстановления кислорода на электроде

Для определения АОА предложено использовать первую волну электровосстановления кислорода, соответствующую стадиям (1) – (3), когда на поверхности ртутно-пленочного электрода образуются активные кислородные радикалы и перекись водорода как конечный продукт [35, 47–49]. В таблице 1 приведены 4 условно разделенные группы веществ, различающиеся по характеру влияния на процесс электровосстановления кислорода. В качестве критерия АОА исследуемых веществ используется кинетический критерий К, который отражает количество кислорода и активных кислородных радикалов, прореагировавших с АО (или смесью АО) за минуту [35].

Вольтамперометрический метод отличается хорошей чувствительностью и является достаточно простым и дешевым. Однако, как в любом подобном ЭХ-методе, разброс показаний прибора при идентичных измерениях является достаточно высоким [1, 35]. Авторами установлена четкая корреляция между количественным содержанием флавоноидов в экстрактах побегов багульника и их АОА. Чем больше общее содержание флавоноидов, тем сильнее АОА образца [1]. Схема вольтамперометрического определения АОА фенолкарбоновых кислот растительного происхождения на ДНК-модифицированном углеродном трафаретном электроде основана на известном способе количественного определения нативной двунитевой ДНК с использованием комплекса $[Co(phen)_3]^{3+}$ в качестве ЭХ-маркера. Количество $[Co(phen)_3]^{3+}$, связанного со слоем ДНК, снижается по мере разрушения последней в результате реакции расщепления [10]. Метод подходит для контроля низкомолекулярных АО в пищевых продуктах. Циклическая вольтамперометрия способна контролировать снижение АОА плазмы и эффективность диализа. Метод относительно простой и надежный для определения АОА плазмы или сыворотки крови [10].

Метод полярографии. Предложен простой ЭХ-способ определения АОА флавоноидов, основанный на измерении потенциала полуволны окисления на проточном колоночном электроде. Сообщается, что ЭХ-активность соединений коррелирует со способностью подавлять перекисное окисление липидов [10]. Ввиду токсичности ртути, используемой в полярографах, применение данного метода резко ограничено в настоящее время. Так, из Государственной фармакопеи РФ XIII издания исключена ОФС «Полярография».

Потенциометрический метод оценки АОА. Определение АОА растворов потенциометрическим методом основано на химическом взаимодействии АО с медиаторной системой, в качестве которой используется смесь $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$. Добавление растворов, содержащих вещества, проявляющие АОА, в ячейку приводит к изменению окислительно-восста-

Таблица 1.

Группы веществ, различающиеся по характеру влияния на процесс электровосстановления кислорода [35]

№ группы	Названия веществ	Влияние на электровосстановление кислорода	Предполагаемый электродный механизм
1	Каталаза, фталоцианины металлов, гуминовые кислоты	Увеличение тока электровосстановления кислорода, сдвиг потенциала в отрицательную область	Механизм EC* с последующей реакцией диспропорционирования перекиси водорода и частичной регенерацией молекулярного кислорода
2	Соединения фенольной природы, витамины A, E, C, B, флавоноиды, убихинон, глюкоза	Уменьшение электровосстановления кислорода, сдвиг потенциала в положительную область	Механизм EC с последующей химической реакцией взаимодействия АО с активными кислородными радикалами
3	N-, S-, Se-содержащие соединения, амины, аминокислоты, активные альдегиды	Уменьшение электровосстановления кислорода, сдвиг потенциала в отрицательную область	Механизм CEC с предшествующей и последующей химическими реакциями взаимодействия АО с активными кислородными радикалами
4	Супероксиддисмутаза (СОД), порфирины металлов, цитохром С	Уменьшение электровосстановления кислорода, сдвиг потенциала в положительную область	Механизм EC с каталитическим восстановлением кислорода через образование промежуточного комплекса

Примечание: *E – электродная стадия процесса, C – химическая реакция.

новительного потенциала среды в результате взаимодействия АО с окисленным компонентом $K_3[Fe(CN)_6]$ медиаторной системы [20, 50, 51]. Предложенным методом исследованы стехиометрические коэффициенты реакций взаимодействия ряда АО с медиаторной системой. Показана зависимость стехиометрических коэффициентов от структуры молекулы некоторых АО. Данные о стехиометрических коэффициентах реакции приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Стехиометрические коэффициенты реакции медиаторной системы с АО [20]

№ п/п	Вещество	m:n
1	Аскорбиновая кислота	1:2
2	Цистеин	1:1
3	Глутатион	1:1
4	Гидрохинон	1:2
5	Катехол	1:2
6	Танин	1:10-12
7	Мочевая кислота	1:2

$$n \times Me^{ox} + m \times AO_{red} + n \times e \rightarrow n \times Me^{red} + m \times AO_{ox}.$$

Применение потенциометрического метода определения АОА позволит проводить экспрессный отбор образцов для их дальнейшей идентификации. Показатель АОА лекарственных препаратов на основе ЛРС может быть применен для оценки качества и соблюдения технологии при производстве и хранении. Потенциометрический метод адаптирован к условиям проточно-инжекционного анализа, что предоставляет дополнительную возможность его использования непосредственно в процессе производства лекарственных растительных препаратов [20].

Хроматографические методы

Тонкослойная хроматография. Разработана ТСХ-методика определения АОА некоторых групп БАВ растений. В предлагаемом варианте методики зоны индивидуальных веществ, обладающих АОА, после разделения непосредственно на пластине обрабатывали подкисленным раствором калия перманганата, выступающим в данном случае в качестве проявителя. Зоны индивидуальных АО обесцвечивали раствор калия перманганата на пластине, проявляясь в виде белых пятен на розовом фоне [52]. В результате ВЭТСХ-2,2-дифенил-1-пикрилгидразил-анализа выявлены компоненты эфирного масла мяты перечной (ментон, изоментон и пулегон), ответственные за проявление АРА [53]. Данные способы позволяют лишь судить о присутствии АО различной природы в ЛРС и не дают представления об их количественном содержании. Кроме того, разделить все БАВ, присутствующие в ЛРС и проявляющие АОА, в одной хроматографической системе не представляется возможным.

Газовая хроматография (ГХ). Методом капиллярной газожидкостной хроматографии исследованы антиоксидантные свойства 14 индивидуальных эфирных масел. Оценка антиоксидантных свойств проведена по реакции окисления алифатического альдегида (транс-2-гексеналя) в соответствующую карбоновую кислоту в присутствии эфирного масла и без (в контрольном опыте) под действием света и кислорода воздуха при выдерживании в течение 145 суток при комнатной температуре. Количественное содержание гексеналя в пробах определяли методом капиллярной ГХ методом внутреннего стандарта [23]. Степень окисления гексеналя и компонентов эфирных масел (отн. %) определяли по отношению к их содержанию в исходных образцах [23,54].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В работе [88] описан метод одновременного определения общего полифенольного индекса и общего антоцианового индекса с использованием инжекционно-проточной установки и спектрофотометрическим детектированием на двух длинах волн 280 и 520 нм. Аппаратура для жидкостной хроматографии использована для определения АО с двумя детекторами: со спектрофотометрическим на диодной матрице и хемилюминесцентным. Определение АОА фенольных соединений (оксикислот, флавоноидов, токоферолов) методом ВЭЖХ с кулонометрическим детектором приведены в обзоре [88], авторами показано, что чем меньше потенциал окисления фенольных соединений, тем больше его АОА.

Спектральные методы

Метод спектрофотометрии. Наиболее многочисленные методы и их модификации, упоминаемые в литературе, используют фотометрическую регистрацию, вероятно, как самую удобную и доступную. Возможно и спектрофотометрическое определение суммарного содержания АО без разделения смеси АО, при этом результат рассчитывают с помощью хемометрических алгоритмов. К сожалению, недостаточная изученность природных смесей АО и трудоемкость получения многомерных градуировок препятствуют широкому применению таких методик. На практике вместо суммарного содержания АО обычно определяют суммарную АОА изучаемых смесей. Этот интегральный показатель также называют суммарной антиоксидантной емкостью **(Total Antioxidant Capacity, TAC)** [11].

Метод TAC. Колориметрическое определение общей АОА (TAC) по окислению кроцина, представляющего собой красящее вещество желтых стручков плода китайского растения *Gardenia grandiflora*, впервые было предложено авторами [10]. Метод заключается в том, что кроцин окисляется 2,2′-азобис-(2-амидинопропан)гидрохлоридом (ААРН) в присутствии испытуемого образца и без (контрольный опыт)

при термостатировании при 37 °С в течение 60–75 мин. После инкубирования измеряется оптическая плотность при 450 нм. Последние усовершенствования этого метода позволяют определять АОА плазмы человека. Метод был стандартизован по индивидуальному соединению, в качестве которого был использован тролокс – водорастворимый аналог витамина Е (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота), – ***метод TAEC***. Исследования показали, что существенный вклад в общую АОА образцов вносят мочевая кислота, билирубин, альбумин, незначительный вклад приходится на долю аскорбиновой кислоты и совсем никакого – на гемоглобин. ТАС не чувствителен к процессам замораживания – размораживания образцов и дает стабильные результаты при хранении образцов при комнатной температуре до 4 ч. Результаты определений занижаются в присутствии лимонной кислоты примерно на 20%. Метод пригоден для оценки АОА в том числе и пищевых продуктов [10].

Методы, основанные на способности ингибировать образование ТБК-активных продуктов (TBARP). Метод основан на измерении оптической плотности ТБК-активных продуктов при длине волны 532±2 нм. В работе [26] объектами исследования служили флавицин, диосмин, гесперидин, выделенные из растительного сырья. Антиоксидантное действие исследуемых флавоноидов было изучено *in vitro* на модели Fe^{2+}-индуцированного перекисного окисления липидов (ПОЛ) в липосомальной системе, полученной на основе фосфатидилхолина. Эффективность антиоксидантного действия оценивали по степени ингибирования интенсивности ПОЛ липосом в опытных образцах по отношению к контрольным. Интенсивность ПОЛ липосом измеряли по накоплению тиобарбитуровой кислоты (ТБК) [26].

Способ с окислением дезоксирибозы в системе, генерирующей радикалы, описан авторами [10]. 2-дезоксирибоза окисляется гидроксильными радикалами, образуемыми в реакции Фентона, и распадается до малонового диальдегида (МДА), который, взаимодействуя с ТБК, окрашивает раствор в розовый цвет. Спектрофотометриование проводится при 532 нм [55].

Описан метод аскорбатзависимого ПОЛ, основанного на способности к окислению кислородом воздуха в разбавленных водных растворах остатков олеиновой кислоты в составе твина-80 в присутствии кофакторов окисления – ионов железа (II) и аскорбиновой кислоты. АОА оценивают по степени уменьшения концентрации комплекса МДА (продукта окисления) с ТБК по сравнению с контролем. АОА определена данным методом для экстракта семян *Nelumbo nucifera*, чайных экстрактов и трансдермальной мази на основе лимонника китайского [56–59].

Другой фотометрический способ основан на фотоколориметрии железотиацианатных комплексов. Для этого к аликвоте исследуемой смеси добавляют раствор линолевой кислоты в 80%-м этаноле, $FeCl_2$ и NH_4CNS. Смесь инкубируют при 40 °С и определяют концентрацию гидропероксидов, измеряя оптическую плотность при 500 нм [10].

АОА кверцетина в лизосомальных фракциях печени мыши изучалась авторами [11] с использованием гидрофильного генератора радикалов ААРН и гидрофобного генератора радикалов 2,2′-азо-бис-(2,4-диметилвалеронитрила) (AMVN). Ингибируемое кверцетином лизосомальное ПОЛ измерялось по методу TBARS с реакционными частицами ТБК [60]. Отмечается, что АОА кверцетина на модели с гидрофильным генерированием радикалов оказалась выше. Синтетический жирорастворимый АО ди-трет-бутил-п-крезол оказался более активен в реакциях окисления липидов, нежели кверцетин, и тем более активен, чем рутин – гликозид кверцетина. Изучение ингибирующего влияния АОА всех рацематов альфа-токоферола, 2,6-ди-трет-бутил-п-крезола (ВНТ) и тролокса на образование реакционных частиц ТБК и короткоцепочечных альдегидов в гомогенатах печени крыс исследовали авторы [10]. Концентрации TBARS измеряли флуориметрически, а альдегиды определялись методом ГХ после дериватизации пробы метилгидразином. Показано, что содержание TBARS и альдегидов в гомогенатах печени в процессе пробоподготовки снижается в присутствии АО. Предполагается, что эти вещества образуются в результате автоокисления гомогенатов в процессе подготовки пробы. Наиболее эффективным ингибитором образования альдегидов оказался токоферол, а накопление TBARS в максимальной степени подавляется тролоксом [10].

Метод DPPH. Одним из способов оценки АОА является колориметрия СР, основанная на реакции DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), растворенного в метаноле, с образцом АО по схеме [10]:

$$DPPH^* + AO \rightarrow DPPH\text{-}H + A^*.$$

В результате восстановления DPPH АО снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в метаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 514 нм обычными методами спектрофотометрии. Авторы модифицировали способ определения АОА объединением стандартной фотометрической процедуры с методом оптотермического окна (optothermal window, OW) – недорогим, нетрадиционным детектором поглощения. Оптотермическое преобразование позволяет увеличить чувствительность определений на два порядка, повысить линейный диапазон измерений в 16 раз по сравнению с традиционными способами спектрофотометрии. Важным преимуществом оптотермического способа измерения поглощения является также то, что возможна работа с опалесцирующими образцами [10].

Для определения АРА экстрактов ЛРС использовали реакцию со стабильным свободным радикалом DPPH в 96% этиловом спирте [61–70]. Степень обесцвечивания раствора DPPH при добавлении экстрактов определяли спектрофотометрически при 517 нм. Из полученных линейных зависимостей концентрации непрореагировавшего DPPH от объема добавленного экстракта определяли объем настоя, необходимый для 50% деградации DPPH. АРА оценивали по количеству вещества DPPH, вступающего в реакцию с 1 мл экстракта, по формуле [58] или в качестве стандарта использовали α-токоферол, а степень ингибирования DPPH (в %) рассчитывали по формуле [57].

АОА водных экстрактов из корневищ бадана толстолистного изучали также методом DPPH [57]. Однако для количественной оценки АРА извлечений использовали величину скорости реакции радикала DPPH с экстрактом корневищ бадана толстолистного в начальный момент времени (υ). Значение υ рассчитывали как разность между скоростью реакции DPPH с экстрактом в водной среде (υ_0) и скоростью реакции DPPH с водой (υ_{H_2O}). Величину скорости для исследуемых реакций определяли как тангенс угла наклона начального прямолинейного участка кинетической кривой [66]. Чем больше скорость реакции радикала DPPH с экстрактами (υ), тем выше их АРА.

Липосомальное окисление. Об определении АОА соединений на модели окисления униламелярных (одномембранных) липосом кислородом воздуха (катализируемое ионами Fe^{2+}) сообщается авторами [10, 61]. Липосома представляет собой простейшую модель биологической клетки и так же, как последняя, имеет мембрану из двойного слоя фосфолипидов и внутреннее пространство. Продуктами окисления липосом, содержащих фосфатидилхолин, в состав которого входят остатки ненасыщенных жирных кислот, являются диены, детектирование которых проводят фотометрически при 232 нм [10].

Метод FRAP **(Ferric Reducing/Antioxidant Power)** позволяет провести прямое определение низкомолекулярных АО по восстановлению ими железа. В методе FRAP вводят в избытке ионы Fe^{3+} и фотометрический реагент – трипиридилтриазин, 1,10-фенантролин, 2,2′-дипиридил и др. Под действием АО (восстановителей) образуется интенсивно окрашенный комплекс железа (II) с реагентом. При низких pH восстановление трипиридилтриазинового комплекса Fe (III) в комплексе Fe (II) сопровождается появлением интенсивной голубой окраски. Измерения основаны на способности АО подавлять окислительный эффект реакционных частиц, генерируемых в реакционной смеси. Окраска развивается медленно, поэтому аналитический сигнал измеряют через τ минут после смешивания реагентов, не дожидаясь установления равновесия. АОА находят по градуировочному графику, предварительно построенному по растворам стандартного вещества $X_{ст}$. Как правило, АОА выражают в пересчете на $X_{ст}$, то есть указывают массу или число молей $X_{ст}$, которые в данных условиях дают такой же аналитический сигнал, что и 1 г изучаемого объекта. В качестве $X_{ст}$ используют распространенные в природе АО – кверцетин, рутин и др. – либо синтетический аналог витамина Е – тролокс. Величина АОА зависит не только от состава пробы, но и от выбора $X_{ст}$, а также от условий измерения сигнала. Однако при использовании одной и той же методики для совокупности однотипных объектов легко определяемый показатель АОА прямо пропорционален суммарному содержанию АО. Именно поэтому метод FRAP позволяет судить об относительной ценности разных вин, разных сортов чая и других источников поступления АО в организм человека [11].

Созданы аналоги метода FRAP, в которых вместо железа (III) окислителем служат соединения Cu (II), Ce (IV) или Ru (IV). Наиболее известен метод ***CUPRAC***, предложенный турецкими аналитиками. В России метод FRAP обычно используют в модификации, выражая АОА объектов в пересчете на аскорбиновую кислоту [11].

Опубликованы уже сотни работ, в которых биологи, медики и специалисты по технологии пищевых продуктов приводят значения АОА, полученные методом FRAP. Преимущества метода FRAP по сравнению с другими вариантами определения АОА – экспрессность и низкая стоимость единичного анализа, простота оборудования, хорошая сходимость результатов. Это один из немногих методов, обеспечивающих возможность прямого (даже автоматизированного) измерения суммарного содержания АО на уровне 10^{-6}–10^{-3} моль/л. Однако с помощью FRAP трудно определять липофильные АО. Некоторые известные АО (глутатион) не определяются. С другой стороны, не все определяемые этим методом восстановители активны по отношению к свободным радикалам в условиях *in vivo*, что связано с большей кислотностью модельной системы [11]. Химизм, кинетику и механизм процессов, протекающих при определении АОА методом FRAP, изучали лишь немногие авторы (таблица 3), публикаций обзорного типа вообще не было [11].

По литературным данным, АО, определяемые методом FRAP, реагируют с ионами железа (III) с образованием интенсивно окрашенного и координационно насыщенного комплекса железа (II) с фотометрическим реагентом. Более вероятен иной механизм формирования аналитического сигнала, предполагающий первоначальное образование комплекса железа (III) с 2,2′-дипиридилом и его последующее восстановление АО. При одновременном окислении нескольких АО не исключено их взаимодействие, а также окисление первоначально образующихся продуктов избытком железа (III), образование комплексов железа (III) с окисленными формами полифенолов и другие побочные реакции [11, 61].

Таблица 3.

Развитие и применение метода FRAP для определения АОА разных объектов

№ п/п	Реагент	Хст	Объекты анализа	Примечания
1	TPTZ	Fe (II)	Плазма крови	τ=4 мин. Изучены стехиометрия реакции и аддитивность
2	TPTZ	Fe (II), АК	Чай, вино	Определение АОА, обусловленной полифенолами
3	TPTZ	Fe (II)	Чай	Сопоставлены значения АОА разных сортов чая
4	TPTZ	Fe (II)	Модельные растворы	τ=30 мин. Выявлено влияние неводного растворителя
5	DPA	АК	Растения	–
6	DIP	АК	Кровь, ткани	Метод ПИА. Проверено влияние посторонних веществ
7	TPTZ	Fe (II)	Модельные растворы	Изучена чувствительность определения разных АО как функция их структуры и редокс-потенциала
8	TPTZ	КТ	Разные вина	Сопоставлены разные методы определения АОА вин
9	DIP, PHEN	АК	Модельные смеси	τ=60 мин. Применен стоп-раствор. Проверка аддитивности
10	DIP	–	Лекарственные препараты	Тест-метод
11	DIP, PHEN, TPTZ, $[Fe(CN)_6]^{3-}$	Fe (II)	Модельные растворы	Сопоставлены 6 вариантов метода. Выявлена неаддитивность аналитического сигнала при работе с $[Fe(CN)_6]^{3-}$
12	PHEN	АК	Красные сухие вина	Корреляция АОА с другими показателями качества вин
13	FZ	Fe (II)	Модельные смеси	Изучена чувствительность определения разных АО
14	DIP, PHEN	АК	Модельные смеси	Выявлена неаддитивность сигнала при недостатке окислителя
15	DIP	Fe (II)	Модельные растворы	Предложены кинетические параметры оценки АОА

Примечания: условные обозначения: ПИА – проточно-инжекционный анализ, TPTZ-трипиридилтриазин, DIP – 2,2′-дипиридил, PHEN – о-фенантролин, DPA-пиридиндикарбоновая кислота, FZ – феррозин, АК – аскорбиновая кислота, КТ – катехол, τ – время экспозиции, мин.

Плохо проработаны и метрологические аспекты этого анализа. Неизвестны значения пределов обнаружения индивидуальных АО, не стандартизованы условия измерений. Ввиду отсутствия стандартных образцов с аттестованным содержанием АО большое внимание уделяется сравнению результатов, полученных методом FRAP и методами, основанными на торможении радикальных реакций, однако выводы разных авторов противоречат друг другу.

Методы, основанные на способности ингибировать аутоокисление адреналина. Об АОА исследуемого растительного сырья судят также по его способности ингибировать аутоокисление адреналина *in vitro* и тем самым предотвращать образование активных форм кислорода. АОА исследуемых препаратов выражают в процентах ингибирования аутоокисления адреналина и вычисляют по известной формуле [27, 28, 36, 67, 71]. Величина АОА более 10% свидетельствует о наличии АОА. В работе [67] использован метод оценки АОА на начальных этапах свободнорадикального окисления по ингибированию супероксидрадикала в реакции аутоокисления адреналина в щелочной среде при длине волны 347 нм [36].

Однако следует отметить, что наряду с положительными моментами данный метод имеет и недостатки. Результаты, полученные в разное время экспозиции, сильно разнятся между собой и не могут отвечать критерию оценки качества растительного сырья. Поэтому авторы предлагают ввести новый временной параметр – период индукции, который имеется на всех кривых аутоокисления адреналина в присутствии растительных экстрактов и увеличивается с ростом процента БАВ в экстрактах. Скорее всего, именно в это время БАВ и проявляют свое антиоксидантное действие.

Показано, что наиболее специфичным к фенольным соединениям растительных экстрактов являются спектрофотометрический и потенциометрический методы. Определена АОА растительных экстрактов двумя альтернативными методами: по ингибированию супероксидрадикала в реакции аутоокисления адреналина и амперометрическим способом. Обе методики дают объективные результаты. Однако в технике исполнения и экспрессности спектрофотометрический метод уступает амперометрическому [67].

Методы с использованием ферментных систем (ABTS / H_2O_2 / пероксидаза). При инкубировании ABTS [2,2′-азино-бис(3-этилбензтиазолино-6-сульфоновая кислота)] с пероксидазой и перекисью водорода образуется относительно стабильный катион-радикал $ABTS^+$, с максимумом поглощения 414 нм в спектре электромагнитного излучения. В присутствии АО обнаруживается период индукции перед появлением окраски. Низкомолекулярные АО задерживают образование окраски пропорционально своему количеству. Общая АОА китайских трав оценивалась авторами с использованием системы ABTS / H_2O_2 / пероксидаза хрена на планшетном сканере [10]. Исключительно высокой АОА обладают тропическая Almond Terminalia и горный Radicis Cortex. Рабочий раствор, содержащий 2,0 мМ ABTS и 0,86 нМ пероксидазы хрена в 50 мМ фосфатном буфере (pH=7,0), загружается в количестве 240 мкл в ячейки 96-луночной планшеты. Туда же добавляется 10 мкл образца и 25 мкл 1 мМ раство-

ра перекиси водорода в 50 мМ фосфатном буфере. Отсчет времени до начала образования зеленой окраски радикала $ABTS^+$ начинался немедленно. Система калибровалась по аскорбиновой кислоте, выстраиванием зависимостей времени индукции (до появления зеленой окраски) от концентрации аскорбиновой кислоты. АОА образцов выражали в количестве 1 мг аскорбиновой кислоты на 1 г исследованного растения. Метод быстрый, но самый дорогой из всех выше рассмотренных [10, 59, 62].

Спектрофотометрический метод с использованием реактива Фолина – Чикольте. В последнее время наиболее широкое применение находит спектрофотометрическое определение соединений фенольного ряда [72]. Метод основан на окислительно-восстановительной реакции, в ходе которой восстанавливается фосфорно-молибденовая кислота (ФМК). Интенсивность появляющейся синей окраски зависит от концентрации восстановителя. На практике чаще всего используют смесь ФМК и фосфорновольфрамовой кислот, называемую реактивом Фолина – Чикольте. Известно, что с реактивом Фолина – Чикольте кроме компонентов таннино-катехиновой смеси, могут реагировать присутствующие в экстракте восстанавливающие сахара, аскорбиновая кислота, белки и аминокислоты (цистеин и тирозин). Однако в большинстве случаев для этого требуются дополнительные условия или реагенты (так, аскорбиновая кислота и восстанавливающие сахара способны реагировать с ФМК только при нагревании). Кроме того, содержание фенольных соединений в настое значительно больше, чем других компонентов, способных в указанных условиях реагировать с реактивом Фолина. Поэтому данный метод позволяет получать более достоверные результаты [58]. Исследованы АРА и АОА экстрактов различных сортов чая, ЛРС с использованием реактива. Выявлена корреляционная связь между содержанием полифенолов и АОА экстрактов. В качестве стандарта в методе используют водный раствор галловой кислоты [58, 61, 65].

Ферро-/феррицианидный спектрофотометрический метод. Были измерены спектры поглощения ферро- и феррицианида калия. $K_3[Fe(CN)_6]$ имеет максимум в видимой области спектра при 420 нм, в то время как $K_4[Fe(CN)_6]$ при этой длине волны не поглощает. В результате взаимодействия окислителя (восстановителя) с ферро- или феррицианидом калия изменяется соотношение $[Fe(CN)_6]^{4-}/[Fe(CN)_6]^{3-}$ и соответственно оптическая плотность раствора, содержащего медиаторную пару. Уменьшение оптической плотности при добавлении к системе исследуемого АО свидетельствует о том, что анализируемый раствор обладает восстановительными свойствами, увеличение – окислительными. Изменение оптической плотности при 420 нм обусловлено изменением концентрации $K_3[Fe(CN)_6]$ и соответствует концентрации окислителя (восстановителя), выраженной в мольэкв/л. Зависимость оптической плотности растворов, содержащих медиаторную пару, от концентрации восстановителя носит линейный характер [51].

Метод конкурирующих реакций. В работе [73] проводилось сравнение реакционной способности кверцетина (Q) и дигидрокверцетина (DHQ) по отношению к пероксирадикалам методом конкурирующих реакций. Реакция проводилась в термостатируемом реакторе. Начальная концентрация Q составляла $(3{,}30–4{,}05)\cdot10^{-4}$ М, AIBN – $2{,}0\cdot10^{-3}$ М. Пероксильные радикалы генерировали при термическом распаде азодиизобутиронитрила (AIBN) в условиях естественной аэрации. Кинетика процесса отслеживалась спектрофотометрическим методом путем прямого наблюдения за расходованием Q по изменению интенсивности полосы поглощения, обусловленной сопряжением двойной связи в кольце «С» с кетогруппой (λ_{max}=376 нм). Как показали результаты исследования, введение в систему Q – AIBN дигидрокверцетина в различных соотношениях не влияло на скорость расходования Q, что свидетельствует о значительном превышении константы скорости взаимодействия Q с пероксильными радикалами по сравнению с DHQ. DHQ не является конкурирующим реагентом (ингибитором) для Q в реакции с пероксильными радикалами. Таким образом, высокая реакционная способность кверцетина по отношению к пероксильным радикалам обусловлена наличием не только о-дигидроксигрупп в кольце В, как в DHQ, но и двойной связи с оксо- и гидроксильной группой в кольце С [73].

Флуориметрические методы

Метод Oxygen Radical Absorption Capacity, ORAC. Метод определения адсорбционной емкости по отношению к кислородным радикалам [10] является одним из наиболее применяемых в настоящее время. Он был первоначально разработан доктором Гохуа Као в Национальном институте старения (США) в 1992 г. Автоматизированный метод, созданный в 1996 г. Као с доктором Рональдом Прайером, интенсивно применялся при исследованиях АО и окислительного стресса. Метод основан на измерении интенсивности флуоресценции определенного соединения и ее изменении от времени протекания реакции. В присутствии соединений, связывающих кислородные радикалы, увеличивается время флуоресценции вследствие защитного действия АО. Количественное определение АОА осуществляется по площади между двумя кривыми – свободной реакции и с добавлением АО (рисунок 4) [10]. Первоначально в качестве флуоресцирующего вещества применялся белок В-фикоэритрин. Однако оказалось, что он вступает в реакцию с фенольными соединениями, являющимися главными АО растительного происхождения, что приводило к систематически заниженным результатам определения АОА. Поэтому на фирме Brunswick Laboratories впервые применили другое, более стабильное, флуоресцирующее соеди-

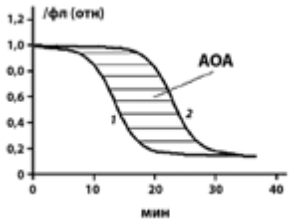


Рисунок 4. Принцип определения АОА по изменению продолжительности флуоресценции. Кривая 1 – кинетика флуоресценции в отсутствии АО, кривая 2 – то же, в присутствии АО

нение – флуоресцеин. Метод относительно простой и чувствительный, но длительный по времени (около 95 мин на определение) и требует наличия флуоресцентного детектора. В этой системе 2,2′-азо-бис-(2-амидинопропан)дигидрохлорид (ААРН) используется в качестве источника перекисных радикалов [10]. Определение продуктов взаимодействия диацилпроизводных флюоресцеина (АЦФ) с гидроксильными радикалами проводят флюориметрически [74]. Интенсивность флюоресценции определяют при длине волны $\lambda_{возб.}$=490 нм и $\lambda_{исп.}$=530 нм на флюориметре.

Зависимости интенсивности флюоресценции от концентрации образующегося во времени гидроксильного радикала в инкубационной среде (при отсутствии и в присутствии тестируемого соединения) носят нелинейный характер, но в фиксированном временном интервале (2000 с) могут быть с достаточно хорошим приближением (p=0,99) аппроксимированы линейными зависимостями вида y=ax+b. Такие зависимости позволяют оценить концентрации флюоресцирующих продуктов, образовавшихся под действием гидроксильных радикалов.

Утверждается, что существует шесть наиболее вредных кислородных реакционноспособных частиц: пероксидные (ROO·) и гидроксильный (HO·) радикалы, супероксид-ион ($O_2^{\cdot-}$), синглетный кислород ($^1O_2$), перекись водорода H_2O_2 и пероксинитрит ($OONO^-$). Метод ORAC измеряет только АОА против пероксидного и гидроксильного радикалов, но в дальнейшем планируется распространить его и на другие вредные реакционноспособные частицы. Указанным методом может быть определена АОА как водорастворимых, так и жирорастворимых объектов, таких как пищевые продукты, напитки, химикаты, добавки, плазма и сыворотка крови, моча и т.д. При этом не требуется практически никакой предварительной пробоподготовки, за исключением того, что биологические образцы перед определением должны соответствующим образом храниться (в сухом льду). Тем не менее анализ одного образца занимает более 1,5 ч. В качестве стандартных соединений применяются тролокс (определение пероксидов) и галловая кислота (гидроксил-радикалы). Соответственно, единицей измерения в методе ORAC является мкмоль стандарта на единицу массы или объема [10].

Метод Гуо и Янга основан на определении АОА соединений по их способности связывать гидрокси-радикалы HO· которые, как полагают, являются наиболее реакционноспособными в физиологических условиях и ответственными за множество нежелательных в организме последствий, таких как онкогенез, атеросклероз и мутации ДНК [10]. В модельной системе, предложенной авторами, генерация гидроксил-ионов протекает из кислорода при участии комплексов железа с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) по следующей схеме:

$$Fe^{2+} – EDTA + O_2 \rightarrow Fe^{3+} – EDTA + O_2^{\cdot-},$$

$$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2,$$

$$Fe^{2+} – EDTA + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow Fe^{3+} – EDTA + H_2O_2,$$

$$Fe^{2+} – EDTA + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} – EDTA + OH^- + {}^{\cdot}OH.$$

Добавления перекиси водорода в этом случае не требуется. Образованные радикалы HO· взаимодействуют с терефталевой кислотой (ТР) с образованием флуоресцирующей (длина волны возбуждения составляла 326 нм, а испускания – 432 нм) 2-гидрокситерефталевой кислоты (HO-TP):

$$TP + {}^{\cdot}OH \rightarrow HO\text{-}TP.$$

С этой реакцией может конкурировать реакция связывания гидрокси-радикалов АО:

$$AO + {}^{\cdot}OH \rightarrow \text{продукты}.$$

Хемилюминесцентные методы

Хемилюминесцентное детектирование пероксирадикалов и сравнение АОА фенольных соединений описано в [10]. В методе, являющемся одной из множества модификаций методов хемилюминесцентного определения АОА, используется способность люминола давать свечение после взаимодействия со СР [41, 68, 75–82]. СР в системе генерируются постоянно в результате инициируемого теплом распада ААРН. Авторы исследовали кинетику хемилюминесценции свободного и ингибированного бутилированным гидрокситолуолом (ВНТ, 2,6-ди-трет-бутил-п-крезол) и тролоксом распада ААРН. Кинетика изменения интенсивности люминесценции (в относительных единицах – RLU) показана на рисунке 5 [10].

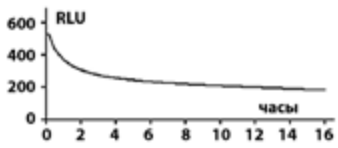


Рисунок 5. Кинетика изменения интенсивности люминисценции люминола (в относительных еденицах – RLU) при отсутствии АО. Индикатор – ААРН

При добавлении образца АО наблюдается подавление люминесценции. При этом в случае соединения тролокс отчетливо заметен период индукции – время, по истечении которого люминесценция возрастает, достигая практически первоначального уровня. Период индукции $T_и$ прямо пропорционален количеству добавленного тролокса (рисунок 6) [10]. Несколько иначе ведет себя ВНТ. При его добавлении не наблюдается полного ингибирования люминесценции, сопровождаемого периодом индукции, но заметно частичное подавление люминесценции (рисунок 7) [10]. Авторы сделали предположение о том, что разное влияние на хемилюминесценцию соединений одного класса (фенолы) вызвано, по-видимому, различной степенью ионизации молекул тролокса и ВНТ вследствие различной кислотности их ОН-групп [10].

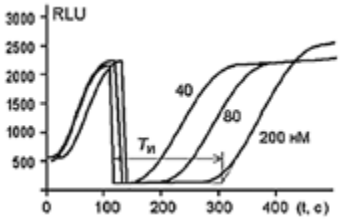


Рисунок 6. Изменение интенсивности люминисценции при добавлении в систему 40, 80 и 200 нМ тролокса

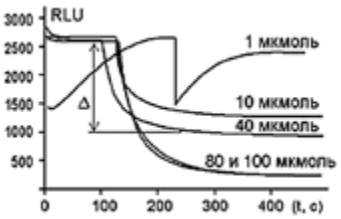


Рисунок 7. Изменение интенсивности люминисценции при добавлении в систему 1, 10, 40, 80 и 100 мкМ ВНТ

Метод фотохемилюминесценции (ФХЛ). Математическое моделирование кинетики ФХЛ с участием рибофлавина в присутствии АО – супероксиддисмутазы и аскорбиновой кислоты провели авторы [10]. Была использована специально разработанная компьютерная программа Kinetic Analyzer. Интенсивность ФХЛ принимали пропорциональной концентрации супероксида, поскольку в системе присутствовал люцигенин. Показано, что экспериментальные кривые ФХЛ описываются достаточно точно для следующей совокупности реакций (в скобках – константы скоростей, $M^{-1}\times c^{-1}$):

$$h\nu + RH \rightarrow R^{\cdot} + O_2^{\cdot-} \ (2{,}3\times10^{-4}\ c^{-1});$$

$$RH + {}^{\cdot}O_2^{-} \rightarrow R^{\cdot} + H_2O_2 \ (1000);$$

$$RH \rightarrow \ldots \ (0{,}005\ c^{-1});$$

$${}^{\cdot}O_2^{-} + {}^{\cdot}O_2^{-} \rightarrow \ldots + \text{фотон} \ (2\times10^{5});$$

$$SOD + {}^{\cdot}O_2^{-} \rightarrow SOD + H_2O_2 \ (1\times10^{5});$$

$$ASC + {}^{\cdot}O_2^{-} \rightarrow \ldots \ (2\times10^{7}).$$

Здесь RH – рибофлавин, ${}^{\cdot}O_2^{-}$ – супероксидный радикал; $R^{\cdot}$ – радикал рибофлавина; SOD – супероксиддисмутаза; ASC – аскорбат.

С использованием двух экспериментальных моделей, фагоцитарной и липосомной, исследовались антиоксидантные эффекты эфирных масел в зависимости от их концентрации. Первая модель представляла собой активированные фагоциты крови человека, вырабатывающие в ответ на стимуляцию большое количество АФК, количество и кинетику продукции которых регистрируют с помощью биохемилюминометра. АОА эфирных масел определяют по степени тушения активированной хемилюминесценции. В липосомной модели окислительное разрушение биомембран, сопровождающееся образованием АФК, моделируют добавлением к суспензии фосфолипидов яичного желтка минеральной кислоты [23].

Метод железоиндуцированной хемилюминесценции (ХЛ). Для оценки способности к переокислению и интенсивности образования СР в жидких продуктах термообработки сапропелей использовали метод железоиндуцированной ХЛ. Для измерения параметров ХЛ в кювету вводили 0,2 мл фракции жидких продуктов и 20 мл фосфатного буфера (pH=8,0). Кювету помещали в светоизолированную термостатируемую камеру хемилюминомера ХЛ-003 ($t_{камеры}$=37 °С). Свечение индуцировали добавлением 1 мл 50 мМ раствора сульфата железа (II). Измеряли следующие параметры хемилюминесценции: светосумму, спонтанное свечение, амплитуды быстрой и медленной вспышек, тангенс угла наклона кривой хемилюминесценции в период нарастания медленной вспышки [80].

Биологические методы

Методы, использующие биологические маркеры. Описан анализ восстанавливающей способности и количественная оценка АОА *in vitro* гидрида кремния и 7 коммерчески доступных водорастворимых АО. Эксперимент включал определение окислительно-восстановительных потенциалов, pH и клеточную фотосенсибилизацию методом спектрофотометрии, что позволило объективно оценить антиокислительную эффективность соединений [10]. Для оценки абсолютной восстановительной способности АО было использовано модифицированное Кларком (1923) уравнение Нернста, связывающее парциальное давление водорода и восстановительный потенциал в единицах rH:

$$E_h = 1{,}23 - RT(pH/F + \ln [1/P_0]/4F).$$

где E_h – измеренный окислительно-восстановительный потенциал; F – константа Фарадея; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура. Число 1,23 – разность измеренного потенциала при

парциальном давлении кислорода в одну атмосферу и в растворе при том же значении pH. rH определяется как

$$rH = - \log P_o,$$

где P_o – парциальное давление кислорода.

Величина rH характеризует абсолютный восстановительный потенциал соединения, исключая влияние pH на величину измеренного окислительно-восстановительного потенциала. Сравнивая величины rH до и после обработки АО, можно получить представление о восстановительной активности соединения, а заодно и сравнить их [10]. Однако измерение восстановительного потенциала хорошо только *in vitro*, проблема моделирования *in vivo* при этом сохраняется. Так, если сделать предположение о том, что наилучшими АО являются энергичные восстановители, то можно дойти до абсурдного вывода об эффективности таких соединений, как борогидрид натрия $NaBH_4$ или алюмогидрид лития $LiAlH_4$, которые в физиологических условиях окажутся, скорее всего, сильнейшими цитотоксикантами. Поэтому наряду с величиной абсолютного восстановительного потенциала авторы рекомендуют оценивать эффективность АО на живой модели [10]. В качестве таковой подходят яйцеклетки китайского хомяка, а в качестве удобных для контроля реакционноспособных кислородных частиц – поглощающие излучение радикалы красителя малахитового зеленого [10].

Достоинства и слабые места использования окисления протеинов в качестве маркера окислительного стресса *in vivo* обсуждаются авторами [8]. Утверждается, что протеины имеют преимущество по сравнению с такими маркерами, как продукты перекисного окисления или ДНК, потому что всякая модификация протеинов весьма сильно отражается на их биологических свойствах. К тому же продукты модификации (окисления) протеинов относительно стабильны и легко детектируемы. Вид их модификации позволяет более точно определить повреждающие механизмы и факторы [10].

Окислительное повреждение ДНК радикалами, образующимися в реакции Фентона, с последующим анализом продуктов окисления использовано авторами [10] для оценки хемопротекторной и АОА соединений. 250 мкг ДНК инкубируется в присутствии или без АО в растворе диметилсульфоксида в трис-буфере при 37 °С в течение 15 мин. Затем добавляются реагенты Фентона, продуцирующие гидроксил-радикалы, и смесь инкубируется еще 45 мин при той же температуре. После инкубации ДНК осаждается этанолом с хлористым натрием. ДНК, содержащая образованные 8-оксопроизводные гуанозина, анализируется после маркирования радиоактивным ^{32}P по описанному методу [10].

Определение АОА на модели тест-системы Parametium caudatum. В последнее время первичной оценке фармакологического эффекта, в том числе и антиоксидантного действия, различных препаратов с использованием теста *in vivo* в литературе уделяется большое внимание. Культура клеток *Parametium caudatum* была использована авторами в качестве биологической модели для определения антиоксидантного (регулирующего ПОЛ) типа действия водных извлечений из ЛРС (на примере листьев крапивы двудомной и плодов облепихи крушиновидной). Инициатором ПОЛ мембран клеток являлся 3% раствор водорода пероксида. Оценку АОА исследуемых объектов проводили в соответствии со значениями индекса биологической активности. Установлено, что настой листьев крапивы двудомной проявляет АОА в концентрациях от $1 \cdot 10^{-1}$ – $1 \cdot 10^{-4}$, в остальных случаях жизнеспособность клеток снижается. Отвары плодов облепихи крушиновидной как свежих, так и высушенных обладают АОА в наивысших концентрациях $1 \cdot 10^{-1}$ и $1 \cdot 10^{-2}$, при увеличении степени разведения данной активностью не обладают, а в большинстве случаев снижают жизнеспособность клеток (рисунок 8). В среднем все исследуемые объекты в высоких концентрациях проявляют антиоксидантные свойства, повышая устойчивость клеток к воздействию процессов свободнорадикального окисления примерно на 20–30% [83].

Рисунок 8. Зависимость индекса АОА исследуемых объектов от их концентрации в растворе

Определение АОА на модели гемолиза эритроцитов. В работе [62] установлена АОА комплексного растительного средства «Литофит» *in vitro* в форме экстракта сухого в условиях перекисного повреждения эритроцитов. Перекисный гемолиз вызывали реактивом Фентона, компоненты которого были использованы в минимальных концентрациях, вызывающих 100% лизис эритроцитов: $Fe_2S0_4 \cdot 7H_20$ – 0,01 мг/мл (в пересчете на 100% раствор перекиси водорода). Рассчитывали концентрацию исследуемого растительного средства, ингибирующую перекисный гемолиз на 50% (IC_{50}).

Определение АОА на лабораторных животных. В работе [84] установлена АОА водного экстракта кипрея узколистного на основании его положительного влияния на физическую работоспособность белых беспородных мышей.

Другие методы

Кинетические методы. Для оценки АОА Н.В. Сизовой с соавторами предложен метод микрокалориметрии. Метод основан на регистрации теплового эффекта радикальных реакций окисления или полимеризации и позволяет по периоду индукции рассчитать эффективное содержание ингибиторов в сложных природных смесях. По приросту тепловыделения в течение периода индукции можно рассчитать константу скорости взаимодействия пероксидного радикала и ингибитора [6, 7]. Предложенный метод микрокалориметрии очень удобен в качественной оценке АОА сложных природных смесей, так как регистрируемая кривая даёт точное и быстрое представление о наличии и силе природных ингибиторов радикальных процессов [23].

В работе [6] на модельной реакции радикального инициированного окисления кумола оценивают антиоксидантные свойства 100%-го эфирного масла полыни горькой и пихтовых экстрактов полыни горькой, тысячелистника и крапивы, березовых почек, березовых листьев, календулы. На рисунке 9 приведены экспериментальные кривые окисления кумола в присутствии ингибиторов – эфирных масел и витамина Е [6].

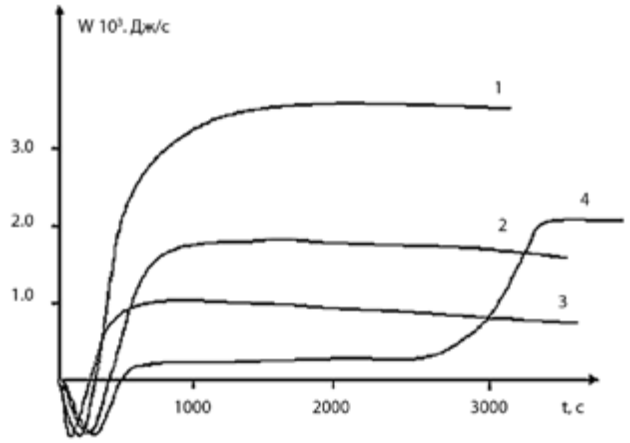


Рисунок 9. Кривые тепловыделения модельной реакции окисления кумола в присутствии ингибиторов различного типа: 1 – без ингибитора; 2 – пихтовый экстракт полыни С=2,12 г/л; 3 – эфирное масло полыни С=0,63 г/л; 4 – витамин Е масляный раствор С=6,24 г/л

В качестве модельной реакции при изучении антиокислительной эффективности экстрактивных веществ образцов разных видов растений сем. Geraniaceae (герань лесная, герань кровяно-красная, герань луговая, журавельник цикутовый), сем. Rosaceae (лапчатка, малина лесная, ежевика лесная) выбран процесс радикально-цепного инициированного окисления изопропилового спирта (75 °С, инициатор – AIBN). Эфективность ингибирующего действия экстрактов оценивали по степени снижения скорости поглощения кислорода воздуха при окислении модельного субстрата в присутствии добавок экстрактивных веществ образцов. Скорость поглощения кислорода определяли с помощью высокочувствительной манометрической установки [9].

Методом микрокалориметрии на модельной реакции окисления кумола проведено сравнение АОА пихтового масла и CO_2-экстракта пихты, подсолнечного масла и CO_2-экстракта семян подсолнечника. Как правило, в липофильных фракциях самыми мощными АО являются токоферолы, они предохраняют натуральные растительные масла от окисления. Для жирных масел метод микрокалориметрии позволяет определять основной липидный АО – токоферол, который является ингибитором модельной реакции окисления кумола, что позволяет определять его количественно. Для эфирных масел, как слабых АО, оценить АОА можно по степени понижения скорости окисления модельной реакции [7].

Газоволюметрический метод. Для определения АОА гуминовых кислот изучали инициированное AIBN жидкофазное окисление кумола в среде диметилсульфоксида (ДМСО) [63]. За кинетикой процесса окисления следили газоволюмометрически, измеряя количество поглощенного кислорода при постоянной температуре 75 °С и постоянном парциальном давлении кислорода 760 мм рт. ст. на установке, описанной в [63]. Газоволюмометрический метод использован также для определения АОА соединений, в основе которого лежит инициированное ионами железа окисление молекулярным кислородом липопротеинов яичного желтка. Параметром, характеризующим АОА фенольных АО, выбрана концентрация АО, вызывающая снижение в два раза объема поглощенного кислорода [85].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возросшее потребление медикаментов, наблюдаемое в последнее время во многих странах, а также увеличение номенклатуры фармацевтических препаратов ещё не означает победу человечества в борьбе со многими распространёнными заболеваниями, в том числе вызванными различными сердечно-сосудистыми нарушениями. Для профилактики таких заболеваний широко используются вещества, обладающие АОА [86, 88]. Вопросы кислородного метаболизма в организме человека являются объектами постоянного внимания медиков, химиков и биохимиков. При нарушении баланса между биохимическими механизмами оксигеназной утилизации кислорода, механизмами защиты от вредных воздействий его высокореакционных метаболитов возникает окислительный стресс. Фармакологическая коррекция окислительного стресса осуществляется с помощью БАВ, в частности АО. Они прерывают быстрорастущие процессы окисления, образуя малоактивные радикалы, легко выводящиеся из организма. Одной из самых перспективных групп БАВ, обладающей АОА, являются расти-

тельные фенольные соединения, среди которых ведущее место занимают полифенолы. Поэтому одним из важных показателей качества растительного сырья является их АОА [36, 67]. Однако необходимо контролируемое потребление АО, поскольку при большом содержании они становятся проантиоксидантами. Рекомендуемые уровни потребления АО приняты в РФ в 2004 году – 350–1300 мг/сутки, а в других странах – 800–1000 мг/сутки. Практическое использование АО растительного происхождения для регуляции свободнорадикальных процессов в организме человека выдвигает на первый план проблему количественной оценки АОА комплексных препаратов на основе ЛРС.

Тем не менее до сих пор не существует метода, который дал бы полную информацию о состоянии и взаимодействиях сложных систем, в которых образуются и вступают в реакции АО. Нет также единого термина, который бы определял антиоксидантные свойства соединения или комплекса соединений. Предлагают различать антиоксидантную емкость, АОА, понимая под первым «количество молей ловушек радикалов в исследуемом образце». Под АОА понимают константу скорости действия АО против СР. Используют также термины антиоксидантной силы, антиоксидантной способности. Таким образом, наблюдается смешение термодинамических и кинетических понятий. В общем случае термин «активность» используют как термодинамический и его не следует применять как кинетический. Все существующие методы определения АОА страдают теми или иными недостатками.

Сравнительная оценка ряда методов определения АО в различных системах показала, что распространенный метод добавок образцов, содержащих АО, в модельную реакцию окисления относительно легко окисляющегося субстрата является наглядным, но, как правило, требует относительно больших количеств образца и времени для анализа. При определении АОА наиболее широко используются электрохимические (амперометрия и кулонометрия) и спектрофотометрические методы анализа (TBARP, DPPH и хемилюминесцентные методы) (рисунки 10–12). Электрохимические методы характеризуются высокой чувствительностью и экспрессностью. Вольтамперометрическое определение суммарной АОА по относительному изменению тока электровосстановления кислорода на ртутно-пленочном электроде в последнее время не находит широкого распространения, так как его использование запрещено во многих странах [87, 88]. Однако в ходе спектрофотометрического определения АО проявляются все проблемы, которые обычно осложняют анализ неразделенных смесей, а именно: не полностью известный качественный состав, наложение сигналов разных аналитов или дериватов, разная чувствительность их определения, непредсказуемое влияние посторонних веществ, неаддитивность аналитического сигнала [87]. Наиболее быстрым, чувствительным и информативным методом показал себя ХЛ-метод, который

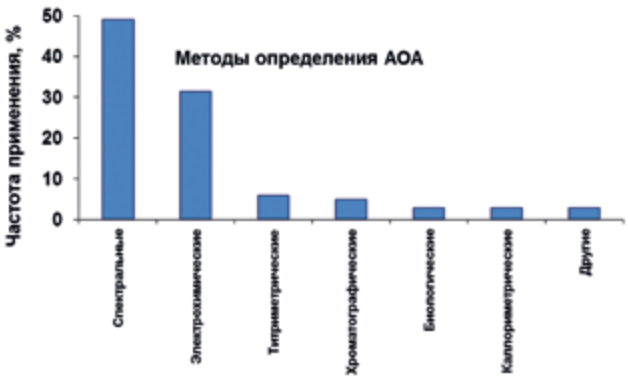


Рисунок 10. **Частота применения различных методов определения АОА**

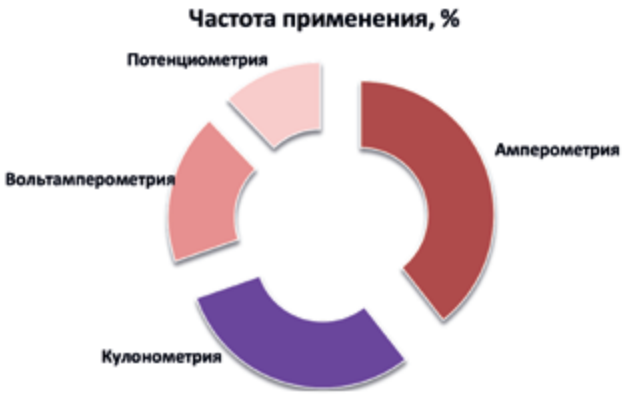


Рисунок 11. **Частота применения электрохимических методов определения АОА**

Рисунок 12. **Частота применения спектральных методов определения АОА**

можно использовать для экспресс-анализа качества и количества АО в различных материалах и продуктах. Этот метод позволяет анализировать микрограммы образцов. При этом в одном опыте определяется общее содержание АО и качественные показатели: кинетические характеристики АРА наиболее и наименее активного АО, если образец содержит смесь АО. Специальными опытами показано, что ХЛ-методом можно определять как жиро-, так и водорастворимые АО в экстрактах, тканях, плазме крови и т.д. [89].

В заключение хочется отметить объективную невозможность существования не то что единого метода для оценки АОА соединений, но даже возможности сравнения результатов, полученных разными методами. И связано это, очевидно, с многообразием протекающих в природе радикальных процессов. Одно дело, когда определяется АОА соединения (или группы соединений), применяемого для стабилизации химических продуктов и полимеров, и совсем другое – влияние АО на процессы, протекающие в живой клетке. В результате каждый исследователь выбирает готовый, создает новый или модифицирует уже известный метод, исходя из своих целей и возможностей [10], а также зачастую прибегает к исследованию АОА изучаемого объекта при помощи комплекса различных методов.

Из вышеизложенного следует, что изыскания в области определения суммарного содержания АО и АОА объектов фармацевтического назначения актуальны как в практическом, так и в теоретическом плане.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.И. Короткова, О.А. Аврамчик, М.С. Юсубов и др. Определение антиоксидантной активности экстрактов растительного сырья методом катодной вольтамперометрии // Хим.-фарм. журн. 2003. № 9. С. 55–56.
2. И.Ф. Абдулин, Е.Н. Турова, Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова. Электрогенерированный бром – реагент для определения антиоксидантной способности соков и экстрактов // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2002. Т. 62. № 9. С. 13–15.
3. В.В. Амосов, В.Н. Зеленков, А.А. Лапин, М.В. Марков. Антиоксидантная емкость спиртовых экстрактов из некоторых видов рода лабазник (Filipendula) // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. Вып. 64. 2009. С. 243–244.
4. А.А. Лапин, М.Ф. Борисенков, И.В. Карманов и др. Антиоксидантные свойства продуктов растительного происхождения // Химия растительного сырья. 2007. № 2. С. 79–83.
5. Патент РФ 2170930, МКП G01N33/50, G01N33/52. Способ определения антиокислительной активности / Т.В. Максимова, И.Н. Никулина, В.П. Пахомов и др.; заявитель и патентообладатель: ГОУ ВПО Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова. – № 2000111126/14; заявл. 05.05.2000; опубл. 20.07.2001. – БИ 07/2005.
6. Н.В. Сизова. Сравнение антиоксидантной активности пихтового масла и CO_2-экстракта пихты, подсолнечного масла и CO_2-экстракта семян подсолнечника // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 99–102.
7. Н.В. Сизова, О.Ю. Веретнова, А. Ефремов. Оценка антиокислительной активности эфирных масел методом микрокалориметрии // Химия растительного сырья. 2002. №3. С. 57–60.
8. В.Р. Хайруллина, Л.Р. Якупова, А.Н. Терегулова и др. Антиокислительные свойства бикомпонентных композиций на основе кверцетина и дигидрокверцетина // Тезисы материалов V Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Уфа. 2008. С. 308.
9. В.Р. Хайруллина, Г.Г. Гарифуллина, А.Я. Герчиков. Антиокислительная активность экстрактов растений сем. Geranlaceae, Rosaceae на примере модельной реакции окисления изопропилового спирта // Хим.-фарм. журн. 2005. № 3. С. 28–30.
10. В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева. Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 63–75.
11. Т.Г. Цюпко, И.С. Петракова, Н.С. Бриленок и др. Определение суммарного содержания антиоксидантов методом FRAP // Аналитика и контроль. 2011. Т. 15. № 3. С. 287–298.
12. И.Ф. Абдулин, Е.Н. Турова, Г.К. Будников. Органические антиоксиданты как объекты анализа // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2001. Т. 67. № 9. С. 3–13.
13. Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии // Журнал аналитической химии. 2005. Т. 60. № 7. С. 678–691.
14. Х.З. Брайнина, А.В. Иванова, Е.Н. Шарафутдинова. Оценка антиоксидантной активности пищевых продуктов методом потенциометрии // Известия вузов. Пищевая технология. 2004. №4. С. 73–75.
15. А.А. Лапин, В.Н. Зеленков, А.С. Музычук. Антиоксидантная емкость водорастворимых полисахаридов растительного сырья // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 257.
16. Л.Т. Козаева, С.А. Бекузарова, А.А. Лапин, В.Н. Зеленков. Определение содержания антиоксидантов водных экстрактов лабазника вязолистного методом кулонометрического титрования электрогенерированным бромом // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 251.
17. В.В. Амосов, А.А. Лапин, М.В. Марков, В.Н. Зеленков. Антиоксидантная емкость спиртовых экстрактов рода лабазник // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 225.
18. И.Ф. Русина, А.Ф. Карташева, Т.В. Максимова, О.Т. Касайкина. Анализ содержания антиоксидантов в фармпрепаратах, пищевых добавках и биосистемах методом хемилюминесценции // Альманах клинической медицины. 2006. № 12. С. 128.
19. Л.Б. Терешкина, Г.П. Федосеева, А.А. Лапин, В.Н. Зеленков. Содержание антиоксидантов в сортах амаранта Екатеринбургского ботанического сада // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 286.
20. Е.Н. Шарафутдинова, А.В. Иванова, А.И. Матерн, Х.З. Брайнина. Качество пищевых продуктов и антиоксидантная активность // Аналитика и контроль. 2011. Т. 15. № 3. С. 281–286.
21. А.Я. Яшин, Я.И. Яшин, Н.И. Черноусова и др. Методы определения антиоксидантной активности пищевых продуктов и БАДов // Мир измерений. 2012. № 1. С. 30–35.
22. П.В. Масленников, Г.Н. Чупахина, Л.Н. Скрыпник и др. Содержание низкомолекулярных антиоксидантов в лекарственных растениях Калининградской области // Химия растительного сырья. 2012. № 3.С. 127–133.
23. Е.В Михайлова, В.С. Савостин, А.П. Васильева. Оценка прооксидантной и антиоксидантной активности эфирных масел // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 354–356.
24. М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, И.Г. Зенкевич. Антирадикальная активность флавоноидов и их комбинаций с другими антиоксидантами // Фармация. 2004. № 2. С. 30–32.
25. С.В. Луценко, Н.Б. Фельдман, В.А. Быков. Растительные флаволигнаны. Биологическая активность и терапевтический потенциал. – М. 2006. 236 с.
26. Е.О. Сергеева, Е.Г. Доркина, Л.А. Саджая и др. Изучение антиоксидантного действия гесперидина, диосмина, флавицина и кверцетина *in vitro* // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 372–374.
27. О.В. Тринеева, Е.Ф. Сафонова, С.С. Воропаева, А.И. Сливкин. Антиоксидантная активность водно-спиртовых извлечений листьев крапивы двудомной // Фармация. 2013. № 1. С. 11–12.
28. О.В. Тринеева, И.И. Сафонова, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин. Определение антиоксидантной активности извлечений из

плодов облепихи крушиновидной // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2012. № 2. С. 266–268.

29. Л.П. Нилова, А.А. Вытовтов, Е.В. Камбулова, М.С. Кайгородцева. Определение антиоксидантной активности порошков из растительного сырья перманганатным методом // Потребительский рынок Евразии: современное состояние, теория и практика в условиях Евразийского экономического союза и ВТО: Сборник статей III Международной научно-практической конференции. 2015. С. 118–122.

30. О.В. Тринеева, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин, И.И. Сафонова. Определение антиоксидантной активности растительных масел и масляных экстрактов, применяемых в фармации // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2013. Т. 79. № 2. С. 26–27.

31. Д.А. Фадеева, М.А. Халикова, Т.С. Полухина и др. Определение антиоксидантной активности некоторых веществ аминокислотной, пептидной и полифенольной природы *in vitro* // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2011. № 4(99). Вып. 13/2. С. 178–180.

32. ГОСТ Р 54036-2010. Продукты пищевые. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов в клубнях картофеля амперометрическим методом. Введ. 2012–01–01. – М.: Изд-во стандартов, 2011. 7 с.

33. Е.Н. Семенистая, О.Г. Ларионов. Изучение состава и антиоксидантной активности растительных экстрактов методом ВЭЖХ с УФ- и амперометрическим детектированием // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 9. С. 43–48.

34. Н.Н. Сажина. Определение антиоксидантной активности различных биоантиоксидантов и их смесей амперометрическим методом // Химия растительного сырья. 2016. № 4. С. 71–76.

35. В.М. Мисин, Н.Н. Сажина, Е.И. Короткова. Измерение антиоксидантной активности экстрактов смесей чая электрохимическими методами // Химия растительного сырья. 2011. № 2. С. 137–143.

36. Е.И. Рябинина, Е.Е. Зотова, Е.Н. Ветрова и др. Новый подход в оценке антиоксидантной активности растительного сырья при исследовании процесса аутоокисления адреналина // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 117–121.

37. П.Н. Савин, В.М. Болотов, Д.А. Кудинов. Антиоксидантная активность антоциановых красителей // Тезисы материалов межрег. научно-практ. конф. «Проблемы здоровьясбережения школьников и студентов. Новые научные тенденции в медицине и фармации». – Воронеж. 2008. С. 381–383.

38. П.Н. Саввин, В.М. Болотов. Исследование антиоксидантных свойств желейного мармелада // Химия растительного сырья. 2008. № 4. С. 177–179.

39. В.В. Иванов, О.Н. Денисенко, Л.А. Бережная. Определение антиоксидантной активности извлечений из травы горца (рейноутрии) сахалинского *Polygonum Sachalinense* F. SCHMIDT // Здоровье и образование в XXI веке. 2016. Т. 18. № 10. С. 125–128.

40. Н.С. Родионова, М.В. Мануковская, Я.П. Коломникова, М.В. Серченя. Исследование антиоксидантной активности настоек из ежевики и клюквы, приготовленных методом ультразвукового экстрагирования // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. 2015. № 4(66). С. 98–103.

41. Ю.А. Панасенкова, Е.И. Ременякина, В.Д. Левичкин и др. Способы тестирования антиоксидантных свойств лекарственных препаратов в лабораторных условиях и возможности использования этих показателей в клинической практике // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2013. Т. 24. № 25(168). С. 239–243.

42. Е.Ю. Демченкова. Новый метод определения антиоксидантной активности лекарственных средств // Биомедицина. 2006. Т. 1. № 5. С. 22.

43. Е.Ю. Демченкова, В.П. Пахомов. Определение антиоксидантной активности лекарственных средств, БАДов и лекарственного растительного сырья // Биомедицина. 2010. Т. 1. № 5. С. 76-78.

44. М.А. Сысоева, Л.Р. Юмаева, В.С. Гамаюрова и др. Сравнительная характеристика антиоксидантной активности водных и спиртовых извлечений чаги // Химия растительного сырья. 2009. № 2. С. 121–124.

45. В.А. Гульшина, Л.Б. Терешкина, Н.П. Романова и др. Оценка качества сырья амаранта по содержанию антиоксидантов и кальция // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 241.

46. Г.М. Алексеева, Э.Л. Арзуманян, Л.И. Слепян, А.Л. Марченко Определение антиоксидантной активности в водных и спиртоводных извлечениях из штаммов растений семейства аралиевых // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 382–383.

47. М.В. Ларина. Растительные фенолы и антиокислительная активность экстрактов // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 107.

48. И.В. Шилова, Е.А. Краснов, Е.Ю. Авдеева и др. Химический состав и антиоксидантные свойства растений рода лабазник и альфредия // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 217.

49. И.В. Шилова, Е.И. Короткова, А.Н. Вторушина. Антиоксидантные свойства и биологически активные вещества экстракта лабазника обыкновенного // Тезисы материалов V Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Уфа. 2008. С. 329.

50. Е.Р. Газизуллина, Я.А. Окулова, К.Г. Попова и др. Потенциометрический метод определения антиоксидантной активности пищевых объектов и объектов фармации с использованием комплексов металлов // Материалы XX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. 2016. С. 251.

51. Л.П. Некрасова, Р.И. Михайлова, И.Н. Рыжова. Определение антиоксидантной активности электрохимически активированной воды потенциометрическим и спектрофотометрическим методами // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 5–4. С. 559–563.

52. А.С. Чистякова, Т.А. Брежнева, А.А. Мальцева. Изучение антиоксидантной активности некоторых групп БАВ методом ТСХ // Сборник научных трудов «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 289–290.

53. Д.Н. Оленников, Л.В. Дударева. Химический состав и антирадикальная активность эфирного масла российских образцов *Mentha piperita* // Химия растительного сырья. 2011. № 4. С. 109–114.

54. А.Л. Самусенко. Исследование антиоксидантной активности эфирных масел лимона, розового грейпфрута, кориандра, гвоздики и их смесей методом капиллярной газовой хроматографии // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 107–112.

55. П.Б. Лубсандоржиева. Антиоксидантная активность экстрактов *Calendula officinalis* L. // Химия растительного сырья. 2009. № 4. С. 123–126.

56. А.Ш. Кайшев, С.А. Реккандт, Н.Ш. Кайшева, В.А. Челомбитько. Антиоксидантная активность биокомпозиций на основе спиртовых отходов // Фармация. 2009. № 5. С. 7–10.

57. Е.И. Кондратенко, А.В. Великородов, Мохамад Ахмед Эль сайед Авад и др. Химический состав и антиоксидантная активность экстрактов семян NELUMBO NUCIFERA // Химия растительного сырья. 2012. № 3. С. 115–120.

58. А.А. Федосеева, О.С. Лебедкова, Л.В. Каниболоцкая. Антиоксидантная активность настоев чая // Химия растительного сырья. 2008. № 3. С. 123–127.

59. М.С. Макиева, А.В. Воронков, Ю.А. Морозов. Определение антиоксидантной активности трансдермальной мази с экстрактом лимонника китайского // Фармация и фармакология. 2015. Т. 3. № 1. С. 66–67.

60. Е.И. Кондратенко, Н.А. Ломтева, А.А. Бони и др. Иммунотропные и антиоксидантные свойства экстракта лотоса орехоносного // Фармация. 2012. № 1. С. 40–42.

61. Н.Б. Еремеева, Н.В. Макарова, И.А. Платонов. Антиоксидантная активность экстрактов черноплодной рябины, полученных в надкритических условиях // Техника и технология пищевых производств. 2016. Т. 42. № 3. С. 12–18.

62. Ю.А. Батуева, А.А. Торопова, А.Г. Мондодоев, Л.Н. Шантанова Мембраностабилизирующее и антиоксидантное действие комплексного растительного средства «Литофит» в тест-системах *in vitro* // Сибирский медицинский журнал. 2015. Т. 136. № 5. С. 122–124.

63. В.С. Бережной, О.В. Смирнова, И.В. Ефимова. Определение антиоксидантной и антирадикальной активности низкотемпературных фракций гуминовых веществ // Вестник Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого. 2013. № 73–2. С. 68–71.

64. Е.Г. Линхоева, А.А. Торопова, Е.В. Петров, С.В. Лемза. Определение антиоксидантной активности противодиабетического средства «Глюковит» // Вестник Бурятского государственного университета. 2013. № 12. С. 146–149.

65. В.Б. Кулиев. Антиоксидантная активность экстрактов из плодов *Crataegus Meyeri (Rosaceae)* // Растительные ресурсы. 2013. Т. 49. № 2. С. 275–286.

66. А.В. Белый, Н.И. Белая. Антирадикальная активность дубильных веществ корневищ *BERGENIA CRASSIFOLIA* в реакции с 2,2′-дифенил-1-пикрилгидразилом // Химия растительного сырья. 2012. № 3. С. 121–126.

67. Е.И. Рябинина, Е.Е. Зотова, Е.Н. Ветрова, Н.И. Пономарева. Сравнение химико-аналитических методов определения танидов и антиоксидантной активности растительного сырья // Аналитика и контроль. 2011. Т. 15. № 2. С. 202–208.

68. А.Р. Ахметьянова, Т.В. Булгаков, Э.Х. Галиахметова и др. Оценка уровня антиоксидантной активности перспективных дикорастущих и культивируемых лекарственных растений республики Башкортостан // Медицинский вестник Башкортостана. 2016. Т. 11. № 4(64). С. 68–71.

69. В.А. Волков, Н.А. Дорофеева, П.М. Пахомов. Кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений // Химико-фармацевтический журнал. 2009. Т. 43. № 6. С. 27–31.

70. В.И. Дейнека, И.П. Анисимович, А.Ю. Михеев и др. О некоторых особенностях определения антиоксидантной активности // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 415–418.

71. А.А. Мальцева, Т.А. Брежнева, А.И. Сливкин, П.А. Гвоздевский. Флавоноиды растения *Polemonium coeruleum* L. и предварительная оценка их антиоксидантной активности // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2010. Вып. 65. С. 89–90.

72. В.Н. Сорокопудов, Н.А. Лучина, О.А. Мостовой Антиоксидантные свойства видов малины // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2011. № 4(99). Вып. 13/2. С. 196–198.

73. И.Г. Конкина, С.А. Грабовский, Ю.И. Муринов, Н.Н. Кабальнова. Сравнительная оценка реакционной способности кверцетина и дигидрокверцетина по отношению к пероксильным радикалам // Химия растительного сырья. 2011. № 3. С. 207–208.

74. М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, И.Г. Зенкевич. Антирадикальная активность флавоноидов и их комбинаций с другими антиоксидантами // Фармация. 2004. № 2. С. 30–32.

75. А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, Г.Н. Бузук, Т.А. Толкачева. Антиоксидантная активность водных экстрактов лекарственных растений // Веснік Віцебскага дзяржаўнага універсітэта. 2012. Т. 1. № 67. С. 47–53.

76. И.В. Бабенкова, Ю.О. Телескин, Н.А. Тюкавкина и др. Антиоксидантная активность масла из зародышей пшеницы // Фармация. 2001. № 2. С. 15–18.

77. И.В. Бабенкова, Е.А. Буравлев, К.В. Буравлева, Ю.О. Теселкин. Определение антиоксидантной активности плазмы крови в экспериментальных и клинических исследованиях // Евразийский союз ученых. 2015. № 4–10(13). С. 97–100.

78. А.В. Паничкин, Л.С. Большакова, В.Н. Милентьев и др. Использование хемилюминесценции для оценки антиоксидантных свойств пищевых веществ // Фундаментальные исследования. 2013. № 10–11. С. 2436–2439.

79. Р.Т. Муллагулов, В.Н. Козлов, Л.Ф. Пономарева. Изучение антиоксидантной активности лекарственных трав методом хемилюминесценции в опытах *in vitro* // Вестник Волжского университета им. В.Н. Татищева. 2012. № 1(9). С. 231–234.

80. А.А. Ноздрунова, О.И. Кривонос, В.Е. Высокогорский и др. Химический состав и окислительные свойства жидких продуктов термической переработки сапропелей // Химия растительного сырья. 2008. № 4. С. 141–146.

81. Н.Ю. Грибова, Т.А. Филиппенко, А.Н. Николаевский и др. Влияние ультразвука при экстракции антиоксидантов из листьев толокнянки // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 10. С. 43–45.

82. Т.А. Филиппенко, Н.Ю. Грибова. Антиоксидантное действие экстрактов лекарственных растений и фракций их фенольных соединений // Химия растительного сырья. 2012. № 1. С. 77–81.

83. О.В. Тринеева, А.И. Сливкин. Исследование мембраностабилизирующей, антиоксидантной и антитоксической активности водных извлечений из лекарственного растительного сырья (на примере плодов облепихи крушиновидной и листьев крапивы двудомной) на тест-системе *Paramecium caudatum* // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2016. № 1. С. 165–169.

84. И.В. Полежаева, О.Ф. Веселова, Н.И. Полежаева. Антиоксидантные свойства водного экстракта вегетативной части кипрея узколистного // Тезисы материалов IV Всеросс. научной конф. «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар. 2006. С. 274.

85. А.Н. Николаевский, Т.А. Филиппенко, О.П. Книга, В.В. Левкина. Определение антиоксидантной активности веществ при окислении липопротеинов яичного желтка газоволюмометрическим методом // Биомедицинская химия. 2006. Т. 52. № 2. С. 211–218.

86. Э.Т. Оганесян, О.А. Андреева, Ю.А. Быковских и др. Изучение антиоксидантной активности извлечений из надземной части хризантемы корейской (*Chrysanthemum* x *koreanum Makai* семейство **Asteraceae**) // Сборник научных трудов: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции». – Пятигорск. 2012. Вып. 67. С. 358–359.

87. Н.Л. Наумова. Современный взгляд на проблему исследования антиоксидантной активности пищевых продуктов // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. 2014. Т. 2. № 1. С. 5–8.

88. В.А. Смирнов, В.В. Смирнова. Современные методы измерения антиоксидантной активности биологических объектов // Альманах современной метрологии. 2015. № 2. С. 248–279.

89. И.Ф. Русина, А.Ф. Карташева, Т.В. Максимова, О.Т. Касайкина. Анализ содержания антиоксидантов в фармпрепаратах, пищевых добавках и биосистемах методом хемилюминесценции // Альманах клинической медицины. 2006. № 12. С. 128.

УДК 615.322; 614.48; 579.61

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ПЛАЗМОЙ НА УРОВЕНЬ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

О.М. Тихомирова[1]*, Е.Ю. Загорулько[1], А.А. Ерузин[2], М.Г. Ожигова[1], М.М. Сычев[2]

Резюме. Изучена эффективность использования неравновесной низкотемпературной плазмы для снижения уровня микробной контаминации двух видов лекарственного растительного сырья (ЛРС) – ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев. Деконтаминацию ЛРС проводили в экспериментально подобранном режиме: время воздействия плазмы – 5,0 мин, частота тлеющего разряда – 1,76 МГц, рабочее давление плазмы – 0,1 Па, газ – аргон. Установлено, что при обработке в указанных условиях содержание спорообразующих бактерий в исследуемых видах ЛРС снижается на 2 порядка, мицелиальных грибов и дрожжей – на 3 порядка.

Ключевые слова: неравновесная низкотемпературная плазма, ромашки аптечной цветки, мяты перечной листья, деконтаминация, аргон.

THE INFLUENCE OF LOW-TEMPERATURE PLASMA TREATMENT ON MICROBIAL CONTAMINATION LEVEL OF MEDICINAL PLANT RAW MATERIAL

O.M. Tikhomirova[1]*, E.Y. Zagorulko[1], A.A. Eruzin[2], M.G. Ozhigova[1], M.M. Sychev[2]

Abstract. Efficacy of non-equilibrium low-temperature plasma treatment for reducing microbial contamination of medicinal plant raw materials (chamomile flowers and peppermint leaves) was studied. Decontamination of plant raw materials was carried out at experimentally defined conditions: exposure time – 5.0 min, glow discharge frequency – 1.76 MHz, working pressure – 0.1 Pa, working gas of plasma – argon. It was found that spore-forming bacteria count after treatment under these conditions decreases by 2 orders of magnitude, yeast and mould count decreases by 3 orders of magnitude.

Keywords: non-equilibrium low-temperature plasma, chamomile flowers, peppermint leaves, decontamination, argon.

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

2 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», 190013, Россия, г. Санкт-Петербург, Московский проспект, д. 26

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

2 – Saint-Petersburg State Institute of Technology, 26, Moskovsky prospect, Saint-Petersburg, 190013, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: olga.tikhomirova@pharminnotech.com
Тел.: 8 (812) 315 24 96

ВВЕДЕНИЕ

Неравновесная низкотемпературная плазма (НТП) представляет собой частично ионизированный газ, в котором содержание положительных и отрицательных зарядов равно. При этом температура тяжелых частиц (400 °С) на несколько порядков меньше температуры электронов (100000 °С), а вся газовая фаза может быть нагрета в пределах 30–100 °С. В такой системе присутствуют различные активные агенты: ионы, возбужденные молекулы, атомы, свободные радикалы, ультрафиолетовое излучение и др. [1–3].

Описано антимикробное действие различных видов НТП в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, их спор, дрожжевых и мицелиальных грибов, вирусов [1, 4–6]. Известны исследования по инактивации эукариотических клеток (микроводорослей) и биопленок бактерий в результате плазменной обработки [7–10]. Воздействие НТП может быть использовано для антисептической обработки живых тканей, дезинфекции и стерилизации различных поверхностей и объектов, в частности изделий из термолабильных материалов, а также жидкостей и воздуха [11–13].

В ряде стран, в том числе в Германии и США, плазменная обработка пищевых продуктов растительного происхождения одобрена различными регулирующими организациями как безопасный и эффективный способ увеличения их срока годности [14–16]. Известны исследования по обработке лекарственного растительного сырья (ЛРС), в которых плазму используют как с целью

модификации технологических свойств сырья, так и для его частичной деконтаминации [17, 18].

Конечный эффект плазменного воздействия определяется видом микроорганизма, особенностями состава окружающей его среды, условиями обработки и типом источника НТП [1]. В связи с этим представляло интерес изучение возможности применения плазменной деконтаминации некоторых официнальных видов ЛРС (ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев) как с естественным уровнем микробной загрязнённости, так и искусственно контаминированных спорообразующими бактериями, мицелиальными и дрожжевыми грибами, типичными для растительного сырья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования использовали по две серии обоих видов ЛРС, приобретенного через аптечную сеть и у организации-производителя: ромашки аптечной цветки (серия P_1: ООО «СОиК», номер серии 040615; серия P_2: АО «Красногорсклексредства», номер серии 130616), мяты перечной листья (серия M_1: ООО «СОиК», номер серии 150815; серия M_2: ООО Фирма «Здоровье», номер серии 020216).

Обработку ЛРС низкотемпературной плазмой проводили на ионно-плазменной камерной модифицированной вакуумной установке ННВ-6,6И1 (Россия) на кафедре химии твердого тела СПбГТИ(ТУ). Основными варьируемыми параметрами технологического процесса плазменной обработки являлись: состав газовой фазы, время экспозиции в активной зоне разряда, рабочее давление газа плазмы, частота тлеющего разряда. Известно, что механизм антимикробного действия НТП зависит от состава газовой фазы. При этом наибольшие различия наблюдаются между газами окислительной и инертной природы [9, 16]. В связи с этим представляло интерес изучение влияния на уровень микробной контаминации ЛРС газов, различающихся по окислительной способности. В настоящем исследовании были использованы следующие режимы плазменной обработки ЛРС, подобранные с учетом анализа литературных данных [1, 17] и результатов собственных исследований: время экспозиции в активной зоне разряда – 1 или 5 мин, частота тлеющего разряда – 1,76 МГц, рабочее давление газа плазмы – 0,1 Па, газы – кислород (газовая фаза окислительного состава) или аргон (газовая фаза инертного состава).

Определение микробиологической чистоты ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев проводили в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания [19]. Определяли показатели, предусмотренные для ЛРС, в технологии обработки которого не используется кипящая вода (категория 4Б): общее число аэробных микроорганизмов в 1 г; общее число дрожжевых и плесневых грибов в 1 г; содержание энтеробактерий, устойчивых к желчи, в 1 г; отсутствие *E. coli* в 1 г. Все опыты для каждой серии ЛРС проводили в трех повторностях.

Для искусственной контаминации ЛРС в качестве тест-культур использовали штаммы типичных представителей спорообразующих бактерий (как более устойчивых к воздействию НТП) – *Bacillus subtilis* АТСС 6633, дрожжей – *Rhodotorula rubra* 341, мицелиальных грибов – *Aspergillus niger* 2а (из коллекции микробных культур кафедры микробиологии ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России).

Получали суспензии спор, клеток или конидий тест-культур в стерильном фосфатном буфере с концентрацией: *B. subtilis* – 10^8 сп/мл, *R. rubra* – 10^7 кл/мл, *A. niger* – 10^7 кон/мл. Навески ЛРС, подлежащие контаминации, обрабатывали взвесью соответствующей тест-культуры, перемешивали и подсушивали при температуре 42±1 °С. Обработанное ЛРС разделяли на две части (опыт и контроль). Опытный образец подвергали плазменной обработке.

В опытном и контрольном образцах проводили определение числа бактерий и грибов чашечным агаровым методом, используя модифицированный глубинный метод посева, по методике, описанной в ОФС.1.2.4.0002.15 [19].

Для определения влияния НТП на уровень микробной контаминации ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев навеску ЛРС соответствующей серии подвергали обработке на ионно-плазменной камерной вакуумной установке ННВ-6,6И1 в указанных условиях, определяли микробиологическую чистоту ЛРС после плазменного воздействия и сравнивали полученные результаты с исходным уровнем контаминации сырья.

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» Государственной фармакопеи XIII издания [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование ЛРС с естественным уровнем микробной контаминации

На первом этапе исследовали влияние плазменной обработки на уровень микробной контаминации ромашки аптечной цветков (серии P_1 и P_2) и мяты перечной листьев (серии M_1 и M_2). Предварительно определили исходный уровень микробной контаминации указанных серий ЛРС.

Обработку низкотемпературной плазмой в среде газов окислительной (кислород) и инертной (аргон) природы проводили в условиях: время воздействия – 1,0 мин, частота тлеющего разряда – 1,76 МГц, рабочее давление плазмы – 0,1 Па. Результаты представлены в таблице 1.

На основании анализа данных, приведённых в таблице 1, установлено, что общее содержание аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов в ЛРС, обработанном НТП, снижается по сравнению с необработанным сырьём (различия достоверны при уровне значимости 95%). Следует отметить, что только в образцах мяты перечной листьев обеих серий не происходило значительного снижения содержания общего число аэробных микроорганизмов. При этом для всех исследуемых серий ЛРС уменьшение общего числа грибов составляло 1–2 порядка в зависимости от вида плазмы. Наиболее существенное снижение содержания грибов было отмечено после обработки всех исследованных серий ЛРС плазмой аргона.

Большая выраженность антимикробного действия инертного газа плазмы (аргона) по сравнению с окислительным (кислородом) может быть объяснена тем, что в случае обработки в условиях пониженного давления наибольший вклад в реализацию антимикробного эффекта вносит коротковолновое ультрафиолетовое излучение. Известно, что возбужденные атомы аргона являются мощным источником данного излучения, что обеспечивает выраженность антимикробного эффекта [9, 10]. Следует учитывать также вклад непосредственной бомбардировки клеток микроорганизмов атомами аргона, обладающими большой молекулярной массой и высокими значениями кинетической энергии. Роль свободных радикалов кислорода повышается в плазме атмосферного давления [1, 9, 10]. Поскольку в эксперименте обработка проводилась в условиях вакуума, для дальнейших исследований был выбран газ аргон.

Плазменная обработка искусственно контаминированного ЛРС

Поскольку все использованные в исследовании серии ЛРС соответствовали по микробиологической чистоте требованиям ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», было проведено моделирование ситуации обработки НТП сырья с повышенным уровнем микробной контаминации. Контаминировали образцы мяты перечной листьев серии M_2 и ромашки аптечной цветков серии P_1 типичными тест-культурами спорообразующих бактерий (*B. subtilis*), дрожжей (*R. rubra*) и мицелиальных грибов (*A. niger*). Выбор спорообразующих бактерий был обусловлен тем, что именно эндоспоры бактерий из-за особенностей состава и строения наиболее устойчивы к воздействию НТП [1, 6]. Из литературных источников также известно, что наличие пигментов (каротиноидов, меланинов) в клетках грибов, в том числе и указанных видов, способствует их большей устойчивости к разным видам антимикробных агентов, в том числе ионизирующего и ультрафиолетового излучений [20, 21].

На основании результатов проведенных исследований для плазменной обработки был выбран газ аргон, однако длительность обработки увеличили до 5 мин, поскольку эффективность обработки НТП существенно зависит от времени экспозиции в активной зоне разряда [1, 17]. Дальнейшее увеличение длительности обработки было нецелесообразно в связи с технологическими особенностями установки.

Таким образом, на следующем этапе обработку НТП проводили в условиях: время воздействия – 5,0 мин, частота тлеющего разряда – 1,76 МГц, рабочее давление плазмы – 0,1 Па, газ – аргон.

Таблица 1.

Исследование влияния НТП различного газового состава на уровень микробной контаминации ЛРС

ЛРС		Общее число аэробных микроорганизмов, КОЕ в 1,0 г	Общее число дрожжевых и плесневых грибов, КОЕ в 1,0 г	Энтеробактерий, устойчивых к желчи, КОЕ в 1,0 г	*E. coli* в 1,0 г
P_1	необраб.*	$(4,1\pm0,2)\cdot10^5$	$(2,3\pm0,3)\cdot10^3$	менее 10^1	отсутствие
	O_2	$(1,9\pm0,7)\cdot10^5$	$(1,0\pm0,5)\cdot10^2$	менее 10^1	отсутствие
	Ar	$(1,5\pm0,6)\cdot10^5$	$(3,0\pm0,9)\cdot10^1$	менее 10^1	отсутствие
P_2	необраб.	$(2,1\pm0,8)\cdot10^6$	$(1,5\pm0,5)\cdot10^5$	менее 10^1	отсутствие
	O_2	$(3,1\pm0,6)\cdot10^5$	$(1,6\pm0,7)\cdot10^3$	менее 10^1	отсутствие
	Ar	$(1,4\pm0,4)\cdot10^5$	$(4,0\pm0,5)\cdot10^2$	менее 10^1	отсутствие
M_1	необраб.	$(3,9\pm0,7)\cdot10^4$	$(1,4\pm0,2)\cdot10^3$	менее 10^1	отсутствие
	O_2	$(3,0\pm0,9)\cdot10^4$	$(7,5\pm1,6)\cdot10^1$	менее 10^1	отсутствие
	Ar	$(1,9\pm0,8)\cdot10^4$	$(3,0\pm0,9)\cdot10^1$	менее 10^1	отсутствие
M_2	необраб.	$(4,1\pm0,7)\cdot10^4$	$(3,5\pm0,6)\cdot10^2$	менее 10^1	отсутствие
	O_2	$(3,1\pm0,3)\cdot10^4$	$(3,0\pm0,9)\cdot10^1$	менее 10^1	отсутствие
	Ar	$(3,4\pm0,9)\cdot10^3$	менее 10^1	менее 10^1	отсутствие
Требования ГФ XIII для ЛРС категории 4Б		не более 10^5	не более 10^4	не более 10^3	отсутствие

Примечание: * – «необраб.» – показатели для ЛРС, не обработанного плазмой.

Определяли уровень микробной контаминации искусственно загрязненных образцов, обработанных НТП (опыт) и не обработанных НТП (контроль). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Влияние плазменной обработки на содержание микроорганизмов в образцах искусственно контаминированного ЛРС

ЛРС		Содержание микроорганизмов в ЛРС, КОЕ в 1,0 г		
		B. subtilis	*A. niger*	*R. rubra*
M_2	Контроль	$(2,8\pm0,7)\cdot10^4$	$(1,4\pm0,4)\cdot10^5$	$(6,9\pm0,6)\cdot10^3$
	Опыт	$(4,8\pm0,3)\cdot10^2$	$(2,0\pm0,5)\cdot10^2$	менее 10^1
P_1	Контроль	$(4,1\pm0,5)\cdot10^6$	$(1,8\pm0,2)\cdot10^5$	$(2,2\pm0,1)\cdot10^3$
	Опыт	$(2,7\pm0,6)\cdot10^4$	$(3,9\pm0,4)\cdot10^2$	менее 10^1

Анализ данных, представленных в таблице 2, показал, что в искусственно контаминированных образцах ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев, обработанных НТП, общее содержание аэробных спорообразующих бактерий снижается по сравнению с необработанным ЛРС на 2 порядка, мицелиальных и дрожжевых грибов – на 3 порядка (различия достоверны при уровне значимости 95%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что обработка НТП разных серий ромашки аптечной цветков и мяты перечной листьев приводит к достоверному снижению уровня их микробной контаминации. При проведении плазменной обработки ЛРС плазмой аргона в течение 5,0 мин при частоте тлеющего разряда 1,76 МГц, рабочем давлении плазмы 0,1 Па содержание аэробных спорообразующих бактерий снижается на 2 порядка, мицелиальных грибов и дрожжей – на 3 порядка.

Таким образом, обработка НТП может быть использована для снижения уровня микробной контаминации и, следовательно, вероятности биопорчи мяты перечной листьев и ромашки аптечной цветков в процессе хранения ЛРС.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Fridman, G. Friedman. Plasma medicine. – London: John Wiley & Sons, 2013. 545 p.
2. Л.С. Полак. Теоретическая и прикладная плазмохимия. – М.: Наука, 1975. 154 с.
3. Ю.А. Лебедев. Введение в плазмохимию. – Новосибирск: Наука, 1994. 89 с.
4. O.J. Cahill, T. Claro, N. O'Connor et al. Cold air plasma to decontaminate inanimate surfaces of the hospital environment // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. № 6. P. 2004–2010.
5. K. Oehmigen, J. Winter, M. Hähnel et al. Estimation of possible mechanisms of Escherichia coli inactivation by plasma treated sodium chloride solution // Plasma Process. Polym. 2011. V. 8. № 10. P. 904–913.
6. H. van Bokhorst-van de Veen, H. Xie, E. Esveld et al. Inactivation of chemical and heat-resistant spores of Bacillus and Geobacillus by nitrogen cold atmospheric plasma evokes distinct changes in morphology and integrity of spores // Food Microbiol. 2015. V. 45. P. 26–33.
7. M.Y. Alkawareek, S.P. Gorman, W.G. Grahamb. Eradication of marine biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma: A potential approach to control biofouling? // Int. Biodeterior. Biodegr. 2014. V. 86A. P. 14–18.
8. G. Brelles-Marico. Challenges in biofilm inactivation: the use of cold plasma as a new approach // Bioprocessing & Biotechniques. 2012. V. 2. № 4. P. 107–111.
9. M. Laroussi. Low-temperature plasmas for medicine? // Trans. Plasma Sci. 2009. V. 37. № 6. P. 714–725.
10. M. Laroussi. Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art // Plasma Process. Polym. 2005. № 2. P. 391–400.
11. V. Boxhammer, G. E. Morfill, J. R. Jokipii. Bactericidal action of cold atmospheric plasma in solution // New J. Physics. 2012. V. 14. P. 113042–113060.
12. N. O'Connor, O. Cahill, S. Daniels. Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? // J. Hosp. Inf. 2014. V. 88. № 2. P. 59–65.
13. M. Naïtali, G. Kamgang-Youbi, J.-M. Herry. Combined effects of long-living chemical species during microbial inactivation using atmospheric plasma-treated water // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 76. № 22. P. 7662–7664.
14. Anwendung von Plasmaverfahren zur schonenden Haltbarmachung am Beispiel verderblicher Lebensmittelprodukte in der Nachernte (FriPlas). URL: https://www.atb-potsdam.de/forschungsprogramme/projekt.html?xq=229 (дата обращения 03.06.2017).
15. L.F. Pivarnik, R. Worobo. Non-thermal or alternative food processing methods to enhance microbial safety and quality // NIFA–USDA Bulletin. 2014. 8 p. URL: http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/files/227891.pdf (дата обращения 24.06.2017).
16. B.A. Niemira. Cold plasma decontamination of foods // Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2012. V. 3. P.125–142.
17. Патент РФ № 2428203 C1, МПК A61K 41/00. Способ деконтаминации лекарственного растительного сырья / М.В. Богма, А.А. Ерузин, Т.С. Потехина, Л.М. Манойлова, И.Б. Гавриленко; патентообладатель Санкт-Петербургский гос. технологический ин-т. – № 2010119315/15; заявл. 13.05.10; опубл. 10.09.11.
18. Патент РФ № 2484838 C1, МПК A61K 36/00. Способ подготовки измельченного лекарственного растительного сырья (ЛРС) для таблетирования методом прямого прессования / М.М. Сычев, А.А. Ерузин, И.Б. Гавриленко, М.В. Богма, Л.М. Манойлова; патентообладатель Санкт-Петербургский гос. технологический ин-т. – № 2011132534/15; заявл. 02.08.11; опубл. 20.06.13.
19. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII издание. Т. 1. – М. 2015. 1470 с. URL: http:// 193.232.7.120/feml/clinical_ref/ pharmacopoeia_1_html/HTML/ (дата обращения 01.03.2017).
20. I. Mannazzu, S. Landolfo, T. Lopes da Silva et al. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest // World J. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 31. № 11. P. 1665–1673.
21. Н.Н. Гесслер, А.С. Егорова, Т.А. Белозерская. Меланиновые пигменты грибов в экстремальных условиях существования // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 2. С. 125–134.

УДК 615.1

ИЗУЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ И ЧИСЛОВЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА СЫРЬЯ *ARISTOLOCHIA CLEMATITIS* L.

И.О. Суина[1]*, И.И. Тернинко[1]

Резюме. В статье представлены результаты изучения технологических параметров (удельная масса, насыпная масса, объемная масса, пористость, порозность, свободный объем слоя сырья, коэффициенты поглощения экстрагентов) и отдельных числовых показателей качества [влажность, зольный остаток (общий и нерастворимый в 10% растворе кислоты хлористоводородной), измельчённость сырья, посторонние примеси] кирказона ломоносовидного травы. Определено содержание экстрактивных веществ. Полученные данные будут использованы при разработке проекта фармакопейной статьи (ФС) на кирказона траву и в технологическом процессе при производстве экстракционных препаратов.

Ключевые слова: кирказон ломоносовидный, технологические параметры, числовые показатели качества.

STUDY OF TECHNOLOGICAL PARAMETERS AND THE NUMERICAL INDICATORS OF THE QUALITY OF RAW MATERIALS *ARISTOLOCHIA CLEMATITIS* L.

I.O. Suina[1]*, I.I. Terninko[1]

Abstract. The article presents the results of a study of technological parameters (specific mass, bulk, mass, volume mass, porosity, quantity cavities between particles, free volume of layer of raw materials and coefficient of absorption of solvents) and individual the numerical indicators of the quality [moisture, ash residue (total and insoluble in 10% solution of hydrochloric acid), chopped raw materials foreign materials] of the herb of aristolochia clematitis. The content of extractive substances was determined. The obtained data will be used in the development of the project of a pharmacopeia article on the herb of *Aristolochia clematitis* and in the technological process in the production of extraction preparations.

Keywords: *Aristolochia clematitis*, technological parameters, the numerical indicators.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

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

* адресат для переписки:
E-mail: suina.irina@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Последнее время всё больший интерес в сфере разработки фитопрепаратов представляют нефармакопейные виды растений [1–3]. Кирказон ломоносовидный (рисунок 1) широко используется в народной медицине [4] и гомеопатии [6] при желудочных расстройствах, отравлениях, в гинекологической практике, а также в качестве дезинфицирующего средства [7].

Лекарственное растительное сырье (ЛРС), которое применяется в официальной медицине, должно отвечать требованиям нормативной документации, то есть быть стандартным. Учитывая, что для кирказона травы отсутствуют утвержденные параметры качества, первоочередной задачей является стандартизация данного ЛРС с разработкой проекта ФС. В ГФ XIII в ОФС 1.5.1.0001.15 «Лекарственное растительное сырье. Фармацевтические субстанции растительного происхождения» [8] изложены унифицированные подходы к стандартизации ЛРС. Одним из обязательных

Рисунок 1. ***Aristolochia clematitis*** **[5]**

элементов качества являются так называемые числовые показатели – влажность, содержание золы общей и нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, степень измельченности и содержание посторонних примесей, которые определяют доброкачественность ЛРС наряду с содержанием биологически активных веществ и дают возможность судить о соблюдении параметров (сроков, места, температурных режимов и т.д.) заготовительного процесса. Так же ГФ XIII для ЛРС, которое может быть использовано для получения экстракционных лекарственных форм, регламентирует определять «Экстрактивные вещества».

Для определения рациональной технологии получения лекарственных растительных средств важным элементом исследования ЛРС является установление технологических параметров: удельной, насыпной и объемной массы, пористости, порозности, свободного объема слоя сырья, а также коэффициентов поглощения экстрагентов.

Целью нашей работы было определить технологические параметры и отдельные числовые показатели качества кирказона ломоносовидного травы для разработки проекта ФС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В качестве объекта была использована кирказона ломоносовидного трава (*Herba Aristolochia clematitis*), заготовленная в июле 2016 года в городе Новый Оскол Белгородской области.

Подготовка проб для исследования. Сырье высушено методом естественной воздушно-теневой сушки. Степень измельчения 3–5 мм. Определение каждого параметра проводили с 5 образцами каждой серии сырья. Методики исследования приведены в литературе [8–10].

Удельная масса (d_y, г/см^3). Удельная масса – это отношение массы абсолютно сухого измельченного сырья к объему растительного сырья.

Около 5,0 г (точная навеска) помещали в пикнометр емкостью 100 мл, заливали водой очищенной на 2/3 объема и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 1,5–2 ч, периодически перемешивая для удаления воздуха из сырья. После этого пикнометр охлаждали до 20 °С, доводили объем до метки водой очищенной. Определяли массу пикнометра с сырьем и водой. Предварительно определяли вес пикнометра с водой.

Формула расчёта удельной массы, г/см^3:

$$d_y = \frac{P \times d_ж}{P + G - F},$$

где P – масса абсолютно сухого сырья, г; G – масса пикнометра с водой, г; F – масса пикнометра с водой и сырьем, г; $d_ж$ – удельная масса воды, г/см^3 ($d_ж$=0,9982 г/см^3).

Насыпная масса ($d_н$, г/см^3). Насыпная масса – это отношение массы измельченного сырья при естественной влажности к занятому сырьем полному объему.

В мерный цилиндр помещали измельченное сырье, слегка встряхивали для выравнивания сырья и определяли полный объем, который оно занимает. После этого сырье взвешивали.

Формула расчёта насыпной массы, г/см^3:

$$d_н = P_н / V_н,$$

где $P_н$ – масса измельченного сырья при определенной влажности, г; $V_н$ – объем, который занимает сырье, см^3.

Объемная масса (d_0,г/см^3). Объёмная масса – это отношение измельченного сырья при определенной влажности к его полному объему, который включает поры, трещины и капилляры, наполненные воздухом.

Около 10,0 г (точная навеска) сырья быстро помещали в мерный цилиндр с водой очищенной и определяли объем. По разности объемов в мерном цилиндре определяли объем, который занимает сырье.

Формула расчёта объёмной массы, г/см^3:

$$d_0 = P_0 / V_0,$$

где P_0 – масса измельченного сырья при определенной влажности, г; V_0 – объем, который занимает сырье, см^3.

Пористость ($\Pi_с$). Пористость – это величина пустот внутри растительной ткани. Отношение разницы между удельной массой и объемной массой к удельной массе.

Формула расчёта пористости:

$$\Pi_с = \frac{d_y - d_0}{d_y},$$

где d_y – удельная масса сырья, г/см^3; d_0 – объемная масса сырья, г/см^3.

Порозность ($\Pi_ш$). Порозность – это величина пустот между кусочками измельчённого материала. Отношение разницы между объемной и насыпной массами к объемной массе.

Формула расчёта порозности:

$$\Pi_ш = \frac{d_0 - d_н}{d_0},$$

где d_0 – объемная масса сырья, г/см^3; $d_н$ – насыпная масса сырья, г/см^3.

Свободный объем слоя сырья (*V*). Свободный объём слоя сырья – это относительный объем пустот в единице слоя сырья. Отношение между разницей удельной массы и насыпной массы к удельной массе.

Формула расчёта свободного объёма сырья:

$$V = \frac{d_у - d_н}{d_у},$$

где $d_у$ – удельная масса сырья, г/см^3; $d_н$ – насыпная масса сырья, г/см^3.

Коэффициенты поглощения экстрагентов (X, мл/г). Коэффициент поглощения экстрагентов – это количество растворителя, который заполнял межклеточные поры, вакуоли, воздушные полости в сырье и не извлекался из шрота.

Около 5,0 г измельченного сырья, взвешенного с точностью до ±0,01 г, помещали в мерный цилиндр и заливали известным объемом экстрагента (вода, этанол 30, 50, 70, 96%) таким образом, чтобы сырье было покрыто полностью, и оставляли на несколько часов. Затем сырье фильтровали через бумажный фильтр. Фильтрат помещают в другой мерный цилиндр и фиксируют его объем.

Формула расчёта коэффициента поглощения экстрагента (X, мл/г):

$$X = \frac{V - V_1}{P},$$

где V – объем экстрагента, которым заполняли сырье, мл; V_1 – объем экстрагента, полученного после поглощения сырьем, мл; P – масса измельченного сырья, г.

Определение экстрактивных веществ, %. Определение экстрактивных веществ проводили в соответствии с методом 1, изложенным в ГФ XIII, ОФС 1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». В качестве экстрагентов использовали воду и смеси воды и этанола (30, 50, 70, 96%).

Определение влажности, %. Определение влажности проводили в соответствии с методикой, изложенной в ГФ XIII, ОФС 1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Определение общей золы, %. Определение золы общей проводили в соответствии с методикой, изложенной в ГФ XIII, ОФС 1.2.2.2.0013.15 «Зола общая».

Определение золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, %. Определение золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, проводили в соответствии с методикой, изложенной в ГФ XIII, ОФС 1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте».

Измельченность и содержание примесей определяли в соответствии с требованиями ГФ XIII, ОФС 1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения технологических параметров и числовых показателей качества сырья кирказона ломоносовидного приведены в таблицах 1–4.

Таблица 1.

Технологические параметры кирказона ломоносовидного травы

Показатель	Серия 18.07.16	Серия 22.07.16	Серия 28.07.16
Удельная масса ($d_у$), г/см^3	1,27±0,07	1,25±0,12	1,25±0,16
Насыпная масса ($d_н$), г/см^3	0,15±0,01	0,15±0,01	0,15±0,01
Объемная масса (d_0), г/см^3	0,50±0,01	0,50±0,01	0,50±0,01
Пористость ($П_с$)	0,61±0,03	0,60±0,05	0,60±0,03
Порозность ($П_ж$)	0,70±0,08	0,70±0,12	0,68±0,07
Свободный объем слоя сырья (V)	0,88±0,16	0,88±0,09	0,87±0,10

Таблица 2.

Коэффициенты поглощения экстрагентов

Экстрагент	Коэффициенты поглощения экстрагента		
	Серия 18.07.16	Серия 22.07.16	Серия 28.07.16
Вода очищенная	5,59±0,24	5,50±0,20	5,50±0,18
30% этанол	5,00±0,06	5,00±0,10	4,90±0,13
50% этанол	4,60±0,01	4,60±0,03	4,60±0,01
70% этанол	3,90±0,16	3,80±0,2	3,90±0,18
96% этанол	3,10±0,04	3,20±0,08	3,20±0,05

Таблица 3.

Содержание экстрактивных веществ в кирказона ломоносовидного траве

Экстрагент	Содержание экстрактивных веществ, %		
	Серия 18.07.16	Серия 22.07.16	Серия 28.07.16
Вода очищенная	36,2	36,1	36,2
30% этанол	35,1	35,3	35,1
50% этанол	34,2	34,2	34,0
70% этанол	29,4	29,2	29,5
96% этанол	24,2	24,0	24,3

Таблица 4.

Отдельные показатели качества кирказона ломоносовидного травы

Показатель	Серия 18.07.16	Серия 22.07.16	Серия 28.07.16	Рекомендованная норма для проекта ФС
Влажность	3,9%	4%	4%	Не более 10%
Зола общая	14%	13,9%	14%	Не более 15%
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	1,6%	1,5%	1,5%	Не более 2%
Частицы, проходящие сквозь сито с отверстием размером 3 мм	3%	3%	2,9%	Не более 5%
Сырьё, изменившее окраску	2%	2,2%	1,8%	Не более 3%
Органические примеси	0,9%	0,6%	0,8%	Не более 1%
Минеральные примеси	0,35%	0,4%	0,3%	Не более 0,5%
Стебли диаметром выше 3 мм	0,9%	1%	0,8%	Не более 2%

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены технологические параметры (удельная масса, насыпная масса, объемная масса, пористость, порозность, свободный объем слоя сырья, коэффициенты поглощения экстрагентов) и отдельные числовые показатели доброкачественности кирказона ломоносовидного травы [содержание экстрактивных веществ, влажность, зольный остаток (общий и нерастворимый в 10% растворе кислоты хлористоводородной), степень измельченности и содержание примесей]. Полученные данные будут использованы при разработке проекта фармакопейной статьи (ФС) на кирказона траву и в технологическом процессе при производстве экстракционных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е.И. Демидова. Фармакогностическое изучение нефармакопейных лекарственных растений: граната обыкновенного и имбиря аптечного // Смоленский медицинский альманах. 2016. № 1. С. 78–81.
2. Н.Ф. Гончаров, И.В. Михайлов, Н.Н. Гончаров. Гидроксикоричные кислоты цветков и листьев нефармакопейных видов рода боярышник // Фундаментальные исследования. 2011. № 9(1). С. 146–148.
3. Н.В. Андреева, И.Ш. Малогулова. Виды шикши как перспективный источник БАВ в условиях Якутии // Современные наукоемкие технологии. 2013. № 9. С. 51–52.
4. O.E. Samsonova, V.N. Belous, Yu.A. Dudar. Pharmacological characterization of *Aristolochia clematitis* L. growing in the Stavropol Region // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2006. V. 4. P. 199–201.
5. Плантариум определитель растений. URL: http://www.plantarium.ru/page/view/item/3710.html (дата обращения 10.09.2017).
6. D. Nitzsche, M.F. Melzig, M.A. Volker . Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid I – A component of Aristolochiaceae plant extracts used in homeopathy // Environmental toxicology and pharmacology. 2013. V. 35. P. 325–334.
7. H. Benmehdia, A. Behilila, F. Memmou. Free radical scavenging activity,kinetic behavior and phytochemical constituents of *Aristolochia clematitis* L. roots // Arabian Journal of Chemistry. 2013. V. 4. P. 3–10.
8. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. II. 2015. URL: http://www.femb.ru/feml (дата обращения 01.07.2017).
9. В.И. Чуешов, М.Ю Чернов, Л.М. Хохлова и др. Промышленная технология лекарств. Учебник. В 2-х т. Т. 2. / Под ред. проф. В.И. Чуешова. – Харьков: МТК-Книга; НФаУ, 2002. 716 с.
10. П.П. Ветров, С.В. Гарная, С.О. Прокопенко, О.В. Кучер. Технологические параметры растительного сырья // Фармац. журн. 1987. № 3. С. 52–56.

УДК 615.214.2

ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЭФИРНОГО МАСЛА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ СЕМЯН ЛИМОННИКА КИТАЙСКОГО (*SCHISÁNDRA CHINÉNSIS* BAILL.) С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ХРОМАТО-МАСС–СПЕКТРОМЕТРИИ

Н.В. Карташова[1], И.А. Самылина[1], А.В. Стреляева[1], Р.М. Кузнецов[1]

Резюме. Проведен анализ компонентного состава эфирного масла семян лимонника китайского. Плоды (лат. Fructus Schisandrae) и семена (Semina Schisandrae) лимонника китайского служат лекарственным растительным сырьем. Хромато-масс спектрометрический анализ был выполнен у настойки спиртовой плодов лимонника китайского, а затем у настойки семян лимонника китайского. По результатам газожидкостного хромато-масс-спектрометрического анализа, выполненного на приборе фирмы Agilent Technologies, было установлено наличие мажорных и минорных компонентов. Было проведено качественное и количественное сравнение настоек с помощью библиотеки полных масс-спектров NIST-05. В настойках были обнаружены следующие группы биологически активных веществ: терпеноиды, фенилпропаноиды, тритерпеновые сапонины, гликозиды, углеводы, лигнаны, аминокислоты и фуранокумарины. В результате анализа настойки плодов лимонника китайского обнаружено 36 веществ, относящихся к разным классам: спиртам, кислотам, сахарам, кетонам, антраценпроизводным, терпенам, эфирам и прочим соединениям. Было подсчитано относительное процентное содержание каждого компонента с учетом неидентифицированных пиков. По результатам исследования можно сделать заключение о химической неоднородности эфирного масла семян лимонника китайского. В эфирном масле из семян лимонника китайского были обнаружены следующие группы биологически активных веществ: терпеноиды, фенилпропаноиды, тритерпеновые сапонины, гликозиды, углеводы, лигнаны, аминокислоты и фуранокумарины.

Ключевые слова: лимонник китайский, ГХ-МС, компонентный состав, настойка, схизандрин.

STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL RECEIVED FROM HERBAL DRUG PRODUCTS OF SHIZANDRA CHINESIS' SEEDS (*SCHISÁNDRA CHINÉNSIS* BAILL.) BY THE CHROMATOMASS-SPECTROMETRY METHOD

N.V. Kartashova[1], I.A. Samylina[1], A.V. Strelyaeva[1], R.M. Kuznetsov[1]

Abstract. The analysis of component composition of the *Schizandra chinensis* has been carried out. Fruits (Fructus Schisandre) and seeds (Semina Schisandre) of Schisandra Chinese serve as medicinal plant raw materials. The chromatography analysis of component composition of alcoholic tincture of fructus of the *Schizandra chinensis* and of alcoholic tincture of semina of the *Schizandra chinensis* has been carried. The existence of major and minor components has been established by the results of chromatography analysis made with Agilent Technologies device. Qualitative and quantitative distinction between galenicals has been revealed with the help of ChemStationE 02.00 software and library for Mass Spectrometry NIST-05. In galenicals terpenoids, phenylpropanoids, threternenal saponins, carbohydrates, lignans, aminoacids and furanocumarins have been detected. As a result of the analysis of tincture of fruits *Schisandra chinese* were detected 36 substances belonging to different classes: alcohols, acids, sugars, ketones, anthracene derivatives, terpenes, ethers and other compounds. The relative percentage of each component was calculated taking into account unidentified peaks. According to the results of the study, it's possible to draw a conclusion about the chemical heterogeneity of the essential oil of *Shizandra chinesis*' seeds. The following groups of biologically active substances were found in the essential oil from the *Shizandra chinesis*' seeds: terpenoids, phenylpropanoids, triterpene saponins, glycosides, carbohydrates, lignans, amino acids and furanocoumarins.

Keywords: *Schizandra chinensis*, chromatography, component composition, tincture, schizandrin.

1 – ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России, 117418, Россия, г. Москва, Нахимовский пр., д. 45

1 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 45, Nakhimovskiy pr., Moscow, 117418, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: nataliekartashova@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Лимонник китайский – достаточно хорошо изученное и официальное лекарственное растение, обладающее адаптогенными свойствами, повышающее физическую активность, выносливость и работоспособность. В официальной медицине используют семена и целые сушеные плоды, так как они обладают наибольшей эффективностью. Российской фармацевтической промышленностью в настоящее время выпускаются только лишь настойка семян и настойка плодов лимонника китайского. В настоящий момент существует нормативная документация (фармакопейная статья) на лекарственное растительное сырье семена лимонника китайского.

Родовое латинское название лимонника – Schizandra – образовано от греческих слов «schizo» – разделять и «andros» – мужчина и связано с раздельнополыми цветками. Видовое название chinensis дано по месту произрастания (China – Китай). Русское название растения обусловлено сильным лимонным запахом листьев, стеблей [1–5].

В литературных источниках, преимущественно иностранных авторов, большое внимание уделяется поиску новых фармакологических эффектов, связанных с применением разнообразного лекарственного растительного сырья (ЛРС) лимонника китайского (плоды, семена, кора стеблей и корней с корневищами) в различных лекарственных формах (масляные экстракты, настои, настойки), а также индивидуальных биологически активных соединений (схизандрин, γ-схизандрин, гомизин А и другие), выделенных из этого сырья.

В настоящее время социально и экономически важным направлением в современной фармации является расширение ассортимента безопасных и эффективных лекарственных средств (ЛС), обладающих тонизирующим и общеукрепляющим действием. В этом отношении особую ценность представляют препараты на основе лекарственных растений (ЛР), проявляющих адаптогенную активность. Подобное фармакологическое действие в наибольшей степени среди адаптогенных растений имеет лимонник китайский. Данный эффект растения обеспечивает группа фенилпропаноидов – лигнаны, обусловливающие также гепатопротекторные свойства его препаратов.

Несмотря на многолетний опыт изучения лимонника китайского, в нашей стране не разработан государственный стандартный образец (ГСО) схизандрина, что, таким образом, оставляет открытым вопрос стандартизации сырья и лекарственных препаратов (ЛП) данного растения.

Таким образом, представляется актуальным дальнейшее фитохимическое исследование семян лимонника китайского в рамках разработки стандартного образца и современных подходов к химическому анализу ЛРС и ЛП на его основе, а также создание новых эффективных тонизирующих средств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Хромато-масс-спектрометрический анализ осуществлялся на приборе фирмы Agilent Technologies состоящем из газового хроматографа 7890 (колонка HP-5, 50 м х 320 мкм х 1,05 мкм) и масс-селективного детектора 5975 С с квадрупольным масс-анализатором; температурная программа хроматографирования: 40 °С изотерма 2 мин; далее программируемый нагрев до 250 °С со скоростью 5 °С/мин и при 250 °С изотерма 15 мин; далее программируемый нагрев до 320 °С со скоростью 25 °С/мин и при 320 °С изотерма 5 мин. Ввод осуществлялся в количестве 1 мкл. Использовался инжектор с делением потока 1:50. Пробоподготовка не проводилась.

Температура инжектора 250 °С. Температура интерфейса 280 °С. Газ-носитель – гелий, скорость потока – 1 мл/мин. Хроматограммы были получены в режиме регистрации сигнала по полному ионному току. Программное обеспечение – ChemStation E 02.00.

Идентификацию компонентного состава (качественный анализ) проводили по библиотеке полных масс-спектров NIST-05 и соответствующим значениям линейных хроматографических индексов Ковача. Относительное содержание компонентов смеси (количественный анализ) определяли вычислением соотношения площадей хроматографических пиков (методом нормализации).

Объектом исследования является эфирное масло семян Лимонника китайского.

Было подсчитано относительное процентное содержание каждого компонента с учетом неидентифицированных пиков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В объекте (эфирном масле семян лимонника) были идентифицированы соединения, относящихся к разным классам: спиртам, кислотам, сахарам, кетонам, антраценпроизводным, терпенам, эфирам и прочим.

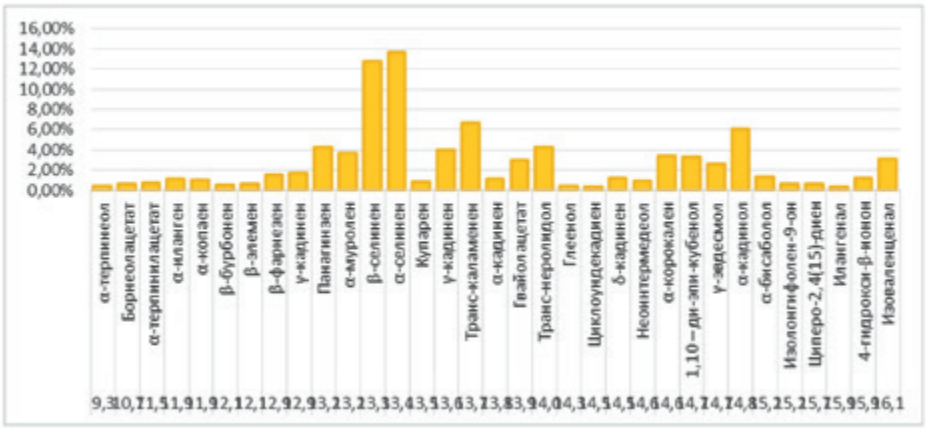


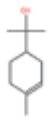
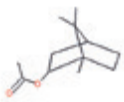
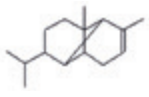
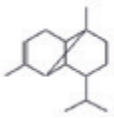
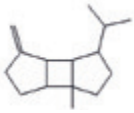
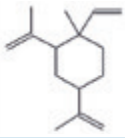
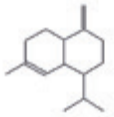
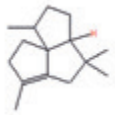
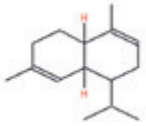
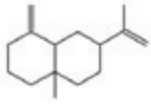
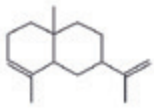
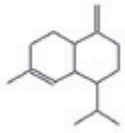
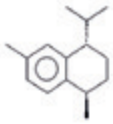
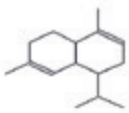
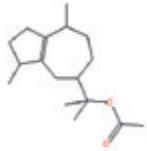
Диаграмма 1. Относительное процентное содержание идентифицированных компонентов эфирного масла лимонника китайского

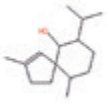
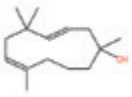
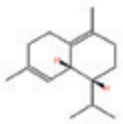
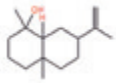
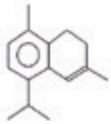
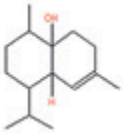
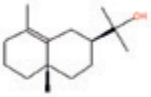
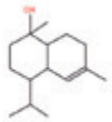
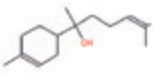
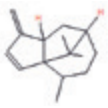
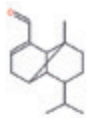
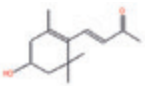
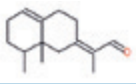
В результате анализа настойки плодов лимонника китайского обнаружено 36 веществ.

В эфирном масле лимонника китайского были идентифицированы следующие соединения: α-терпинеол, борнеолацетат, α-терпинилацетат, α-иланген, α-копаен, β-бурбонен, β-элемен, β-фарнезен, γ-кадинен, панагинзен, α-муролен, β-селинен, α-селинен, купарен, γ-кадинен, транс-каламенен, α-кадинен, гвайолацетат, транс-неролидол, глеенол, циклоундекадиен, δ-кадинен, неоинтермедеол, α-корокален, 1,10 – ди-эпи-кубенол, γ-эвдесмол, α-кадинол, α-бисаболол, изолонгифолен-9-он, циперо-2,4(15)-диен, илангенал, 4-гидрокси-β-ионон, изоваленценал.

Таким образом, в эфирном масле из семян лимонника китайского были обнаружены следующие группы биологически активных веществ: терпеноиды, фенилпропаноиды, тритерпеновые сапонины, гликозиды, углеводы, лигнаны, аминокислоты и фуранокумарины.

Основные идентифицированные соединения в эфирном масле лимонника китайского

№ пика	Время удерживания, мин	Название соединения	% от макс.	% от общего	Структурная формула
1	9,297	α-терпинеол	3,98%	0,545%	
2	10,681	борнеолацетат	5,54%	0,759%	
3	11,546	α-терпинил-ацетат	6,30%	0,863%	
4	11,881	α-иланген	8,80%	1,206%	
5	11,940	α-копаен	8,33%	1,141%	
6	12,076	β-бурбонен	4,78%	0,654%	
7	12,135	β-элемен	4,99%	0,683%	
9	12,876	β-фарнезен	11,45%	1,568%	
10	12,919	γ-кадинен	13,37%	1,831%	
11	13,162	панагинзен	31,71%	4,343%	
12	13,211	α-муролен	27,78%	3,805%	
13	13,314	β-селинен	93,23%	12,770%	
14	13,411	α-селинен	100%	13,697%	
15	13,508	купарен	6,50%	0,890%	
16	13,584	γ-кадинен	29,48%	4,038%	
17	13,665	транс-каламенен	49,25%	6,746%	
18	13,811	α-кадинен	9,00%	1,233%	
19	13,876	гвайолацетат	22,35%	3,061%	
20	14,011	транс-неролидол	31,91%	4,371%	

№ пика	Время удерживания, мин	Название соединения	% от макс.	% от общего	Структурная формула
21	14,271	глеенол	3,95%	0,541%	
22	14,454	циклоундека-диен	3,53%	0,483%	
23	14,541	δ-кадинен	9,71%	1,330%	
24	14,568	неоинтермедеол	7,83%	1,072%	
25	14,633	α-корокален	25,22%	3,454%	
26	14,692	1,10 – ди-эпи-кубенол	24,49%	3,354%	
27	14,730	γ-эвдесмол	19,67%	2,693%	
28	14,811	α-кадинол	44,40%	6,081%	
31	15,152	α-бисаболол	10,63%	1,456%	
32	15,217	изолонгифолен-9-он	5,53%	0,757%	
33	15,741	циперо-2,4(15)-диен	5,52%	0,757%	
34	15,860	илангенал	3,37%	0,462%	
35	15,919	4-гидрокси-β-ионон	9,44%	1,293%	
36	16,076	изоваленценал	23,13%	3,168%	

Газовый хроматограф Agilent 7890

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования можно сделать заключение о химической неоднородности эфирного масла лимонника китайского. В настойках из семян и плодов лимонника китайского были обнаружены следующие группы биологически активных веществ: терпеноиды, фенилпропаноиды, тритерпеновые сапонины, гликозиды, углеводы, лигнаны, аминокислоты и фуранокумарины.

Методом хромато-масс-спектрометрии удалось идентифицировать в эфирном масле, полученном из плодов лимонника китайского, 36 соединений, преимущественно терпеноидной природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. В.А. Куркин, А.В. Дубищев, В.Н. Ежков и др. Антидепрессантная активность некоторых фитопрепаратов и фенилпропаноидов // Хим.-фармац. журн. 2006. Т. 40. № 11. С. 33–38.
2. А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Ю.Я. Харитонов. Валидация аналитических методов // Фармация. 2006. Т. 54. № 4. С. 8–12.
3. А.П. Арзамасцев, В.Л. Багирова, Н.П. Садчикова. Основные аспекты совершенствования фармакопейного анализа // Хим.- фармац. журн. 2000. Т. 34. № 5. С. 47–48.
4. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / Под ред. П.С. Чикова. – М. 1980. 340 с.
5. Т.П. Березовская, Н.В. Дощинская, Е.А. Серых. Методы микроскопического анализа ботанических объектов. – Томск. 1978. 113 с.
6. Т.А. Воронина, С.Б. Середенин. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М. 2000. С. 122–136.
7. К. Геккелер, Х. Экштайн. Аналитические и препаративные лабораторные методы. – М.: Химия, 1994. 409 с.

Масс-селективный детектор Agilent 5975 C с квадрупольным масс-анализатором

8. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. Ч. 1. 704 с.
9. Государственная фармакопея СССР. XI изд. – М.: Медицина, 1986. 1078 с.
10. Государственный реестр лекарственных средств. Офиц. изд. (Данные по состоянию на 1 апр. 2008 г.). – М.: Ремедиум, 2008. 1208 с.
11. Н.И. Гринкевич, А.А. Сорокина. Легенды и быль о лекарственных растениях. – М.: Наука, 1988. С. 159–161.
12. В.С. Гуревич, К.Н. Конторщикова, Л.В. Шатилина. Сравнительный анализ двух методов определения активности супероксиддисмутазы // Лаб. дело. 1990. № 4. С. 44–47.
13. А.А. Долгова, Е.Я. Ладыгина. Морфолого-анатомическое исследование лекарственного растительного сырья: практикум по фармакогнозии. – М.: Медицина, 1977. С. 227–228.
14. Г.Г. Запесочная. Методические основы химической стандартизации растительного сырья и фитопрепаратов // Современное состояние и перспективы научных исследований в области фармации: тез. докл. науч.- практ. конф., посвящ. 25-летию фарм. фак-та СамГМУ. Самара, 11–12 сент. 1996 г. – Самара. 1996. С. 127.
15. Г.Г. Запесочная, В.А. Куркин, В.П. Бойко, В.К. Колхир. Фенилпропаноиды – перспективные биологически активные вещества лекарственных растений // Хим.-фармац. журн. 1995. Т. 29. № 4. С. 47–50.

BÜCHI

Лиофильная сушилка Lyovapor™
Вдохновитесь инновационными технологиями

· Неограниченная ёмкость конденсора.

· Непрерывный процесс лиофильной сушки.

· Удаленный контроль процесса через смартфон.

Официальный дистрибьютор BUCHI:
8 495 252 00 98 (Центральный офис в Москве)
8 800 333 42 24 (Бесплатный звонок по России)
info@phct.ru || www.phct.ru

Фармконтракт
группа компаний

www.buchi.ru/lyovapor

Quality in your hands

УДК 615.322.07

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ СБОРА «ЛОРПОЛИФИТ» ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

У.Н. Буханова[1]*, Н.Г. Селезенев[1], Е.А. Сухосырова[2], Ю.М. Копашева[2], Н.Н. Гирба[2]

Резюме. Изучена *in vitro* антимикробная активность водных извлечений из сбора «Лорполифит» (настой 1:10), настоев отдельных компонентов сбора (1:10) и модельного настоя, изготовленного из настоев (1:10) отдельных компонентов сбора, взятых пропорционально частям сбора, в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Установлено наличие бактерицидного и бактериостатического действия в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P и *Escherichia coli* ATCC 25922. Не обнаружено антимикробной активности всех исследуемых водных настоев (1:10) в отношении *Candida albicans* ATCC 10231.

Ключевые слова: инфекции верхних дыхательных путей, антимикробная активность, лекарственный растительный сбор «Лорполифит», настой.

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COMBINATION PLANT MEDICINAL PRODUCT «LORPOLIPHYT» FOR THE TREATMENT OF DISEASES OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT

U.N. Bukhanova[1]*, N.G. Selezenev[1], E.A. Sukhosyrova[2], Y.M. Kopasheva[2], N.N. Girba[2]

Abstract. *In vitro* antimicrobial activity of infusion (1:10) from the combination plant medicinal product «Lorpoliphyt», infusions (1:10) the individual components of combination and model infusion, made from infusions (1:10) of the individual components of the combination plant medicinal product, taken in proportion to the parts of the collection, against gram-positive and gram-negative microorganisms were studied. The presence of bactericidal and bacteriostatic action against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P and *Escherichia coli* ATCC 25922 was revealed. The antimicrobial activity of all tested infusions (1:10) against *Candida albicans* ATCC 10231 was not found.

Keywords: upper respiratory infection, antimicrobial activity, combination plant medicinal product «Lorpoliphyt», infusion.

1 – ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им/ академика И.П. Павлова» Минздрава России, 390026, Россия, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

2 – ООО «ОЛФАРМ», 117105, Россия, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 3а, стр. 5

1 – Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov, 9, Visocovoltnaya str., Ryazan, 390026, Russia

2 – «OLPHARM», 3A/5, Nagatinskaya str., Moscow, 117105, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: montis-74@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции верхних дыхательных путей (ВДП) и ЛОР-органов занимают первое место в структуре общей заболеваемости в мире, а удельный вес данной патологии составляет у взрослых 27,6%, у подростков – 39,9% и у детей – 61% [1], что актуализирует проблему расширения спектра лекарственных средств для внедрения в комплексную терапию данных заболеваний, в том числе за счет препаратов растительного происхождения.

По характеру течения инфекционные заболевания ВДП условно делятся на острые и хронические, а также подразделяются в зависимости от локализации воспалительного процесса. В популяции широко распространены такие заболевания, как фарингиты, тонзиллиты, ларингиты, ангины и др. Их возбудителями чаще всего являются стрептококки, стафилококки, пневмококки, кандида и др. [2–4].

В зависимости от этиологического агента и локализации воспаления симптомы и последствия инфекции ВДП весьма различны и складываются из симптомов общей интоксикации и местных патологических изменений [1]. Имеется тесная зависимость роли возбудителей от варианта течения заболевания: при остром риносинусите и обострении хронического риносинусита основное значение имеют стрептококк *Streptococcus pneumoniae* (25–35%) и гемофильная палочка *Haemophilus influenzae* (нетипируемые штаммы, 6–26%) [2]. Развитие фолликулярных и лакунарных ангин наиболее часто связано с β-гемолитическим стрептококком группы А (*Streptococcus pyogenes*), а в развитии тонзиллярных осложнений важную роль помимо стрептококков играют также представители семейства Enterobacteriaceae и анаэробные возбудители. В этиологии острого тонзиллофарингита важную роль играет инфекционный фактор, при-

чем вирусы составляют до 15–40% у детей и 30–65% у взрослых, бактерии (в первую очередь стрептококковая и стафилококковая флора и гемофильная палочка) – 30–40% у взрослых и 5–10% у детей [5].

Существенно отличается микрофлора при хронической гнойной патологии ЛОР-органов. Так, основную массу возбудителей составляют различные виды стафилококков (при этом чаще других встречается *S. aureus*), а также различные представители рода *Streptococcus*. Крайне широко представлена группа грамотрицательных микроорганизмов, которая включает различные бактерии семейства Enterobacteriaceae (при хронической гнойной патологии ЛОР-органов наиболее часто определяются *Proteus, Escherichia, Klebsiella, Serratia*). Необходимо отметить возрастание доли грибковой патологии при хронических формах инфекции, что объясняется длительным течением гнойного процесса, длительным местным или системным применением антибиотиков, а также ослаблением иммунного статуса больного. Достаточно часто при хронической гнойной патологии ЛОР-органов высеваются ассоциации микроорганизмов [3, 5, 6, 18].

В развитии хронического воспаления ВДП значение имеет не только видовой, но и количественный состав условно-патогенной микрофлоры. Например, грибы рода *Candida* в количестве 10^{1-4} КОЕ/мл не вызывают воспалительную патологию глоточной миндалины, превышение данного порога способствует развитию воспаления. Встречаемость ассоциаций грибов рода *Candida* и *S. aureus* составляет 23,7% от общего количества выделенных грибов рода *Candida* [6].

Назначение системной антибактериальной терапии традиционно считается обязательным при большинстве инфекционных заболеваний ЛОР-органов [7]. Однако при острых инфекциях ВДП назначение антибактериальных препаратов (АБП) не всегда рационально, так как, во-первых, острые респираторные инфекции могут вызываться не только бактериями, но и различными вирусами, нередки случаи сочетанной и суперинфекции; во-вторых, у условно-патогенных микроорганизмов имеется природная и приобретенная устойчивость к АБП [5, 8–10].

Возникновение устойчивых штаммов при использовании антибиотиков и их высокая токсичность, приводящая к различным осложнениям в клинике, диктует необходимость поиска альтернативных средств борьбы с инфекциями ВДП. Существенное значение для практики имеют препараты растительного происхождения в первую очередь в связи с их хорошей переносимостью, практически полным отсутствием противопоказаний, мягким регулирующим действием на факторы резистентности, возможностью использовать в домашних условиях, экономичностью [5].

Растения имеют неограниченные возможности синтезировать огромный спектр вторичных метаболитов (алкалоидов, гликозидов, терпеноидов, сапонинов, флавоноидов, кумаринов, хинонов, противомикробных и противогрибковых пептидов), оказывающих повреждающее действие на бактериальную клетку и тормозящих рост и размножение бактерий [8].

На наш взгляд, для воздействия на очаг инфекционного воспаления ВДП наиболее целесообразно назначение препаратов местного действия в комплексе с лекарственными растительными препаратами, в частности сборами, оказывающими многостороннее действие. Сборы воздействуют комплексно, так как содержат сумму биологически активных веществ (БАВ) разных групп (полифенольные соединения, фенолгликозиды, дубильные вещества, органические, фенолкарбоновые и другие кислоты, микроэлементы, витамины и т.д.). Преимущество отдается сборам, обладающим противовоспалительным, иммуностимулирующим свойством [5, 11, 12], что отличает их от искусственных антибиотиков, являющихся иммунодепрессантами [10]. Кроме того, сбор должен иметь выраженную антимикробную активность в отношении микроорганизмов, формирующих микробный пейзаж при патологических состояниях ВДП.

Целью данной работы явилось исследование антимикробной активности водных извлечений из сбора «Лорполифит» (настой 1:10), настоев отдельных компонентов сбора (1:10) и модельного настоя, изготовленного из настоев (1:10) отдельных компонентов сбора, взятых пропорционально частям сбора в объеме 100 мл, в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – сбор «Лорполифит», состоящий из 7 видов фармакопейного лекарственного растительного сырья (ЛРС): цветков ноготков (*Calendula officinalis* L.) [ООО ПКФ «ФИТОФАРМ», Россия, серия 030916, годен до 09.18]; травы хвоща (*Equisetum arvense* L.) [ООО ПКФ «ФИТОФАРМ», Россия, серия 010616, годен до 06.20]; листьев подорожника большого (*Plantago major* L.) [ООО ПКФ «ФИТОФАРМ», Россия, серия 010616, годен до 06.19]; цветков ромашки (*Chamomilla recutita* L.) [«ФармаЦвет», Россия, серия 261116, годен до 12.19]; травы тысячелистника (*Achillea millefolium* L.) [ООО ПКФ «ФИТОФАРМ», Россия, серия 010116, годен до 01.19]; корневищ и корней девясила (*Inula helenium* L.) [ООО «Лек С+», Россия, серия 010116, годен до 02.19]; травы зверобоя (*Hypericum perforatum* L.) [ООО ПКФ «ФИТОФАРМ», Россия, серия 020616, го-

ден до 06.19], традиционно используемого в качестве средств, обладающих противовоспалительным, иммуномодулирующим и антимикробным свойствами [13]. Сбор готовили в лабораторных условиях в соответствии с ОФС 1.4.1.0020.15 «Сборы» [14].

Водное извлечение из сбора «Лорполифит» (настой 1:10) изготавливали в соответствии с ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары» ГФ XIII [15]. С целью снижения инициальной контаминации образцов настои готовили с использованием стерильной воды очищенной. Большинство компонентов сбора содержит эфирные масла, поэтому сосуд для настаивания был плотно укупорен в течение всего времени настаивания, перемешивание осуществлялось путем покачивания инфундирки.

Настои (1:10) каждого компонента сбора «Лорполифит» готовили из промышленных образцов ЛРС стандартной степени измельчения в соответствии с ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары».

Модельный настой (1:10) сбора «Лорполифит» готовили из настоев (1:10) отдельных компонентов сбора, взятых пропорционально частям сбора в объеме 100 мл.

Для проведения исследования использовали тест-штаммы: *Staphylococcus aureus* АТСС 6538-Р; *Escherichia coli* АТСС 25922; *Candida albicans* АТСС 10231, полученные из коллекции ЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России и ВКПМ ФГБУ ГосНИИгенетика.

Испытание на наличие антимикробного действия водных извлечений из сбора «Лополифит» (настой 1:10) проводили глубинным чашечным агаровым методом путем сравнения интенсивности роста тест-штаммов микроорганизмов в присутствии и без испытуемого препарата [16].

Накануне испытания тест-штаммы микроорганизмов активировали высевом со среды хранения на питательную среду № 1 (бактерии) и среду № 2 (дрожжи) с последующей инкубацией при температуре 32,5±2,5 °С в течение 16–24 ч. Выросшие культуры со скошенного агара суспендировали в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида до мутности, эквивалентной 0,5 по стандарту McFarland, что примерно составляет (1,0–1,5)x10^8 КОЕ/мл для бактерий и (1,0–5,0)x10^6 КОЕ/мл для дрожжей. Мутность суспензии микроорганизмов устанавливали с использованием денситометра DEN-1. Стандартизованную суспензию тест-штамма микроорганизма разводили методами десятикратных разведений в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида до концентрации около 100 КОЕ/мл (разведение 10^{-6} – *S. aureus, E. coli*, разведение 10^{-4} – *C. albicans*).

В стерильные чашки Петри диаметром 90 мм вносили 1 мл испытуемого образца, затем прибавляли 1 мл суспензии тест-штамма микроорганизма с концентрацией около 100 КОЕ/мл. Чашки с бактериями заливали 15 мл расплавленной и охлажденной до 42,5±2,5 °С среды № 1, чашки с дрожжами – тем же количеством среды № 2. В контрольные чашки вместо испытуемого образца вносили такое же количество стерильной воды очищенной. После застывания агара чашки с посевами переворачивали, помещали в термостат и инкубировали при температуре 35,5±2,5 °С для бактерий и 25,5±2,5 °С для грибов в течение 48–72 ч. После окончания времени инкубации просматривали посевы и отмечали появление типичного роста тест-микроорганизмов в контрольных чашках (без препарата) и испытуемых (с препаратом).

Определение фактической концентрации микробных клеток стандартизованной суспензии проводили поверхностным чашечным агаровым методом [17].

Определение инициальной контаминации водных извлечений проводили в соответствии с ОФС 1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментального изучения антимикробного действия водных извлечений из сбора «Лорполифит» (настой 1:10), настоев (1:10) отдельных компонентов сбора и модельного настоя (1:10) представлены в таблице 1.

При сравнении интенсивности роста бактериальных тест-штаммов *S. aureus* и *E. coli* в присутствии и без испытуемого препарата возникли трудности, вызванные наличием инициальной контаминации образцов. Общее число аэробных микроорганизмов в испытуемых образцах, кроме образцов настоя травы зверобоя, травы тысячелистника, корневищ и корней девясила, находилось в диапазоне 4,0x10^1÷1,7x10^3 КОЕ/мл. В отношении тест-штамма *C. albicans* подобных проблем не возникло, так как в состав питательной среды № 2 входит антибиотик левомицетин для предотвращения роста бактерий.

Наличие или отсутствие роста тест-штаммов *S. aureus* и *E. coli* на чашках с испытуемыми образцами подтверждали с помощью микроскопического исследования. Во всех мазках, кроме образца настоя корневищ и коней девясила, обнаружены грамположительные споровые и неспоровые палочки.

По результатам микроскопирования установлено отсутствие *S. aureus* в мазках образцов водного извлечения из сбора «Лорполифит», настоя цветков календулы, настоя листьев подорожника, настоя

Таблица 1.

Антимикробная активность водных извлечений из сбора «Лорполифит» (настой 1: 10), настоев (1:10) отдельных компонентов сбора и модельного настоя (1:10) сбора «Лорполифит»

Наименование образца	Общее число аэробных микроорганизмов (инициальная контаминация), КОЕ/мл	*S. aureus* ATCC 6538 P		*E. coli* ATCC 25922		*C. albicans* ATCC 10231
		КОЕ/чашку	Микроскопия	КОЕ/чашку	Микроскопия	КОЕ/чашку
Настой (1:10) из сбора «Лорполифит»	$2,0x10^2$	164*	грамположительные споровые палочки	173	грамположительные споровые и неспоровые палочки; грамотрицательные палочки	163
Настой (1:10) цветков календулы	$1,4x10^3$	сплошной рост*	грамположительные споровые палочки	сплошной рост**	грамположительные споровые и неспоровые палочки	155
Настой (1:10) листьев подорожника	$4,0x10^1$	20*	грамположительные споровые палочки	135	грамположительные споровые и неспоровые палочки; грамотрицательные палочки	155
Настой (1:10) травы хвоща	$6,0x10^1$	68	грамположительные споровые палочки; единичные грамположительные кокки	136	грамположительные споровые и неспоровые палочки; грамотрицательные палочки	173
Настой (1:10) цветков ромашки	$1,7x10^3$	сплошной рост*	грамположительные споровые и неспоровые палочки	сплошной рост**	грамположительные споровые и неспоровые палочки	182
Настой (1:10) травы зверобоя	<10	45	грамположительные споровые палочки; грамположительные кокки	135	грамотрицательные палочки	175
Настой (1:10) травы тысячелистника	<10	58	грамположительные споровые палочки; единичные грамположительные кокки	127	грамотрицательные палочки	177
Настой (1:10) корневищ и корней девясила	<10	89	грамположительные кокки	125	грамотрицательные палочки	180
Модельный настой (1:10) сбора «Лорполифит»	$7,0x10^2$	сплошной рост*	грамположительные споровые палочки	сплошной рост	грамотрицательные палочки; грамположительные неспоровые палочки	177
Контроль культуры (без испытуемого препарата)	–	93	грамположительные кокки	130	грамотрицательные палочки	160

Примечание: * – отсутствие в мазках *S. aureus*.
**– отсутствие в мазках *E. coli*.

цветков ромашки и модельного настоя. В мазках образцов настоев травы хвоща, травы тысячелистника и травы зверобоя в поле зрения микроскопа наряду с грамположительными споровыми и неспоровыми палочками обнаружены единичные грамположительные кокки.

Установлено отсутствие *E. coli* в мазках образцов настоев цветков календулы и цветков ромашки.

Таким образом, по результатам проведенного исследования можно сделать вывод, что водное извлечение из сбора «Лорполифит» (настой 1:10), настои (1:10) из цветков календулы, листьев подорожника, цветков ромашки и модельный настой, изготовленный из настоев 1:10 отдельных компонентов сбора, взятых пропорционально частям сбора, обладают бактерицидным действием в отношении *S. aureus*

АТСС 6538-Р: отсутствует рост тест-микроорганизма в присутствии испытуемого препарата. Настои (1:10) из травы хвоща, травы зверобоя и травы тысячелистника обладают бактериостатическим действием в отношении *S. aureus* АТСС 6538-Р: наблюдается уменьшение роста тест-микроорганизма в присутствии испытуемого препарата. Настой (1:10) из корневищ и корней девясила не обладает антимикробным действием в отношении *S. aureus* АТСС 6538-Р: рост тест-микроорганизма аналогичен контролю.

Водное извлечение из сбора «Лорполифит» (настой 1:10), модельный настой, изготовленный из настоев (1:10) отдельных компонентов сбора, настои (1:10) цветков календулы, травы хвоща, травы зверобоя, травы тысячелистника, корневищ и корней девясила не обладают антимикробным действием в отношении *E. coli* АТСС 25922 – рост тест-микроорганизма аналогичен контролю. Настои (1:10) из цветков календулы и цветков ромашки обладают бактерицидным действием в отношении *E. coli* АТСС 25922: отсутствует рост тест-микроорганизма в присутствии испытуемого препарата. Данный факт позволяет прогнозировать проявление антимикробного действия в отношении *E. coli* у сбора «Лорполифит» при условии совершенствования технологии получения извлечений из данной фитокомпозиции, например используя промышленные способы экстрагирования, направленные на увеличение выхода из сбора БАВ, обладающих антибактериальной активностью.

Все испытанные образцы водных извлечений (1:10) не обладают антимикробным действием в отношении *C. albicans* АТСС 10231 – рост тест-микроорганизма аналогичен контролю.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Доказана выраженная антибактериальная активность водного извлечения из сбора «Лорполифит» (настой 1:10); модельного настоя объемом 100 мл, изготовленного из настоев (1:10) отдельных компонентов сбора, взятых пропорционально частям сбора, а также подтверждено антимикробное действие настоев (1:10) из цветков календулы, листьев подорожника, цветков ромашки в отношении *S. aureus* АТСС 6538-Р.
2. Выявлена антибактериальная активность в отношении *E. coli* АТСС 25922 у настоев (1:10) из цветков календулы и цветков ромашки.
3. Не обнаружено антибактериальной активности всех исследуемых водных настоев (1:10) в отношении *C. albicans* АТСС 10231.
4. Сбор «Лорполифит» можно рассматривать как дополнение к проводимой системной антибиотикотерапии при заболеваниях ВДП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н.Л. Кунельская, А.Ю. Ивойловов, М.И.Кулагина. Экспекторанты в комплексной терапии // Медицинский совет. 2015. № 3. С. 75–77.
2. Оториноларингология / Под ред. чл.-кор. РАМН, проф. В.Т. Пальчуна, проф. А.И. Крюкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 368 с.: ил. (Серия «Клинические рекомендации»).
3. Оториноларингология: национальное руководство / Под ред. В.Т. Пальчуна. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 960 с. (Серия «Национальные руководства»).
4. П.М. Масесе, Т.В. Фатеева, П.Г. Мизина, И.Н. Зилфикаров. Изучение антимикробной активности лекарственной композиции с экстрактами эвкалипта и эхинацеи // Фармация. 2016. Т. 65. № 3. С. 40–42.
5. С.В. Морозова. Возможности применения препаратов растительного происхождения при неспецифических инфекционно-воспалительных заболеваниях глотки // Русский медицинский журнал. 2007. Т. 15. № 7. С. 592
6. О.А. Гизенгер, С.А. Шетинина. Мониторинг микрофлоры поверхности глоточной миндалины у детей с хроническим аденоидитом, проживающих на территории города Челябинска // Вестник оториноларингологии. 2016. № 1. С.33–36.
7. Е.И. Каманин, О.У. Стецюк. Инфекции верхних дыхательных путей и ЛОР-органов // Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – Смоленск: МАКМАХ, 2007. С. 248–257.
8. Д.В. Тапальский, Ф.Д. Тапальский. Антибактериальная активность официнальных лекарственных растений в отношении экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий // Проблемы здоровья и экологии. 2015. С. 69–74.
9. Д.М. Хисямова, В.А. Куркин, А.В. Лямин, А.В. Жестков. Антимикробная активность водных извлечений из подземных органов некоторых видов лапчатки // Фармация. 2016. № 1. С. 32–34.
10. Н.Н. Гаврилова, И.А. Ратникова, Л.П. Треножникова, К. Баякышова, А.Х. Хасенова. Антимикробная активность лекарственных растений в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов // Биотехнология. Теория и практика. 2010. № 4. С. 44–47.
11. Н.В. Иващенко, И.А. Самылина. Антимикробная активность лекарственного сбора «Уросан» // Фармация. 2013. № 2. С. 39–40.
12. Г.Н. Селезенев, Д.М. Попов, Н.Г. Селезенев, В.И. Коноплева. Разработка и исследование лекарственного растительного сбора «УВАУР» // Сеченовский вестник. 2014. № 1(15) С. 138–139.
13. В.Ф. Корсун, Г.В. Лавренова, Е.В. Корсун, Б.А. Султанбеков. Лекарственные растения в ЛОР-практике: руководство по клинической фитотерапии. – Спб: Изд-во Н-Л, 2010. 304 с.
14. ОФС 1.4.1.0020.15. Сборы // Государственная фармакопея. XIII изд. Т. 2.
15. ОФС.1.4.1.0018.15. Настои и отвары // Государственная фармакопея. XIII изд. Т. 2.
16. ОФС 1.2.4.0002.15. Микробиологическая чистота // Государственная фармакопея. XIII изд. Т. 1.
17. ОФС 1.7.2.0008.15. Определение концентрации микробных клеток // Государственная фармакопея. XIII изд. Т. 2.
18. J. BrooK, K. Shah. Bacteriology of adenoids of and tonsils in children with recurrent adenotonsillitis // Annals Otol, Rhinol Laryngol. 2001. № 110. P. 844–848.

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.

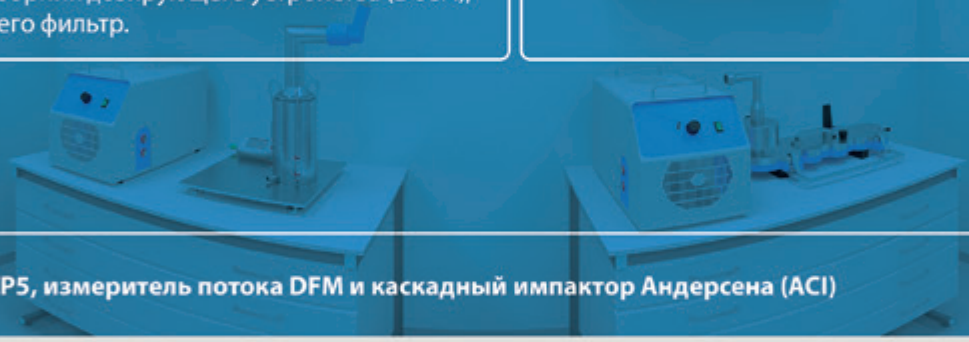
Насос HCP5, устройство DUSA MDI и контроллер потока TPK2000

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; 615.015.1; 615.453.6

ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРИ ОЦЕНКЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ *IN VITRO*

Н.И. Филиппова[1]*, А.А. Теслев[1]

Резюме. В статье представлены описания математических моделей, используемых для изучения высвобождения лекарственных веществ из систем с модифицированным высвобождением (модели нулевого и первого порядков, модель Weibull, модель Hixon – Crowell, модель Higuchi, модель Baker – Lonsdale, модель Hopfenberg, модель Gompertz, модель Korsmeyer – Peppas, модель Peppas – Sahlin). Приведены результаты обработки данных экспериментов по изучению высвобождения ибупрофена из матричных таблеток на основе карбомера с применением моделей Higuchi и Korsmeyer – Peppas.

Ключевые слова: тест «Растворение», кинетика высвобождения, математическое моделирование, модифицированное высвобождение, ибупрофен, матричные таблетки, лекарственное вещество, лекарственная форма.

APPLICATION OF MATHEMATICAL MODELING IN THE EVALUATION OF *IN VITRO* DRUG RELEASE

N.I. Filippova[1]*, A.A. Teslev[1]

Abstract. Descriptions of mathematical models using for drug dissolution studying from modified-release systems (zero-order kinetic, first-order kinetic, Weibull model, Hixon – Crowell model, Higuchi model, Baker – Lonsdale model, Hopfenberg model, Gompertz model, Korsmeyer – Peppas model, Peppas – Sahlin model) were presented in the article. Results of ibuprofen release from carbomer matrix tablets were processed using Higuchi and Korsmeyer – Peppas models.

Keywords: dissolution test, release kinetic, mathematical models, modified-release, ibuprofen, matrix tablets, drug, dosage form.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

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

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

ВВЕДЕНИЕ

Важными этапами процесса разработки лекарственного препарата (ЛП) является выбор, рациональное обоснование лекарственной формы (ЛФ) и оценка высвобождения лекарственного вещества (ЛВ), особенно для ЛФ с модифицированным высвобождением [1].

Высвобождение лекарственного вещества (ЛВ) является процессом, обеспечивающим достижение фармакологического эффекта. В общем случае различают немедленное, пролонгированное, модифицированное [замедленное непрерывное, прерывистое (пульсирующее), отсроченное] высвобождение ЛВ [2, 3].

Прерывистое (пульсирующее) высвобождение – это высвобождение ограниченного количества ЛВ через временные промежутки, запрограммированные в препарате [4, 5].

Отсроченное высвобождение – это процесс высвобождения ЛВ за время, отличное от немедленно следующей локализации ЛФ [4].

Разработка математических моделей, учитывающих состав ЛФ и факторы, влияющие на высвобождение, является актуальной при создании ЛФ и позволяет сократить количество исследований [6]. Применение моделей возможно за счёт введения некоторых упрощений (математических изменений) процесса высвобождения.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ПРИМЕНЕНИИ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ

На профиль высвобождения ЛВ оказывают влияние различные факторы (вид ЛФ, полиморфизм, кристалличность, размер частиц, растворимость ЛВ и его дозировка и др.). Так, растворимые ЛВ высвобождаются из матричных таблеток главным образом за счёт диффузии, тогда как для малорастворимых ЛВ основным механизмом высвобождения является процесс эрозии матрицы [7].

Для интерпретации значений, полученных при анализе растворения ЛФ, могут использоваться уравнения, описывающие кривую растворения как математическую функцию от времени эксперимента $C(t)$.

Математические модели могут применяться в следующих случаях:

- оптимизация кинетики и определение механизмов высвобождения ЛВ;
- определение влияния технологических факторов (давление прессования, геометрические параметры, состав и проч.) на высвобождение ЛВ;
- оптимизация состава ЛП на основе уравнения высвобождения;
- прогнозирование степени высвобождения ЛВ и его диффузии из полимерной матрицы (сокращение числа экспериментов) [4].

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Математические модели позволяют спрогнозировать высвобождение ЛВ и определить параметры разрабатываемой ЛФ. Однако для составления модели, в наиболее полной мере отражающей высвобождение ЛВ, необходимо также учитывать параметры *in vivo* [8].

К настоящему времени разработано большое число моделей, описывающих высвобождение ЛВ из различных ЛФ:

1) модель нулевого порядка;
2) модель первого порядка;
3) модель Weibull;
4) модель Hixson – Crowell;
5) модель Higuchi;
6) модель Baker – Lonsdale;
7) модель Hopfenberg;
8) модель Gompertz;
9) модель Korsmeyer – Peppas;
10) модель Peppas – Sahlin и др.

Известно, что в ходе диффузии происходит перенос вещества из области с высокой в область с низкой концентрацией (по направлению вектора градиента концентрации).

Первый закон диффузии Фика

Закон позволяет описать диффузионный поток концентраций при допущении устойчивого состояния. Поток вещества движется из области с высокой концентрацией в область с меньшей концентрацией и при этом пропорционален их градиенту [4]:

$$J = -D\frac{dc}{dx},$$

где J – количество вещества, проходящего перпендикулярно через единицу площади поверхности за единицу времени, $см^{-2} \cdot с^{-1}$; D – коэффициент диффузии, $см^2 \cdot с^{-1}$; $\frac{dc}{dx}$ – градиент концентраций.

Знак минус указывает на то, что диффузия происходит в направлении, обратном увеличению концентраций.

Второй закон диффузии Фика

Скорость изменения концентраций изменяется в объёме с диффузионным полем пропорционально скорости изменения пространственного градиента концентраций в точке поля. Здесь константой пропорциональности является коэффициент диффузии (D) [4]:

$$\frac{dc}{dt} = D\frac{d^2c}{dx^2}.$$

Ограничения применимости законов Фика

Первый и второй законы Фика применимы для жидкостного потока и потока концентраций через полупроницаемую мембрану. Однако существуют некоторые ограничения при описании процесса диффузии ЛВ, например изменение граничных условий, диффузия не по Фику и др.

Известно, что полимеры имеют широкий диапазон времени релаксации, связанный с изменениями их структуры. Так, при понижении температуры или увеличении исходной концентрации усиливается движение молекул полимера. Наряду с этим полимеры способны изменять состояние (из стеклованного (аморфного) в эластичное) при переходе температуры стеклования [9, 10].

Alfrey, Gurnee и Lloyd (1966) предложили классификацию, позволяющую сравнить скорости диффузии и релаксации полимера, выделив 3 случая [9, 11]:

1. Case-I-транспорт (диффузия по Фику), при котором скорость диффузии намного меньше, чем скорость релаксации полимера (граничный случай 1).
2. Case-II-транспорт [12], при котором диффузия протекает очень быстро в сравнении с процессом релаксации полимера (граничный случай 2).
3. Диффузия не по Фику (аномальная диффузия), при которой скорости диффузии и релаксации сопоставимы.

Case-I-транспорт и Case-II-транспорт являются достаточно простыми и могут быть описаны с использованием одного параметра [9].

В случае Case-I-транспорта параметры систем высвобождения зависят от величины коэффициента диффузии. В случае Case-II-транспорта – от скорости продвижения фронта диффузии, которая определяет

глубину проникновения диффундирующего вещества и является константой. Оба случая являются граничными в отношении вида кривой «сорбция – время» [9].

Если обозначить количество сорбата за время t как $K \cdot t^n$, где K и n – константы, тогда системы, подчиняющиеся Case-II-транспорту, будут характеризоваться выражением с показателем степени n=1, а системы, подчиняющиеся Case-I-транспорту, – с n=½ [9].

Системы, не подчиняющиеся закону Фика (случай аномальной диффузии), занимают промежуточное положение между Case-I-транспортом и Case-II-транспортом, а n в этом случае принимает значение между ½ и 1. Такие системы нуждаются в применении двух и более параметров для описания взаимодействия между процессами диффузии и релаксации [9]. Рассмотрим некоторые математические модели, описывающие высвобождение ЛВ.

Модель высвобождения нулевого порядка

Растворение ЛФ, медленно высвобождающей ЛВ, может быть представлено уравнением (1) [4, 13-15]:

$$W_0 - W_t = K \cdot t, \quad (1)$$

где t – время, мин; W_0 – исходное количество ЛВ в ЛФ, %; W_t – количество ЛВ в ЛФ через время t, %; K – константа пропорциональности, мин$^{-1}$.

Преобразовывая выражение (1), получают уравнение (2):

$$f_t = K_0 \cdot t, \quad (2)$$

где $f_t = 1 - \frac{W_t}{W_0}$, t – время, мин; f_t – часть ЛВ, растворенного за время t; K_0 – константа нулевого порядка, мин$^{-1}$.

Для веществ, высвобождение которых соответствует данной модели, характерна линейная зависимость степени растворения ЛВ от времени.

Таким образом, в единицу времени высвобождается одинаковое количество ЛВ. Считается, что такая модель идеализированным образом описывает высвобождение ЛВ из пролонгированных ЛФ. В общем случае модель может быть выражена уравнением (3):

$$Q_t = Q_0 + K_0 \cdot t, \quad (3)$$

где t – время, мин; Q_t – количество ЛВ, растворенного за время t, %; Q_0 – исходное количество ЛВ, %; K_0 – константа высвобождения нулевого порядка, мин$^{-1}$.

Модель нулевого порядка может использоваться для описания высвобождения ЛВ из ЛФ с модифицированным высвобождением, например для трансдермальных, матричных систем с малорастворимыми ЛВ, ЛФ, покрытых оболочкой, осмотических систем и т.д. [16].

Модель высвобождения первого порядка

Модель была разработана Gibaldi и Feldman (1967), а затем Wagner (1969). В ее основе лежит уравнение Noyes – Whitney (1897) (4), которое отражает поверхностное взаимодействие, характерное для растворения твёрдых частиц в жидкой среде [13–15]:

$$\frac{dC}{dt} = K \cdot (C_s - C), \quad (4)$$

где t – время, мин; C – концентрация растворенного вещества в момент времени t; C_s – растворимость при равновесии и температуре эксперимента; K – константа пропорциональности первого порядка, мин$^{-1}$.

Уравнение (4) было позднее доработано Brunner и соавт. (1900) включением площади твердой поверхности, доступной для растворения (S):

$$\frac{dC}{dt} = K_1 \cdot S \cdot (C_s - C), \quad (5)$$

где K_1 – новая константа пропорциональности.

С использованием первого закона Фика было установлено следующее соотношение для K_1:

$$K_1 = \frac{D}{V \cdot h}, \quad (6)$$

где D – коэффициент диффузии вещества в среде растворения, см^2·с$^{-1}$; V – объём среды растворения, см^3; h – ширина диффузионного слоя, см.

Hixson и Crowell адаптировали уравнение Noyes – Whitney (4) следующим образом (7):

$$\frac{dW}{dt} = K^* \cdot S \cdot (C_s - C), \quad (7)$$

где t – время, мин; W – количество растворенного вещества за время t; $\frac{dW}{dt}$ – скорость перехода вещества в раствор за время t; K^* – константа, введённая в уравнение Hixson – Crowell, мин$^{-1}$.

После умножения обеих частей выражения (6) на V и замены $K_1 \cdot V$ на K получим (8):

$$K = \frac{D}{h}. \quad (8)$$

Используя те же преобразования, можно записать уравнение Hixson – Crowell следующим образом:

$$\frac{dW}{dt} = \frac{K^* \cdot S}{V} \cdot (V \cdot C_s - W) = K \cdot (V \cdot C_s - W), \quad (9)$$

где $K = K^* \cdot S$.

Принимая в виде допущения, что ЛФ с неизменной поверхностью находится в идеальных условиях (условиях погружения), то после интегрирования уравнения (9) получим (10):

$$W = V \cdot C_s \cdot (1 - e^{-kt}), \quad (10)$$

после логарифмирования выражение (10) примет вид (11):

$$\lg V \cdot C_s - W = \lg V \cdot C_s - \frac{K \cdot t}{2{,}303}. \quad (11)$$

Для описания этой модели может быть также использовано соотношение (12):

$$Q_t = Q_0 \cdot e^{-K_1 \cdot t}$$

$$\left(\ln \frac{Q_t}{Q_0} = K_1 \cdot t \text{ или } \ln Q_t = \ln Q_0 \cdot K_1 \cdot t \right.$$

$$\left. \text{или } \lg Q_t = \lg Q_0 - \frac{K_1 \cdot t}{2{,}303} \right), \quad (12)$$

где t – время, мин; Q_t – количество вещества, высвободившегося за время t; Q_0 – исходное количество вещества в растворе; K_1 – константа высвобождения первого порядка, мин$^{-1}$.

Графическая зависимость доли невысвободившегося ЛВ от времени представляет собой прямую с угловым коэффициентом $\left(-\frac{K_1}{2{,}303} \right)$.

Модель Weibull

Функция распределения Weibull впервые была введена в фармацевтическую практику Langenbucher (1972) [16–18].

$$W = 1 - e^{-\left(\frac{t}{t_D}\right)^{\beta}}, \quad (13)$$

где W – количество ЛП, растворившегося ко времени t, %; t_D – время, необходимое для растворения 63,2% ЛП, мин; β – параметр формы кривой.

После преобразования (13) получим уравнение (14):

$$t = t_D \left[\ln \left\{ \frac{1}{1 - W} \right\} \right]^{1/\beta}. \quad (14)$$

Если обе части уравнения (14) прологарифмировать и умножить на β, приходим к выражению (15):

$$\ln \left(\ln \frac{1}{1 - W} \right) = \beta \cdot \ln t - \beta \cdot \ln t_D. \quad (15)$$

Модель Hixson – Crowell (модель кубического корня)

Для ЛВ, имеющих монодисперсный состав, Hixson и Crowell (1931) предложили уравнение (16), основанное на кубическом корне из массы и радиуса частиц [4, 13–15]:

$$Q_0^{\frac{1}{3}} - Q_t^{\frac{1}{3}} = K_{HC} \cdot t, \quad (16)$$

где t – время, мин; K_{HC} – константа Hixson – Crowell, мин$^{-1}$.

Для определения профиля высвобождения строят зависимость кубического корня доли невысвободившегося ЛВ от времени.

Модель Hixson – Crowell может применяться для различных ЛФ, например таблеток с контролируемым высвобождением, при растворении которых исходная геометрическая форма сохраняется в течение всего времени, а размеры таблетки уменьшаются.

Модель Higuchi

Математическая модель, предложенная Higuchi (1961), является первой, описывающей высвобождение ЛВ из матричных систем как процесс диффузии, основанный на законе Фика и зависящий от квадратного корня времени [12–15, 20, 21].

Модель основана на следующих положениях:

1) исходная концентрация ЛВ в матрице значительно превышает его растворимость;
2) модель основана на постоянной одномерной диффузии;
3) исследуемое ЛВ находится в идеальном состоянии (частицы имеют значительно меньший диаметр по сравнению с размерами системы);
4) набухаемость и растворение матрицы ограничены или незначительны;
5) в среде всегда достигается условие погружения [22].

Растворение из таблеток на основе гомогенных матриц может быть представлено уравнением (17):

$$f_t = Q_t = A \cdot \sqrt{D \cdot (2C - C_s) \cdot C_s \cdot t}, \quad (17)$$

где t – время, с; Q_t – количество ЛВ, высвободившегося за время t с единицы поверхности A; D – коэффициент диффузии молекул ЛВ, см^2·с$^{-1}$; C – исходная концентрация ЛВ; C_s – растворимость ЛВ в среде матрицы.

Соотношение (17) верно для всего времени растворения, за исключением момента полного высвобождения. Для гетерогенных матричных систем (таблеток),

в которых концентрация ЛВ меньше его растворимости, а высвобождение происходит через поры матрицы, выражение (17) может быть представлено в виде (18):

$$f_t = Q_t = A \cdot \sqrt{\frac{D \cdot \varepsilon}{\tau} \cdot (2C - \varepsilon \cdot C_s) \cdot C_s \cdot t}, \qquad (18)$$

где t – время, с; Q_t – количество высвободившегося ЛВ за время t с единицы поверхности A; D – коэффициент диффузии молекул ЛВ в среду, см^2·с$^{-1}$; C – исходная концентрация ЛВ; C_s – растворимость ЛВ в матрице; ε – пористость матрицы; t – фактор извилистости капиллярной системы матрицы.

Кривизна (извилистость) матрицы определяется как величина радиуса и разветвленности каналов и пор матрицы. Пористость – свойство матрицы, определяемое числом каналов или пор, через которые жидкость проникает внутрь для высвобождения ЛВ [23].

В общем случае модель Higuchi можно представить в упрощенном виде (19):

$$f_t = Q_t = K_H \cdot \sqrt{t}, \qquad (19)$$

где K_H – константа растворения Higuchi, с$^{-0,5}$.

Модель Higuchi может быть использована для описания растворения нескольких типов ЛФ с модифицированным высвобождением, например для некоторых трансдермальных систем и матричных таблеток (с растворимыми ЛВ) [13, 14].

Точное решение уравнения может быть найдено для тонких пленок толщиной d, ЛП с однородным дозированием в условиях постоянной диффузии и высвобождения $Q_t \sim t^{0,5}$ [21].

Модель Baker – Lonsdale

Модель была разработана Baker и Lonsdale (1974) на основе модели Higuchi для описания высвобождения ЛВ из матриц сферической формы (20) [4, 13–15]:

$$\frac{3}{2} \cdot \left[1 - \left(\frac{Q_t}{Q_\infty}\right)^{\frac{2}{3}}\right] - \frac{Q_t}{Q_\infty} = \frac{3 \cdot D_m \cdot C_{ms}}{r_0^2 \cdot C_0 \cdot \tau} \cdot t, \qquad (20)$$

где t – время, с; Q_t – количество ЛВ, высвободившееся за время t; Q_∞ – общее количество высвободившегося ЛВ; D_m – коэффициент диффузии, см^2·с$^{-1}$; C_{ms} – растворимость ЛВ в матрице; r_0 – радиус сферической матрицы, см; C_0 – исходная концентрация ЛВ в матрице; t – фактор извилистости капиллярной системы матрицы.

Для негомогенных матриц, в структуре которых присутствуют микротрещины и/или капилляры, способствующие высвобождению ЛВ, используют уравнение (21):

$$\frac{3}{2} \cdot \left[1 - \left(\frac{Q_t}{Q_\infty}\right)^{\frac{2}{3}}\right] - \frac{Q_t}{Q_\infty} = \frac{3 \cdot D_f \cdot C_{fs} \cdot \varepsilon}{r_0^2 \cdot C_0 \cdot \tau} \cdot t, \qquad (21)$$

где D_f – коэффициент диффузии, см^2·с$^{-1}$; C_{fs} – растворимость ЛВ в среде, окружающей матрицу; ε – пористость матрицы, которая может быть выражена уравнением (22):

$$\varepsilon = \varepsilon_0 + K \cdot C_0, \qquad (22)$$

где ε_0 – исходная пористость матрицы; K – характерный объем ЛФ.

Если ε_0 бесконечно мало, уравнение (22) может быть представлено в виде (23) [13]:

$$\frac{3}{2} \cdot \left[1 - \left(\frac{Q_t}{Q_\infty}\right)^{\frac{2}{3}}\right] - \frac{Q_t}{Q_\infty} = \frac{3 \cdot D_f \cdot K \cdot C_{fs}}{r_0^2 \cdot \tau} \cdot t. \qquad (23)$$

В общем виде модель Baker – Lonsdale может быть представлена уравнением (24) [13]:

$$\frac{3}{2} \cdot \left[1 - \left(\frac{Q_t}{Q_\infty}\right)^{\frac{2}{3}}\right] - \frac{Q_t}{Q_\infty} = k \cdot t, \qquad (24)$$

где k – константа высвобождения, с$^{-1}$, являющаяся угловым коэффициентом модельной прямой.

Модель используется для приведения к линейному виду кривых высвобождения ЛВ из микрокапсул и микросфер [13].

Модель Hopfenberg

Модель используется для описания высвобождения ЛВ из ЛФ с плоской, сферической и цилиндрической поверхностью по механизму эрозии через поверхность полимера, сохраняющуюся постоянной на протяжении всего эксперимента (25) [4, 13–15]:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 \cdot t}{C_0 \cdot a_0}\right]^n, \qquad (25)$$

где t – время, мин; Q_t – количество ЛВ, высвободившегося за время t; Q_∞ – количество высвободившегося ЛВ при полном «истощении» ЛФ; $\frac{Q_t}{Q_\infty}$ – доля растворившегося ЛВ; k_0 – константа скорости эрозии, мм/мин; C_0 – исходная концентрация ЛВ в матрице, г/г; a_0 – начальный радиус для сферы или цилиндра или половина толщины для плоских ЛФ, мм; n – показатель, учиты-

вающий геометрию ЛФ (n = 1, 2 или 3 для плоских, цилиндрических или сферических ЛФ соответственно).

El-Arini и Leuenberger модифицировали модель с учетом времени запаздывания высвобождения ЛВ в начальный момент времени следующим образом [14]:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - \left[1 - k_1 \cdot t \cdot (t-1)\right]^n, \quad (26)$$

где $k_1 = \frac{k_0}{C_0 \cdot a_0}$, мин$^{-1}$.

Модель Gompertz

Профиль растворения ЛФ может быть также описан моделью Gompertz, представленной уравнением (27) [4, 13, 15]:

$$Q_t = Q_{\max} \cdot e^{-\alpha \cdot e^{\beta \cdot \log t}}, \quad (27)$$

где t – время, мин$^{-1}$; Q_t – доля ЛВ, высвободившегося за время t; $Q_{\max}$ – максимальное количество высвободившегося ЛВ; α – невысвободившееся количество ЛВ за время t=1 [4, 13, 15]; β – степень высвобождения в единицу времени.

Модель используется для описания высвобождения хорошо растворимых ЛВ и ЛФ с немедленным высвобождением.

Модель Korsmeyer – Peppas

Korsmeyer с соавт. (1983) предложили соотношение, описывающее высвобождение ЛВ из полимерных систем [4, 13–15]:

$$f_t = K \cdot t^n, \quad (28)$$

где t – время, мин; f_t – часть ЛВ, высвободившегося за время t; K – константа степени высвобождения, мин$^{-1}$; n – показатель высвобождения.

Уравнение (18) используется для описания высвобождения ЛВ из ЛФ с модифицированным высвобождением.

Для применения описания растворения ЛВ по модели Korsmeyer – Peppas первые 60% экспериментальных данных о высвобождении должны соответствовать этой модели.

Если высвобождение ЛВ происходит в идеальных условиях (в условиях погружения), то могут быть допущены следующие начальные и граничные условия (29):

$$t{=}0: \; -\frac{d}{2} < x < \frac{d}{2}; \; c{=}c_0 \quad (29)$$

$$t{>}0: \; x = \pm\frac{d}{2}; \; c{=}c_1,$$

где t – время мин; c_0 – исходная концентрация ЛВ в системе; c_1 – концентрация ЛВ в системе полимер – вода.

Достаточно точное выражение может быть получено для небольшого значения времени t при втором условии, тогда выражение для второго закона Фика [13] примет вид:

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = 2\left(\frac{D_t}{\delta^2}\right)^{\frac{1}{2}} = a \cdot t^{\frac{1}{2}}. \quad (30)$$

Если диффузия является основным механизмом высвобождения ЛВ, то график зависимости количества высвободившегося ЛВ от квадратного корня времени представляет прямую линию.

В некоторых экспериментальных случаях, когда механизм высвобождения отличается от закона Фика (так называемая диффузия не по Фику), может быть использовано более общее уравнение (31):

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = a \cdot t^n. \quad (31)$$

Величина n используется для описания различий в высвобождении из матричных таблеток плоскоцилиндрической формы (таблица 1):

Таблица 1.

Интерпретация механизмов диффузионного высвобождения из слоя полимера в модели Korsmeyer – Peppas [13, 24, 25]

Показатель высвобождения (n)	Механизм высвобождения ЛВ	Характер зависимости от времени
0,45≤n	Диффузия по закону Фика	$t^{-0,5}$
0,45<n<0,89	Диффузия не по закону Фика	t^{n-1}
n=0,89	Case-II-транспорт	Высвобождение нулевого порядка
n>0,89	Аномальная диффузия (Super Case II)	t^{n-1}

Для нахождения показателя n может быть использована только часть кривой высвобождения, где Q_t/Q_∞<0,6.

Результат изображают в виде графической зависимости величины логарифма суммарного процента высвободившегося ЛВ от величины логарифма времени.

Данная модель одновременно учитывает несколько процессов:

- диффузию воды в таблетку;
- набухание таблетки после проникновения воды;
- формирование гелевого слоя;
- диффузию ЛВ и наполнителей из таблетки;
- растворение полимерной матрицы.

Кроме этого, модель учитывает плоскоцилиндрическую форму таблетки, растворение полимера, изменение объема таблетки [26].

Модель Peppas – Sahlin

Модель, разработанная Peppas и Sahlin, учитывает взаимосвязанные эффекты диффузии по Фику и Case-II-транспорта. Значение K_1 демонстрирует вклад диффузии по Фику, в то время как значение K_2 связано как с растворением, так и с релаксацией полимерных цепей. Константы K_1 и K_2 могут быть вычислены путем подстановки показателя n из модели Korsmeyer – Peppas в модель Peppas – Sahlin.

После нахождения значений K_1 и K_2 может быть рассчитана степень высвобождения ЛВ посредством диффузии по Фику и соотношение вкладов процесса релаксации полимера и диффузии по Фику [26].

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_1 \cdot t^m + K_2 \cdot t^{2m}, \quad (32)$$

где t – время, мин; m – показатель высвобождения; $\frac{Q_t}{Q_\infty}$ – доля высвободившегося ЛВ в момент времени t; K_1 и K_2 – кинетические константы, мин$^{-m}$ и мин$^{-2m}$.

Первый член в правой части уравнения показывает вклад в высвобождение диффузии по Фику (f), а второй член – вклад в высвобождение процесса релаксации полимера (R). Соотношение этих вкладов может быть рассчитано следующим образом:

$$\frac{R}{f} = \frac{K_2 \cdot t^m}{K_1}. \quad (33)$$

Для расчета кинетических констант результаты высвобождения рассматривают как систему нелинейных уравнений. Система линейных или нелинейных уравнений может быть решена различными способами (подстановкой, вычитанием, составлением матрицы, графически).

Для вычисления значений K_1 и K_2 с использованием метода подстановки используют суммарные количества высвободившегося ЛВ (Q_1 и Q_2) в двух следующих друг за другом точках времени (t_1 и t_2).

Количество ЛВ, высвободившегося при t_1 (Q_1), может быть записано следующим образом:

$$Q_1 = K_1 \cdot t_1^m + K_2 \cdot t_1^{2m}, \quad (34)$$

$$K_1 = \frac{Q_1 - K_2 \cdot t_1^{2m}}{t_1^m}. \quad (35)$$

Количество ЛВ, высвободившегося при t_2 (Q_2), может быть записано следующим образом:

$$Q_2 = K_1 \cdot t_2^m + K_2 \cdot t_2^{2m}. \quad (36)$$

После преобразования уравнений (34) и (35) получим:

$$K_2 = \frac{Q_2 \cdot t_1^m - Q_1 \cdot t_2^m}{t_2^{2m} \cdot t_1^m - t_1^{2m} \cdot t_2^m}. \quad (37)$$

Аналогичным образом может быть вычислено значение K_1.

Методом подстановки могут быть вычислены значения K_1 и K_2 для количества ЛВ, высвободившегося при t_1. Чтобы вычислить те же значения для t_2, используют значения суммарного высвобождения ЛВ при t_2 и t_3 и т.д. Преимущество такого метода состоит в том, что он позволяет вычислить значения K_1 и K_2 в каждом временном интервале, а затем рассчитать количество ЛВ, высвобождаемого по каждому из механизмов во всех временных интервалах, что позволяет получить представление о характере растворения ЛП [28].

В таблице 2 представлено краткое обобщение сведений о рассмотренных математических моделях.

Выбор наилучшей модели высвобождения ЛВ может проводиться на основе различных критериев. Наиболее распространенным методом является использование коэффициента корреляции (r^2) для оценки модельного уравнения с наибольшей точностью.

ОЦЕНКА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИБУПРОФЕНА ИЗ МАТРИЧНЫХ ТАБЛЕТОК НА ОСНОВЕ КАРБОМЕРА С ПРИМЕНЕНИЕМ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ

Ранее исследованы профили высвобождения ибупрофена из матричных таблеток в фосфатном буфере (pH 7,2) и установлено, что на скорость и степень высвобождения ЛВ существенно влияют количество карбомера и скорость его нейтрализации. Скорость набухания карбомера возрастает с увеличением содержания в составе нейтрализующего агента [29].

Для оценки высвобождения ибупрофена из карбомерных матричных систем применяли математические модели, основанные на уравнениях Higuchi и Korsmeyer – Peppas.

Экспериментальные кривые высвобождения ибупрофена (рисунки 1, 3) построены с использованием усредненных значений.

Полученные значения кинетических констант использовали для моделирования линейных зависимостей экспериментальных составов (рисунки 2, 4) [29].

Таблица 2.

Основные математические модели, описывающие высвобождение ЛВ [4]

Модель	Математическое уравнение	Краткая характеристика
Нулевого порядка	$Q_t = Q_0 - K_0 \cdot t$	диффузионный процесс
Первого порядка	$\lg Q_t = \lg Q_0 - \frac{K_1 \cdot t}{2{,}303}$	диффузионный процесс по первому закону Фика
Weibull	$W = 1 - e^{-\left(\frac{t}{t_D}\right)^{\beta}}$	эмпирическая модель, функция высвобождения в реальном времени
Hixson – Crowell	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_{HC} \cdot t$	высвобождение механизмом эрозии
Higuchi	$Q_t = A \cdot \sqrt{D \cdot (2C - C_s) \cdot C_s \cdot t}$ $Q_t = K_H \cdot \sqrt{t}$	диффузионный процесс по первому закону Фика
Baker – Lonsdale	$\frac{3}{2} \cdot \left[1 - \left(\frac{Q_t}{Q_\infty}\right)^{\frac{2}{3}}\right] - \frac{Q_t}{Q_\infty} = k \cdot t$	высвобождение из матриц сферической формы
Hopfenberg	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 \cdot t}{C_0 \cdot a_0}\right]^n$	высвобождение механизмом эрозии
Gompertz	$Q_t = Q_{\max} \cdot e^{-\alpha \cdot e^{\beta \cdot \log t}}$	для растворимых ЛВ и ЛФ с немедленным высвобождением
Korsmeyer – Peppas	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = a \cdot t^n$	полуэмпирическая модель, основанная на механизме диффузии
Peppas – Sahlin	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_1 \cdot t^m + K_2 \cdot t^{2m}$	учитывает вклад диффузии по Фику и релаксации полимерных цепей

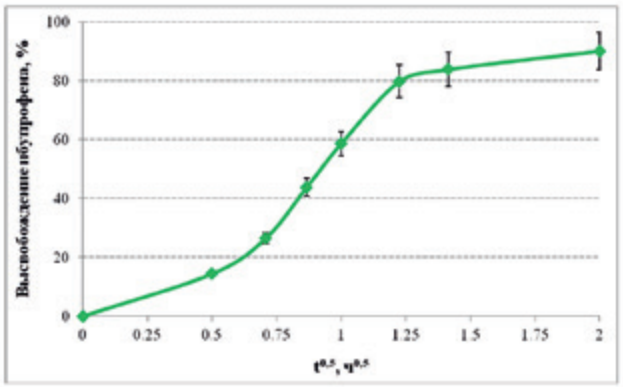


Рисунок 1. Профиль высвобождения таблеток ибупрофена с карбомером (состав MGA-2 [29]). Среда растворения – фосфатный буфер (pH 7,2)

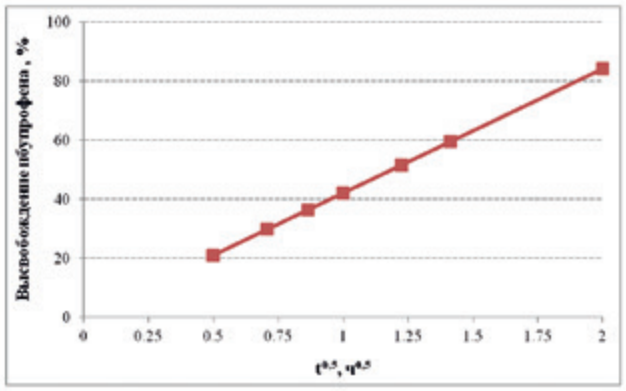


Рисунок 2. Модельная кривая высвобождения по Higuchi таблеток ибупрофена с карбомером (состав MGA-2 [29]). Среда растворения – фосфатный буфер (pH 7,2); K=0,0706 мин$^{-0,5}$; r^2=0,95

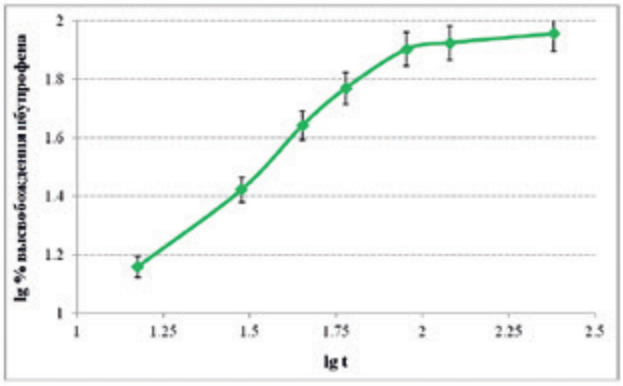


Рисунок 3. Профиль высвобождения таблеток ибупрофена с карбомером (состав MGA-2 [29]). Среда растворения – фосфатный буфер (pH 7,2)

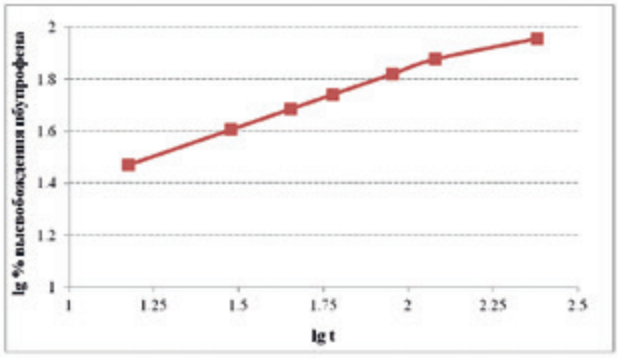


Рисунок 4. Модельная кривая высвобождения по Korsmeyer – Peppas таблеток ибупрофена с карбомером (состав MGA-2 [29]). Среда растворения – фосфатный буфер (pH 7,2); n=0,45; K=0,0873 мин$^{-0,45}$; r^2=0,95

Таким образом, модель Higuchi и модель Korsmeyer – Peppas (n<0,5) позволяют рассматривать высвобождение ибупрофена из матричных таблеток на основе карбомера (состав MGA-2 [29]) как диффузионный процесс, подчиняющийся закону Фика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все представленные модели позволяют осуществить математическую обработку профилей высвобождения ЛВ из ЛФ с модифицированным высвобождением.

Достаточно высокие значения коэффициентов корреляции экспериментальных и модельных (по Higuchi и Korsmeyer-Peppas) кривых высвобождения показывают, что использование любой из рассматриваемых моделей позволяет оценить высвобождение ибупрофена из матричных таблеток.

Использование данных уравнений позволяет описать высвобождение ибупрофена из матричных таблеток на основе карбомера как диффузионный процесс и привести к линейному виду экспериментальные кривые высвобождения.

Упомянутые модели могут применяться при создании прикладного программного обеспечения, позволяющего моделировать профили высвобождения ЛВ *in silico*.

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. ОФС.1.4.2.0014.15. Растворение для твердых дозированных лекарственных форм // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд., Т. 2. – М. 2015. С. 225–243.
3. 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 г. № 43291).
4. H.K. Shaikh, R.V. Kshirsagar, S.G. Patil. Mathematical models for drug release characterisation: A review // World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2015. V. 4. № 4. P. 324–338.
5. М.В. Леонова. Новые лекарственные формы и системы доставки лекарственных средств: особенности пероральных лекарственных форм. Ч. 2 // Лечебное дело. 2009. № 3. С. 18–26.
6. R.D. Manga, P.K. Jha. Mathematical models for controlled drug release through pH-responsive polymeric hydrogels // Journal of Pnarmaceutical Sciences. 2016. V. 106. № 2. P. 629–638.
7. B. Narasimhan. Mathematical models describing polymer dissolution: consequences for drug delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. 2001. № 48. P. 195–210.
8. J. Siepmann, N.A. Peppas. Mathematical modeling of controlled drug delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. 2001. № 48. P. 137–138.
9. J. Crank. The mathematics of diffusion. – N.Y.: Oxford University Press, 1975. 414 p.
10. H. Lee et al. Coupled Non-Fickian Diffusion and Large Deformation of Hydrogels // Mechanics of Time-Dependent Materials and Processes in Conventional and Multifunctional Materials. 2011. V. 3. P. 25–28.
11. T.Jr. Alfrey, E.F. Gurnee, W.G. Lloyd. Diffusion in glassy polymers // Journal of Polymer Science: Part C. 1966. V. 12. № 1. P. 249–261.
12. Д.Ю. Гребёнкин и др. Ретроспектива развития науки о растворении твердых дозированных лекарственных форм (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 4(17). С. 142–150.
13. K.H. Ramteke et al. Mathematical models of drug dissolution: A review // Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP). 2014. № 3(5). P. 388–396.
14. К.В. Алексеев и др. Фармацевтическая технология. Твердые лекарственные формы : учебное пособие / Под ред. С.А. Кедика. – М.: Институт фармацевтических технологий, 2011. 661 с.
15. M. Jafari, B. Kaffachi. Mathematial kinetic modeling on isoniazid release from Dex-HEMA-PNIPAAm nanogels // Nanomed Research Journal. 2016. V. 1. № 2. P. 90–96.
16. J. Balcerzak, M. Mucha. Analysis of model drug release kinetics from complex matrices of polylactide-chitosan // Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives. 2010. V. 15. P. 117–126.
17. F. Langenbucher. Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 1972. V. 24. № 12. P. 979–981.
18. F. Langenbucher. Parametric representation of dissolution-rate curves by the RRSBW distribution // Pharmaceutical Industry. 1976. № 38. P. 472–477.
19. А.И. Тенцова, А.А. Литвин, Г.С. Киселева. Использование математических уравнений для описания процесса растворения лекарственного вещества из таблеток // Фармация. 1986. Т. 35. № 3. С. 26–29.
20. T. Higuchi. Mechanism of sustained action medication:theoretical analysis of rate release of solid drugs dispersed in solid matrices // J Pharm Sci. 1963. № 52. P. 1145–1149.
21. J. Siepmann, N.A. Peppas. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse // International Journal of Pharmaceutics. 2011. № 418. P. 6–12.
22. Е.Г. Киселев, С.В. Барановский. Кинетика выхода препаратов фунгицидного и гербицидного действия из пролонгированных форм, полученных из разрушаемого поли-3-гидроксибутирата // Журнал сибирского федерального университета. Серия: Биология. 2016. Т. 9. № 2. С. 233–240.
23. S. Dash et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems // Acta Poloniae Pharmaceutica. Drug Research. 2010. V. 67. № 3. P. 217–223.
24. P.S.Ch. Bose et al. Formulation and evaluation of sustained release floating tablets of diltiazem hcl using xanthan gum // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2011. V. 2. № 1. P. 319–328.
25. M. Gierszewska-Drużyńska, J. Ostrowska-Czubenko. Mechanism of water diffusion into noncrosslinked and ionically crosslinked chitosan membranes // Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives. 2012. V. 17 P. 59–66.
26. G. Singhvi, M. Singh. Review: *in vitro* drug release characterization models // International Journal of Pharmaceutical Studies and Research (IJPSR). 2011. V. 2. № 1. P. 77–84.
27. H. Wen, K. Park. Oral controlled release formulation design and drug delivery. Theory to Practice. – Canada: John Wiley & Sons, 2010. 364 p.
28. O. Mady. Mechanisms and percent of drug release of each new mathematic approach // International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences (IRJPAS). 2013. № 3(6). P. 56–69.
29. Н.И. Филиппова и др. Регулирование высвобождения ибупрофена из матричных таблеток на основе карбопола // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 1(18). С. 58–64.

novinox
SINCE 1956

СОВРЕМЕННОЕ ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

NOVINOX –
мы даем
новые идеи!

стр. 399

Подъемные колонны для бинов и бочек, вакуумных загрузчиков, мельниц и иного оборудования

- Стационарное и мобильное исполнение
- Механический или пневматический привод
- Точная выгрузка при подъеме на большую высоту
- Нагрузка от 10 до 120 кг!

Смесители для бинов и бочек

- Обеспечивает замкнутый цикл между взвешиванием сырья, смешением, складом, карантином и упаковкой в единой герметичной системе из одного контейнера
- Компактный размер
- Низкий уровень шума
- Работа с различными типами контейнеров от 50 до 300 л

Бины, бочки, емкости для хранения и транспортировки сыпучих продуктов, порошков и гранул, жидких и вязких продуктов

Системы транспортировки бинов и емкостей с опрокидыванием

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 615.21/.26; 615.81

ИЗУЧЕНИЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА «ГМДП, ЛИОФИЛИЗАТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ» ПРОИЗВОДСТВА АО «ПЕПТЕК» (РОССИЯ) В СХЕМАХ СОЧЕТАННОЙ АНТИБИОТИКО-ИММУННОЙ ТЕРАПИИ НА МОДЕЛИ ИНФИЦИРОВАННОЙ РАНЫ КОЖИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ У КРЫС

М.С. Журавлева[1]*, Т.М. Андронова[2], Е.И. Нестерова[2]****

Резюме. В статье приведены результаты исследования ранозаживляющей активности лекарственного средства «ГМДП, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» на модели инфицированной раны кожи и мягких тканей у крыс с целью подтверждения преимущества сочетанной терапии инфицированных ран антибиотиком и исследуемым иммунотерапевтическим препаратом по сравнению с монотерапией антибиотиком. В исследовании использованы макроскопический, планиметрический и гистологический методы. Статистически достоверно установлены преимущества предложенной сочетанной терапии по скорости и полноте очищения и закрытия раны, в том числе по интенсивности эпителизации, формирования грануляционной ткани, а также в отношении качества грануляционной ткани, степени редукции воспалительных изменений, лизиса струпа. В контрольной (интактной) группе площадь ран уменьшалась в среднем со скоростью 14,0±4,1 мм^2/день, в то время как в группе «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон» это значение составило 25,1±4,7 мм^2/день (достоверное отличие от контроля, p=0,0096).

Ключевые слова: ГМДП (глюкозаминилмурамилдипептид), «Цефтриаксон», специфическая активность, гнойные инфицированные раны, лечение.

STUDY OF WOUND HEALING ACTIVITY OF A MEDICINAL PRODUCT «GMDP LYOPHILIZATE FOR PREPARATION OF SOLUTION FOR INJECTION» PRODUCTION JSC «PEPTEK» (RUSSIA) IN THE SCHEMES OF COMBINED ANTIBIOTIC-IMMUNE THERAPY ON THE MODEL OF INFECTED SKIN WOUNDS AND SOFT TISSUES IN RATS

M.S. Zhuravleva[1]*, T.M. Andronova[2], E.I. Nesterova[2]****

Abstract. The results of the study of the wound healing activity of the drug «GMDP lyophilizate for solution for injection» are presented in the model of infected skin and soft tissue wound in rats in order to confirm the benefits of combined therapy of infected wounds with an antibiotic and the immunotherapeutic agent being tested in comparison with monotherapy with an antibiotic. The study used macroscopic, planimetric and histological methods. The advantages of the proposed combined therapy for the speed and completeness of wound cleansing and closure, including the intensity of epithelialization, the formation of granulation tissue, as well as the quality of granulation tissue, the degree of reduction of inflammatory changes, and lysis of the scabies are statistically reliable. In the control (intact) group the area of wounds decreased on average with speed 14,0±4,1 mm^2/day, while in the «GMDP lyophilizate + Ceftriaxone» group this value was 25,1±4,7 mm^2/day (significant difference from the control, p=0,0096).

Keywords: GMDP (Glucoseminylmuramildipeptidum), Ceftriaxone, specific activity, purulent infected wounds, therapy.

1 – Независимый испытательный центр ООО «ОЛФАРМ», 117105, Россия, г. Москва, ул. Нагатинская, д. 3А

2 – АО «Пептек», 117997, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10

1 – Independent testing center «OLPHARM», 3A, Nagatinskaya str., Moscow, 117105, Russia

2 – CJSC «Peptek», 16/10, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: juravleva@olpharm.ru

** адресат для переписки:
E-mail: med_spec@peptek.ru
Тел.: 8 (495) 122 25 03; 8 (495) 122 25 30

ВЕДЕНИЕ

Существуют два основных направления в лечении гнойных ран в первой фазе раневого процесса. Первое направление связано с физическим очищением раны от гнойно-некротических масс и включает такие методы, как хирургическая обработка раны, осмотерапия, обработка гнойной раны сорбентами, протеолитическими ферментами, пульсирующей струей жидкости, в том числе с антисептиками, вакуумная обработка, обработка лучами лазера, ультразвуком, крио-

воздействие и др. [1]. Часто эти методы комбинируют. Второе направление связано с применением консервативных методов лечения с использованием лечебных препаратов и средств, способных ограничить и ликвидировать раневую инфекцию. Среди них головная роль принадлежит антибиотикам [2]. Однако во многих случаях антибиотики оказываются недейственными в связи с возрастающей устойчивостью к ним микроорганизмов [3, 4]. Кроме того, они токсичны, могут вызывать тяжелые аллергические реакции и подавлять иммунный ответ в организме, увеличивая риск возникновения тяжелых форм сепсиса. Поэтому применять антибиотики следует осторожно и рационально с учетом чувствительности к ним штамма микроорганизма, выделенного от данного больного [5], что малодоступно в реальных условиях для значительной части лечебных учреждений. Кроме того, и методы физического очищения гнойных ран, и дополнительная к ним антибиотикотерапия имеют общий недостаток: они не используют для очищения ран собственные защитные механизмы организма.

В связи с этим в последнее десятилетие в практике лечения гнойных ран на первой ее фазе все чаще базовую терапию гнойно-воспалительных процессов (ГВП) стали дополнять применением лекарственных средств, повышающих собственные защитные механизмы организма, и в частности стимулирующих микро- и макрофагальную реакцию [6–9]. Такой подход к лечению гнойных ран в первой фазе раневого процесса отвечает саногенезу. Предпосылками к применению средств иммунокоррекции является тот факт, что гнойно-воспалительные процессы сопровождаются иммунодефицитным состоянием, которое в подавляющем большинстве случаев усиливается при применении антибиотиков, как правило, оказывающих иммуносупрессивное действие. Снижение иммунного потенциала организма у пациентов способствует вялому течению гнойно-воспалительного процесса, увеличивает риск вторичного инфицирования вплоть до септических состояний. Иммунокоррекция, проводимая параллельно с антибактериальной терапией, позволяет не только предотвратить прогрессирование иммунодефицита, но и активизировать клеточное макрофагальное звено иммунной системы, восстановить бактерицидный потенциал фагоцитирующих клеток [7, 10]. Арсенал современных средств иммунотерапии достаточно большой и характеризуется способностью различных иммуномодуляторов специфически воздействовать на конкретные звенья иммунной системы. Однако даже при включении известных иммунотерапевтических препаратов в схему лечения во многих случаях не удается решить все задачи консервативного лечения раневого ГВП: ускорения ранозаживления, сочетаемого с полным очищением раны, качественным процессом грануляции и восстановлением иммунного гомеостаза у пациента. Таким образом, задача консервативного лечения при раневых ГВП все еще не решена и по-прежнему является актуальной.

Известно, что применение в сочетанной антибиотико-иммунной терапии препаратов ГМДП (класс мурамилдипептидов) у хирургических больных с гнойно-септическими и инфекционными процессами приводило к ускоренному очищению ран от гнойно-некротических масс, уменьшало отечность и болезненность ран, ускоряло репаративные процессы и сопровождалось улучшением иммунологического статуса. У больных, получавших сочетанно с антибиотиками ГМДП (препарат Ликопид®), отмечали увеличение общего количества Т-лимфоцитов, восстановление иммунорегуляторного индекса за счет увеличения $CD8^+$, а также показателей противоинфекционного иммунитета ($CD16^+$, $CD22^+$) и показателей фагоцитоза [9].

Целью настоящего исследования являлось изучение эффективности применения новой лекарственной формы иммунотерапевтического лекарственного средства (ЛС) «ГМДП, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» (далее – «ГМДП, лиофилизат») производства АО «Пептек» (Россия) в сочетанной антибиотико-иммунной терапии на модели инфицированной раны кожи и мягких тканей у крыс.

РЕГУЛИРУЮЩИЕ СТАНДАРТЫ

- Федеральный закон Российской Федерации об обращении лекарственных средств (ст. 4, 11) от 12 апреля 2010 года № 61-ФЗ.
- Приказ Минздравсоцразвития РФ от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении правил лабораторной практики».
- Международный стандарт ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- Эксперименты на животных проводились с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными.

Исследования выполнялись в соответствии с санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) СП 2.2.1.3218-14.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали белых аутбредных крыс-самцов массой 289,3±7,2 г. Общее количество животных составило 50 особей. Производитель животных – Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Животных по 1 особи содержали индивидуально в полипропиленовых клетках в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 20–26 °С и относительная влажность 30–70% (СП 2.2.1.3218-14). Освещение в комнатах – естественно-искусственное (12 ч – день, 12 ч – ночь).

Кормление крыс осуществляли стандартным комбикормом гранулированным полнорационным (экструдированным) ПК-120 производства ООО «Лабораторкорм» (Россия). Корм давали в кормовое углубление клетки или в кормушку. Водопроводную воду предоставляли в стандартных поилках.

Оценку ранозаживляющей активности исследуемого ЛС «ГМДП, лиофилизат» изучали на модели экспериментальной гнойной раны кожи и мягких тканей у крыс в сочетанной антибиотико-иммунной терапии с препаратом «Цефтриаксон, порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения, 1 г» (ОАО «Синтез», Россия) [6].

Для введения крыс в наркотический сон использовали смесь двух ветеринарных средств «Золетил 100» (Virbac, Франция) и «Рометар, 20 мг/мл» (Bioveta, Чехия) в соотношении 1:2. На крысу весом 290–300 г вводили внутримышечно 0,15 мл наркотической смеси. Ожидание глубокого наркотического сна составило 5–7 мин.

Заснувшее животное помещали в распластанном положении на поверхность лабораторного стола и машинкой выстригали необходимую площадь тела на спине. При помощи заранее приготовленного трафарета (2х2 см) обводили контур будущей раны маркером в межлопаточной области. Пинцетом с зацепами приподнимали кожу и прямыми ножницами вырезали лоскут кожи с подкожной клетчаткой по внутреннему контуру. После формирования ран зажимом Кохера раздавливали края раны и подлежащие ткани. Инфицирование проводили путем наложения на поверхность раны стерильной салфетки пропитанной суточной бактериальной взвесью, содержащей 0,5 мл *Escherichia coli* в концентрации $9{,}6 \times 10^9$ КОЕ/мл и 0,5 мл *Staphylococcus aureus* в концентрации $1{,}2 \times 10^9$ КОЕ/мл [11–13]. Животных рассаживали в клетки по одному. Приблизительно через 2 ч после процедуры животные выходили из состояния наркотического сна. На 48 ч рану закрывали повязкой. На третьи сутки развивалась модель гнойного воспаления кожи и подлежащих тканей.

Дизайн исследования представлен в таблице 1.

Лечение животных начинали через 48 ч после нанесения ран и продолжали в течение 15 дней.

Для анализа ранозаживляющей активности изучаемого образца оценивали общее состояние и поведение животных, массу тела, ректальную температуру, потребление корма и воды, проводили макроскопическое описание ран, планиметрический анализ скорости заживления раневой поверхности и гистологический анализ [14].

При планиметрическом анализе для расчета площади раны фиксировали контур ее поверхности на прозрачной пленке. Пленку вырезали по контуру и взвешивали. Величину площади раны (S) в мм^2 вычисляли по формуле:

$$S = \frac{100 \times M_р}{M_{пл}},$$

где $M_р$ – масса прозрачной пленки [мг], вырезанной по контуру раны, $M_{пл}$ – масса [мг] квадрата прозрачной пленки площадью 100 мм^2.

Площади ран регистрировали на 3-е, 5-е, 10-е, 15-е, 20-е, 25-е и 30-е сутки после операции.

Ранозаживляющий эффект ЛС оценивали статистически по динамике изменения площади ран [% от исходной] у крыс в опытных группах по отношению к аналогичным показателям в контроле, а также по скорости уменьшения площади ран.

Скорость уменьшения площади ран (V) рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{(S - S_t)}{t},$$

где S – площадь раны исходная, S_t – площадь раны через t дней, t – количество дней наблюдения.

Таблица 1.

Характеристика групп в эксперименте по оценке ранозаживляющего действия лекарственного средства «ГМДП, лиофилизат»

№ группы	Животные		Исследуемое ЛС	Дозы ЛС	Режим введения ЛС
	Пол	Кол-во			
1	♂	10	0,9% раствор натрия хлорида	–	Внутримышечно, ежедневно в течение 15 дней
2	♂	10	«ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон»	0,011 мг/кг ГМДП + 0,3 г/кг «Цефтриаксона»	Внутримышечно, ежедневно в течение 15 дней
3	♂	10	«ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон»	0,011 мг/кг ГМДП + 0,21 мг/кг глицина + 0,3 г/кг «Цефтриаксона»	Внутримышечно, ежедневно в течение 15 дней
4	♂	10	«Цефтриаксон»	0,3 г/кг «Цефтриаксона»	Внутримышечно, ежедневно в течение 15 дней

Среднюю скорость уменьшения площади ран ($V_{ср}$) рассчитывали по формуле:

$$V_{ср} = \frac{V_1 + V_2 ... + V_n}{n},$$

где V_1, V_2, V_n – скорость заживления ран отдельных животных в разные периоды регистрации, n – количество периодов регистрации.

Индекс ускорения заживления ран (I_v) по сравнению с контролем составил $I_v = \frac{V_{ср}\ опыт \times 100\%}{V_{ср}\ контроль}$.

Статистический анализ данных был выполнен с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft Inc., USA). Результаты измерения исследованных показателей были усреднены по экспериментальным группам и представлены в виде M±m, где M – среднее значение показателя по группе, m – стандартное отклонение. Достоверность различий между группами определяли с помощью параметрического критерия Стьюдента t при p≤0,05 при нормальном распределении выборки и непараметрического U-критерия Манна – Уитни при p≤0,05 при ненормальном распределении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате эксперимента было установлено, что общее физиологическое состояние опытных животных на протяжении эксперимента было удовлетворительным и не имело значимых отличий от контрольной группы. Животные сохраняли опрятный внешний вид и хороший аппетит. Пищевая активность и водопотребление оставались в норме.

Динамика массы тела экспериментальных животных в период лечения приведена в таблице 2.

Согласно данным таблицы 2 динамика массы тела крыс-самцов всех экспериментальных групп была положительной и не имела статистически значимых отличий как между собой, так и с контрольной группой.

Установлено, что при введении ЛС «ГМДП, лиофилизат» в сочетанной схеме лечения с «Цефтриаксоном» просматривалась тенденция к большему приросту массы тела животных.

За день до формирования патологии и в период лечения у всех экспериментальных животных измеряли ректальную температуру.

Ректальная температура животных всех экспериментальных групп оставалась в пределах видовой нормы и не имела статистически значимых отличий как между собой, так и с контрольной группой [15].

Макроскопическое исследование

Гнойные раны у экспериментальных животных сформировались через 48 часов, имели характерные признаки воспаления. Края раны с участками некроза были гиперемированы и отечны, дно раны влажное с гнойным отделяемым желтого цвета, местами бордово-синюшного оттенка, мутное со зловонным запахом.

На 4–5-е сутки сформированные гнойные раны покрывались тонким, рыхлым струпом, при нарушении целостности которого наблюдали мутное отделяемое с геморрагическим компонентом.

К 10-м суткам исследования струп уплотнялся, раневое отделяемое отсутствовало, края раны были незначительно гиперемированы.

К 15–20-м суткам исследования визуально площадь раны значительно уменьшалась, что было более выражено в группах «ГМДП, лиофилизат» + Цефтриаксон» и «ГМДП, субстанция» + Цефтриаксон».

К 30-м суткам исследования в группах «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон» и «ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон» у отдельных животных отмечали отпадение струпа и полное заживление, что свидетельствует о более ускоренном переходе к эпителизации раны.

Планиметрический анализ

Площади ран регистрировали на 3-е, 5-е, 10-е, 15-е, 20-е, 25-е и 30-е сутки после операции. Ранозаживляющий эффект ЛС «ГМДП, лиофилизат» оценивали статистически по динамике изменения площади ран [% от исходной] у крыс в опытных группах по отношению к аналогичным показателям в контроле, а так-

Таблица 2.

Динамика массы тела животных

Группа, лекарственное средство	Изменение массы (г) тела животных через											
	Исходная (n=10)		2 дня (n=10)		7 дней (n=10)		14 дней (n=7)		21 день (n=4)		28 дней (n=4)	
	M	m	M	m	M	m	M	m	M	m	M	m
Контроль	284,0	4,9	287,1	4,1	314,9	9,5	349,0	16,9	381,8	29,2	400,8	25,0
«ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон»	290,7	6,7	297,9	6,6	320,0	9,7	340,4	6,2	376,3	4,1	402,5	4,8
«ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон»	292,0	5,2	301,7	5,3	316,3	13,6	344,9	26,9	393,0	34,8	415,3	16,5
«Цефтриаксон»	292,2	9,3	299,4	8,6	321,6	11,6	339,9	13,0	373,3	27,6	399,5	30,9

Примечания: статистически значимых отличий не выявлено (расчеты были произведены с помощью критерия Стьюдента t при p<0,05).

же по скорости уменьшения площади ран. Также рассчитывали индекс ускорения заживления ран.

Результаты приведены в таблице 3.

Из данных, приведенных в таблице 3, следует, что в контрольной группе площадь ран уменьшалась в среднем со скоростью 14,0±4,1 мм^2/день, в то время как в опытных группах эти значения составили:

- группа «ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон» – 20,9±3,2 мм^2/день (достоверное отличие от контроля, p=0,04);
- группа «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон» – 25,1±4,7 мм^2/день (достоверное отличие от контроля, p=0,0096);
- группа «Цефтриаксон» – 18,0±1,3 мм^2/день (достоверного отличия от контроля нет, но тенденция к увеличению просматривается).

Таким образом, наибольшая скорость заживления ран отмечалась в группе, получившей сочетанную терапию «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон» при внутримышечном введении ЛС ежедневно в течение 15 дней.

На основании данных, приведенных в таблице 3, были рассчитаны индексы скорости заживления ран.

Индекс ускорения заживления ран в группе «Цефтриаксон» по отношению к контрольной группе составил 128,5%, что свидетельствует об ускорении ранозаживляющего эффекта на фоне введении антибиотика. Индекс ускорения заживления ран в группах «ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон» и «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон» составил 149,1% и 179,3%, что свидетельствует о существенной интенсификации процесса ранозаживления при применении сочетанной антибиотико-иммунной терапии, особенно с использованием тестируемой новой лекарственной формы «ГМДП, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций».

Полное закрытие раны достигалось в группе крыс, получавших сочетанную терапию «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон», у 50% животных на 25-й день и у 100% животных на 30-й день наблюдения, тогда как в группе крыс, получавших монотерапию антибиотиком «Цефтриаксон», полное закрытие раны достигалось лишь у 25% животных на 30-й день. В контроле к 30-му дню ни у одного животного не достигалось полного закрытия раны.

Гистологическое исследование

На 7-е и 14-е сутки периода лечения проводили эвтаназию 3 животных из каждой экспериментальной группы с последующим взятием образцов поврежденной кожи для гистологических исследований.

На основании патоморфологического исследования образцов кожи экспериментальных животных, взятых на лечение, было установлено следующее.

На 7-е сутки

Контрольная группа: большая часть раневой поверхности покрыта широким струпом, под которым располагается фибринозный экссудат с большим количеством нейтрофильных лейкоцитов (гнойный экссудат) с распространением в подлежащие ткани. По краям дефекта отмечается регенерация эпителия, под которым можно видеть выраженную воспалительную инфильтрацию с отеком и признаками формирования грануляционной ткани (рисунок 1) .

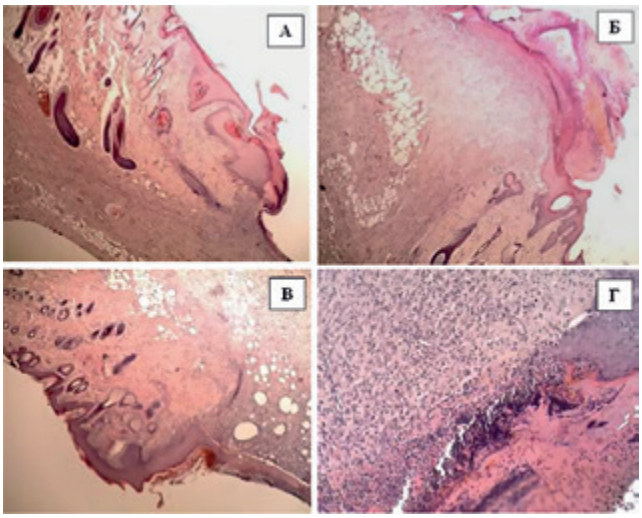


Рисунок 1. Края раны, врастание эпидермиса под струп с очаговой гиперплазией последнего. На краях дефекта идет эпителизация, в том числе и под струпом, эпителий гипертрофирован и наползает на поверхность раны. Под эпителием и струпом выраженная воспалительная инфильтрация и начало развития грануляционной ткани. А, Б, В, – Ув. х40, Г –Ув. х100, Окраска гематоксилин-эозином

Группа «ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон»: площадь и толщина струпа на раневой поверхности меньше, чем в контрольной группе. Воспалительная реакция также была выражена слабее. Отмечается активное образование грануляционной ткани. В то же время у отдельных животных выявлен участок с деструкцией и гнойной инфильтрацией со слабо выраженными пролиферативными процессами в подлежащей ткани (рисунок 2).

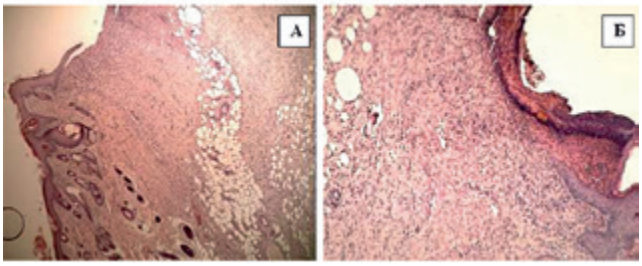


Рисунок 2: Края раны. Нарастание эпителия по краям раны, в том числе под струпом. По сравнению с интактным эпителием отмечается гипертрофия вновь образованного пласта эпителия. Воспалительная инфильтрация умеренная, отмечается активное формирование грануляционной ткани. А, Б – Ув. х40. Окраска гематоксилин-эозином

Таблица 3.

Ранозаживляющий эффект исследуемых лекарственных средств

№	исходная		5-й день (n=10)				10-й день (n=7)				15-й день (n=7)				20-й день (n=4)				25-й день (n=4)				30-й день (n=4)				$V_{ср}$
	Мр	S, мм²	Мр	S, мм²	% от исходной	V	Мр	S, мм²	% от исходной	V	Мр	S, мм²	% от исходной	V	Мр	S, мм²	% от исходной	V	Мр	S, мм²	% от исходной	V	Мр	S, мм²	% от исходной	V	
Контрольная группа																											
1	71,6	289,9	44,2	179	61,7	22,2	23,2	93,9	32,4	19,6	9,8	39,7	13,7	16,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	80,4	325,5	75,4	305	93,8	4,0	43,9	177,7	54,6	14,8	26,2	106,1	32,6	14,6	13,9	56	17,3	13,5	10,3	42	12,8	11,4	10,2	41	12,7	9,5	11,3
3	98,4	398,4	62,9	255	63,9	28,7	50	202,4	50,8	19,6	29,4	119,0	29,9	18,6	18	73	18,3	16,3	10,2	41	10,4	14,3	5,9	24	6,0	12,5	18,3
4	80,8	327,1	45,9	186	56,8	28,3	31,1	125,9	38,5	20,1	22,4	90,7	27,7	15,8	11,2	45	13,9	14,1	9,5	38	11,8	11,5	8	32	9,9	9,8	16,6
5	82	332,0	42,7	173	52,1	31,8	33,5	135,6	40,9	19,6	20,4	82,6	24,9	16,6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	79,6	322,3	43,2	175	54,3	29,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	70,7	286,2	47,3	191	66,9	18,9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	82,6	334,4	49,2	199	59,6	27,0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	86,9	351,8	54,1	219	62,3	26,6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	70,1	283,8	60,9	247	86,9	7,4	41,2	166,8	58,8	11,7	25,4	102,8	36,2	12,1	17,1	69	24,4	10,7	14,2	57	20,3	9,1	9,6	39	13,7	8,2	9,9
M	80,3	325,1	52,6	212,9	65,8	22,5	37,4	151,2	45,8	17,9	23,1	93,3	28,1	15,8	15,1	60,9	18,5	13,6	11,1	44,7	13,8	11,6	8,4	34,1	10,6	10,0	14,0
m	8,5	34,5	10,7	43,5	13,8	9,6	8,9	36,0	9,4	3,3	6,6	26,7	7,3	2,0	3,1	12,6	4,4	2,3	2,1	8,6	4,4	2,1	1,9	7,8	3,4	1,8	4,1
«ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон»																											
1	78,3	317,0	32,4	131	41,4	37,2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	73,5	297,6	41,5	168	56,5	25,9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	83,2	336,8	33,7	136	40,5	40,1	27,1	109,7	32,6	22,7	18,8	76,1	22,6	17,4	-	-	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	91,4	370,0	33,8	137	37,0	46,6	22,8	92,3	24,9	27,8	13,7	55,5	15,0	21,0	5,5	22	6,0	17,4	4	16	4,3	14,2	2,2	9	2,4	12,0	23,2
5	86,4	349,8	33,4	135	38,7	42,9	21	85,0	24,3	26,5	17,2	69,6	19,9	18,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	89,4	361,9	48,6	197	54,4	33,0	31,8	128,7	35,6	23,3	18,9	76,5	21,1	19,0	2	8	2,2	17,7	0	0	0,0	14,5	0	0	0,0	–	23,3
7	84,8	343,3	39,5	160	46,6	36,7	20,6	83,4	24,3	26,0	11,1	44,9	13,1	19,9	1,8	7	2,1	16,8	1,4	6	1,7	13,5	1	4	1,2	11,3	20,7
8	91,5	370,4	39,1	158	42,7	42,4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	74,1	300,0	36,7	149	49,5	30,3	26,9	108,9	36,3	19,1	17,4	70,4	23,5	15,3	7,2	29	9,7	13,5	5,1	21	7,0	11,2	3,8	15	5,1	9,5	16,5
10	90,5	366,4	41,2	167	45,5	39,9	28,2	114,2	31,2	25,2	17,2	69,6	19,0	19,8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
M	84,3	341,3	38,0	153,8	45,3	37,5	24,7	99,8	28,3	25,3	15,9	64,5	18,3	19,2	4,1	16,7	5,0	16,4	2,6	10,6	3,2	13,3	1,8	7,1	2,2	8,2	20,9
m	6,9	28,0	5,0	20,4	6,5	6,3	4,8	19,2	5,3	2,2	3,4	13,9	4,1	1,3	2,7	10,8	3,6	1,9	2,3	9,5	3,0	6,6	1,6	6,6	1,2	5,6	3,2

Окончание табл. 3

№	исходная		5-й день (n=10)				10-й день (n=7)				15-й день (n=7)				20-й день (n=4)				25-й день (n=4)				30-й день (n=4)				$V_{ср}$
	Мр	S, мм²	Мр	S, мм²	% от исходной	V	Мр	S, мм²	% от исходной	V	Мр	S, мм²	% от исходной	V	Мр	S, мм²	% от исходной	V	Мр	S, мм²	% от исходной	V	Мр	S, мм²	% от исходной	V	
«ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон»																											
1	85,4	345,7	49,8	202	58,3	28,8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	89,2	361,1	28,6	116	32,1	49,1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	94	380,6	33,8	137	36,0	48,7	27,7	112,1	29,5	26,8	24,9	100,8	26,5	18,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	85,9	347,8	42,2	171	49,1	35,4	30,7	124,3	35,7	22,3	26	105,3	30,3	16,2	13,4	54	15,6	14,7	8	32	9,2	12,6	0	0	0,0	–	20,2
5	83,5	338,1	28,9	117	34,6	44,2	21,4	86,6	25,6	25,1	14,2	57,5	17,0	18,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	82	332,0	25,6	104	31,2	45,7	20	81,0	24,4	25,1	11	44,5	13,4	19,2	1	4	1,2	16,4	0	0	0,0	13,3	0	0	0,0	-	26,6
7	91,8	371,7	21,1	85	23,0	57,2	21	85,0	22,9	28,7	18	72,9	19,6	19,9	1,5	6	1,6	18,3	0	0	0,0	14,9	0	0	0,0	-	31,0
8	92,4	374,1	42,1	170	45,6	40,7	34,6	140,1	37,4	23,4	26,8	108,5	29,0	17,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	90,2	365,2	33,4	135	37,0	46,0	21,2	85,8	23,5	27,9	18,1	73,3	20,1	19,5	6,5	26	7,2	16,9	3,2	13	3,5	14,1	1,1	4	1,0	12,0	22,7
10	81,1	328,3	24,3	98	30,0	46,0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
M	87,6	354,5	33,0	133,5	37,7	44,2	25,2	97,8	27,6	25,6	19,9	76,2	21,4	18,5	5,6	22,7	6,4	16,6	2,8	11,3	3,2	13,7	0,3	1,1	0,3	12,0	25,1
m	4,6	18,6	9,2	37,2	10,4	7,8	5,8	19,2	5,2	2,3	6,2	26,5	6,9	1,4	0,7	4,8	1,9	1,5	3,8	15,3	3,3	1,0	0,6	2,2	0,8	0,0	4,7
«Цефтриаксон»																											
1	87,4	353,8	34,2	138	39,1	43,1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	85,4	345,7	56,6	229	66,3	23,3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	-	–	–	–	–
3	88,8	359,5	55,9	226	63,0	26,6	40,8	165,2	45,9	19,4	24,6	99,6	27,7	17,3	15,6	63	17,6	14,8	6,8	28	7,8	13,3	3,4	14	3,8	11,5	17,2
4	85,3	345,3	47,3	191	55,5	30,8	35,1	142,1	41,1	20,3	23	93,1	27,0	16,8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5	79	319,8	41,1	166	52,0	30,7	40	161,9	50,6	15,8	30,5	123,5	38,6	13,1	9,2	37	11,6	14,1	3,4	14	4,4	12,2	0	0	0,0	-	17,2
6	84	340,1	39,5	160	47,0	36,0	25,3	102,4	30,1	23,8	21,7	87,9	25,8	16,8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	86,6	350,6	35,4	143	40,9	41,5	30,1	121,9	34,8	22,9	24,8	100,4	28,6	16,7	18,9	77	21,8	13,7	5	20	5,7	13,2	3,4	14	3,9	11,2	19,9
8	85	344,1	44,2	179	52,0	33,0	35,1	142,1	41,3	20,2	25	101,2	29,4	16,2	17,1	69	20,1	13,7	6	24	7,0	12,8	3,7	15	4,4	11,0	17,8
9	78,2	316,6	36,9	149	47,2	33,4	27,3	110,5	34,9	20,6	24,6	99,6	31,5	14,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	88,3	357,5	46,2	187	52,3	34,1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
M	84,8	343,3	43,7	177,0	51,5	33,3	33,4	138,7	40,5	20,4	24,9	100,9	29,5	16,1	15,2	61,5	17,8	14,1	5,3	21,5	6,2	12,9	2,6	10,6	3,0	8,4	18,0
m	3,6	14,6	7,9	32,1	8,6	6,0	6,0	26,7	8,3	3,1	2,8	13,6	5,2	1,7	4,2	17,1	4,5	0,5	1,5	5,9	3,6	0,5	1,8	7,1	2,0	5,6	1,3

Примечания: ячейки с прочерком обозначают выбывших их эксперимента животных; 0,0 – животные, у которых полностью зажил раневой дефект.

Группа «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон»: большая часть раневой поверхности под струпом. Струп фрагментирован, состоит из фибрина с небольшим количеством клеточных элементов. Начальные стадии эпителизации отмечаются на достаточно большой площади раневой поверхности. Меньше выражена воспалительная реакция. В то же время остаются участки с очагами некроза и фибриноидного пропитывания под струпом (рисунки 3–5).

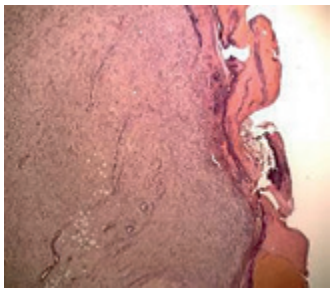


Рисунок 3. Значительная часть раневой поверхности под струпом. Струп частично фрагментирован, состоит в основном из фибрина с минимальным количеством клеточных элементов в стадии распада. Ув. х40. Окраска гематоксилин-эозином

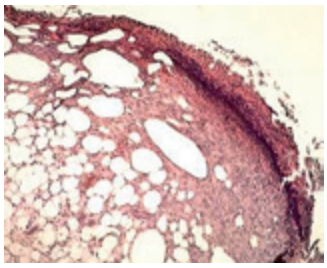


Рисунок 4. Струп тонкий. Под ним активная эпителизация, признаки фиброза и выраженный отек ткани. Ув. х100. Окраска гематоксилин-эозином

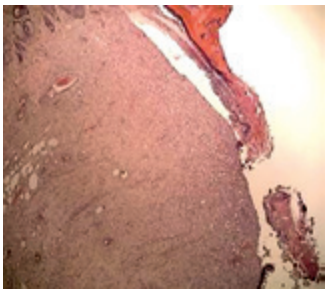


Рисунок 5. Отторжение струпа, раневая поверхность без признаков воспаления, идет активное формирование грануляционной ткани. Ув. х40. Окраска гематоксилин-эозином

Группа «Цефтриаксон»: изменения схожи с описанными для группы «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон», но у отдельных животных отмечаются более выраженные деструктивные изменения в виде очагов некроза с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией, выраженным полнокровием с очагами кровоизлияний. Грануляционная ткань грубая с преобладанием пролиферации фибробластов и формированием большого количества волокон (рисунки 6, 7).

Полученные на 7-е сутки данные показывают, что во всех группах воспалительная реакция выражена в разной степени. Она существенно менее выражена в опытных группах, чем в контрольной, что особенно проявлялось в группе «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон». Зафиксировано начало эпителизации и развития грануляционной ткани. Отмечаемое для контрольной группы наползание эпителия на края раны может свидетельствовать о риске развития келоидных рубцов в процессе ранозаживления. Кроме степени воспалительной реакции, других значимых отличий между опытными группами выявить не удалось, однако только в группе «Цефтриаксон» грануляционная ткань грубая, с преобладанием пролиферации фибробластов и формированием большого количества волокон, что свидетельствует о риске развития впоследствии грубого рубца.

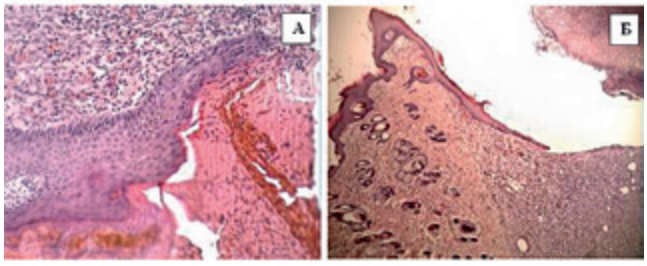


Рисунок 6. По краям раны – растущий гипертрофированный эпителий, под которым формируется грануляционная ткань с большим количеством новообразованных сосудов (Б). У крысы 1 под струпом рыхлая соединительная ткань с лимфомоноцитарной инфильтрацией. Ув. х100 (А), Ув. х40 (Б). Окраска гематоксилин-эозином

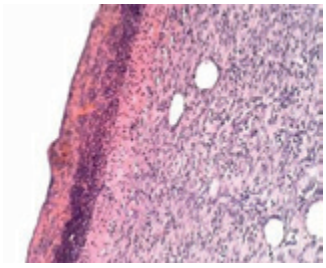


Рисунок 7. Струп небольшой, под ним тонкий слой фибринозно-лейкоцитарной инфильтрации, неактивные грануляции, умеренный отек ткани. Ув. х100. Окраска гематоксилин-эозином

На 14-е сутки

Контрольная группа: в целом процесс эпителизации выражен, воспалительная инфильтрация уменьшается, идет формирование фиброзно-рубцовой ткани (рисунок 8).

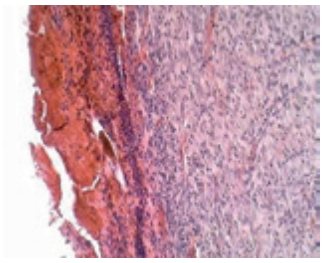


Рисунок 8. Струп сохраняется, наблюдается наползание эпителия и начало эпителизации в центре раны. Под струпом грануляционная ткань. Ув. х100. Окраска гематоксилин-эозином

Группа «ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон»: на большей части раневой поверхности струп отсутствует. Отмечается эпителизация на разных стадиях. По краям регенерата новообразованный пласт эпителия

гипертрофирован. Идет активное созревание грануляционной ткани с минимальными признаками воспаления (рисунки 9, 10).

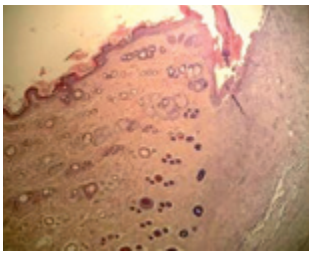


Рисунок 9. Краевая эпителизация, большая часть раневой поверхности без струпа и выраженных признаков воспаления, с формированием рыхлой грануляционной ткани. Ув. х40. Окраска гематоксилин-эозином

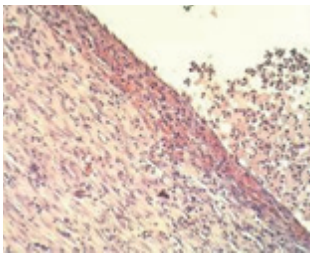


Рисунок 10. Эпителизация раны с гипертрофией образованного эпителия. Заживление под струпом, эпителизация открытой раневой поверхности с тонким слоем активной грануляционной ткани под образующимся эпителием. Ув. х100. Окраска гематоксилин-эозином

Группа «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон»: изменения в целом по скорости эпителизации и активности восстановления соединительной ткани сходны с группой «ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон», немного ее превосходя. Однако отмечаются небольшие очаги с деструкцией и выраженной воспалительной реакцией в участках, где сохраняется достаточно толстый струп (рисунки 11–14).

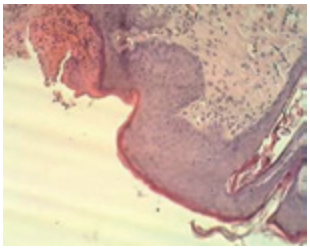


Рисунок 11. Активная эпителизация краев раны с выраженной гипертрофией эпителия. Ув. х40. Окраска гематоксилин-эозином

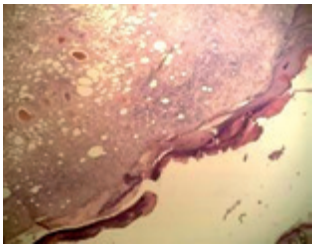


Рисунок 12. Глубокий раневой дефект, сохраняется небольшой струп, отек, участки с начальной эпителизацией, мягкие грануляции с очагами с воспалительной инфильтрацией. Ув. х40. Окраска гематоксилин-эозином

Под эпителием грануляционная ткань с достаточно выраженной лимфомоноцитарной инфильтрацией. Ув. х40. Окраска гематоксилин-эозином.

Группа «Цефтриаксон»: изменения сходны с описанием для групп «ГМДП, лиофилизат» + »Цефтриаксон» и «ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон». Поверхность практически очищена от струпа. Но процесс

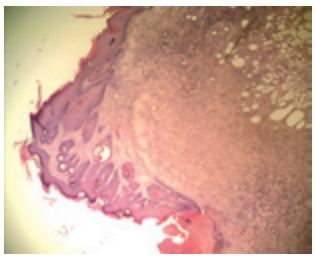
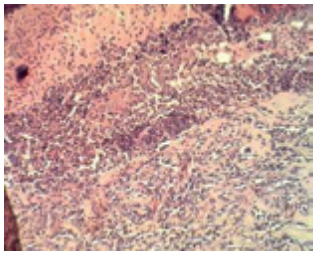


Рисунок 13. Большой участок с регенерированным гипертрофированным эпителием



Рисунки 14. Эпителизация под струпом. В подлежащей ткани выраженная пролиферация фибробластов, новообразование сосудов, капилляры имеют вертикальное расположение по отношению к поверхности (что свидетельствует о более зрелой структуре грануляционной ткани), воспалительная инфильтрация минимальна. Ув. х100. Окраска гематоксилин-эозином

эпителизации идет несколько медленнее и на большей части поврежденной области идет формирование зрелой грануляционной ткани (рисунок 15).

Рисунок 15. Большая часть раневой поверхности без струпа, начинается эпителизация и формирование зрелой грануляционной ткани. Сохраняется небольшая, преимущественно периваскулярная воспалительная инфильтрация. Ув. х40. Окраска гематоксилин-эозином

Полученные на 14-е сутки данные показывают, что к этому сроку можно четко выделить 3 группы, которые заметно отличались от контроля по более быстрому формированию грануляционной ткани и снижению воспаления. Это группы: «ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон», «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон» и «Цефтриаксон». Вместе с тем интенсивность эпителизации, степень редукции воспалительных изменений, лизиса струпа и формирования грануляционной ткани в области повреждения в этих группах различалась. В группах сочетанной терапии с «ГМДП, субстанцией» и «ГМДП, лиофилизатом» наблюдалась меньшая воспалительная реакция и более нежная рубцовая ткань, чем в группе с «Цефтриаксоном», что снижало риск персистенции воспаления и формирования грубого келоидного рубца. Скорость эпителизации и площадь поверхности с эпителизацией в группе «Цефтриаксон» была ниже, чем в группах «ГМДП, субстанция» + «Цефтриаксон» и «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон, а грануляционная ткань более грубая.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели инфицированной раны кожи и мягких тканей у крыс изучена сравнительная эффективность сочетанной антибиотико-иммунной терапии с использованием новой лекарственной формы ГМДП – «ГМДП, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» и монотерапии антибиотиком «Цефтриаксон».

Показано, что при лечении гнойно-воспалительных процессов лучшая ранозаживляющая эффективность консервативного лечения достигается сочетанной антибиотико-иммунной терапией с использованием иммунотерапевтического препарата «ГМДП, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» по сравнению с монотерапией антибиотиком «Цефтриаксон». Преимущества отмечаются по скорости и полноте очищения и закрытия раны, в том числе по интенсивности эпителизации, формирования грануляционной ткани, а также её качеству, степени редукции воспалительных изменений, лизиса струпа.

Статистически достоверно установлено, что индекс ускорения заживления раны по сравнению с контролем (интактная группа) при монотерапии препаратом «Цефтриаксон» составляет 128,5%, а при сочетанной терапии «ГМДП, лиофилизат» + «Цефтриаксон» – 179,3%. При этом в сравнении с применением одного Цефтриаксона при сочетанной терапии с тестируемым препаратом образуется более нежный рубец, что снижает риск формирования грубого келоидного рубца.

Преимущества применения для лечения гнойно-воспалительных процессов ЛС «ГМДП, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» в сочетанной терапии с антибиотиком «Цефтриаксон» в сравнении с монотерапией данным антибиотиком подтверждены макроскопическим, планиметрическим и гистологическим методами.

Совокупность полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что лекарственный препарат «ГМДП, лиофилизат для приготовления растворов для инъекций» является перспективным для дальнейшего изучения в схемах консервативного лечения ГВП.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.Н. Жадинский, Н.В. Жадинский. Лечение гнойных ран в первой фазе раневого процесса // Украинский Журнал Хирургии. 2012. № 2(17). С.109–114.
2. Т.В. Казакова, В.И. Миронов, В.М. Данчинов. Рациональная антибиотикотерапия при гнойных заболеваниях пальцев кисти в условиях хирургического стационара // Журнал инфекц. патол. 2003. Т. 10. № 4. С. 47–49.
3. В.В. Бойко, В.К. Логачев, С.О. Вереснев, др. Проблеми антибактеріальної терапії в клініці невідкладної хірургії // Шпитальна хірургія. 2011. № 3. С. 70–71.
4. Д.В. Самарин. Антибиотикорезистентность // Therapia. Украiтський медичний вісник. 2009. № 12(42). С. 43–45.
5. Ю.С. Лисюк, С.Т. Федоренко, В.А. Мельников. Стартова антибіотикотерапія в комплексном лікуванії гострих гнійних хірургічних захворювань // Клінічна хірургія. 2008. № 11–12. С. 17–18.
6. Б.В. Пинегин. Современные представления о стимуляции антиинфекционного иммунитета с помощью иммуномодулирующих препаратов // Антибиотики и химиотерапия. 2000. № 12. С. 3–8.
7. П.Е. Крайнюков, С.А. Матвеев. Эффективность использования иммуномодулирующей терапии при гнойных заболеваниях кисти // Медицинский вестник юга России. 2013. С. 76–79.
8. Т.А. Васина, Г.В. Булава, Д.Д. Меньшиков, В.Б. Хватов. Этиотропная антибиотико- и иммунотерапия больных с гнойно-воспалительными процессами // Антибиотики и химиотерапия. 1998. № 11. С. 28–33.
9. Л.И. Винницкий, К.Л. Бунятян, Б.В. Пинегин, др. Отечественный иммуномодулятор нового поколения ликопид в комплексном лечении и профилактике инфекционных осложнений в хирургической клинике // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. 1997. № 11. С. 46–49.
10. А.П. Чадаев, А.М. Нурписов, А.В. Пичугин, Р.И. Атауллаханов. Иммуномодуляторы «Иммуномакс» и «Гепон» в комплексном лечении больных острой гнойной хирургической инфекцией // Русский медицинский журнал. 2004. Т. 12. № 24. С. 1427–1433.
11. В.А. Гинюк. Методика моделирования острого местного гнойно-воспалительного процесса у лабораторных животных и проведения эксперимента по лечению полученных гнойных ран с помощью фоторегуляторной и фотодинамической терапии // Мед. журн. 2009. № 1. С. 44–46.
12. Е.А. Грабарская, Н.В. Данилевская, А.А. Дельцов, А.А. Правда. Изучение ранозаживляющей активности новой многокомпонентной мази // Современные фармако- и биопрепараты. 2015. № 3. 48–50 с.
13. ОФС.1.7.2.0008.15. Определение концентрации микробных клеток / Государственная фармакопея РФ. XIII изд. Т. 2.
14. Е.А. Ефимов. Факторы, влияющие на полноту регенерации кожи у млекопитающих // Изв. РАН. Сер. биол. 1999. № 4. С. 488–492.
15. А.П. Линева. Физиологические показатели нормы животных. Справочник. – М.: Аквариум, 2003.

УДК 615.011; 576.08

ИССЛЕДОВАНИЕ КИШЕЧНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ И Pgp-ТРАНСПОРТА ФОСФАЗИДА С ПРИМЕНЕНИЕМ МОДЕЛИ Caco-2

Д.Ю. Гребенкин[1,2]*, Я.М. Станишевский[1], И.Е. Шохин[3], А.М. Стойнова[1], М.А. Карпова[4], А.Г. Корякова[4], А.В. Рябова[2], Б.В. Бровченко[5], А.А. Смирнов[5]

Резюме. Исследована кишечная проницаемость фосфазида *in vitro* с использованием монослоя культуры клеток Caco-2 в апикально-базолатеральном (A-B) и базолатерально-апикальном (B-A) направлениях с добавлением и без добавления ингибитора трансмембранного эффлюкс-транспортёра Pgp циклоспорина А. В качестве контрольных веществ использовались ранитидин и пропранолол. В результате эксперимента были получены величины коэффициентов кажущейся кишечной проницаемости Papp для исследуемого и контрольных веществ. Также полученные данные были сопоставлены с величинами (A) log P для исследуемого и контрольных веществ. На основании результатов исследования можно сделать предположение о низкой кишечной проницаемости фосфазида по классификации БКС. Эксперимент также показал сродство фосфазида к эффлюкс-транспортёрам Pgp.

Ключевые слова: БКС, всасываемость, Caco-2, фосфазид.

Caco-2 INTESTINAL PERMEABILITY AND Pgp-AFFINITY OF PHOSPHAZIDE

D.Yu. Grebenkin[1,2]*, Ya.M. Stanishevskiy[1], I.E. Shohin[3], A.M. Stoinova[1], M.A. Karpova[4], A.G. Koryakova[4], A.V. Ryabova[2], B.V. Brovchenko[5], A.A. Smirnov[5]

Abstract. In this work the intestinal permeability of phospazide *in vitro* was investigated using Caco-2 cell model in apical-basolateral (A-B) and basolateral-apical (B-A) directions as well as with the option of adding of P-glycoprotein (Pgp) inhibitor cyclosporine A. The following standard substances were used: ranitidine and propranolol. Papp values of test and standard substances were obtained. The obtained data were compared with the values (A) log P for the test and standard substances. According the results of this study, the phosphatide presumably has a low intestinal permeability in terms of BCS. The affinity of phosphazide for the efflux transporter Pgp was demonstrated.

Keywords: BCS, permeability, Caco-2, Phosphazide.

1 – Институт биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

2 – ООО «Экзактэ Лабс», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20

3 – ООО «Центр фармацевтической аналитики», 117246, Россия, г. Москва, Научный проезд, д. 20

4 – ООО «Научно-исследовательский институт ХимРар», 141400, Россия, Московская об., г. Химки, ул. Рабочая, д. 2а, к. 1

5 – ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.», 121552, Россия, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А

1 – Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology Peoples' Friendship University of Russia, 6, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

2 – ExacteLabs Company, 20, Nauchniy proezd, Moscow, 117246, Russia

3 – Center of Pharmaceutical Analytics Ltd, 20, Nauchniy proezd, Moscow, 117246, Russia

4 – LLC «Research Institute ChemRar», 2a/1, Rabochaya str., Khimki, Moscow region, 141400, Russia

5- LLC «AZT PHARMA K.B.», 15A, 3-rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: gredmitrij93@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Изучение кишечной проницаемости в модели Caco-2 модели входит в панель тестов ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion; абсорбция, распределение, метаболизм, экскреция), является «золотым стандартом» среди методов оценки кишечной проницаемости *in vitro* [1], а также тестом, на основании результатов которого руководство FDA позволяет установить проницаемость по биофармацевтической классификационной системе (БКС) путём сравнения с контрольными веществами [2]. В качестве контрольных веществ в настоящей работе использовались: ранитидин (стандарт низкой проницаемости по БКС, биодоступность f_a=50–84), пропранолол (стандарт высокой проницаемости по БКС, биодоступность f_a≥85%) [2].

Фосфазид (торговое название монопрепарата – Никавир®) – нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы, модифицированный аналог природного нуклеозида тимидина, противовирусное средство, используемое в терапии ВИЧ и гепатита В. Фосфазид – это оригинальный отечественный препарат, успешно прошедший кли-

нические исследования и зарегистрированный в Российской Федерации в 1999 году. За время применения лекарственный препарат продемонстрировал свою эффективность и безопасность [3]. Препарат удостоен государственной премии РФ в области науки и техники за 2000-й год (Указ Президента Российской Федерации от 26 декабря 2000 года № 2084 «О присуждении Государственных премий Российской Федерации 2000 года в области науки и техники»).

Согласно литературным данным, фосфазид относится к классу 3 БКС, то есть для него установлена низкая кишечная проницаемость [4, 5]. Новые экспериментальные данные в этой области, полученные с использованием культур клеток, позволят более подробно изучить механизмы, обусловливающие особенности фармакокинетки и фармакодинамики фосфазида.

Целью настоящей работы являлось экспериментальное подтверждение класса кишечной проницаемости по БКС для лекарственного средства фосфазид, оценка его сродства к эффлюкс-транспортёру Pgp (P-гликопротеину) и сопоставление полученных данных с величиной рассчитанного показателя гидрофобности (A) log P.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование и материалы

- Линия клеток Caco-2 (ATCC, кат. № HTB-37, США).
- 96-луночные планшеты Millicell-96 с фильтром и резервуаром для изучения транспорта через клеточный монослой 0,4 мкн PCF (Millipore, кат. № PSHT004S5, США).
- 96-луночные планшеты 0,5 мл (Agilent, кат. № 5042-1386, США) с силиконовой крышкой (Nalgene, кат. № 276011, США).
- ВЭЖХ-система Acquity UPLC (Waters, США).
- Гибридный масс-спектрометр с тройным квадруполем и ионизацией электроспреем QTRAP 4500 (Sciex Corp, США).
- Измеритель сопротивления Millicell-ERS (Millipore, кат. № MERS00001, США).
- CO_2 инкубаторы (Sanyo; Sheldon Mfg. Inc., Япония).
- pH-метр pH410 с электродом ЭСК-10601/7 (Аквилон, Россия).
- Автоматический счётчик клеток Countess (Invitrogen, США).

Описание методики проведения анализа с использованием модели Caco-2

Методика эксперимента основывалась на рекомендациях для использования коммерческих наборов MultiScreen® Caco-2 Assay System [6].

Линия клеток Caco-2 была получена из коммерческого набора ATCC (кат. № HTB-37) и культивировалась во флаконах 75 $см^2$ при 37 °C в среде 5% CO_2 (об/об). Среда культивирования содержала глюкозу (4,5 г/л) с добавлением 10% (об/об) эмбриональной телячьей сыворотки, FBS (HyClone, кат. № SH30070.03), 10 мл незаменимых аминокислот («ПанЭко», кат. № Ф116), 10 мл заменимых аминокислот («ПанЭко», кат. № Ф115/50), 5мл пирувата натрия («ПанЭко», кат. № Ф023), флакона L-глутамина («ПанЭко», кат. № Ф032) и 5 мл раствора «пенициллин + стрептомицин» («ПанЭко», кат. № А065).

Для проведения эксперимента клетки Caco-2 20–50 пассажа в состоянии 80–90% покрытия флакона рассаживали в планшеты с двухкомпонентными ячейками Millicell 96 в количестве 13000 на 0,11 $см^2$ лунку (118182 клеток/$см^2$). Клетки Caco-2 инкубировали 21 день с периодической сменой среды.

Целостность монослоя проверяли путем измерения трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) с помощью прибора Millicell-ERS. Приемлемым является значение TEER не менее 3 кОм на лунку.

В день эксперимента готовили буферные растворы анализируемого и контрольных веществ – фосфазида, ранитидина и пропранолола – с концентрацией 1 мкМ и такие же растворы, но с присутствием циклоспорина А с концентрацией 1 мкМ для исследования транспорта соединений в условиях ингибирования эффлюкс-транспорта Pgp.

Для определения скорости транспорта из апикальной (A) в базолатеральную (B) область [A-B] добавляли 90 мкл полученных растворов с анализируемыми веществами в камеру А и по 250 мкл холостого буферного раствора в камеру В.

Для определения скорости транспорта из базолатеральной (B) области в апикальную (A) [B-A] добавляли 250 мкл полученных растворов с анализируемыми веществами в камеру В и по 90 мкл холостого буферного раствора в камеру А.

Таким образом, эксперименты с обоими направлениями транспорта [A-B] и [B-A] проводились параллельно в двух вариантах: обычном и с добавлением циклоспорина А – ингибитора эффлюкс-транспортёра Pgp. Каждый анализ производился в трёх параллельных повторностях с целью дальнейшей статистической обработки данных.

Инкубировали собранную с использованием Millicell 96 систему Caco-2 в течение 2 ч при 37 °C на шейкере с перемешиванием при 300 об/мин. После окончания инкубации разъединяли верхнюю и нижнюю части планшета. Помещали по 210 мкл холодного ацетонитрила в воде (1:1) в подписанные пробирки вместимостью 1,1 мл и по 70 мкл исходных раство-

ров тестируемых и контрольных веществ. В качестве внутреннего стандарта использовали капецитабин в концентрации 1 нг/мл. Перемешивали и хранили при –80 °С до анализа.

ВЭЖХ-МС/МС-условия

Полученные растворы анализировали на ВЭЖХ-системе Acquity UPLC (Waters, США) с тройным квадруполем и ионизацией электроспреем QTRAP 4500 (Sciex Corp, США). Обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Analyst (ver. 1.6.2) (Sciex Corp, США).

- Подвижная фаза: вода Milli-Q (A) / ацетонитрил (B).
- Градиент подвижной фазы: 0–1 мин – 10% B; 1,2–1,3 минуты – от 10% до 90% B; 1,3–2 мин – 90% B.
- Скорость потока подвижной фазы: 0,5 мл/мин.
- Неподвижная фаза: хроматографическая колонка C18 5 мкм, 150x4,6 мм при температуре 40 °С.
- Объем вводимой пробы: 3 мкл.
- Время хроматографирования: 5 мин.
- Детектирование: мониторинг множественных реакций (multiple reactions monitoring, MRM), режим отрицательной ионизации, ион-предшественник m/z 330,08, дочерний ион m/z 125,00, энергия соударений –45 В.
- Время удерживания фосфазида: около 0,58 мин.

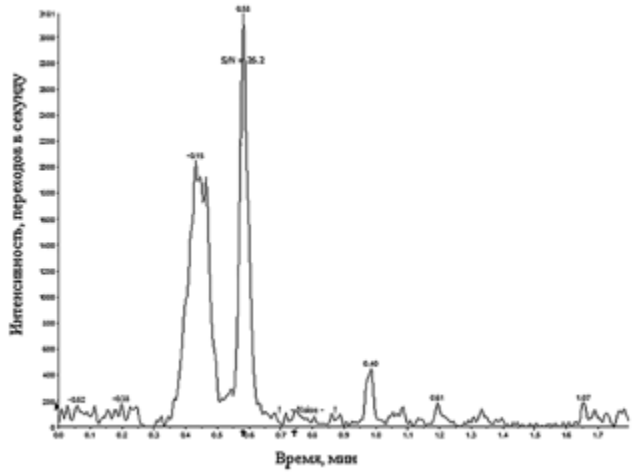


Рисунок 1. Хроматограмма на типичном для анализируемых проб из акцепторных отсеков уровне концентраций (наименьший в эксперименте) показывает приемлемый аналитический параметр сигнал/шум S/N=26,2

Обработка данных

Площади под хроматогрфическими пиками аналита, нормализованные по сигналу внутреннего стандарта (AUC/IS), считали с помощью программы Analyst (ver. 1.6.2) (Sciex Corp, США) и использовали для расчетов.

Проницаемость (Papp, см/с) через монослой клеток Caco-2 оценивалась по формуле (1).

$$P_{app} = \left(\frac{V_A}{Area * Time} \right) x \left(\frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right), \quad (1)$$

где V_A – объем (мл) в акцепторной лунке, который равен 0,25 для транспорта [A-B] и 0,09 для транспорта [B-A]; *Area* – площадь поверхности (см^2), составляет 0,11 см^2 для 96-луночной плашки MultiScreen Caco-2; *Time* – время транспорта (7200 с); $C_A(t)$ – AUC/IS вещества в акцепторной лунке после эксперимента; $C_D(0)$ – AUC/IS исходного раствора вещества в донорной лунке.

Считают проницаемость (P_{app}) вещества в обоих направлениях при наличии и при отсутствии циклоспорина А, а также отношение P_{app} $\frac{B \rightarrow A}{A \rightarrow B}$, которое показывает разницу в проницаемости, возникающую из-за эффлюкс-транспорта. Если отношение Papp B-A/A-B меньше 2,0, то вещество не подвергается активному транспорту и не является субстратом Pgp-транспортера. Для Pgp-субстратов отношение становится близким к 1,0 в присутствии циклоспорина А.

Рассчитанные величины (A) log P для ранитидина, пропранолола и фосфазида получали на основании анализа структур их молекул при помощи онлайн-калькулятора ALOGPS 2.1 [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 приводятся результаты эксперимента в четырёх вариантах (разное направление транспорта в условиях отсутствия или добавления ингибитора Pgp) с данными по каждой из трёх ячеек для Caco-2. В таблицах 2 и 3 приводятся аналогичные данные для контрольных веществ – ранитидина (низкая проницаемость) и пропранолола (высокая проницаемость).

По результатам сравнения полученных значений кажущейся кишечной проницаемости Papp для фосфазида с контрольными веществами можно сделать следующие выводы.

1. Всасываемость фосфазида сопоставима с всасываемостью ранитидина, стандарта низкой кишечной проницаемости (Papp 2,0 против 1,4 соответственно).
2. Всасываемость фосфазида значительно ниже всасываемости пропранолола, стандарта высокой кишечной проницаемости (Papp 2,0 против 22,1 соответственно).

Таким образом, фосфазид может быть классифицирован как субстанция с низкой всасываемостью по классификации БКС.

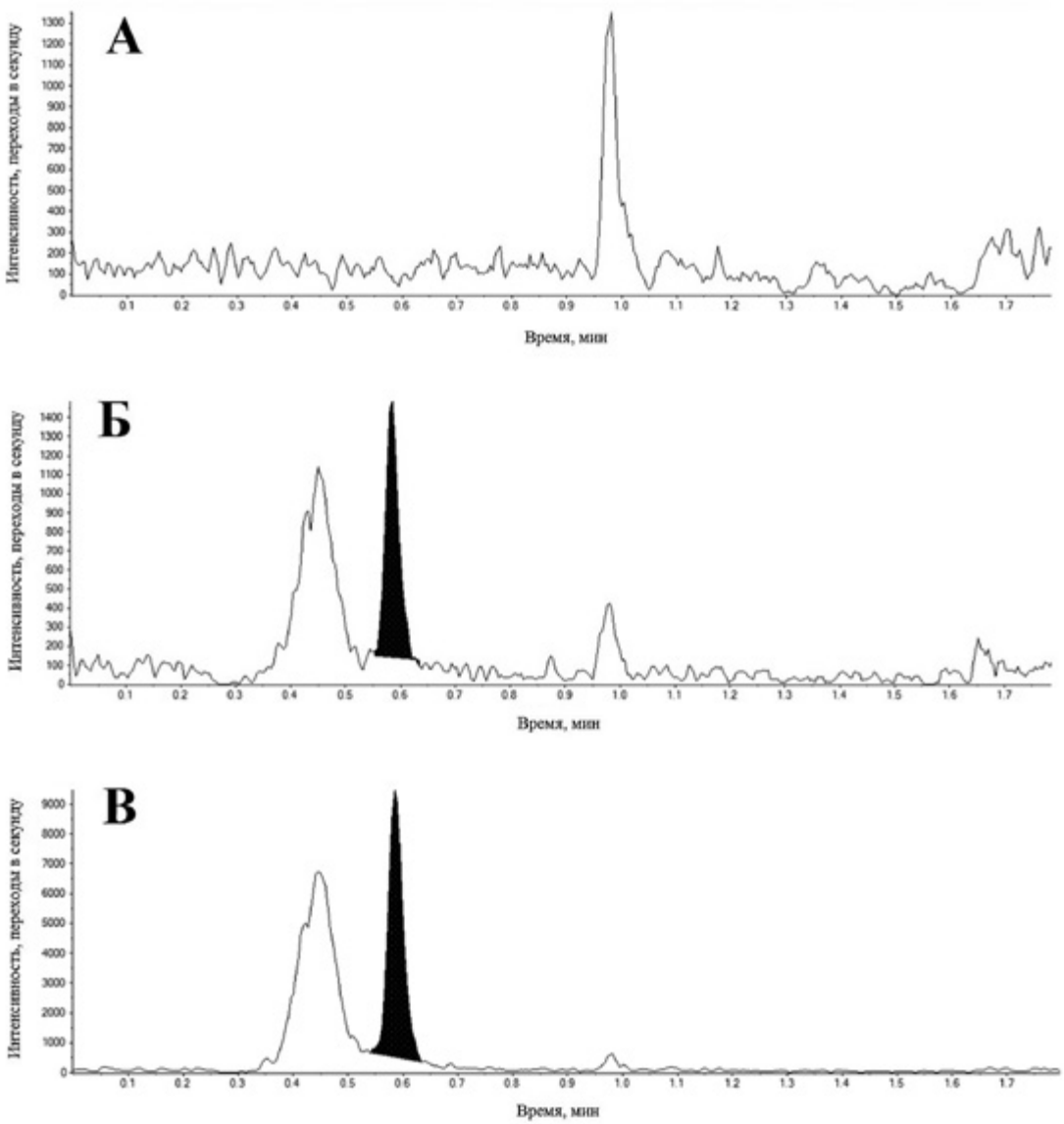


Рисунок 2. Примеры хроматограмм фосфазида: А) холостого раствора, Б) раствора из акцепторного отсека, В) раствора из донорного отсека

По результатам сравнения полученных значений кажущейся кишечной проницаемости Papp для фосфазида в разных направлениях транспорта при отсутствии и при наличии ингибитора эффлюкс-транспортёра Pgp можно сделать следующие выводы.

1. Фосфазид, как показано в эксперименте [B-A], является субстратом эффлюкс-транспортёра Pgp и активно выводится из клетки в нормальных условиях, в то время как в присутствии ингибитора этого транспортёра интенсивность транспорта заметно снижается (Papp 5,7 против 0,6 соответственно).
2. Фосфазид также может быть охарактеризован как субстрат эффлюкс-транспортёра Pgp на основании расчёта отношения $P_{app}\ \frac{B \to A}{A \to B}$, которое составило 2,85 (отношение должно быть больше 2).
3. При обнаруженном в эксперименте уровне погрешности не представляется возможным сравнить интенсивность транспорта [A-B] при отсутствии и при наличии ингибитора Pgp.

Полученные показатели кажущейся кишечной проницаемости Papp исследуемого и контрольных веществ были сопоставлены с соответствующими величинами (A) log P (таблица 4). На основании этого сопоставления можно сделать вывод, что, хотя между величинами и наблюдается значимая корреляция (r^2=0,853), позволяющая достоверно разделить вещества с высокой и низкой кишечной проницаемостью, погрешность эксперимента всё же не даёт возможности обоснованно сравнить сопоставимые по всасываемости вещества, что видно из примера с фосфазидом и ранитидином (RSD составляет 46,8% и 15,7% соответственно). Предположительно, для более точных данных эксперимент с Caco-2 должен быть повто-

рён с использованием растворов более высоких концентраций при условии доказательства сохранения нормальной жизнедеятельности клеток монослоя в данных условиях. Тем не менее погрешность эксперимента не мешает сделать обоснованное предположение о фосфазиде как о веществе с низкой всасываемостью по БКС.

Таблица 1.

Кажущаяся кишечная проницаемость Papp фосфазида в модели Caco-2

Фосфазид				
Номер ячейки	P_{app}, x10^{-6} см/с			
	[A-B]	[B-A]	[A-B] + ингибитор Pgp	[B-A] + ингибитор Pgp
1	3,0	7,5	5,5	0,8
2	1,1	8,7	0,8	0,6
3	2,0	0,9	1,9	0,4
Среднее	2,0	5,7	2,8	0,6
SD	0,9	4,2	2,5	0,2
RSD, %	46,8	73,6	88,7	37,9

Таблица 2.

Кажущаяся кишечная проницаемость Papp ранитидина в модели Caco-2

Ранитидин	
Номер ячейки	P_{app} A-B, x10^{-6} см/с
1	1,5
2	13,1*
3	1,2
Среднее	1,4
SD	0,2
RSD, %	15,7

Примечание: *данные исключены из расчётов.

Таблица 3.

Кажущаяся кишечная проницаемость Papp пропранолола в модели Caco-2

Пропранолол	
Номер ячейки	P_{app} A-B, x10^{-6} см/с
1	22,8
2	23,6
3	20,0
Среднее	22,1
SD	1,9
RSD, %	8,4

Таблица 4.

Корреляция кажущейся кишечной проницаемости Papp и (A) LogP

Вещество	P_{app}, x10^{-6} см/с	(A) LogP
Фосфазид	2,0	0,68
Ранитидин	1,4	0,79
Пропранолол	22,1	3,03
r^2	0,853	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов исследования кишечной проницаемости фосфазида *in vitro* с использованием монослоя культуры клеток Caco-2 можно предварительно охарактеризовать фосфазид как субстанцию с низкой всасываемостью по классификации БКС, что соответствует имеющимся литературным данным. Коэффициент кажущейся кишечной проницаемости Papp для фосфазида сопоставим с таковым для вещества-стандарта низкой кишечной проницаемости ранитидина и значительно уступает веществу-стандарту высокой кишечной проницаемости пропранололу. Результат согласуется с прогнозируемой на основании расчётных показателей липофильности (A) LogP кишечной проницаемостью молекул. Результаты исследования также позволяют сделать предположение о сродстве фосфазида к эффлюкс-транспортёрам Pgp. Сделанные выводы позволяют продолжить более подробное изучение свойств фосфазида в условиях *in vivo* путем проведения соответствующих клинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. P. Artursson, K. Palm, K Luthman. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport // Advanced drug delivery reviews. 2001. Т. 46. № 1. С. 27–43.
2. Draft guidance for industry, waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system / FDA. 2015.
3. Н.В. Сизова и др. Фосфазид – отечественный препарат для лечения ВИЧ-инфекции. Второе рождение //ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2012. Т. 4. № 2. С. 45–54.
4. 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. № 1. С. 48–60.
5. И.Е. Шохин и др. Изучение кинетики растворения инновационного антиретровирусного препарата Никавир® и его фиксированной комбинации с ламивудином (Фосфаладин®) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. №. 2. С. 136–145.
6. J. Phillips, A. Arena. Optimization of Caco-2 cell growth and differentiation for drug transport studies / Millipore Corporation Protocol Note PC1060EN00. 2003.
7. Интерактивные расчеты. URL: http://www.vcclab.org/web/alogps (дата обращения 08.2017).

OL pharm

НЕЗАВИСИМЫЙ ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР

Комплексные доклинические исследования лекарственных препаратов позволяют получить данные о безопасности, качестве и эффективности лекарственных средств:

- изучение общетоксических свойств (острая и хроническая токсичность)
- оценка местнораздражающего действия
- специфические виды токсичности (мутагенность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее и иммунотоксическое действие)
- специфическая фармакологическая активность
- фармакокинетические исследования

МЫ РАБОТАЕМ ДЛЯ ВСЕЙ ФАРМЫ

WWW.OLPHARM.RU

Исследования в области микробиологии

- исследование и тестирование чувствительных патогенных микроорганизмов к антимикробным лекарственным средствам
- изучение антимикробного действия лекарственных средств в отношении определенных видов микроорганизмов во избежание неправильной оценки полученных результатов перед испытанием на микробиологическую чистоту и стерильность
- анализ антагонистической активности пробиотических штаммов и препаратов на их основе методом отсроченного антагонизма на плотной среде в чашках Петри

Исследования в области разработки лекарственных средств

- разработка и валидация аналитических методик
- стандартизация НД на лекарственные препараты
- изучение стабильности лекарственных средств
- изучение кинетики растворения
- исследование фармакокинетики в рамках проведения биоэквивалентности
- проведение трансфера методик

Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ФЛ10 от 08.10.2014

Лицензия № 77.01.13.001.Л.000142.04.09 от 30.04.2009 на выполнение работ с микроорганизмами 3–4 групп патогенности

ООО «ОЛФАРМ»
117105, Г. МОСКВА,
УЛ. НАГАТИНСКАЯ, Д. 3А
ТЕЛ./ФАКС: +7 (499) 611-40-36
E-MAIL: INFO@OLPHARM.RU

УДК 615.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ СЕЛЕКТИВНОГО АКТИВАТОРА Ca-ЗАВИСИМОЙ NO-СИНТАЗЫ НА ГЕМОСТАЗ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

В.С. Орлова[1]*, Е.В. Орлова[2], О.В. Петрова[1], Я.М. Станишевский[1]

Резюме. В работе показано влияние нового препарата – селективного активатора Ca-зависимой NO-синтазы на процессы гемостаза в норме и при диабете 2 типа у лабораторных животных.

Ключевые слова: гемостаз, диабет 2 типа, Ca-зависимая NO-синтаза.

INVESTIGATION OF A CA-DEPENDENT INDUCER ON HEMOSTASIS PROPERTIES IN LABORATORY ANIMALS

V.S. Orlova[1]*, E.V. Orlova[2], O.V. Petrova[1], Ya.M. Stanishevskiy[1]

Abstract. The effect of a new drug – selective activator of Ca-dependent NO-synthase on the processes of hemostasis in norm and type 2 diabetes in laboratory animals is shown in this paper.

Keywords: hemostasis, type 2 diabetes, Ca-dependent NO-synthase.

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 115093, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

2 – ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), 142290, Россия, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 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., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее тяжелых проявлений сахарного диабета является поражение сердечно-сосудистой системы, развитие микро- и макроангиопатий [1], приводящих к поражению почек (нефропатии) [2], нервной системы (нейропатии) [3], глаз (ретинопатии) [4], ишемии мозга (инсульты) [1], сердца (инфаркты) [1], окклюзии периферических сосудов (трофические язвы, эндоартерииты) [1]. В основе этих процессов лежит не только нарушение обмена веществ, но и нарушение гемостаза.

Система гемостаза обеспечивает сохранение крови в жидком состоянии в пределах кровеносных сосудов, образование тромбов в области повреждения стенки сосудов и уборку тромбов после восстановления сосудистой стенки. Условно гемостаз разделяют на три системы: свертывающую, противосвертывающую и фибринолиз, которые тесно взаимодействуют между собой, а также с эндотелиальными клетками, выстилающими внутреннюю стенку сосудов (так называемую интиму).

Каждая из этих систем многокомпонентна, состоит из целого ряда факторов крови, белков, ферментов, ростовых факторов, микроэлементов, из которых наиболее важную роль играет ионизированный кальций, активирующий Ca-зависимую NO-синтазу, от активности которой зависит образование оксида азота (NO). Оксид азота является «модератором» всех функций эндотелия, так как регулирует активность и последовательность запуска всех остальных биологически активных веществ, продуцируемых эндотелием.

NO – базовый фактор антиатерогенеза, ответственен за расширение сосудов, блокирует образование на поверхности эндотелия клеток адгезии, соответственно блокирует адгезию и агрегацию тромбоцитов. Тромбоциты играют большую роль в гемостазе, они обеспечивают равновесие между свертывающей и противосвертывающей системами крови, а также влияют на структурно-функциональное состояние эндотелиальных клеток. Тромбоциты способны прилипать к эндотелию сосудистой стенки (адгезия) и образовывать комплексы друг с другом (агрегация). Физиологическая активность тромбоцитов начинается тогда, когда поврежден сосудистый эндотелий и обнажается субэндотелиальный внеклеточный матрикс.

Участие тромбоцитов в гемостазе заключается в следующем:

1) поддержание нормальной структуры и функции микрососудов, то есть репарации эндотелиальных клеток;
2) спазм поврежденных сосудов путем секреции вазоактивных веществ – серотониниа, катехоламинов, тромбомодулина и других, содержащихся в плотных гранулах и α-гранулах тромбоцитов;
3) образование в поврежденном сосуде тромба путем адгезии тромбоцитов к субэндотелию сосудов и образование агрегатов, участие тромбоцитарных факторов в процессе свертывания крови и в регуляции фибринолиза;
4) стимуляция репарации поврежденной сосудистой стенки выделяющимися ростовыми факторами из адгезированных тормбоцитов.

Процессы агрегации и дезагрегации тромбоцитов строго дозированы, так как усиление одного или другого процесса может соответственно привести к коагулопатии или к кровотечениям.

При сахарном диабете регуляция процессов гемостаза нарушена, усиление агрегации тромбоцитов приводит к нарушению свертывающей системы крови вплоть до развития ДВС-синдрома, который является сигналом крайне тяжелого повреждения сосудистого русла.

ДВС-синдром – это избыточное внутрисосудистое свертывание крови, приводящее к геморрагической коагулопатии потребления и тяжелым осложнениям со стороны сердечно-сосудистой системы. Крайним выражением ДВС-синдрома является выраженная кровоточивость. Эта фаза внутрисосудистого свертывания получила название коагулопатии потребления или тромбогеморрагического синдрома [5].

Не меньшее значение в нарушении гемостаза имеют и эритроциты. Их основная функция – транспортировка кислорода – присуща не всем формам эритроцитов. Это должны быть хорошо сформированные клетки (двояковогнутые дискоциты), легко деформируемые и ответственные за микрореологические параметры крови.

Повышение способности эритроцитов к агрегации и уменьшение их деформируемости приводит к нарастанию вязкости крови, что затрудняет ее продвижение по микроциркуляторному руслу и, соответственно, к нарушению процессов гемостаза.

Наиболее доступный метод изучения агрегации эритроцитов – это определение агрегированных эритроцитов в мазке крови.

Таким образом, при сахарном диабете необходимостью является не только компенсация обмена веществ, но и возможное воздействие на процессы агрегации в русле крови, особенно для предотвращения развития ДВС-синдрома.

В связи с этим задачей исследования явилось изучение влияния препарата «Витанам» на агрегированные тромбоциты и эритроциты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Крыс содержали в клетках T_4 по 5 особей в клетке, кроликов – по 1 особи при температуре 22±3 °С и относительной влажности 60±10%. Освещение – искусственное, продолжительность светлого и темного периодов – 12 ч. В помещении поддерживался 12-кратный воздухообмен, животные имели свободный доступ к стандартному гранулированному корму и к питьевой воде. Все животные получали стандартный комбикорм К-122, изготовленный НПО «Сельскохозяйственные технологии», состав, пищевая ценность, содержание витаминов и микроэлементов которого указаны в таблице 1.

Комбикорм сбалансирован по аминокислотному составу, минеральным веществам, витаминам, изготовлен из высококачественных компонентов.

Таблица 1.

Состав и показатели качества гранулированного корма К-122 для мелких лабораторных животных

В состав корма входят	%	Показатели качества	%
Овес	5	Сырой протеин	17,3
Кукуруза, ячмень	12,1		
Пшеница	14,2		
Шрот подсолчечниковый	7,6	Обменная энергия	247,0 ккал
Отруби пшеничные	15	Сырая клетчатка	9,95
Дрожжи кормовые	2,9	Сырой жир	2,78
Травяная мука 1 класса	27	Ca	0,75
Соль поваренная	0,3	P	0,51
Премикс минерально-витаминный	1	Натрий хлористый	0,54
Мука рыбная	2,8	Лизин	0,75
Мел кормовой	1,6	Мет. + Цист.	0,54

Содержание витаминов и микроэлементов в 1 кг комбикорма в мг:

A – 7,00 тыс. МЕ; B_{12} – 0,02; B_2 – 3,00; B_3 – 20,00; B_4 – 292,00; B_5 – 20,00; B_6 – 4,00; E – 5,00; H – 0,10; K_3 – 1,00; Cu – 2,5; Fe – 10; J – 0,7; Mn – 70; Zn – 70 (сертификат соответствия № РОСС RU. П081. ВОО113 ГОСТ 50258-92).

Метод определения тромбоцитов основан на свойстве плазмы крови изменять ее оптическую плотность в зависимости от степени агрегированности тромбоцитов. По определению процента падения оптической плотности плазмы по отношению к контролю можно судить о процессах дезагрегации.

Полученную плазму крови смешивали с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Исследование агрегации тромбоцитов проводили по методу Борна (G. Born), принцип которого заключается в измерении степени изменения оптической плотности плазмы, богатой тромбоцитами, при добавлении к ней индуктора агрегации АДФ фирмы «Технология-Стандарт» в концентрации 10^{-5} М. Плазму, богатую и бедную тромбоцитами, получали при центрифугировании со скоростью 1000 об/мин и 3000 об/мин. Плазма, бога-

тая тромбоцитами, должна содержать в среднем 2,5х 10^9 тромбоцитов в одном миллилитре. Подсчет тромбоцитов производился автоматически на агрегометре фирмы Chrono-log (США).

При оценке агрегационной способности тромбоцитов использовали показатель – процент падения оптической плотности плазмы, отнесенный к таковому в контроле. Все исследования проводились максимально приближенно к требованиям GLP (Good Laboratory Practice).

Эксперименты проводились по двум направлениям.

1. *In vitro* – получали плазму от контрольных и экспериментальных животных, а также от доноров и больных сахарным диабетом. Добавлением АДФ индуцировали агрегацию тромбоцитов, а затем добавляли исследуемый препарат в разных концентрациях и определяли величину дезагрегации тромбоцитов под действием исследуемого препарата.

Забор крови у крыс производили непосредственно перед введением препарата, а затем через 30, 60, 120 мин после введения препарата «Витанам»: индуктор агрегации – АДФ (10^{-5} М).

Доза 10 мг дала пролонгированный во времени антиагрегационный эффект, который начинался с 30-й минуты, максимально проявлялся на 60-й минуте и снижался на 120-й минуте.

2. *In vivo* – опыты проводились на белых крысах линии Wistar, самцах, весом 180–200 г и на кроликах породы шиншилла, самцах.

Накануне эксперимента животные не получали корма, вода не ограничивалась. Препарат вводился перорально перед экспериментом. Доза вещества рассчитывалась с учетом оптимальных концентраций, полученных в опытах *in vitro*, с пересчетом на массу животного. Взятие крови, получение плазмы и дальнейшие действия проводились в соответствии с указанной выше методикой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных данных можно сделать вывод о наличии дезагрегационного действия препарата (таблицы 2, 3)

В настоящее время применяются антиагреганты нескольких видов, такие как аспирин, курантил, тиклид, плавикс, но все они дают побочные эффекты в виде кровоточивости, агранулоцитоза, головных болей, головокружения, дисфункции печени, некоторые из них вызывают диарею, тромбоцитопению, нейтропению. При применении их необходим постоянный контроль за кровью, определение лейкоцитарной формулы.

Исследуемый препарат «Витанам» выгодно отличается от указанных выше препаратов тем, что имеет выраженное дезагрегирующее действие и не имеет побочных действий.

Таблица 2.

Исследование препарата «Витанам» на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов крыс при пероральном введении препарата (*in vivo*)

кол-во вещества	% падения оптической плотности плазмы, обогащенной тромбоцитами *in vivo*			
	контроль	30 мин	60 мин	120 мин
10 мг per os	56,2	48,7 (14%)	39,6 (30%)	46,5 (20%)
10 мг per os	53,4	40,5 (23%)	36,0 (34%)	50,6 (6%)
плазма крыс со стептоз. диабетом	60,7±1,8	50,1 (18%)	29,8 (50%)	54,2 (11%)

Таблица 3.

Исследование препарата «Витанам» на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов крыс при пероральном введении препарата (*in vitro*)

	АДФ – 10^{-5} М	10 мг/мл	20 мг/мл	
		10^{-3} М	10^{-3} М	10^{-4} М
плазма нормальных крыс	49,5	–	38,0 (24%)	41,9 (8%)
плазма крыс со стептоз. диабетом	60,7	56,2 (8%)	28,0 (54%)	49,5 (19%)
плазма кролика (контроль)	61,2	60,0 (0%)	57,5 (7%)	60,8 (0%)
плазма кролика с аллоксановым диабетом	57,0	50,0 (14%)	32,6 (43%)	48,1 (15%)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно сделать заключение, что примененный на модели развития ДВС-синдрома препарат «Витанам» оказывает выраженное дезагрегирующее действие и не имеет побочных эффектов, что является новым шагом в разработке отечественных препаратов для терапии таких социально значимых заболеваний, как диабет 2 типа и ДВС-синдром, а также в понимании биохимических путей нормализации гемостаза.

Работа выполнена в рамках Программы 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. А.С. Аметов, И.О. Курочкин, А.А. Зубков. Сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания // Русский медицинский журнал. 2014. № 13. С. 954–960.
2. American Diabetes Association: Standards of medical care in diabetes-2007. Diabetes Care. 2007. V. 30. P. 4–41.
3. Diseases and Conditions. Diabetic neuropathy. 2015, Mayo Clinic.
4. Diseases and Conditions. Diabetic retinopathy. 2015, Mayo Clinic.
5. M. Diamant, R. Nieuwland, R.F. Pablo, A.W.A. Smit, K. Radder. Elevated Numbers of Tissue-Factor Exposing Microparticles Correlate With Components of the Metabolic Syndrome in Uncomplicated Type 2 Diabetes Mellitus // Circulation. 2002. V. 106. P. 2442–2447.

sotax
Solutions for Pharmaceutical Testing

стр. 366

ЛУЧШИЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА "РАСТВОРЕНИЕ" ПО МЕТОДАМ **USP 1, 2, 5, 6** НА БАЗЕ SOTAX

Ручная система растворения AT

- Простой ручной отбор образцов с использованием стеклянной пипетки.
- Стационарный автоматический пробоотборник
- Отдельно стоящий модуль отбора проб с направляющими для пипеток.
- Стационарный или ручные канюли
- Автоматический отбор проб с помощью уникальной технологии HollowShaft™ через полый вал мешалки

Полуавтоматическая версия (один инструмент)

- Оффлайн конфигурация с коллектором фракций
- UV-Vis Online конфигурация системы со спектрофотометром
- UV-Vis On/Offline системы
- HPLC Online системы с интеграцией хроматографа в систему растворения
- HPLC On/Offline системы с интеграцией хроматографа и коллектором фракций для сбора и хранения образцов

Двойная полуавтоматическая версия (два тестера растворения)

- Double Offline конфигурация двойной системы растворения с коллектором фракций
- Double UV-Vis Online конфигурация двойной системы со спектрофотометром
- Double UV-Vis On/Offline системы

Полностью автоматическая система растворения

- Offline конфигурация с коллектором образцов
- UV-Vis Online конфигурация с подключением к спектрофотометру и получением результатов в режиме реального времени
- UV-Vis On/Offline конфигурация с подключением к спектрофотометру и коллектору фракций

Полуавтоматическая система CE7

Проведение испытаний на растворение по методу «проточная ячейка» (USP 4)

- Возможность работы с объемами среды растворения от 15 до 4000 мл
- Возможность автоматической смены среды для изменения pH в ходе испытания
- Различные типы ячеек для таблеток, капсул, порошков, гранул, имплантов и суппозиториев

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

УДК 615.2

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА «ВИТАНАМ»

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

Резюме. В работе показано влияние нового препарата «Витанам» – селективного активатора Ca-зависимой NO-синтазы на процессы Т- и В-клеточного иммунитета у лабораторных животных. «Витанам» является иммуномодулятором широкого спектра действия, причем эффект препарата проявляется и при его пероральном введении.

Ключевые слова: Т- и В-клеточный иммунитет, Ca-зависимая NO-синтаза, «Витанам».

THE STUDY OF IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF THE VITANAM

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

Abstract. In the present paper some immunological effects on T- and B-cell immunity of a new drug Vitanam – selective activator of Ca-dependent NO-synthase were shown on the animal model.

Keywords: T- and B-cell immunity, Ca-dependent NO-synthase, Vitanam.

1 – ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН), 115093, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

2 – ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), 142290, Россия, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 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., Pushchino, Moscow region, 142290, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних двух десятилетий оксид азота (NO) был признан одним из самых универсальных игроков в иммунной системе. Ca^{2+}-зависимая NO-синтаза (NOS) участвует в патогенезе и борьбе с инфекционными заболеваниями, опухолями, аутоиммунными процессами и хроническими дегенеративными заболеваниями. Рядом исследователей было показано, что Ca^{2+}-зависимой NOS принадлежит важная роль в регуляции многих иммунных процессов в организме человека и животных [1–2]. Препарат «Витанам» является селективным активатором Ca^{2+}-зависимой NOS. В связи с этим представляло большой интерес изучение влияния полученного препарата на отдельные звенья системы иммунитета, в частности на системы Т- и В-лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение влияния нуклеотидного препарата на систему иммунитета проведено по стандартам и руководствам GLP на мышах линий СВА, BALB/c, $C_{57}Bl_6$ (самцы и самки, масса тела 16–18 г) и крысах, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА и лимфоцитах донорской крови человека.

Мышей содержали в клетках T_3, крыс – в клетках T_4 по 6–10 особей в клетке при температуре 22±3 °С и относительной влажности 60±10%. Освещение искусственное, продолжительность светлого и темного периодов 12 ч. В помещении поддерживался 12-кратный воздухообмен, животные имели свободный доступ к стандартному гранулированному корму и к питьевой воде. Все животные получали стандартный комбикорм К-122, изготовленный НПО «Сельскохозяйственные технологии», состав, пищевая ценность, содержание витаминов и микроэлементов которого указаны в таблице 1.

Комбикорм сбалансирован по аминокислотному составу, минеральным веществам, витаминам, изготовлен из высококачественных компонентов.

Содержание витаминов и микроэлементов в 1 кг комбикорма в мг: А – 7,00 тыс. МЕ, В12 – 0,02, В2 – 3,00, В3 – 20,00, В4 – 292,00, В5 – 20,00, В6 – 4,00, Е – 5,00, Н – 0,10, К3 – 1,00, Cu – 2,5, Fe – 10, J – 0,7, Mn – 70, Zn – 70. (сертификат соответствия № РОСС RU. П081. ВОО113 ГОСТ 50258-92)

Для проведения экспериментов *in vitro* использовали следующие питательные среды: среда А – для отмывания клеток – 199 или «Игла» с добавлением 10% инактивированной (560 °С, 30 мин) фетальной оленьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина.

Таблица 1.

Состав и показатели качества гранулированного корма К-122 для мелких лабораторных животных

В состав корма входят	%	Показатели качества	%
Овес	5	Сырой протеин	17,3
Кукуруза, ячмень	12,1		
Пшеница	14,2		
Шрот подсолчечниковый	7,6	Обменная энергия	247,0 ккал
Отруби пшеничные	15	Сырая клетчатка	9,95
Дрожжи кормовые	2,9	Сырой жир	2,78
Травяная мука 1 класса	27	Ca	0,75
Соль поваренная	0,3	P	0,51
Премикс минерально-витаминный	1	Натрий хлористый	0,54
Мука рыбная	2,8	Лизин	0,75
Мел кормовой	1,6	Мет. + Цист.	0,54

Среда Б для культивирования лимфоцитов в функциональных тестах – среда RPMI-1640, содержащая 5% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ глутамина, $5x10^{-5}$ М 2-меркаптоэтанола и 50 мкг/мл гентамицина.

Среда В для культивирования клеток К 562 (клетки-мишени для естественных киллеров) *in vitro* – среда RPMI-1640, содержащая 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ глутамина и 50 мкг/мл гентамицина.

Для работы с клетками лимфоидных органов *in vitro* животных забивали цервикальной дислокацией, асептически выделяли селезенку или тимус, клетки получали продавливанием через двойную нейлоновую сетку в среде А с последующим отстаиванием в течение 3–5 мин при 4 °С и 3-кратным отмыванием и центрифугированием в среде А. После чего клетки ресуспендировали в среде Б и доводили до необходимых конечных разведений.

При изучении влияния нуклеотидного препарата на ***В-клеточное звено иммунитета*** определяли титры агглютининов к эритроцитам барана в сыворотке крови мышей в тесте прямой гемагглютинации по методу Г.П. Кудриной с соавт. [3], количество антителообразующих клеток в селезенке мышей, иммунизированных эритроцитами барана, определяли по методу Ерне [4], влияние препарата на реакцию бласттрансформации В-лимфоцитов в ответ на стимуляцию липополисахаридом исследовали по методу Б.Б. Фукса и соавт. [5].

Исследование влияния нуклеотидного препарата на титр агглютининов к эритроцитам барана в сыворотке крови в ***тесте прямой гемагглютинации*** выполнено на двух оппозитно реагирующих на эритроциты барана линиях мышей $C_{57}BL_6$ (низкоотвечающие) и СВА (высокоотвечающие). Мышей иммунизировали внутрибрюшинным введением суспензии эритроцитов барана (ЭБ) в субоптимальной дозе 3×10^7 клеток. Подопытным животным одновременно с иммунизацией однократно внутрибрюшинно или 3-кратно в желудок в последующие дни вводили нуклеотидный препарат в дозах 5 и 10 мг/кг.

На 7-е сутки после иммунизации получали сыворотку крови мышей, которую после инактивации комплемента прогреванием при 56 °С в течение 30 мин использовали для определения титра агглютининов (наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается отчетливая агглютинация ЭБ). Определение титра гемагглютининов проводили в лунках микропланшетов для иммунологических реакций методом последующих разведений перед добавлением ЭБ и последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Титры агглютининов к ЭБ выражали величиной $\log_2 T$, где Т – титр антител исследуемой сыворотки [3].

Для определения влияния нуклеотидного препарата на ***количество антителообразующих клеток*** в селезенке мышей СВА и $C_{57}BL_6$, иммунизированных ЭБ, использовали прямой метод локального гемолиза в агаровом геле по методу Ерне [4]. Мышей иммунизировали внутривенным введением ЭБ, отмытых в стерильном физиологическом растворе в субоптимальной иммуногенной дозе 3×10^7 клеток/мышь. Мышам однократно в день иммунизации внутрибрюшинно или 3-кратно в желудок в последующие дни вводили нуклеотидный препарат в дозах 5 и 10 мг/кг соответственно. На 4-е сутки после иммунизаци определяли число АОК в селезенке по методу Ерне. Для этого суспензию клеток селезенки мышей отмывали средой А и смешивали с ЭБ в расплавленном и охлажденном до температуры 40 °С агаре в следующей пропорции: $1x10^6$ клеток в 200 мкл среды Б и 0,15 мл 25% суспензии отмытых ЭБ добавляли к 4 мл 0,75% агара, растворенного на среде Б. Полученную смесь немедленно разливали по чашкам Петри, на которые предварительно наносили равномерный слой 1,5% агара на среде Б. Чашки Петри помещали на 2 ч в термостат при 370 °С. В качестве источника комплемента использовали лиофилизированную сыворотку морских свинок, которую разводили физиологическим раствором (1:5) и добавляли еще на 40 мин. По завершении инкубации подсчитывали число гемолитических бляшек. Число АОК пересчитывали на 1 селезенку и на $1x10^6$ спленоцитов.

Изучение влияния нуклеотидного препарата на ***бласттрансформацию В-лимфоцитов селезенки***, индуцируемую липополисахаридом (LPS), проводили по методу Б.Б. Фукса и соавт. [5] на мышах линии

СВА, которым внутрибрюшинно вводили исследуемый препарат в дозах 10 и 100 мкг/кг. Клетки выделяли аналогично методу при определении АОК. В ячейки круглодонных 96-луночных микропанелей вносили по 100 мкл суспензии клеток селезенки мышей СВА в концентрации $2x10^6$/мл и 100мкл LPS («Дифко», США) в концентрациях 1,0; 5,0; 10 и 20 мкг/мл. Каждую концентрацию митогена и препарата исследовали в трех параллельных опытах. Инкубацию проводили 72 ч при 370 °С в атмосфере 5% CO_2. За 18 ч до окончания инкубации в лунки вносили по 1 мкКu ^{3}Н-тимидина (Amersham, США) (уд. акт. 24 Ku/мМ) в объеме 10 мкл. По окончанию инкубации клетки собирали на стекловолокнистые фильтры с помощью 12-канального харвестера, отмывали 0,15 М NaCl, 5% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и 96% этанолом. Высушенные фильтры помещали во флаконы с 5 мл сцинтилляционной жидкости (5 г 2,5-дифенил-оксазолана 100 мг 1,4-бис(2,5-фенил-оксазолил)бензола на 1 л сцинтилляционного толуола). Образцы просчитывали на сцинтилляционном β-счетчике [Tri-Carb B2810TR (Perkin Elmer, США)]. Результаты выражали в имп/мин.

Для оценки влияния нуклеотидного препарата на ***Т-клеточное звено*** иммунитета использовали реакцию ***гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)*** по методу Е.Ю. Гусева и соавт. [6] и метод поликлональной активации Т-лимфоцитов фитогемагглютинином и конканавалином А по методу Б.Б. Фукса и соавт. [5]. Исследования выполнены на мышах линии СВА (самцы, масса тела 18–20 г), которых иммунизировали подкожным введением в межлопаточную область эритроцитов барана в дозе $1×10^7$ клеток/мышь. Мышам подопытных групп в день иммунизации внутрибрюшинно вводили 5 и 10 мг препарата в 25 мкл стерильного изотонического раствора NaCl. Контрольные животные в этот же срок получали соответствуюшие количества физиологического раствора.

Для проявления реакции ГЗТ на 7-е сутки животным субплантарно в левую заднюю лапу вводили разрешающую инъекцию ЭБ в дозе $1x10^8$ клеток/мышь. В контрлатеральную лапу вводили изотонический раствор NaCl в объеме 50 мкл. Местную воспалительную реакцию оценивали через 24 ч по разнице массы опытной (Ро) и контрольной (Рк) лап.

При исследовании влияния нуклеотидного препарата на ***поликлональную активацию Т-лимфоцитов, индуцированную фитогемагглютинином (ФГА) и конканавалином А (КонА)***, использовали суспензию клеток селезенки мышей СВА. Нуклеотидный препарат в изучаемых дозах вводили мышам внутрибрюшинно 3 раза через каждые 2 дня. Контрольной группе животных вводили среду 199 при тех же условиях в объемах, соответствующих объемам вводимого препарата. На 8-е сутки после последнего введения нуклеотидного препарата мышей забивали и извлекали селезенку, которую гомогенизировали в среде А. Клетки центрифугировали 5 мин при 200 г 3 раза. К осадку клеток добавляли 2 мл среды В. В качестве митогенов использовали ФГА и КонА в концентрациях 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1.0; 2,5; 5; 10 и 20 мкг/мл и ФГА-Р («Серва», ФРГ) – 0,1; 1,0; 10 и 50 мкг/мл. Реакцию проводили в 96-луночных круглодонных планшетах. Культивирование проводили в объеме 200 мкл (100 мкл ФГА и КонА + 100 мкл взвеси клеток $2,5x10^6$ клеток/мл) в CO_2-инкубаторе (5% CO_2) в течение 72 ч. В контроле ставили реакцию на спонтанную пролиферацию клеток селезенки без митогена. Пролиферацию и бласттрансформацию Т-лимфоцитов оценивали по количеству меченого ^{3}Н-тимидина (Amersham, США), включенного в ДНК лимфоцитов. Результаты выражали в имп/мин.

Изучение влияния нуклеотидного препарата на ***продукцию ИЛ-2 клетками селезенки мышей BALB/c, стимулированными КонА***. По 1 мл суспензии спленоцитов мышей в среде Б ($5x10^6$ клеток/мл), 5 мкг/мл КонА и препарата в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл вносили в ячейки 24-луночных панелей и инкубировали 24 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO_2. По окончании инкубации отбирали надосадки, которые хранили при –20 °С. В качестве индикаторных клеток для тестирования активности ИЛ-2 использовали 96-часовые Т-клеточные бласты мышей BALB/c, активированные в тех же условиях, при которых получали ИЛ-2. Клетки до тестирования дважды отмывали средой А с α-метил-Д-маннозидом (20 мг/мл) и переводили в свежую среду Б. Готовили двойные разведения ИЛ-2 в плоскодонных 96-луночных панелях в объеме 100 мкл. Затем в лунки добавляли равный объем суспензии Т-бластов ($0,65x10^6$/мл). Через 14 ч инкубации в лунки вносили ^{3}Н-тимидин в объеме 10 мкл. Затем через 4 ч инкубации клетки осаждали на стекловолокнистые фильтры, отмывали физраствором, преципитировали 5% ТХУ и обрабатывали 96-метанолом. Радиоактивность проб определяли на β-счетчике, результаты выражали в условных единицах активности ИЛ-2 [7].

Оценку влияния нуклеотидного препарата на продукцию ***ИЛ-2 лимфоцитами периферической крови человека, стимулированными ФГА***, проводили по методу M. Lyte [8]. 100 мкл гепаринизированной венозной донорской крови вносили в ячейки 24-луночных панелей и добавляли 90 мкл среды Б, содержащей 20 мкг ФГА и нуклеотидный препарат в конечных концентрациях 10, 50 или 100 мкг/мл. Клетки инкубировали 48 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO_2. По окончании инкубации отбирали надосадки и хранили при –20 °С. Последующее тестирование активности ИЛ-2 проводили на Т-бластах мышей BALB/c в соответствии с описанными выше методическими приемами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния комплексного препарата «Витанам» на В-клеточное звено иммунитета

Лекарственные препараты или химические вещества, обладающие иммуномодулирующей активностью, могут оказывать прямое действие на В-лимфоциты, амплифицируя антигенный сигнал или повышая чувствительность рецепторов к воздействию регуляторных клеток. Иммуномодулирующее действие может проявляться также опосредованно через воздействие препаратов на регуляторные клетки. Интактный В-лимфоцит через антигенспецифический рецепторный комплекс распознает антиген, процессирует его, представляет Т-хелперу типа 2 (Т-зависимый ответ) и в результате информационного межклеточного обмена через продукцию и рецепцию растворимых и мембраноассоциированных медиаторов получает импульс к выработке антител [9]. Поэтому для оценки влияния изучаемых препаратов на В-клеточное звено иммунитета наиболее информативным показателем является исследование продукции антител. Данная интегральная характеристика отражает процессы пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов и состояние регуляторных механизмов, ответственных за эти процессы [9].

В этой связи основной задачей при изучении влияния «Витанамна» В-клеточное звено иммунитета являлась оценка его действия на продукцию антител в тестах прямой гемагглютинации [3] и локального гемолиза в агаровом геле по Ерне [4].

Важной характеристикой функциональной активности В-лимфоцитов является их способность к поликлональному ответу на В-клеточный митоген – бактериальный липополисахарид (LPS). Так как ответ на LPS является Т-независимым, эффект изучаемого препарата, обладающего иммуномодулирующим действием, может означать его непосредственное влияние на В-лимфоциты либо опосредованное действие через регуляторные клетки, не являющиеся Т-лимфоцитами (например, макрофаги).

Влияние препарата «Витанам» на титр агглютининов к эритроцитам барана в сыворотке крови в тесте прямой гемагглютинации

Тест основан на способности антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, агглютинировать эритроциты барана (ЭБ), используемые в качестве антигена.

Исследования выполнены на 40 мышах линии СВА и 40 мышах линии $C_{57}BL_6$ (самцы, масса тела 18–20 г), разделенных на 4 группы по 10 мышей СВА и 10 мышей $C_{57}BL_6$ в каждой. Титры гемагглютининов определяли у двух оппозитно реагирующих на эритроциты барана линий мышей, $C_{57}BL_6$ (низкоотвечающие) и СВА (высокоотвечающие). Мышей иммунизировали внутрибрюшинным введением суспензии эритроцитов барана (ЭБ) в субоптимальной дозе $3x10^7$ клеток. Животным 2-й и 3-й групп одновременно с иммунизацией внутрибрюшинно вводили «Витанам» в дозах 5 и 10 мг/кг. Мыши 4-й группы на фоне иммунизации ЭБ получали 3-кратно в желудок (в день иммунизации и в два последующих дня) изучаемый препарат в дозе 5 мг/кг. Животные 1-й группы не получали «Витанам» и служили контролем. На 7-е сутки после иммунизации получали сыворотку крови мышей, которую для инактивации комплемента прогревали при 560 °С в течение 30 мин. Для определения титра агглютининов (наибольшее разведение сыворотки, при котором наблюдается отчетливая агглютинация ЭБ) в лунки микропланшетов для иммунологических реакций вносили по 50 мкл 0,15 М NaCl. В первую лунку добавляли 50 мкл сыворотки крови, перемешивали пипеточным дозатором и переносили по 50 мкл из одной лунки в другую. В каждую лунку добавляли по 25 мкл 1% суспензии ЭБ. Планшеты встряхивали и инкубировали при комнатной температуре 2,5 ч, после чего просматривали результаты реакции гемагглютинации. Титры агглютининов к ЭБ выражали величиной $\log_2 T$, где Т – титр антител исследуемой сыворотки [3].

Таблица 2.

Влияние препарата «Витанам» на титр гемагглютининов ($\log_2 T$) к эритроцитам барана в сыворотке крови мышей линий СВА и $C_{57}BL_6$ при иммунизации эритроцитами барана в субоптимальной дозе

Группы	Доза и способ введения препарата «Витанам»	Линии мышей	
		СВА	$C_{57}BL_6$
		$\log_2 T$	$\log_2 T$
1	контроль	3,80±0,41	3,50±0,55
2	в/б однократно 5 мг/кг	4,50±0,42	3.67±0,65
3	в/б однократно 10 мг/кг	4,67±0,62	4,33±0,36*
4	в/ж трехкратно 5 мг/кг	4,67±0,65	3,83±0,76

Результаты проведенных исследований показали, что «Витанам» усиливает продукцию антиэритроцитарных антител на субоптимальную дозу ЭБ во всех используемых дозах и способах введения у мышей СВА и при в/б разовой инъекции в дозе 10 мг у мышей $C_{57}BL_6$ (таблица 2). При ответе на субоптимальную дозу антигена «Витанам» усиливает антителогенез, но титры гемагглютининов не достигают уровня, регистрируемого при иммунизации оптимальной дозой ЭБ.

Влияние препарата «Витанам» на количество антителообразующих клеток в селезенке мышей, иммунизированных эритроцитами барана

Прямой метод локального гемолиза, основанный на способности антиэритроцитарных антител в присутствии комплемента лизировать эритроциты барана в агаровом геле с образованием зон гемолиза вокруг антителообразующих клеток (АОК), был предложен [4] для оценки влияния препаратов и химических веществ на иммунный ответ.

Иследования выполнены на 32 мышах линии СВА и 32 мышах линии С57BL6 (самцы, масса тела 18–20 г), которые были разделены на 4 группы по 8 мышей СВА и $C_{57}BL_6$ в каждой. Мышей иммунизировали внутривенным введением ЭБ, отмытых в стерильном физиологическом растворе в субоптимальной иммуногенной дозе 3×10^7 клеток/мышь. Мышам 2-й и 3-й групп внутрибрюшинно вводили «Витанам» в дозах 5 и 10 мг/кг соответственно. Мыши 4-й группы на фоне иммунизации ЭБ получали 3-кратно в желудок препарат в дозе 5 мг/кг (в день иммунизации и в 2 последующих дня), животные 1-й группы внутрибрюшинно получали физиологический раствор и служили контролем. На 4-е сутки после иммунизаци определяли число АОК в селезенке по методу Ерне.

Как видно из таблицы 14, под влиянием «Витанам» при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/кг и при 3-кратном введении в желудок в дозе 5 мг/кг мышам двух использованных линий наблюдается усиление иммунного ответа на эритроциты барана и увеличение количества АОК.

Таблица 3.

Влияние препарата «Витанам» на количесткво антителообразующих клеток (АОК) у мышей линий СВА и $C_{57}BL_6$, иммунизированных ЭБ (представлены средние геометрические и доверительные интервалы)

Группы животных, испытанные дозы препарата и способ введения	Количество АОК на селезенку мышей линий СВА и $C_{57}BL_6$, 1×10^4	
	СВА	$C_{57}BL_6$
1. Группа – контроль (физиологический раствор)	5,81 (4,51÷7,12)	2,78 (1,90÷3,67)
2. Группа – нуклеотидный препарат в/б 5 мг/кг	5,12 (3,91÷7,02)	2,51 (2,24÷2,77)
3. Группа – нуклеотидный препарат в/б 10 мг/кг	9,18 (7,86÷10,51)**	7,35 (6,25÷8,45)**
4. Группа – нуклеотидный препарат в/ж 3-кратно 5 мг/кг	7,07 (5,60÷8,53)*	6,03 (4,90÷7,15)**

В наименьшей из испытанных доз – 5 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении мышам препарата «Витанам» не оказывал иммуностимулирующего действия при иммунизации животных эритроцитами барана.

Влияние препарата «Витанам» на бласттрансформацию В-лимфоцитов селезенки, индуцируемую липополисахаридом

Ранее было отмечено, что важной характеристикой функциональной активности В-лимфоцитов является их способность к поликлональному ответу на селективный В-клеточный митоген – бактериальный липополисахарид (LPS). Если изучаемый препарат оказывает влияние на бласттрансформацию В-лимфоцитов при стимуляции LPS, то этот эффект обусловлен непосредственным влиянием на регуляторные клетки, которые не являются Т-лимфоцитами.

Иследования выполнены на 32 мышах линии СВА (самцы, масса тела 18–20), которые были разделены на 4 группы по 8 мышей в каждой. Определение проводили по методу Б.Б. Фукса и соавт. [5].

В результате проведенных исследований установлено, что «Витанам» в диапазоне испытанных концентраций 1–100 мкг/мл не влияет на индукцию бактериальным липополисахаридом бласттрансформации В-лимфоцитов селезенки мышей линии СВА. Следовательно, «Витанам» не оказывает прямого иммуномодулирующего влияния на В-лимфоциты при поликлональной стимуляции липополисахаридом и выявленное его стимулирование гуморального иммунитета (увеличение титра гемагглютининов и числа АОК) свидетельствует об опосредованных механизмах действия препарата на В-лимфоциты через модификацию регуляторных клеток звеньев иммунитета.

Отсутствие прямого иммуномодулирующего влияния на В-лимфоциты при поликлональной стимуляции липополисахаридом может также быть связано с тем, что Витанам является селективным активатором Ca^{2+}-зависимой NO-синтазы, а LPS, как было показано O. Xie с соавт. [10], является индуктором экспрессии iNOS, которая не является конститутивно экспрессируемой в большинстве тканей и органов и индуцируется посредством индукции LPS промотора – бактериальной хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT).

Исследование влияния препарата «Витанам» на Т-клеточное звено иммунитета

Т-лимфоцитам принадлежит роль координатора функций гуморального и клеточного иммунитета, а также непосредственного участника реакций клеточного иммунитета [11]. При анализе иммуномодулирующего действия препарата «Витанам» на В-лимфоциты (гуморальный иммунный ответ) были получены косвенные доказательства участия Т-клеток в реализации эффектов изучаемого препарата на систему иммунитета.

Т-лимфоциты – функционально гетерогенная популяция. В ее состав входят клетки, выполняющие вспомогательную (Т-хелперы типов 0; 1 и 2); супрес-

сорную (Т-супрессоры) и цитотоксическую (Т-киллеры) функции. Т-лимфоциты при антигенной стимуляции продуцируют широкий спектр цитокинов и могут находиться под ауто- и паракринным влиянием данных факторов, а также через продукцию этих медиаторов влиять на другие типы клеток иммунной системы. На поверхности Т-лимфоцитов представлены рецепторы для цитокинов и других сигнальных молекул, воспринимающих информацию от других клеток иммунной системы.

В связи с этим представляется целесообразным оценить влияние препарата «Витанам» на функциональную активность суммарной популяции Т-лимфоцитов *in vitro* (поликлональная активация Т-клеточными митогенами), а также на отдельные субпопуляции Т-лимфоцитов: эффекторы гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) (Т-хелперы типа 1) и Т-клетки – продуценты интерлейкина-2 (преимущественно Т-хелперы типов 0, 1 и 2).

Влияние препарата «Витанам» на поликлональную активацию, индуцируемую Т-клеточными митогенами – фитогемагглютинином и конканавалином А

Оценку влияния препарата «Витанам» на бласттрансформацию Т-лимфоцитов проводили по методу Б.Б. Фукса и соавт. [5]. Принцип этого метода состоит в том, что под воздействием митогенов фитогемагглютинина (ФГА) и конканавалина А (Кон А) происходит поликлональная активация Т-лимфоцитов, на которую могут влиять изучаемые лекарственные препараты и химические вещества, изменяя при этом функциональное состояние (иммунореактивность) Т-лимфоцитов.

Исследования выполнены на 24 мышах линии СВА (самцы, масса тела 18–20 г), которые были разделены на 3 группы по 8 мышей в каждой. «Витанам» в изучаемых дозах 10 и 100 мг/кг вводили мышам внутрибрюшинно 3 раза через каждые 2 дня. Контрольной группе животных вводили среду 199 при тех же условиях в объемах, соответствующих объемам вводимого препарата. На 8-е сутки после последнего введения преарата «Витанам» мышей забивали и извлекали селезенку, которую гомогенизировали в среде А. Клетки центрифугировали 5 мин при 200 г 3 раза. К осадку клеток добавляли 2 мл среды В. В качестве митогенов использовали ФГА и КонА («Серва», Германия) в концентрациях 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1.0; 2,5; 5; 10 и 20 мкг/мл и 0,1; 1,0; 10 и 50 мкг/мл соответственно. Реакцию проводили в 96-луночных круглодонных планшетах. Культивирование проводили в объеме 200 мкл (100 мкл ФГА и КонА + 100 мкл взвеси клеток $2{,}5x10^6$ клеток/мл) в CO_2-инкубаторе (5% CO_2) в течение 72 ч. В контроле ставили реакцию на спонтанную пролиферацию клеток селезенки без митогена. Пролиферацию и бласттрансформацию Т-лимфоцитов оценивали по количеству меченого ^{3}Н-тимидина (Amersham, США), включенного в ДНК лимфоцитов. Результаты выражали в имп/мин.

Как видно из рисунка 1, «Витанам» в дозе 100 мкг/мл усиливает пролиферативный ответ Т-лимфоцитов, индуцируемый ФГА в дозах 1 и 10 мкг/мл. «Витанам» в дозе 10 мкг/мл усиливает пролиферацию Т-лимфоцитов на ФГА в концентрации 10 мкг/мл.

На основании результатов, представленных на рисунке 2, можно заключить, что «Витанам» оказывает резко выраженное нейтрализующее действие на активность КонА, что выражается в пропорциональном смещении кривых «доза – ответ». Препарат дозозависимо усиливает ответ Т-лимфоцитов на высокие дозы КонА (2,5–20,0 мкг/мл) и угнетает ответ на малые (0,06–0,5 мкг/мл) и оптимальную (1,0 мкг/мл) дозы митогена.

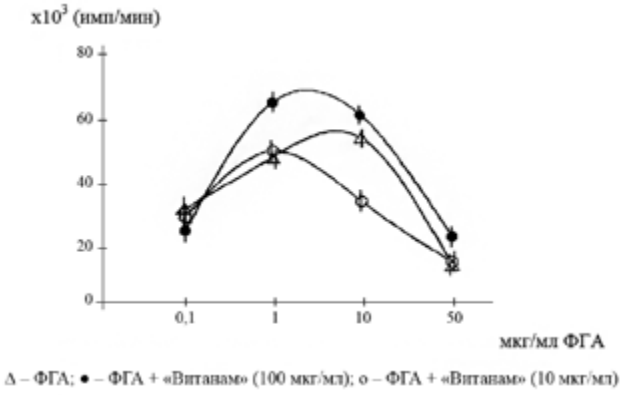


Рисунок 1. Влияние препарата «Витанам» на пролиферацию Т-лимфоцитов селезенки мышей СВА, индуцируемую ФГА

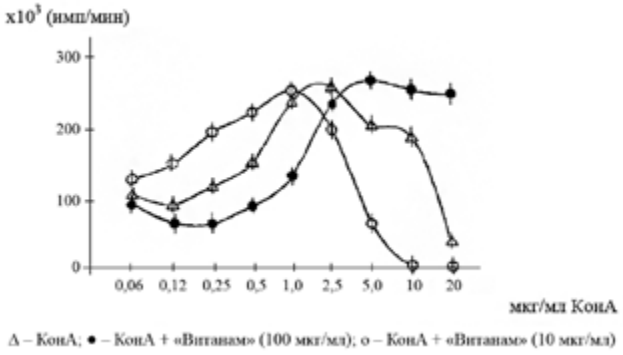


Рисунок 2. Влияние препарата «Витанам» на пролиферацию Т-лимфоцитов селезенки мышей СВА, индуцируемую КонА

Влияние нуклеотидного препаратана на реакцию гиперчувствительности замедленного типа

Реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) – иммунная воспалительная реакция, характеризующаяся относительно медленным развитием и инфильтрацией межуточной ткани лейкоцитами, с преобладанием Т-лимфоцитов. Морфологические проявления реакции (отек, индурация и т.д.) обусловлены продукцией широкого спектра цитокинов, вырабатываемых Т-лимфоцитами и нелимфоидными

вспомогательными клетками, инфильтрирующими пораженную ткань [12].

ГЗТ – антигенспецифическая реакция, главную роль в которой играют Т-хелперы типа 1, стимулирующие созревание предшественников Т-эффекторов ГЗТ. В регуляцию ГЗТ вовлечены Т-супрессоры нескольких типов. Модельная система ГЗТ позволяет получить данные об интегральной функции Т-лимфоцитов в классической системе Т-клеточного иммунитета [13].

Исследования выполнены на 30 мышах линии СВА (самцы, масса тела 18–20 г), которые были разделены на 3 группы по 10 животных в каждой. Мышей иммунизировали подкожным введением в межлопаточную область эритроцитов барана в дозе 1×10^7 клеток/мышь. Мышам 2-й и 3-й групп в день иммунизации внутрибрюшинно вводили «Витанам» в дозах 5 и 10 мг/кг. Контрольные мыши 1-й группы получали внутрибрюшинно соответствующие количества физиологического раствора, использованного для растворения препарата. На 5-е сутки после иммунизации все животные получали субплантарно в левую заднюю лапу разрешающую инъекцию ЭБ в дозе 1×10^7 клеток/мышь в объеме 50 мкл. В подушечку контрлатеральной лапы (контрольная лапа) инъецировали 50 мкл стерильного физиологического раствора. Результаты реакции регистрировали через 24 ч по соотношению величины отека стоп опытной и контрольной лап, который определяли с помощью микрометра. Разница в объеме опытной и контрольной лап характеризовала величину отека и интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа. Индекс реакции (И) вычисляли по формуле:

$$И = ((P_0 - P_к)/ P_к)\times100,$$

где P_0 и $P_к$ – объемы опытной и контрольной лап.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Влияние препарата «Витанам» при внутрибрюшинном введении мышам линии СВА на развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа

Группы животных, испытуемая доза препарата	Индекс реакции
1 группа – контроль	33,3±6,1
2 группа – «Витанам», 5 мг/кг	26,4±6,9
3 группа – «Витанам», 10 мг/кг	26,9±5,9

Данные таблицы 4 свидетельствуют о том, что «Витанам» в испытанных дозах 5 и 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении мышам линии СВА несколько угнетает реакцию ГЗТ, индуцированную ЭБ. Однако этот эффект был слабовыраженным, и показатели индекса реакции у 2-й и 3-й групп, получавших «Витанам» в дозах 5 и 10 мг/кг, статистически достоверно не отличались от показателей контрольной группы.

Влияние препарата «Витанам» на продукцию интерлейкина-2 спленоцитами мышей линии BALB/c, стимулированными конканавалином А

Продукция интерлейкина-2 (ИЛ-2) является одним из основных показателей функциональной активности Т-клеток, а именно Т-хелперов. ИЛ-2 служит медиатором межклеточных взаимодействий гликопротеидной природы. Его участие необходимо для выработки антител и развития иммунного ответа, реакций клеточного иммунитета, пролиферации, Т- и В-лимфоцитов, генерирования лимфокинактивированных киллеров и усиления активности клеток, опосредующих естественную противоопухолевую резистентность организма.

Исследование продукции ИЛ-2 проводили по методу A. Reske-Kunz et al. [14]. Продуцентами ИЛ-2 являлись клетки селезенки мышей линии BALB/c, которым вводили «Витанам» в дозах 10, 50 и 100 мг/кг внутрибрюшинно 3 раза через каждые 2 дня. Контрольной группе животных вводили среду 199 при тех же условиях в объемах, соответствующих объемам вводимого препарата. На 8-е сутки после последнего введения препарата «Витанам» мышей забивали и извлекали селезенку, которую гомогенизировали (см. раздел «Материалы и методы»).

Для индукции ИЛ-2 использовали клетки селезенки мышей BALB/c, стимулированные КонА в присутствии препарата «Витанам» или без него (таблица 5).

Таблица 5.

Влияние препарата «Витанам» на продукцию ИЛ-2 клетками селезенки мышей $BALB_c$, стимулированными КонА

Группы животных, испытуемые препараты и дозы	Уровень выработки ИЛ-2, или ^{3}H-тимидина в мин
1 группа – КонА	9,45±4,40
2 группа – «Витанам», 10 мг/кг	Менее 1
3 группа – «Витанам», 50 мг/кг	Менее 1
4 группа – «Витанам», 100 мг/кг	Менее 1
3 группа – КонА + «Витанам», 10 мг/кг	9,49±4,31
3 группа – КонА + «Витанам», 50 мг/кг	7,00±3,83
3 группа – КонА + «Витанам», 100 мг/кг	5,31±2,31

Из приведенных в таблице 5 данных следует, что «Витанам» дозозависимо угнетает индуцируемую КонА продукцию ИЛ-2 клетками селезенки мышей BALB/c.

Влияние препарата «Витанам» на продукцию ИЛ-2 лимфоцитами периферической крови человека, стимулированными фитогемагглютинином

В данном разделе исследований по оценке влияния препарата «Витанам» на выработку ИЛ-2 его продуцентами являлись лимфоциты донорской крови,

стимулированные фитогемагглютинином. Оценку влияния препарата «Витанам» на продукцию ИЛ-2 лимфоцитами периферической крови человека, стимулированными ФГА, проводили по методу M. Lyte [8]. 100 мкл гепаринизированной венозной донорской крови вносили в ячейки 24-луночных панелей и добавляли 90 мкл среды Б, содержащей 20 мкг ФГА и «Витанам» в конечных концентрациях 10, 50 или 100 мкг/мл. Клетки инкубировали 48 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO_2. По окончании инкубации отбирали надосадки и хранили при –20 °С. Последующее тестирование активности ИЛ-2 проводили на Т-бластах мышей BALB/c в соответствии с методическми приемами, описанными в разделе «Материалы и методы».

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Влияние препарата «Витанам» на продукцию ИЛ-2 лимфоцитами донорской крови, стимулированными фитогемагглютинином

Группы, испытуемые препараты и дозы	Уровень выработки ИЛ-2 или ^{3}H-тимидина в мин	
	Донор №1	Донор №2
1 группа – ФГА	6,06	8,03
2 группа – «Витанам», 10 мкг/мл	Менее 1	Менее 1
3 группа – «Витанам», 50 мкг/мл	Менее 1	Менее 1
4 группа – «Витанам», 100 мкг/мл	Менее 1	Менее 1
3 группа ФГА + «Витанам», 10 мкг/мл	5,44	8,80
3 группа ФГА + «Витанам», 50 мкг/мл	5,63	8,96
3 группа ФГА + «Витанам, 100 мкг/мл	5,99	8,10

Из представленных в таблице 6 данных видно, что «Витанам» в испытанных концентрациях и в использованной схеме постановки эксперимента существенно не влияет на продукцию интерлейкина-2 лимфоцитами периферической крови человека, стимулированными фитогемагглютинином.

Результаты проведенных исследований по оценке иммуномодулирующих свойств препарата «Витанам» из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса 14 совпадают с данными различных авторов, изучавших механизмы действия на иммунную систему нуклеината натрия – ближайшего аналога препарата из дрожжей, которые показали, что нуклеинат натрия повышает функциональную активность Т-лимфоцитов [15–16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги изучения иммуномодулирующих свойств комплексного нуклеотидного препарата, полученного из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса 14, можно отметить, что препарат при введении мышам в дозах 5 и 10 мг/кг усиливает гуморальный иммунный ответ на эритроциты барана и подавляет реакцию ГЗТ на этот антиген.

В системе *in vitro* «Витанам» в концентрациях 1–100 мкг/мл не влияет на индуцируемую LPS пролиферацию В-клеток селезенки и модифицирует митогенный ответ Т-клеток на ФГА и КонА.

Таким образом, «Витанам» является иммуномодулятором широкого спектра действия, причем эффект препарата проявляется и при его пероральном введении.

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. A.V. Shmigol, D.A. Eisner, S. Wray. Simultaneous measurements of changes in sarcoplasmic reticulum and cytosolic // Physiology. 2001. V. 531. P. 707–713.
2. N.J. Willmott, K. Wong, A.J. Strong. A fundamental role for the nitric oxide-G-kinase signaling pathway in mediating intercellular Ca- waves in glia // Neurosci. 2000. V. 20. P. 1767–1779.
3. Г.П. Кудрина и др. Метод, рекомендации по оценке иммунотоксических свойств фармакологических средств. – М. 1992.
4. N.K. Jerne, A.A. Nordin. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells // Science. 1963. V. 140. P. 405–411.
5. Б.Б. Фукс, В.В. Хоробрых, А.Ф. Коркин. Методы постановки реакций бласттрансформации в микромодификации // Иммунология. 1983. № 3. С. 76–79.
6. Е.Ю. Гусев и др. Интегративные составляющая кальцийсвязывающих белков. – М.: БЭБиМ, 1991. № 9. С. 271.
7. Г.Т. Сухих и др. Радиометрическое определение ИЛ-2 в препаратах клеток // Докл. АН СССР 1984. Т. 278. № 3. С. 762.
8. M. Lyte. Generation and measurement of interleukin-2, and mitogen levels in cmall volumes of whole blood // J. Clin. Lab. Anal. 1987. P. 83–88.
9. C.D. Myers. Role of B cell antigen processing and presentation in the humoral immune response // FASEB. V. 5. P. 2547–2553.
10. O. Xie, C. Nathan. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation // J. of Leucocyte Biology. 1994. V. 56. P. 576–582.
11. Б. Альбертс, Д. Брей, Д. Льюис, М. Рэфф, К. Робертс, Д. Уотсон. Молекулярная биология клетки. – М.: Мир, 1994. 504 с.
12. Р.В. Петров и др. Метод, материалы по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств. – М. 1984.
13. D.F. Fiorentino, M.W. Bond, T.R. Mosmann. 2 type of mouse T-helper cell.4.TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones // J. of Experimental Medicine. 1989. V. 170. P. 2081–2095.
14. A. Reske-Kunz, H. Osawa, O. Josimovic-Alasevic et al. Soluble interleukin 2 receptor (Tac chain) is not a reliable marker in kidney transplant recipient monitoring // J. Immunol. 1983. V. 138. P. 192–196.
15. А.М. Земсков, В.М. Земсков, А.В. Петров. Роль нуклеината натрия в систем иммунитета // Иммунология. 1984. № 4. С. 76.
16. В.Г. Передерий, А.М. Земсков. Влияние нуклеината натрия на Т-клеточную систему иммунитета // Врач. дело. 1988. № 8. С. 71.

УДК 615.262

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕРГИЗИРУЮЩЕГО И ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ «МАТЕРИАЛ КОЛЛАГЕНОВЫЙ РАССАСЫВАЮЩИЙСЯ КОЛЛОСТ®, ГЕЛЬ» НА ДОКЛИНИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ *IN VIVO*

И.А. Демьяненко[1], Н.В. Калмыкова[1]*, С.В. Мельникова[2], А.В. Третьякова[2], А.И. Марченко[2], Л.В. Михина[2], А.П. Суслов[1]

Резюме. Исследовали аллергизирующее и генотоксическое действие медицинского изделия «Материал коллагеновый рассасывающийся КОЛЛОСТ®» в форме 7% геля на лабораторных животных. Показано, что после сенсибилизации мышей в течение 30 дней с кратностью один раз в неделю гиперчувствительность немедленного типа у мышей в реакции активной кожной анафилаксии не выявляется. У морских свинок после трехкратной сенсибилизации с интервалом 48 ч конъюнктивальная проба не обнаруживает гиперчувствительности к медицинскому изделию. Методом максимального сенсибилизирующего воздействия кожно-сенсибилизирующее действие медицинского изделия на морских свинках не установлено. Учет хромосомных аберраций в клетках костного мозга мышей не обнаружил наличия генотоксического действия у медицинского изделия.

Ключевые слова: коллагеновый гель, аллергизирующее действие, генотоксическое действие, тест учета хромосомных аберраций, лабораторные животные.

THE STUDY OF ALLERGENIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF THE MEDICAL DEVICE «RESORBABLE COLLAGEN MATERIAL COLLOST®, GEL» IN THE PRE-CLINICAL MODELS *IN VIVO*

I.A. Demyanenko[1], N.V. Kalmykova[1]*, S.V. Melnikova[2], A.V. Tretyakova[2], A.I. Marchenko[2], L.V. Mikhina[2], A.P. Suslov[1]

Abstract. Allergenic and genotoxic effects of the medical device «Resorbable collagen material "COLLOST® gel» were studied in laboratory animals. It was shown than immediate-type hypersensitivity reaction is not detected in mice by the cutaneous anaphylaxis test after once weekly sensitization during 30 days. Conjunctival test revealed no hypersensitivity to medical device in guinea pigs after three times sensitization for every 48 hours. Guinea pig maximization test did not reveal any skin-sensitizing effect of the medical device. Bone marrow chromosome aberration test did not detect genotoxic effects of the medical device.

Keywords: collagen gel, allergenic effects, genotoxic effects, chromosome aberration test, laboratory animals.

1 – ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» (ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), 123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

2 – Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов – филиал ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (НИЦ ТБП – Филиал ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России), 142253, Россия, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Большевик, ул. Ленина, д. 102-А

1 – N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology, 18, Gamaley str., Moscow, 123098, Russia

2 – , Russia Research Center for Toxicology and Hygienic Regulation of Biopreparations - branch of FSBU "State Research Center Institute of Immunology of Federal Medical and Biological Agency, 102-A, Lenina str., Bolshevik village, Serpukhovskiy district, Moscow region, 142253, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: k.nina.v@mail.ru
Тел.: 8 (499) 190 57 21

ВВЕДЕНИЕ

Инъекционные биосовместимые материалы на протяжении длительного времени применяют в эстетической хирургии и косметологии с целью коррекции возрастных и атрофических изменений кожи. Наибольшую эффективность медицинские изделия и препараты данного типа проявляют при исправлении носогубных складок и морщин в нижней трети лица, а также при лечении атрофических рубцов, возникших вследствие акне, травмы или хирургического вмешательства [1]. Основным компонентом инъекционных имплантатов служат различные нативные или химически модифицированные вещества биологического (коллаген, гиалуроновая кислота) и синтетического (поли-L-молочная кислота, гидроксиапатит кальция, полиметилметакрилат и др.) происхождения [2]. Среди них коллаген, являющийся основным белком волокнистого внеклеточного матрикса [3], имеет наибольшую продолжительность широкого клинического

применения. Так, инъекционный имплантат Zyderm I (Inamed Aesthetics, США) на основе коллагена I типа, полученного из шкур крупного рогатого скота (КРС), был разработан в 1976 году и разрешен к применению Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) в 1981 году [1]. Данные клинических исследований, а также обширный опыт практического применения свидетельствуют о высокой эффективности и безопасности инъекционных коллагеновых материалов [4–8].

Биосовместимость, способность к контролируемой биодеградации и индукции образования аутологичной соединительной ткани при данном процессе, возможность выступать в качестве матрикса для клеточной миграции [9–11] обуславливают популярность использования коллагена в качестве компонента имплантатов. В то же время преимущественное применение для производства инъекционных материалов коллагена ксеногенного (в первую очередь из КРС) происхождения считают основной причиной возникновения аллергических реакций, наблюдающихся у небольшой части пациентов [12]. В частности, согласно различным данным литературы, имплантаты марки Zyderm вызывают развитие реакций повышенной чувствительности (покраснение, припухлость, уплотнение, зуд кожи, крапивница) у 1–5% пациентов [1, 2, 12, 13]. Помимо аллергических реакций, в ходе длительного клинического применения имплантатов на основе коллагена КРС в редких случаях было зафиксировано возникновение гранулематозных тканевых реакций в области инъекций [14], а также отмечена возможная связь между введением коллагеновых дермальных имплантатов и возможностью возникновения дерматомиозита [15].

Накопленные клинические данные о биологических свойствах и возможных побочных эффектах инъекционных материалов на основе ксеногенного коллагена приковывают дополнительное внимание к вопросам, касающимся испытаний их безопасности. В настоящей работе представлены результаты изучения аллергизирующего и генотоксического действия отечественного инъекционного медицинского изделия на основе нативного коллагена дермы кожи КРС «Материал коллагеновый рассасывающийся КОЛЛОСТ®» в форме 7% геля на моделях *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Планирование и проведение экспериментов осуществляли в строгом соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики (GLP), утвержденными ГОСТ 33044-2014 [16] и приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ № 119н от 01.04.2016 [17].

Объектом исследования являлось медицинское изделие «Материал коллагеновый рассасывающийся КОЛЛОСТ®, гель». Форма выпуска – стерильный гель 7% в шприцах объемом 3 мл с заглушкой. Состав геля: 7% (по массе) коллагена I типа нативного нереконструированного из шкуры КРС в 10% растворе глюкозы для инфузий. Производитель – ООО «БиоФАРМАХОЛДИНГ» (Россия, серия № 002, годен до 15.01.18).

Изучение *аллергизирующего* и *генотоксического действия* данного медицинского изделия проводили на моделях *in vivo*, рекомендованных в ГОСТ ISO 10993-3-2011 [18], ГОСТ ISO 10993-10-2011 [19], а также в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. А.Н. Миронова [20]. Выбор вводимых доз изделия осуществляли согласно указанным ГОСТ, а также директивам Организации экономического сотрудничества и развития (OECD) № 474, 475 [21, 22].

Лабораторные животные. Для проведения экспериментов использовали мышей линий Balb/c (n=30) и C_{57}Bl/6 (n=50), а также морских свинок – альбиносов (n=46) в равном соотношении по полу, полученных из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Филиал «Андреевка» (Московская область, Солнечногорский район). Животных содержали в поликарбонатных клетках с подстилом из стружки лиственных пород деревьев («Лабораторкорм», Россия) при контролируемых значениях температуры (20–26 °С), влажности (30–70%) и воздухообмена (15 объемов/ч), соблюдении равных по длительности (по 12 ч) светового и темнового периодов, а также при неограниченном доступе к питьевой воде и стандартному гранулированному корму для содержания лабораторных грызунов («Лабораторкорм», Россия). Перед началом экспериментов животных рандомизировали по массе тела. Всех животных выводили из экспериментов путем ингаляционного воздействия углекислого газа.

Обеспечение соблюдения принципов гуманного обращения с подопытными животными. Обоснованность использования лабораторных животных в исследовании, размер выборок, прижизненные манипуляции, метод выведения животных из эксперимента рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией НИЦ ТБП – филиала ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (протоколы № 530, 531 от 29.05.2015).

Изучение аллергизирующего действия

Для оценки аллергизирующего действия коллагенового геля исследовали его способность вызывать гиперчувствительность немедленного типа (ГНТ) у мышей при курсовом введении (эксперимент № 1) и у морских свинок при трехкратном внутрикожном введении (эксперимент № 2). Кроме того, изучали способность медицинского изделия формировать гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) у морских свинок методом максимального сенсибилизирующего воздействия (эксперимент № 3). В экспериментах № 1 и № 2 опытные и контрольная группы состояли из 10 животных при равном соотношении по полу. В экспе-

рименте № 3 опытная группа состояла из 10-и животных, а контрольная – из 6-и, также при равном соотношении по полу. Животным контрольных групп во всех экспериментах вместо геля вводили по 0,1 мл 10% раствора глюкозы для инфузий (ООО «МОСФАРМ», Россия) по аналогичной схеме.

Эксперимент № 1. Двум опытным группам мышей линии Balb/c вводили гель внутрикожно в объеме 0,1 мл и 0,025 мл один раз в неделю в течение месяца. Через 14 дней после последнего введения для выявления сенсибилизации проводили реакцию активной кожной анафилаксии. Для этого всем животным на одной из боковых поверхностей тела внутрикожно инъецировали гель в объеме 0,05 мл. На другой боковой поверхности тела инъецировали 10% раствор глюкозы в том же объеме. Через 20 мин мышам в хвостовую вену вводили 0,2 мл 1% раствора синего Эванса («Диаэм», производство США). Спустя 30 мин животных выводили из эксперимента и оценивали диаметр пятна, образованного окрашенным синим Эванса экссудатом, на внутренней поверхности кожи в местах инъекций.

Эксперимент № 2. Двум опытным группам морских свинок – альбиносов вводили гель внутрикожно в объеме 0,1 мл и 0,025 мл трехкратно с интервалом 48 ч. Через 20 дней после последнего введения для выявления сенсибилизации проводили тестирование животных методом конъюнктивальной пробы. Для этого всем морским свинкам под верхнее веко вводили гель в объеме 0,05 мл, во второй глаз (контрольный) вводили такой же объем 10% раствора глюкозы. Реакцию оценивали визуально через 1, 24, 48 ч, используя полуколичественную (балльную) систему оценки: 0 – отсутствие видимых изменений состояния склеры и конъюнктивы, 1 – легкое покраснение слезного протока, 2 – покраснение слезного протока и склеры, 3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры.

Эксперимент № 3. Каждой морской свинке опытной группы в выстриженные участки кожи спины вводили внутрикожно в двух повторах по 0,1 мл: 1) полного адъюванта Фрейнда (ПАФ), 2) геля 3) геля в смеси с ПАФ в соотношении 1:1. Через 7 суток всем животным опытной группы проводили аппликацию геля на 48 ч (1,5 мл/особь) на межлопаточную область спины. Животным контрольной группы апплицировали тот же объем 10% раствора глюкозы. Зону аппликации за 24 ч обрабатывали раствором 10% лаурилсульфата натрия в вазелине, так как в предварительном эксперименте при подборе апплицирующей дозы гель не вызывал никаких видимых изменений в состоянии кожи. Через 14 дней проводили провокационную пробу с целью выявления сенсибилизации животных. Для этого всем животным на кожу боковой части тела, не использовавшуюся для инъекций и аппликаций, наносили 1,5 мл геля и закрепляли фиксирующей повязкой на 24 ч. Затем фиксирующую повязку снимали и визуально оценивали состояние кожи непосредственно после снятия, через 24, 48 и 72 ч, используя полуколичественную систему оценки: 0 – отсутствие видимых изменений, 1 – дискретная или очаговая эритема, 2 – умеренная и сплошная эритема, 3 – интенсивная эритема и припухлость.

Изучение генотоксического действия

Для оценки генотоксического действия коллагенового геля исследовали его способность вызывать хромосомные аберрации в клетках костного мозга мышей линии $C_{57}Bl/6$ (эксперимент № 4). Три опытные группы, а также группы положительного и отрицательного контроля состояли из 10 животных при равном соотношении по полу.

Эксперимент № 4. Мышам опытных групп вводили коллагеновый гель внутрикожно в дозе 2000 мг/кг массы тела. Двум опытным группам гель вводили однократно. При этом выведение животных из эксперимента и забор костного мозга проводили через 24 и 48 ч соответственно. Одной опытной группе гель вводили курсом по 3 раза в неделю в течение 14 дней. Забор костного мозга проводили через 24 ч после последнего введения. Группе отрицательного контроля вводили однократно внутрикожно 10% раствор глюкозы (в количестве, аналогичном объему геля, введенному опытным группам), группе положительного контроля – однократно внутрибрюшинно циклофосфамид (ООО «ЛЭНС-Фарм», Россия) в дозе 20 мг/кг; костный мозг в обоих случаях выделяли на анализ через 24 ч после введения.

За 3 ч до выведения из эксперимента всем животным вводили внутрибрюшинно 0,025% раствор колхицина (НПП «ПанЭко», Россия) в объеме 0,25 мл. После выведения мышей из эксперимента проводили выделение клеток костного мозга из бедренных костей и готовили препараты их метафазных хромосом стандартным суховоздушным способом [23]. Полученные препараты подвергали цитогенетическому исследованию. Анализировали по 100 метафаз от каждого животного. Подсчитывали число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, ахроматических пробелов (гепов), число метафазных пластинок с множественными повреждениями хромосом.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных численных данных проводили при помощи программ STATISTICA 10 и SPSS. Для оценки нормальности распределения и равенства дисперсий использовали критерии Колмогорова – Смирнова и Левена соответственно. Для оценки статистической значимости отличий (эксперимент № 4) использовали критерий Краскелла – Уоллиса с последующим попарным сравнением групп по Данну [24]. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке гипотез о нормальности распределения полученных

экспериментальных данных, равенстве дисперсий, а также отсутствии различий между экспериментальными группами принимали равным p=0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение аллергизирующего действия

Исследование способности медицинского изделия вызывать у мышей гиперчувствительность немедленного типа (эксперимент № 1).

При проведении реакции активной кожной анафилаксии визуальный анализ кожи в местах инъекционного введения разрешающей дозы геля, а также 10% раствора глюкозы показал, что как в контрольной группе, так и в обеих опытных группах у 100% животных во всех точках инъекций область, окрашенная синим Эванса, была ограничена лишь местом введения иглы и составляла менее 1 мм в диаметре. Поскольку согласно «Методическим рекомендациям по оценке аллергизирующих свойств» [20] на наличие сенсибилизации указывает развитие в зоне введения разрешающей дозы выраженного пятна экссудата диаметром более 3 мм, полученные данные указывают на отсутствие ГНТ к медицинскому изделию у мышей в данной модели.

Исследование способности медицинского изделия вызывать гиперчувствительность немедленного типа у морских свинок (эксперимент № 2).

При проведении конъюнктивальной пробы полуколичественная оценка состояния склеры и конъюнктивы после введения под верхнее веко геля или 10% раствора глюкозы выявила, что у всех животных как в контрольной, так и в обеих опытных группах отсутствовали какие-либо визуальные изменения тканей обоих глаз (0 баллов) на всех исследованных сроках. Таким образом, отрицательная конъюнктивальная проба свидетельствует об отсутствии развития ГНТ к медицинскому изделию у морских свинок в данной модели [20].

Исследование способности медицинского изделия вызывать гиперчувствительность замедленного типа у морских свинок методом максимального сенсибилизирующего воздействия (эксперимент № 3).

В ходе полуколичественного исследования области аппликации геля изменение состояния кожи у 100% животных как в контрольной, так и в опытной группе на всех сроках было оценено в 0 баллов, что явилось показателем отсутствия эритемы и отека. Согласно ГОСТ ISO 10993-10-2011, о наличии сенсибилизации к компонентам медицинского изделия свидетельствует средняя полуколичественная оценка в опытной группе, равная или превышающая 1 балл, в том случае если у контрольных животных данный показатель менее 1 балла. Таким образом, результаты, полученные в данной модели, свидетельствуют об отсутствии развития ГЗТ к медицинскому изделию у морских свинок.

Изучение генотоксического действия

Исследование мутагенного действия медицинского изделия методом учета хромосомных аберраций в клетках костного мозга мышей (эксперимент № 4).

Микроскопический анализ цитогенетических препаратов показал, что в группе положительного контроля, находившейся под воздействием препарата циклофосфамид, обладающего мутагенной активностью, доля метафазных пластинок с повреждениями хромосом находилась в диапазоне 12–17%. В подавляющем числе случаев хромосомные аберрации были представлены одиночными фрагментами, в том числе и по нескольку штук в одной метафазной пластинке, метафазные пластинки с множественными нарушениями составляли на различных препаратах 5–10%. В свою очередь, характер повреждений хромосом во всех опытных группах, а также в группе отрицательного контроля не различался: метафазные пластинки с множественными аберрациями не обнаружены, одиночные аберрации представлены концевыми делециями. Статистический анализ не выявил достоверных различий между опытными группами и отрицательным контролем (таблица 1). В то же время, группа положительного контроля достоверно превосходила все остальные экспериментальные группы по уровню хромосомных аберраций. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии мутагенного действия у медицинского изделия в настоящей модели.

Таблица 1.

Результаты оценки мутагенного действия медицинского изделия после внутрикожного введения в дозе 2000 мг/кг

Экспериментальная группа	Продолжительность введения	Интервал между последним введением и аутопсией (часы)	Количество животных в группе	Количество метафазных пластинок с хромосомными повреждениями (%) Me (Q1; Q3)[1]
1. Опыт	однократно	24	10	2 (1; 2,5)*
2. Опыт	однократно	48	10	1,25 (1; 2)*
3. Опыт	14 дней	24	10	1,75 (1; 2)*
4. Отрицательный контроль	однократно	24	10	1,75 (1; 2,5)*
5. Положительный контроль	однократно	24	10	15,00 (13; 16,5)

Примечания: [1]Me – медиана, (Q1; Q3) – квартили (нижняя, верхняя).
*p<0,05 по сравнению с группой положительного контроля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что коллаген обладает низкой иммуногенностью относительно большинства других белков [25], животное происхождение данного биорезорбируемого материала вызывает повышенную оза-

боченность практикующих специалистов касательно аллергических свойств и безопасности применения в целом медицинских изделий и лекарственных средств на его основе.

В настоящей работе проведено изучение аллергизирующего и генотоксического действия медицинского изделия «Материал коллагеновый рассасывающийся КОЛЛОСТ®, гель» на основе коллагена I типа из шкур КРС. Исследование выполнено на лабораторных животных (мыши, морские свинки) в экспериментальных моделях, рекомендованных принятой на законодательном уровне в Российской Федерации нормативной документацией, регламентирующей проведение доклинических испытаний безопасности медицинских изделий и лекарственных средств. Данные модели были предложены несколько десятилетий назад [23, 26–28] и на протяжении длительного времени являются стандартными для оценки аллергических и мутагенных свойств медицинских изделий *in vivo*.

Проведенный в различных экспериментах анализ аллергизирующего действия показал, что медицинское изделие не вызывает развития ГНТ у мышей и морских свинок при различных схемах сенсибилизации (курсовом и трехкратном внутрикожном введении). Также методом максимального сенсибилизирующего воздействия не выявлена способность геля формировать ГЗТ у морских свинок. Таким образом, аллергизирующие свойства медицинского изделия в использованных экспериментальных моделях *in vivo* не выявлены. Полученные данные свидетельствуют о низкой степени аллергенной активности компонентов медицинского изделия, а также в пользу низкого риска возможного проявления аллергических реакций при его клиническом применении. Тем не менее при экстраполяции на человека результатов, полученных в настоящей работе на лабораторных животных, необходимо принимать во внимание опубликованные данные о том, что характер иммунного ответа на коллаген, а также локализация распознаваемых антигенных детерминант на молекулах тропоколлагена в значительной степени может зависеть от видовой принадлежности как животного, из которого был получен коллаген, так и животного – реципиента данного белка [29]. Так, данные клинических наблюдений указывают на наличие у 2–4% популяции людей гиперчувствительности к коллагену КРС в составе инъекционных коллагеновых имплантатов [30–32].

Исследование генотоксического действия медицинского изделия КОЛЛОСТ® не выявило у него способности вызывать хромосомные аберрации в клетках костного мозга мышей как при однократном, так и при курсовом внутрикожном введении. Результат проведенного эксперимента, наряду с данными по отсутствию аллергенности в моделях *in vivo*, также говорит в пользу безопасности коллагенового геля. К настоящему времени не было опубликовано ни одной работы, свидетельствующей о возможном наличии какой-либо мутагенной активности у коллагенов различных типов. Полученные экспериментальные данные об отсутствии цитогенетической активности у исследуемого медицинского изделия полностью соответствуют этому факту.

ЛИТЕРАТУРА

1. R.S. Narins, P.H. Bowman. Injectable skin fillers // Clinics in plastic surgery. 2005. V. 32. № 2. P. 151–162.
2. B.L. Eppley, B. Dadvand. Injectable soft-tissue fillers: clinical overview // Plastic and reconstructive surgery. 2006. V. 118. № 4. P. 98e–106e.
3. M.D. Shoulders, R.T. Raines. Collagen structure and stability // Annual review of biochemistry. 2009. V. 78. P. 929-958.
4. A.W. Klein, M.L. Elson. The history of substances for soft tissue augmentation // Dermatologic surgery. 2000. V. 26. № 12. P. 1096–1105.
5. T.R. Knapp, E.N. Kaplan, J.R. Daniels. Injectable collagen for soft tissue augmentation // Plastic and reconstructive surgery. 1977. V. 60. № 3. P. 398–405.
6. L.S. Cooperman, V. Mackinnon, G. Bechler, B.B. Pharriss. Injectable collagen: a six-year clinical investigation // Aesthetic plastic surgery. 1985. V. 9. № 2. P. 145–151.
7. B.A. Matti, F.V. Nicolle. Clinical use of Zyplast in correction of age- and disease-related contour deficiencies of the face // Aesthetic plastic surgery. 1990. V. 14. № 3. P. 227–234.
8. S.J. Stegman, T.A. Tromovitch. Implantation of collagen for depressed scars // Journal of dermatologic surgery and oncology. 1980. V. 6. № 6. P. 450–453.
9. А. М. Хилькин, А.Б. Шехтер, Л.П. Истранов, В.Л. Леменев. Коллаген и его применение в медицине. – М.: Медицина, 1976. 228 с.
10. S. Chattopadhyay, R.T. Raines. Collagen-based biomaterials for wound healing // Biopolymers. 2014. V. 101. № 8. P. 821–833.
11. D. Brett. A Review of collagen and collagen-based wound dressings // Wounds 2008. V. 20. № 12. P. 347–356.
12. S.H. Bentkover. The biology of facial fillers // Fascial plastic surgery. 2009. V. 25. № 2. P. 73–85.
13. F.M. Kamer, M.M. Churukian. Clinical use of injectable collagen. A three-year retrospective review // Archives of otolaryngology. 1984. V. 110. № 2. P. 93–98.
14. R.R. Moscona, R. Bergman, R. Friedman-Birnbaum. An unusual late reaction to Zyderm I injections: a challenge for treatment // Plastic and reconstructive surgery. 1993. V. 92. № 2. P. 331–334.
15. J. Cukier, R.A. Beauchamp, J.S. Spindler, S. Spindler, C. Lorenzo, D.E. Trentham. Association between bovine collagen dermal implants and a dermatomyositis or a polymyositis-like syndrome // Annals of internal medicine. 1993. V. 118. № 12. P. 920–928.
16. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. Введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 года приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 года № 1700-ст.
17. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» от 01.04.16 г. № 199н.
18. ГОСТ ISO 10993-3-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 3. Исследования генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию. Введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2013 года приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 года № 1316-ст.

19. ГОСТ ISO 10993-10-2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 10. Исследования раздражающего и сенсибилизирующего действия. Введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2013 года приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 декабря 2011 года № 1347-ст.
20. Л.П. Коваленко, В.Н. Федосеева, А.Д. Дурнев, А.С. Иванова, Т.Б. Мастернак, А.Н. Миронов, Е.В. Арзамасцев, Т.А. Гуськова, И.Б. Жоголева, О.Л. Верстакова, Л.У. Радченко. Методические рекомендации по оценке аллергизирующих свойств лекарственных средств // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: в 2 т. / Под ред. Миронова А.Н. – М: Гриф и К, 2012. Т. I. С. 51–63.
21. OECD. Test № 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. – Paris: OECD Publishing, 2014. URL: http://dx.doi.org/10.1787/9789264224292-en (дата обращения 10.10.2017).
22. OECD. Test № 475. Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. – Paris: OECD Publishing, 2014. URL: http://dx.doi.org/10.1787/9789264224407-en (дата обращения 10.10.2017).
23. R.J. Preston, B.J. Dean, S. Galloway, H. Holden, A.F. McFee, M. Shelby Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells // Mutation research. 1987. V. 189. № 2. P. 157–165.
24. С. Гланц. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. С. 351–352.
25. S. Gorgieva, V. Kokol. Collagen- vs. gelatin-based biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives // Biomaterials Applications for Nanomedicine / Ed. R. Pignatello. – Rijeka: InTech, 2011. P. 17–52.
26. Z. Ovary. Immediate reaction in the skin of experimental animals provoked by antibody antigen interaction // Progress in allergy. 1958. V. 5. P. 459–508.
27. B. Magnusson, A.M. Kligman. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test // Journal of investigative dermatology. 1969. V. 52. № 3. P. 268–276.
28. J.J. Parks, H.M. Leibowitz, A.E. Maumenee. Immediate hypersensitivity reactions in the cornea of the guinea pig // Journal of immunology. 1962. V. 69. P. 323–325.
29. A.K. Lynn, I.V. Yannas, W. Bonefield. Antigenicity and immunogenicity of collagen // Journal of biomedical material research. 2004. V. 71. № 2. P. 343–354.
30. L. Cooperman, D. Michaeli. The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study // Journal of the American academy of dermatology. 1984. V. 10. № 4. P. 638–646.
31. L. Cooperman, D. Michaeli. The immunogenicity of injectable collagen. II. A retrospective review of seventy-two tested and treated patient // Journal of the American academy of dermatology. 1984. V. 10. № 4. P. 647–651.
32. G. Charriere, M. Bejot, L. Schnitzler, G. Ville, D.J. Hartmann. Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients // Journal of the American academy of dermatology. 1989. V. 21. № 6. P. 1203–1208.

УДК 615.036.2

ОТЧЕТ О КЛИНИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ: ОБЗОР РЕГУЛЯТОРНЫХ ТРЕБОВАНИЙ И ОРГАНИЗАЦИОННО-ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ

Е.А. Радькова[1]*, И.Н. Петрова[1], К.А. Леус[2], И.А. Добромыслов[2]

Резюме. Отчет о клиническом исследовании является одним из важнейших документов в истории разработки лекарственного препарата. Подготовка отчета требует от специалистов знания российских и зарубежных регуляторных требований, рекомендаций и руководств профессиональных сообществ, а также эффективной организации работы на всех этапах его подготовки. В данной статье приведен обзор действующих российских и международных нормативных документов и рекомендаций профессиональных ассоциаций по вопросам структуры и содержания отчета о клиническом исследовании, а также описан пример алгоритма подготовки отчета, от самых ранних этапов (обработка данных) до написания итогового отчета с интерпретацией полученных результатов.

Ключевые слова: лекарственные препараты, клинические исследования, управление данными, статистический анализ, отчет о клиническом исследовании.

CLINICAL STUDY REPORT: AN OVERVIEW OF REGULATORY DOCUMENTS AND THE ORGANIZATIONAL AND PRACTICAL ASPECTS OF DEVELOPMENT

E.A. Radkova[1]*, I.N. Petrova[1], K.A. Leus[2], I.A. Dobromyslov[2]

Abstract. Clinical study report is one of the main documents during the drug development. The preparation of the clinical study report requires knowledge of Russian and foreign legislation, awareness of guidelines and recommendatioins issued by the professional associations as well as the effective process management. This article provides an overview of the current Russian and international regulatory documents and recommendations of professional organizations on the content and structure of the clinical study report, and describes an example of an algorithm for preparing the report from the earliest stages (data processing) to writing the final report with interpretation of study results.

Keywords: drugs, clinical trials, data management, statistical analysis, clinical study report.

1 – ООО «ОСТ Рус», 191014, Россия, г. Санкт-Петербург, Ковенский переулок, д. 5

2 – ООО «Дата МАТРИКС», 191014, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Некрасова, д. 14

1 – LLC OCT Rus, 5, Kovenskiy per., Saint-Petersburg, 191014, Russia

2 – LLC Data MATRIX, 14, Nekrasova str., Saint-Petersburg, 191014, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: ERadkova@oct-clinicaltrials.com
Тел.: 8 (812) 449 86 34, доб. 20-21

ВВЕДЕНИЕ

Согласно определению руководств по надлежащей клинической практике (Good Clinical Practice, GCP) отчет о клиническом испытании/исследовании (Clinical Trial/Study Report) – это отчет в письменной форме, представляющий собой описание клинического испытания/исследования какого-либо терапевтического, профилактического или диагностического средства с участием человека в качестве субъекта, объединяющий клиническое и статистическое описания, представление данных и их анализ [1]. Несмотря на кажущуюся ясность и простоту определения, отчет о клиническом исследовании представляет собой объемный, многокомпонентный документ, разработка которого требует знаний широкого перечня регуляторных требований, изучения современных тенденций и подходов к обработке, анализу и описанию данных, а также вовлечения специалистов различных областей (врачей-клиницистов, менеджеров по обработке данных, биостатистиков, «медицинских писателей», специалистов по фармаконадзору, менеджеров по контролю качества в клинических исследованиях). Важность отчета о клиническом исследовании трудно переоценить, так как данный документ включает максимально полные сведения о выполненном клиническом исследовании, в том числе детальное описание плана исследования, список вовлеченных организаций и специалистов, подробное описание исходных характеристик участников исследования, полученные результаты оценки эффективности, безопасности, фармакокинетики и других изучаемых свойств

лекарственного препарата, а также их клиническую и статистическую интерпретацию. Отчеты о клинических исследованиях служат основой при принятии регуляторными органами решений о возможности проведения дальнейших исследований лекарственного препарата или его регистрации с последующим внедрением в клиническую практику. Кроме того, отчет является базовым документом при подготовке публикаций с результатами исследования в научных изданиях, выполнении систематических обзоров и метаанализов, разработке дальнейших исследований лекарственного препарата или препаратов, близких по механизму действия или изучаемым показаниям. Выше сказанное определяет первостепенные задачи при подготовке отчета о клиническом исследовании:

- разработку документа в соответствии с регуляторными требованиями, принципами доказательной медицины и современными подходами представления данных медико-биологических исследований,
- эффективную организацию процесса подготовки и написания документа с целью обеспечения высокого качества и соблюдения сроков предоставления отчета в регуляторные органы.

В настоящей статье приводится обзор действующих российских и международных регуляторных документов и рекомендаций профессиональных ассоциаций по вопросам структуры и содержания отчета о клиническом исследовании, а также обсуждаются организационно-практические аспекты разработки данного документа. Основное внимание уделено интервенционным клиническим исследованиям, которые являются обязательными в ходе клинической разработки лекарственного препарата. Вопросы подготовки отчетов с результатами наблюдательных программ и исследований являются отдельным направлением с соответствующими регуляторными требованиями и методическими подходами, поэтому в данной статье не освещаются.

ОБЗОР РЕГУЛЯТОРНЫХ ТРЕБОВАНИЙ И РЕКОМЕНДАЦИЙ

Перечень основных международных и российских регуляторных документов, в которых затрагиваются вопросы подготовки отчетов о клинических исследованиях, представлен в таблице 1.

Первые подробные требования к структуре и содержанию отчетов исследований были опубликованы в 1995 г. Международной конференцией (в настоящее время – советом) по гармонизации технических требований к регистрации фармацевтических продуктов, предназначенных для применения человеком (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for

Таблица 1.

Базовые документы для подготовки отчета о клиническом исследовании

Международный совет по гармонизации технических требований к регистрации фармацевтических продуктов, предназначенных для применения человеком // The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH); http://www.ich.org
• ICH E3 Guideline: Structure and Content of Clinical Study Reports. Step 4, 30 November 1995 • ICH E3 Guideline: Structure and Content of Clinical Study Reports. Questions & Answers (R1). 6 July 2012 • ICH E6 (R1): Guideline for Good Clinical Practice. Step 4, 10 June 1996 • Integrated Addendum to ICH E6(R1): Guideline for Good Clinical Practice E6(R2). Step 4, 9 November 2016 • ICH E9 Guideline: Statistical Principles for Clinical Trials. Step 4, 5 February 1998 • Addendum to ICH E9(R1). Step 1 (в процессе разработки)
Всемирная медицинская ассоциация // The World Medical Association; http://www.wma.net
• The Declaration of Helsinki, 1964. Seventh revision, 2013, 64th Meeting, Florenza
Российская Федерация
• Федеральный закон № 61-ФЗ от 12 апреля 2010 г. «Об обращении лекарственных средств» (ред. от 03.07.2016) • Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 200н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей клинической практики» • ГОСТ Р 52379-2005. Надлежащая клиническая практика. Утвержден приказом Ростехрегулирования от 27.09.2005 № 232-ст. • Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 1. ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». Москва, 2013. 322 с. • Письмо ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России от 26.11.2013 № 13308 (рекомендации при составлении отчетов о клинических исследованиях и отчетов об исследовании биоэквивалентности лекарственных препаратов)
Евразийский Экономический союз (ЕАЭС); http://eec.eaeunion.org/
• Правила надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза. Утверждены решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 79. • Требования к структуре и содержанию отчета о клиническом исследовании. Приложения №№ 1–9 к правилам надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза. Утверждены решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 79.
Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США // Food and Drug Administration (FDA); http://www.fda.gov
• Guidance for Industry: Submission of Abbreviated Reports and Synopses in Support of Marketing Applications. August 1999
Европейское медицинское агентство // European Medicines Agency (EMA); http://www.ema.europa.eu
• CPMP/EWP/2747/00 Note for Guidance on Coordinating Investigator Signature of Clinical Study Reports. 18 October 2001. • CPMP/EWP/2998/03 Note for Guidance on the Inclusion of Appendices to Clinical Study Reports in Marketing Authorisation Applications. 23 June 2004. • EMA/240810/2013 European Medicines Agency Policy on Publication of Clinical Data for Medicinal Products for Human Use. Policy/0070. 2 October 2014. • EMA/357536/2014 Questions and Answers on the European Medicines Agency Policy on Publication of Clinical Data for Medicinal Products for Human Use. 8 June 2015. • EMA/90915/2016 External guidance on the implementation of the European Medicines Agency policy on the publication of clinical data for medicinal products for human use. 11 April 2017.

Human Use, ICH). Руководство ICH E3 Structure and Content of Clinical Study Reports («Структура и содержание отчетов о клинических исследованиях») по настоящее время сохраняет свою актуальность во всем мире и служит основой для разработки национальных требований и рекомендаций, что позволяет специалистам разных стран использовать единые общие подходы при подготовке отчетов и упрощает процедуру рассмотрения и признания результатов исследований регуляторными органами других государств. Кроме того, разработка отчетов невозможна без изучения таких основополагающих документов ICH, как руководство ICH E6 Good Clinical Practice от 1996 г. («Надлежащая клиническая практика») и ICH E9 Statistical Principles for Clinical Trials от 1998 г. («Статистические принципы клинических исследований»), которые в настоящее время обновляются, что в дальнейшем потребует от индустрии клинических исследований пересмотра ряда процедур и подходов как в проведении исследований, так и в управлении данными и их анализе.

Другим базовым международным документом является Хельсинкская декларация, принятая на XVII сессии Всемирной медицинской ассоциации в 1964 году (последний пересмотр декларации состоялся в 2013 году). В данном документе изложены этические принципы деятельности врачей и других участников медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта исследования. Утверждение (заявление) о том, что клиническое исследование лекарственного препарата проводилось в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации, является обязательной составляющей отчета любого исследования. Важно отметить следующие требования декларации в отношении публикации и распространения результатов исследований: «*Все стороны должны неукоснительно придерживаться общепринятых этических принципов при подготовке отчетов об исследованиях. Как положительные, так и отрицательные, а также не позволяющие сделать окончательные выводы результаты исследований должны публиковаться или иным образом становиться публично доступными. В публикации должны быть указаны источники финансирования, принадлежность к каким-либо организациям и имеющиеся конфликты интересов*».

Российские требования к структуре и содержанию отчетов о клинических исследованиях во многом гармонизированы с положениями ICH и изложены в печатном издании «Руководство по экспертизе лекарственных средств» (ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2013 г.) [2]. Выход данного руководства значительно облегчил процесс разработки отчетов для подачи на рассмотрение в российские регуляторные органы и способствовал формированию единого понимания у участников российского фармацевтического рынка критериев качества документа и подходов к его разработке. Разработка основных документов клинического исследования, включая отчет с полученными результатами, невозможна без внимательного изучения положений «настольной книги» для всех специалистов, вовлеченных в клинические исследования лекарственных препаратов, – ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» [1]. Другими основополагающими нормативными документами российского законодательства являются Федеральный закон № 61-ФЗ от 12.04.2010 г. «Об обращении лекарственных средств» и приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 200н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей клинической практики» [3, 4]. Приказ № 200н впервые ввел ряд регуляторных требований по отношению к электронным системам, которые используются для сбора и обработки данных исследования. К таким требованиям относятся валидация данных (обеспечение полноты, точности, надежности и стабильности), наличие стандартных операционных процедур при использовании электронных систем, отслеживание изменений в системах, надежность маскирования данных при использовании слепого метода и ряд других.

При разработке отчетов о клинических исследованиях воспроизведенных препаратов важно учитывать рекомендации к содержанию отчетов и полноте представляемых результатов, изложенные в письме ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» № 13308 от 26 ноября 2013 года.

В последние годы наблюдалась масштабная работа по подготовке нормативно-правовой базы в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС), учрежденного в 2014 году (государства-участники: Армения, Белоруссия, Казахстан, Киргизия, Россия). Требования ЕАЭС к структуре и содержанию отчетов о клинических исследованиях приведены в составе правил надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза от 2016 г. [5]. Важно отметить, что рекомендации ЕАЭС гармонизированы с международными руководствами ICH E3 и ICH E6, а также с российским законодательством.

Для специалистов, которые подготавливают отчеты для подачи на рассмотрение в регуляторные органы США (Food and Drug Administration, FDA, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) и Европы (European Medicine Agency, EMA, Европейское медицинское агентство), объектом внимательного изучения становятся нормативные документы, посвященные вопросам создания «сокращенных» (abrreviated) отчетов (FDA), оформления подписей и приложений к отчету (EMA), подробные сведения о которых указаны в таблице 1.

Следует отметить чрезвычайную важность последних изменений в европейском законодательстве, которые ознаменовали новую эпоху в клинических ис-

следованиях – эпоху открытости результатов исследований. Вступивший в силу в январе 2015 года документ POLICY/0070 «European Medicines Agency Policy on Publication of Clinical Data for Medicinal Products for Human Use» (Политика/0070 «Политика Европейского медицинского агентства в части публикации клинических данных о медицинских продуктах для применения у человека») обязывает фармацевтические компании представлять отчет о клиническом исследовании в двух форматах: (а) в полном формате (scientific review version) для изучения экспертами EMA и (б) в редактированном формате (redacted clinical report) для публикации в открытом доступе. Публикация материалов необходима для препаратов, которые впервые регистрируются на территории Европейского союза после 1 января 2015 года, или ситуаций, когда компания-разработчик планирует расширение/модификацию списка показаний или расширение линейки ранее зарегистрированного лекарственного препарата. В дополнительных нормативных актах EMA (таблица 1) изложены требования к содержанию редактированного формата с учетом сохранения защиты персональных данных участников исследования и конфиденциальности информации, составляющей коммерческую тайну. Безусловно, данный новый вектор в индустрии клинических исследований будет способствовать прозрачности взаимоотношений всех ее участников: производителей, которые смогут избежать проведения лишних исследований или снизить риски при разработке лекарственных средств, используя опыт других исследований; врачей и научных работников, которые получат доступ к оригинальным и полным данным о профиле эффективности и безопасности лекарственных препаратов; и, наконец, потребителей, которые смогут получить более детальную информацию о назначаемой терапии [6]. Вместе с тем введение данных требований приводит к необходимости обсуждения новых подходов к разработке отчетов о клинических исследованиях, в том числе пересмотра структуры и содержания отдельных разделов отчета с целью оптимизации процедур подготовки как полной версии документа, так и редактированного формата на ее основе.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ АССОЦИАЦИЙ

Рекомендации и указания регуляторных документов носят довольно подробный характер. Тем не менее специалисты, вовлеченные в разработку отчетов о клинических исследованиях, могут сталкиваться на практике с возможностью различного толкования отдельных положений руководств и проблемой выбора объема данных и формата их представления, с одной стороны достаточного для экспертизы результатов исследования и полноценной оценки профиля эффективности и безопасности лекарственного препарата, а с другой – оптимального с точки зрения объема итогового финального отчета и сроков его разработки. В таких случаях полезными ресурсами могут служить рекомендации профессиональных сообществ, среди которых особенно хотелось бы выделить CONSORT и CORE Reference, подробное описание которых приводится ниже.

CONSORT 2010 Statement (Consolidated Standards of Reporting Trials Statement, «Консолидированные стандарты отчетности об испытаниях») – это рекомендации по представлению результатов рандомизированных клинических исследований. Предложения CONSORT-группы были впервые опубликованы в 1996 г. и в дальнейшем обновлялись в 2001 г. и 2010 г. Текущая редакция CONSORT 2010 Statement включает две части:

- лист проверки отчета (CONSORT 2010 Checklist), состоящий из 25 пунктов, в которых особое внимание уделяется вопросам описания дизайна исследования, анализа и интерпретации данных;
- рекомендуемая блок-схема представления распределения пациентов в исследовании (CONSORT 2010 flow diagram).

Данные рекомендации на нескольких языках, включая русский, а также дополнительные материалы опубликованы в открытом доступе на сайте CONSORT-группы [7]. Более 600 журналов и редакторских групп мира внедрили положения CONSORT в требования к публикациям, в которых представляются результаты рандомизированных клинических исследований. Использование рекомендаций CONSORT при подготовке отчета позволяет повысить качество представления результатов исследования и в дальнейшем повышает эффективность разработки статей и других публикаций на его основе.

CORE Reference (Clarity and Openness in Reporting: E3-based Reference, «Ясность и открытость репортирования: рекомендации на основе ICH E3») – это подробные рекомендации по написанию отчетов с учетом последних тенденций и изменений в европейском законодательстве в сторону открытости и публичности результатов исследований лекарственных препаратов. Проект был инициирован в 2014 г. [8] и завершен в 2016 г. [9] совместно Европейской и Американской ассоциациями медицинских писателей (European Medical Writers Association, EMWA; Americal Medical Writers Association, AMWA). Основной задачей проекта являлась разработка практических рекомендаций по написанию полной версии отчета в такой форме, которая бы потребовала минимум изменений и учитывала бы все особенности требований EMA при разработке редактированной версии, публикуемой в дальнейшем в открытом доступе. История проекта, информация о рабочей группе специалистов и мате-

риалы руководства доступны для изучения на сайте проекта [10]. Руководство состоит из двух частей:

- CORE Reference mapping tool – табличное представление структуры отчета, которая предлагается проектом CORE Reference, в сравнении с рекомендациями ICH E3;
- CORE Reference – основной документ проекта, который включает (1) введение с описанием целей и задач проекта, ссылками на регуляторные документы, инструкциями по использованию руководства и (2) проект структуры отчета с детальными пояснениями и комментариями к каждому из разделов.

Инициаторы проекта подчеркивают, что предложения группы CORE Reference носят рекомендательный характер и являются мнением международной группы специалистов по разработке документации для клинических исследований. Вместе с тем проект вызвал большой интерес у специалистов отрасли во всем мире, многие фармацевтические компании и контрактные исследовательские организации внедряют рекомендации CORE Reference в стандартные операционные процедуры и локальные практики. Авторы статьи надеются, что практические рекомендации CORE Reference в скором времени найдут свое широкое применение и в Российской Федерации.

ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ ОТЧЕТА О КЛИНИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ

Процесс подготовки отчета о клиническом исследовании включает несколько этапов, каждый из которых имеет свои цели и задачи, требует вовлечения работников определенной специальности, использования соответствующего программного обеспечения, разработки стандартных операционных процедур и системы контроля качества. Ниже приводится пример алгоритма, начальным этапом которого являются самые ранние процессы – работа с данными, которые собираются в ходе клинического исследования. Схема описываемой модели приведена на рисунке 1.

Подготовительный этап: очистка данных (data cleaning), проведение совещания по рассмотрению данных (data review meeting), финализация плана статистического анализа (finalization of statistical analysis plan), закрытие базы данных (database lock), «выгрузка» данных для статистического анализа (data transfer)

Работы по очистке данных проводятся как в ходе исследования, так и после его завершения и включают автоматические (системные) и ручные проверки

Рисунок 1. Пример алгоритма обработки и анализа данных для отчета о клиническом исследовании

ИРК: индивидуальная регистрационная карта, эИРК: электронная индивидуальная регистрационная карта, MedDRA: the Medical Dictionary for Regulatory Activities (Медицинский словарь для нормативно-правовой деятельности), WHO-Drug: the World Health Organization Drug Dictionary (Словарь лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения); CDISC SDTM: the Clinical Data Interchange Standards Consortium Study Data Tabulation Model (Модель табуляции данных исследования Консорциума стандартов клинических данных)

для выявления недостающих значений, устранения ошибок введения и противоречий в базе данных. Внимательная и аккуратная работа на данном этапе значительно повышает качество и сокращает сроки подготовки статистического и медицинского (итогового) отчетов в дальнейшем.

Эффективность разработки отчета и взаимодействия всех вовлеченных сторон существенно повышает проведение совещания по рассмотрению данных. Целью совещания является проверка целостности и корректности собранных данных, надлежащего выполнения всех необходимых стандартных операционных процедур, связанных со сбором и обработкой данных, в том числе процедур перед закрытием базы данных. Участникам совещания данные предоставляются в заслепленном виде (без указания группы терапии), что позволяет объективно принимать решения о популяциях для статистического анализа и других аспектах использования данных пациентов в ходе статистической обработки.

Финализация плана статистического анализа до закрытия базы данных – обязательный подход для исключения манипуляций с данными и предотвращения искажений результатов исследования. На данном этапе утверждаются методы и подходы статистического анализа, перечень и шаблоны таблиц, рисунков и листингов. Любые отклонения от плана при последующем анализе в обязательном порядке описываются в итоговом отчете о клиническом исследовании.

Важной процедурой подготовительного этапа является закрытие базы данных, что обеспечивает её защиту от внесения каких-либо изменений после начала статистического анализа и является гарантией объективности результатов исследования. Процесс закрытия базы должен быть надлежащим образом задокументирован, после чего может быть выполнена «выгрузка» данных для проведения статистического анализа биостатиком. В Российской Федерации отсутствуют обязательные требования к формату «выгрузок» с данными клинических исследований. В мировой практике к настоящему времени широкое применение получил необходимый для FDA-контролируемых исследований стандарт SDTM (Study Data Tabulation Model, модель табуляции данных исследования), разработанный CDISC (The Clinical Data Interchange Standards Consortium, консорциум стандартов клинических данных).

Статистический анализ и подготовка статистического отчета

Соответствие статистического анализа заранее утвержденному плану является ключевым фактором обеспечения валидности результатов клинического исследования. Несмотря на отсутствие регуляторных требований к программному пакету для анализа, стандартным подходом в индустрии клинических исследований является использование статистических пакетов «SAS» (компания SAS, США), «R» (некоммерческая организация R Foundation) или «SPSS» (компания IBM, США). Следует принимать во внимание необходимость проведения валидации разработанного программного кода для анализа с подготовкой соответствующей документации.

Написание итогового отчета

Разработкой полной версии отчета, как правило, занимаются специалисты по написанию медицинской документации (зарубежное название профессии – «medical writers», «медицинские писатели»). На данном этапе особенно важно следовать самым актуальным регуляторным требованиям к структуре и содержанию отчетов с учетом того, в какие регуляторные органы планируется подача материалов исследования на рассмотрение. В зависимости от фазы и программы клинического исследования объем итогового отчета может варьироваться от нескольких десятков до нескольких тысяч страниц, что определяет сроки его подготовки и количество вовлеченных специалистов. Вместе с тем в структуре отчета любого клинического исследования можно выделить следующие основные части:

- синопсис (synopsis) – краткое изложение плана, методологии и результатов исследования;
- тело отчета (report body) – обоснование исследования, описание целей, задач, методологии и процедур исследования, методов статистического анализа, представление результатов исследования и их интерпретация, выводы и заключение;
- подробное описание (narratives) летальных исходов, прочих серьезных и значимых нежелательных явлений;
- приложения к отчету (appendices) – основные документы и полная информация об исследовании, перечень данных по каждому участнику исследования, индивидуальные регистрационные карты.

На рисунке 2 представлена диаграмма распределения указанных частей отчета по объему (числу страниц) на примере клинических исследований III фаз с участием 200–400 пациентов. В 2008 г. Европейской ассоциацией медицинских писателей был проведен опрос специалистов о продолжительности этапов разработки отчетов для подобных исследований [11], полученные результаты приведены в таблице 2. Следует отметить, что итоги опроса в целом совпадают с текущими тенденциями подготовки отчетов как в российских, так и в зарубежных компаниях.

Отдельно необходимо подчеркнуть важность корректных техник и подходов представления и описания результатов клинических исследований. Данным аспектам посвящены многочисленные статьи и отдельные монографии [12–16], а также семинары профессиональных ассоциаций, например проводимые в

рамках ежегодных конференций EMWA и AMWA. Краткий перечень вопросов по данному направлению включает:

- техники обобщения информации с целью краткого, емкого и ясного представления ключевых результатов и наблюдений исследования,
- использование корректной терминологии, необходимость поддержания постоянства терминологии по всему тексту документа,
- подходы к форматированию документа, созданию удобной «навигации» по тексту многостраничного отчета о клиническом исследовании (использование гиперссылок, сносок, создание заголовков и оглавления),
- корректное представление наиболее важных результатов статистического анализа (например, выбор показателей описательной статистики в зависимости от вида и распределения данных).

Таблица 2.

Результаты опроса «медицинских писателей» о длительности каждого из этапов подготовки отчета о клиническом исследовании (для исследований III фазы с размером выборки 200-400 пациентов) (по данным S. Hamilton [11])

Этап	Средняя длительность (в рабочих днях)	Диапазон
От закрытия базы данных до первой версии статистического отчета	16,0	5–38
Ревью (проверка) и одобрение статистического отчета	9,5	5–14
От одобрения статистического отчета до первой версии итогового отчета	13,9	10–25
Ревью (проверка) и одобрение итогового отчета	23,5	6–100
Контроль качества итогового отчета	3,6	1–10

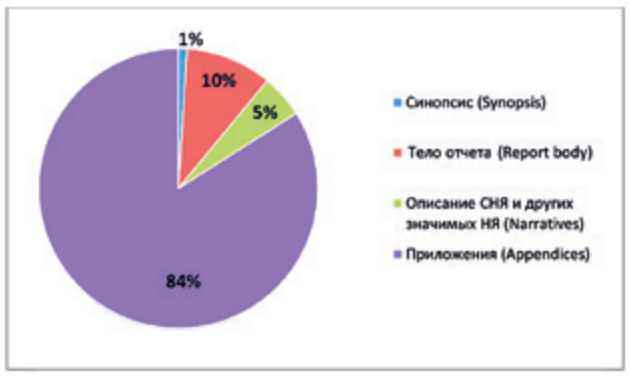


Рисунок 2. Структура отчета о клиническом исследовании и доля (по числу страниц) каждой из частей отчета (обобщенные данные для исследований III фазы с размером выборки 200–400 пациентов)

СНЯ – серьезное нежелательное явление; НЯ – нежелательное явление

При разработке документов на английском языке рекомендуется использовать справочники по стилю, например широкую популярность приобрело издание и веб-ресурс AMA Manual of Style (Руководство по стилю Американской медицинской ассоциации), которое предназначено для специалистов, работающих с результатами медико-биологических исследований [17]. Данный справочник содержит рекомендации по подготовке публикаций, а также приводит описание корректных подходов и примеры распространенных ошибок в терминологии, изложении текста, представлении результатов измерений и оценок.

Контроль качества итогового документа

Процедуры контроля качества (Quality Check / Quality Assurance) сопровождают клиническое исследование на всем его протяжении, включая этап подготовки финального отчета. Особое внимание при проверке документа уделяется вопросам соответствия структуры и содержания отчета требованиям надлежащей клинической практики, применимым регуляторным документам, а также аккуратности изложения материала, отсутствию противоречий, ошибок и опечаток по тексту документа.

Важным аспектом подготовки отчета о клиническом исследовании является эффективная организация и координация работы всех вовлеченных специалистов. На первых этапах работы особое значение имеет взаимодействие менеджеров по обработке данных, биостатистиков и «медицинских писателей». Вопросы клинической интерпретации результатов исследования могут потребовать привлечения врачей и научных работников узкой специальности. В последние годы все большее число клинических исследований включает оценку отдельных свойств лекарственного препарата, например изучение фармакокинетики, фармакодинамики, исследование биомаркеров и проведение генетических анализов современными высокотехнологичными методами. Привлечение сотрудников соответствующих лабораторий и организаций представляется обязательным подходом для корректной интерпретации полученных результатов. Таким образом, отчет о клиническом исследовании – результат работы широкого круга специалистов, и эффективность его подготовки определяется базовыми основами управления: четким распределением обязанностей, реалистичным грамотным планированием, правильной постановкой задач и контролем их исполнения. Дополнительными мерами по повышению качества процессов подготовки отчета также служат тренинги по проекту, стартовые и промежуточные совещания, разработка инструкций и стандартных операционных процедур для основных этапов работы над отчетом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отчет о клиническом исследовании является одним из важнейших документов в истории разработки лекарственного препарата. Подготовка отче-

та требует от специалистов знания российских и зарубежных регуляторных требований, рекомендаций и руководств профессиональных сообществ, а также эффективной организации работы на всех этапах его подготовки. Представленные в статье современные требования и тенденции, а также практические аспекты разработки отчета о клиническом исследовании позволяют повысить качество представления и интерпретации результатов исследований как в рамках отчета, так и при дальнейшей публикации результатов клинических исследований в печатных изданиях в России и за рубежом.

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р 52379-2005. Надлежащая клиническая практика. Утвержден приказом Ростехрегулирования от 27.09.2005 № 232-ст.
2. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1 / ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». – М. 2013. 322 с.
3. Федеральный закон № 61-ФЗ от 12.04.2010 г. «Об обращении лекарственных средств».
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 200н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей клинической практики».
5. Правила надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза (утв. решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 79).
6. Открытые данные клинических исследований – зачем это отрасли? // Фармацевтический вестник. URL: http://www.pharmvestnik.ru/publs/lenta/v-rossii/otkrytye-dannye-klinicheskix-issledovanij-zachem-eto-otrasli.html. (дата обращения 19.07.2017).
7. CONSORT. URL: http://www.consort-statement.org/ (дата обращения 19.07.2017).
8. S. Hamilton, W. Seiler, A. Gertel. The EMWA Budapest Working Group: A 2-year collaboration to make recommendations for aligning the ICH E3 guideline with current practice and developing clinical study protocol guidance // Medical writing. 2014. № 23(4). P. 281–288.
9. S. Hamilton, A. Bernstein, G. Blakey, V. Fagan, T. Farrow, D. Jordan et al. Developing the Clarity and Openness in Reporting: E3-based (CORE) Reference user manual for creation of clinical study reports in the era of clinical trial transparency // Research Integrity and Peer Review. 2016. № 1. P. 4.
10. CORE Reference. URL: http://www.core-reference.org/ (дата обращения 19.07.2017).
11. S. Hamilton. Effective scheduling of clinical study reports // The Write Stuff. 2008. № 17(3). P. 133–134.
12. J.R. Matthews, R.W. Matthews. Successful scientific writing. A step-by-step guide for the biological and medical sciences. 3rd ed. – New York: Cambridge university press, 2007. 253 p.
13. L.F. Wood, M. Foote. Targeted regulatory writing techniques: clinical documents for drugs and biologics. – Switzerland: Birkhauser Verlag, 2009. 235 p.
14. T.A. Durham, J.R. Turner. Introduction to statistics in pharmaceutical clinical trials. – UK, USA: Pharmaceutical Press, 2008. 241 p.
15. В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева. Математическая статистика в клинических исследованиях. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 304 с.
16. Т.А. Ланг, М. Сесик. Как описывать статистику в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов. – М.: Практическая медицина, 2016. 480 с.
17. AMA Manual of Style. URL: http://www.amamanualofstyle.com/ (дата обращения 19.07.2017).

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

www.phct-group.com

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

info@phct-group.com

УДК 615.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТАНДАРТА IDEF0 ПРИ ПОДГОТОВКЕ К ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКЕ

С.А. Рожнова[1], А.В. Цыпкина[1]* , О.С. Белохвостова[1]

Резюме. В статье представлена информация об использовании стандарта IDEF0 при визуализации процесса подготовки фармацевтического предприятия к фармацевтической разработке новых лекарственных препаратов. Раскрываются основные процедуры, входящие в аналитический этап фармацевтической разработки, их последовательность и взаимосвязь.

Ключевые слова: фармацевтическая разработка, графическое моделирование, аналитический этап.

THE USE OF THE IDEF0 STANDARD IN PREPARATION FOR PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT

S.A. Rozhnova[1], A.V. Tsypkina[2]*, O.S. Belokhvostova[3]**

Abstract. The article presents information on the use of the IDEF0 standard in process visualization pharmaceutical development analytical stage.

Keywords: pharmaceutical development, graphic modeling, analytical stage.

1 – ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» (РНИМУ им. Н.И. Пирогова), 117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 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

Фармацевтическая разработка (ФР) – важнейший этап процесса внедрения в производство нового лекарственного препарата (ЛП). При методическом подходе к процессам ФР важным и достаточно сложным является планирование и моделирование самого процесса в целом и включенных в него стадий. Постоянное усложнение технических и организационных систем фармацевтических производственных предприятий и исследовательских лабораторий требует процессного подхода субъектов обращения ЛП к процессам ФР и внедрения в производство новых продуктов, что обусловливает необходимость применения специальных средств их описания и анализа.

Для решения задачи графического моделирования процессов во многих отраслях производственной деятельности широко применяется система стандартов IDEF, позволяющая определить и упорядочить процессы, соответствующие им потоки информации, выявить целесообразную последовательность их выполнения, разработать универсальную бизнес-модель, интегрированную с компьютеризированными инструментами и технологиями [1].

ФР включает в себя несколько этапов (рисунок 1). На каждом из этапов ФР проводятся различные процедуры: от маркетинговых исследований и экономического анализа состояния хозяйственной деятельности предприятия до формирования регламента на ЛП [2].

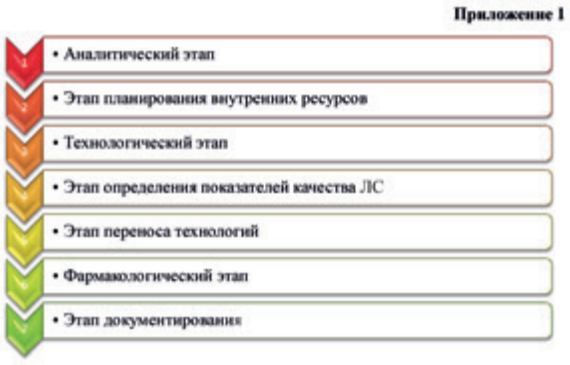


Рисунок 1. Этапы процесса фармацевтической разработки

Для управления процессами, происходящими во время ФР, можно построить графическую модель в соответствии со стандартами семейства IDEF, позволяющими визуализировать всю си-

стему действий и последовательность процедур, происходящих в процессе ФР.

Методология IDEF0 (Integrated Definition Function Modeling) принята в качестве государственного стандарта во многих странах мира и применяется в различных отраслях производства и науки. Преимущество метода IDEF0 заключается в полноте описания процессов, возможности в совокупности и детально рассмотреть потоки информации относительно этапов ФР (разделение и слияние дуг), а также в наличии жестких требований, обеспечивающих получение моделей стандартного вида [1].

Нами проведено исследование возможности практического использования стандарта IDEF0 для функционального моделирования для некоторых этапов ФР. Выбранная для исследования методика моделирования процессов позволяет описать объект с помощью средств и правил графического изображения, визуально отразить все этапы, стадии ФР и связи между ними [3].

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

- описать последовательность и функциональную зависимость стадий и процедур аналитического этапа ФР;
- оформить результаты исследования в формате стандарта IDEF0.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования были использованы основы стандарта IDEF0 [1] и программное обеспечение Ramus 1.1. (средство структурного моделирования процессов, кроссплатформенная система моделирования), предназначенное для описания процессов предприятия и (или) создания систем классификации и кодирования [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рассматривая процесс ФР в целом, мы разработали контекстную диаграмму верхнего уровня (рисунок 2).

Представленная диаграмма содержит краткие сведения о процессе и цель его осуществления.

Модель процесса представлена блоком с граничными стрелками. Функциональный блок – прямоугольник, содержащий имя и номер, используемый для описания функции. В рассматриваемом нами случае в качестве функционального блока выступает процесс, идентифицируемый глаголом «разработать».

В правом нижнем углу размещен номер блока (0), обозначенный символом «А» и цифрой, определяющей последовательность процесса, – «А0». Номер блока использован для его идентификации на диаграмме и в соответствующем тексте основной модели или тексте документации методического характера.

На представленной диаграмме цель осуществления процесса ФР обозначена в форме глагольного оборота «разработать лекарственный препарат».

Простые горизонтальные стрелки, подходящие слева к блоку (входы), определяют информационный поток о предпосылках разработки нового лекарственного препарата (ЛП). В нашем исследовании предпосылкой для выполнения цели является необходимость расширения ассортиментного портфеля предприятия-производителя.

Рисунок 2. Контекстная диаграмма верхнего уровня

Вертикальные стрелки, направленные к блоку сверху (управление), определяют условия или необходимые функции для выполнения процесса ФР. В исследуемом случае это материально-технические условия фармацевтического промышленного предприятия или исследовательской лаборатории.

Вертикальные стрелки на диаграмме, направленные к блоку снизу, соответствуют исполнителям процедур и ответственным лицам.

Стрелки, покидающие блок справа, – выходы, данные произведенные функцией, полученный нами результат, в ходе реализации всех этапов мы должны сформировать пакет документов, необходимый для внедрения нового ЛП в производство.

В строке общей информации диаграммы размещается наименование организации-разработчика (в нашей схеме обозначается, например, «ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова»), а также информация об авторе работы (например, «кафедра фармации») и непосредственно наименование проекта «Фармацевтическая разработка». В диаграмму внесены следующие данные: дата создания проекта, ревизия (дата внесения возможных исправлений или дополнений), уровень диаграммы (правый верхний угол) – «верх».

Процесс ФР включает этапы, первым из которых является аналитический. Используя метод графического моделирования стандарта IDFE0, разработана дочерняя диаграмма первого уровня, на которой последовательно представлены все этапы (рисунок 3).

Задача первого этапа (аналитического) обозначена, как «провести аналитический этап», второго – «провести планирование внутренних ресурсов», третьего – «провести технологический этап», четвертого – «установить показатели качества ЛП и отработать методы их контроля», пятого – «перенести технологии», шестого – «провести фармакологический этап», седьмого – «задокументировать результаты этапов».

Аналитический этап является основополагающим в процессе ФР. Он направлен на обоснование и принятие решения о целесообразности всего процесса и проведения последующих этапов (таблица 1).

Таблица 1.

Процедуры стадий аналитического этапа ФР

№ пп	Стадия	Процедуры
1	Оценка экономической целесообразности создания нового ЛП	1) маркетинговый анализ фармацевтического рынка с целью оценки востребованности нового ЛП; 2) анализ жизненного цикла ЛП; 3) анализ экономических затрат для реализации проекта; 4) анализ потенциальных механизмов продвижения нового ЛП при введении его в обращение; 5) анализ конкурентов; 6) анализ потребительских свойств ЛП; 7) юридическая экспертиза.
2	Оценка подготовленности фармацевтического предприятия к проведению ФР и внедрению нового ЛП	1) анализ подготовленности персонала; 2) технологический анализ.

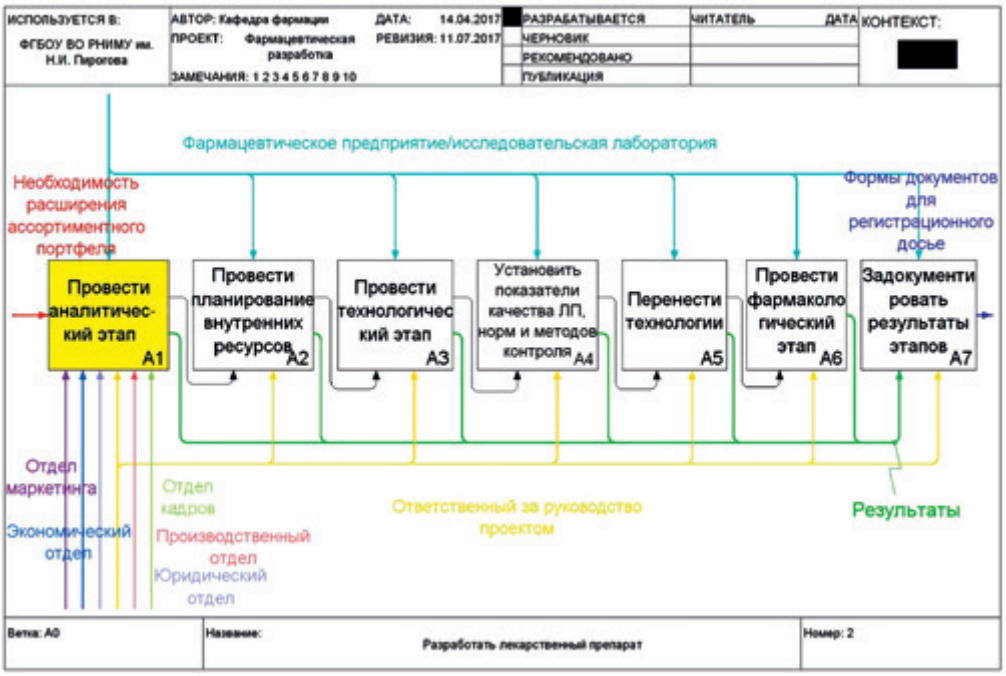


Рисунок 3. **Дочерняя диаграмма первого уровня**

Данные, представленные в таблице 1, отражают последовательность проведения процедур на аналитическом этапе ФР. На основании представленных данных составлена функциональная модель дочерней диаграммы второго уровня, включающая две стадии аналитического этапа (А11, А12), поток информации, необходимой для их реализации, а также исполнителей, ответственных за качество выполнения каждой из процедур (рисунок 4).

Стадии аналитического этапа ФР содержат дочерние блоки с названиями: 1) «Провести анализ фармацевтического рынка с целью оценки востребованности нового ЛП», 2) «Провести анализ готовности предприятия к началу проведения ФР».

Для аналитического этапа стрелки входа соответствуют предпосылке «анализ проекта», стрелки выхода – отчетам по проведенным процедурам, стрелки управления – фармацевтическому предприятию или научно-исследовательской лаборатории, стрелки механизма – отделам или подразделениям или ответственным лицам предприятия. Стрелки на диаграмме задаются с учетом взаимодействия каждой функции. Использованы связи «выход – механизм» – стрелки, обозначенные черным цветом, так как выход одной функции является средством достижения цели для другой, то есть без завершения любого из этапов последующий не может начать осуществляться.

На рисунке 5 представлена дочерняя диаграмма третьего уровня с моделированием процедур, выполняемых на стадии анализа фармацевтического рынка с целью оценки востребованности нового ЛП:

- маркетинговые исследования (определение конкуренции в нише, в которой планируется позиционировать новый ЛП, анкетирование и интервьюирование потребителей, работников аптеки, анализ жизненного цикла ЛП, анализ потребительских свойств ЛП);
- юридическая экспертиза (наличие патентной защиты);
- анализ экономических затрат для реализации проекта;
- анализ потенциальных механизмов продвижения нового ЛП при выведении его в обращение.

Процедуры выполняются в порядке строго одна за другой. Результаты данной стадии помещаются в общий отчет (обозначено зеленой стрелкой), параллельно с отчетом каждого из этапов (красная стрелка).

За каждую из процедур несет ответственность определенное лицо или группа лиц. На диаграмме разграничение ответственности обозначено определенным цветом стрелок, направленных снизу к блоку.

Предполагается, что при принятии решения о целесообразности вывода нового ЛП на фармацевтический рынок должен быть проведен следующий комплекс маркетинговых исследований:

- клиентский анализ – маркетинговое исследование (оценка непосредственных потребителей);
- сегментирование – выделение в пределах рынка четко обозначенных групп потребителей, различающихся по своим потребностям, характеристикам или поведению;

Рисунок 4. **Дочерняя диаграмма второго уровня**

Рисунок 5. **Дочерняя диаграмма третьего уровня**

- определение целевой группы потребителей;
- позиционирование нового ЛП;
- внешняя конкурентная среда;
- анализ рентабельности нового продукта в составе действующего ассортиментного портфеля;
- определение оптимальной розничной цены нового препарата.

На рисунке 6 представлена дочерняя диаграмма третьего уровня (2) с моделированием процедур по оценке возможности проведения фармпредприятием процесса ФР. Готовность должна быть определе-

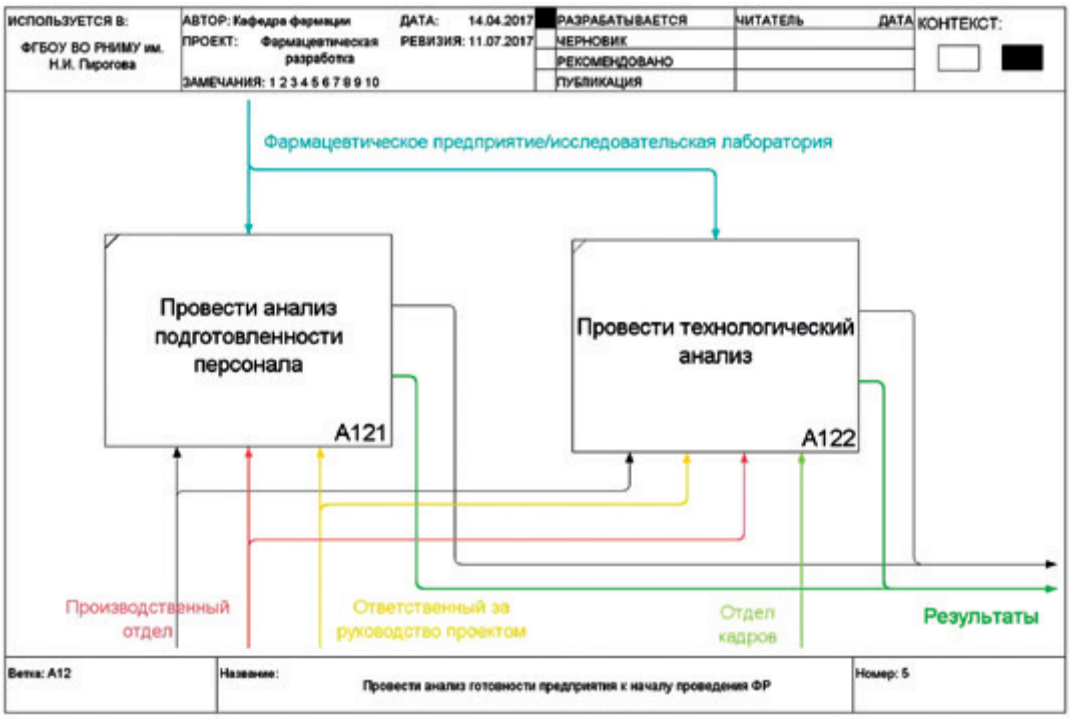


Рисунок 6. **Дочерняя диаграмма третьего уровня (2)**

на по наличию материально-технической базы, подготовленности персонала. При этом производственному отделу фармацевтического предприятия необходимо провести анализ имеющегося технологического и аналитического оборудования, сформировать заявки на недостающее оборудование, а также определить необходимый квалификационный уровень персонала фармацевтического предприятия. В свою очередь, отдел кадров должен разработать порядок прохождения переквалификации персонала до начала процесса разработки ЛП.

На основании совокупности информации, полученной в ходе исследования аналитического этапа, построена модель общей диаграммы в виде дерева узлов (рисунок 7). Иерархия узлов модели представлена наглядно, что позволяет рассмотреть данный этап в совокупности входящих стадий и процедур и определить его место в процессе ФР, а также ту информацию, которая должна быть получена после проведения данного этапа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. С помощью использования стандарта IDEF0 удалось отобразить:
   - последовательность и взаимодействие процессов и процедур ФР;
   - трудовые ресурсы и их распределение;
   - движение документооборота.
2. Модели, представленные таким образом, понятны всем работникам, задействованным в процессе ФР.
3. Полученные данные могут быть использованы в системах управления процессами и персоналом при ФР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методология функционального моделирования РД IDEF0. – М.: Издательство стандартов, 2000. 75 с.
2. А.В. Цыпкина. Методический подход в оценке требований к помещениям и оснащению оборудования при фармацевтической разработке // Сборник тезисов XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. 2017. С. 294–295.
3. В.В. Репин, В.Г. Елиферов. Процессный подход к управлению. Моделирование бизнес-процессов. – М.: Манн, Иванов и Фербер, 2012. 544 с.
4. ПО. Ramus 1.1. URL: http://download.freedownloadmanager.org/Windows-PC/Ramus-Educational/FREE.html (дата обращения 02.06.2017).

Рисунок 7. Дерево узлов аналитического этапа ФР

УДК 615.322; 339.13(470)

МНОГОВЕКТОРНЫЙ МАРКЕТИНГОВЫЙ АНАЛИЗ РОССИЙСКОГО РЫНКА ФИТОПРЕПАРАТОВ

А.В. Акамова[1]*, О.Д. Немятых[1], И.А. Наркевич[1]

Резюме. Полученные в работе данные показали, что наибольшая (79%) доля препаратов растительного происхождения представлена отечественными предприятиями-производителями. При этом в структуру импорта максимальный (более 13%) вклад вносят европейские страны, в первую очередь Германия (6,86%). Препараты лекарственного растительного сырья, в том числе сборы, имеют наибольший (31,54%) удельный вес на рынке. Значительная доля субстанций (7,67%) и полуфабрикатов (10,17%) в структуре импорта указывает на зависимость отечественного производителя от поставок сырья из-за рубежа. Абсолютное большинство (19,87%) репрезентованных на российском рынке препаратов относится к средствам, влияющим на пищеварительный тракт и обмен веществ.

Ключевые слова: фитопрепараты, ГРЛС, фармацевтический рынок.

MULTIPLE VIEW MARKETING ANALYSIS OF THE RUSSIAN PLANT-BASED DRUGS MARKET

A.V. Akamova[1]*, O.D. Nemyatykh[1], I.A. Narkevich[1]

Abstract. The received results show that the greatest (79%) share of plant-based drugs is presented by the domestic manufacturers. The greatest contribution (more than 13%) in structure of import supply is made by the European manufacturing enterprises. Germany (6.86%) is leading among them. The presentation of botanical drugs (31.54%) is the most frequent. One can't help paying attention to the fraction of substances (7.67%) and semi-finished products (10.17%) in structure of import supply. The latter the indicates the dependence of domestic manufacturers on supply of raw materials from abroad. It is important to notice the share (19.87%) of medicines for digestive tract diseases and metabolic disorders treatment.

Keywords: plant-based drugs, state register of medicines, pharmaceutical market.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – St. Petersburg Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Healthcare, 14 A, Prof. Popova str., St. Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: alexandra.akamova@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Разработка лекарственных препаратов (ЛП) с политерапевтической активностью на фоне приемлемого профиля безопасности (особенно в условиях длительного лечения), способных оказывать мягкое воздействие на организм, является одним из перспективных направлений фармацевтической науки и практики и одним из базовых элементов направления «Превентивная медицина» в рамках «дорожной карты» HealthNet [1, 2]. В связи с этим отмечается интерес ученых к лекарственным растениям, ценность которых связана с высокой степенью сродства биологически активных веществ организму человека [2].

Анализ данных об источниках оригинальных лекарственных средств свидетельствует о том, что в последние десятилетия интерес к растениям остается на довольно высоком уровне: доля зарегистрированных оригинальных лекарственных средств растительного происхождения составляет 33%, а синтетические препараты в большинстве случаев являются аналогами природных соединений. Последнее, в свою очередь, обуславливает высокий спрос на библиотеки мишень-ориентированных природных соединений [3].

В настоящее время фитопрепараты составляют около 20% от общего числа зарегистрированных на отечественном рынке ЛП, а динамика продаж демонстрирует стабильный прирост в денежном выражении. При этом в аптечной рознице фитопрепараты оцениваются как высокомаржинальная категория товаров [4, 5]. По данным ВОЗ, в ближайшие годы доля ЛП, разработанных на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС), увеличится до 60% [6]. При этом прогнозы компании BBC Research предполагают увеличение рынка фитопрепаратов на 6,6% ежегодно, а к 2020 году – до $ 35,4 млрд [7]. Все указанное выше подчеркивает перспективность данного сегмента для всех субъектов фармацевтического рынка.

Цель работы – оценить современное состояние российского рынка препаратов растительного происхождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались методы контент-анализа, агрегирования данных, сравнительного анализа. Информационную базу исследования составили данные Государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС) по состоянию на 25 июля 2016 г. Статистическая обработка данных проводилась с использованием MS Excel 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование ассортимента фитопрепаратов, внесенных в ГРЛС, позволило установить, что в настоящее время широта ассортимента определяется ЛП растительного происхождения, которые представлены отечественными (79%) и импортными производителями (21%) (рисунок 1) [4, 8].

Наибольший вклад в структуру предложения среди импортных препаратов вносят 23 страны Европы – более 13%. Из них отдельно стоит выделить Германию – 6,86%, Словению – 1,31%, Францию – 1,22%. Доля зарегистрированных фитопрепаратов среди стран азиатского региона и стран американского континента в плоскости рассматриваемой проблемы менее весома и составляет 2,89% и 0,5%, соответственно. Страны ближнего зарубежья, в том числе Украина, Республика Беларусь, Казахстан, Грузия, Латвия и Литва, суммарно охватывают немногим более 1,7% в общей структуре предложения. Среди стран-поставщиков следует выделить Германию, Индию, а также Китай, Украину, Францию и Швейцарию, в которых 10 и более предприятий поставляют свою продукцию на российский рынок (таблица 1) [8].

Таблица 1.

Ведущие страны – поставщики фитопрепаратов

Страна-поставщик	Количество предприятий-производителей
Германия	37
Индия	22
Китай	18
Украина	13
Франция	12
Швейцария	10
Чехия	5

Данные ГРЛС демонстрируют, что выпуск отечественных фитопрепаратов обеспечивают 180 предприятий (юридические лица, держатели регистрационных удостоверений). Среди лидеров по количеству ЛП растительного происхождения в портфеле компании стоит отметить ООО Фирма «Здоровье» (Московская обл., пос. Нахабино), АО «Красногорсклексредства» (г. Красногорск), ФГУП «НПО «Микроген» (г. Москва), ООО «Лек С+» (г. Химки), ЗАО «Вифитех» (г. Москва) (рисунок 2) [8].

Рисунок 1. Структуризация ассортимента фитопрепаратов по странам-поставщикам

Анализ рынка по базовым для фармацевтической разработки растениям позволяет отметить препараты валерианы (3,51%), пустырника (2,58%), боярышника (2,34%), календулы (2,06%), эвкалипта (1,98%), мяты (1,65%), зверобоя (1,57%), солодки (1,57%), тимьяна (1,49%), ромашки (1,45%), алтея (1,41%), шиповника (1,33%), подорожника (1,21%), эхинацеи (1,09%), гинкго (1,05%), крапивы (1,05%), березы (0,97%), толокнянки (0,93%), женьшеня (0,89%), сенны (0,89%) [8].

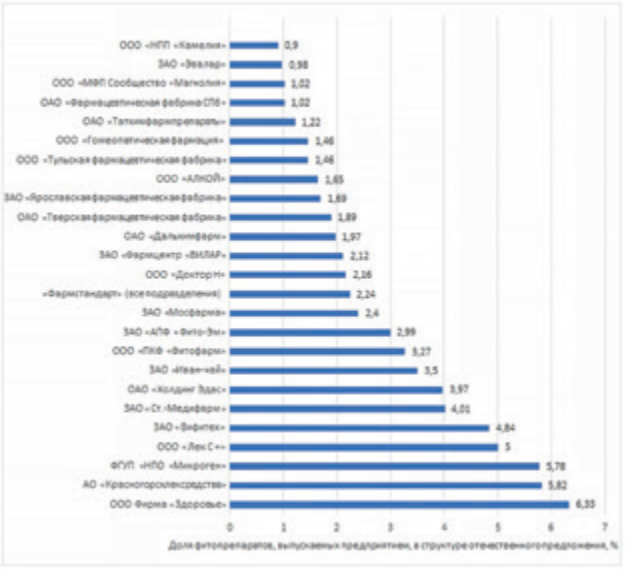


Рисунок 2. Топ-25 отечественных предприятий-производителей

Согласно данным ГРЛС на российском рынке доступны препараты в виде 18 форм выпуска, которые относятся к 13 фармакотерапевтическим группам (рисунки 3–5) [8].

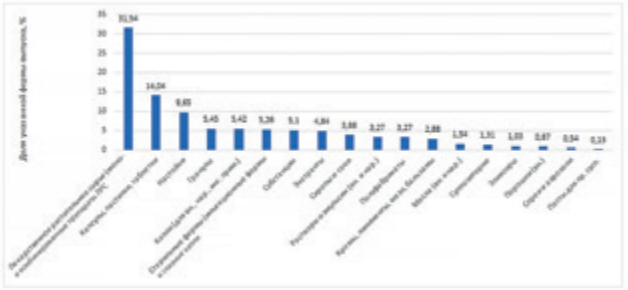


Рисунок 3. Структуризация предложения фитопрепаратов по формам выпуска

Сравнительная оценка вклада различных форм выпуска в общую структуру ассортимента ЛП растительного происхождения указывает на тот факт, что наибольший (31,54%) удельный вес в исследуемом аспекте имеют препараты, представляющие собой моно- и комбинированные препараты ЛРС. Значительную долю на рынке также занимают такие формы, как таблетки и капсулы (14,04%), настойки (9,65%), гранулы (5,45%), капли для внутреннего и наружного применения (5,42%), инъекционные формы и глазные капли (5,26%), экстракты (4,84%). При этом весьма существенную часть (5,10%) составляют субстанции. Доля сиропов, растворов, мягких лекарственных форм, масел, полуфабрикатов (экстракты, концентраты, лиофилизаты), суппозиториев, эликсиров, порошков, а также спреев и аэрозолей в структуре предложения не столь значительна и суммарно охватывает немногим более 18,5% [8].

Нельзя обойти вниманием достаточно сконцентрированный вклад (21%) импортных производителей в структуру предложения в разрезе форм выпуска. Наиболее весомое их влияние заметно в сегменте капсул и таблеток (35,67%), капель для внутреннего и наружного применения (11,33%), сиропов (7,33%, в т.ч. числе детских), а также субстанций (7,67%) и полуфабрикатов (10,17%, экстракты, концентраты, лиофилизаты). Препараты ЛРС и галеновые формы представлены импортными поставщиками в сравнительно небольших количествах (рисунок 4) [8].

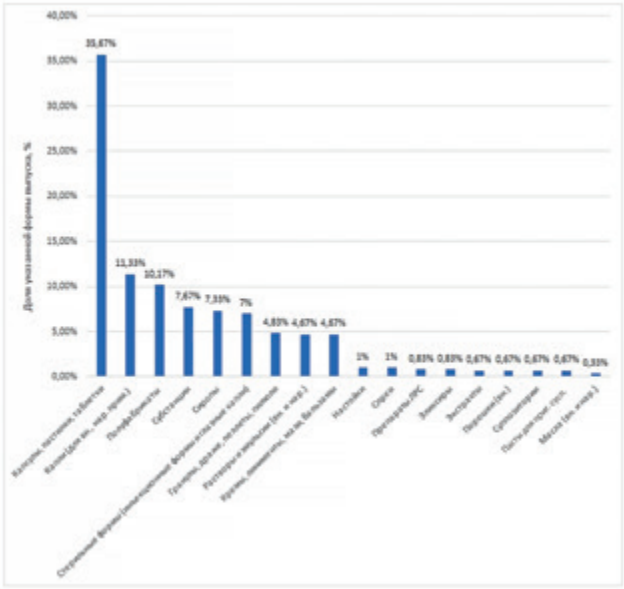


Рисунок 4. Структуризация импорта фитопрепаратов по формам выпуска

Таким образом, полученные данные указывают на сравнительно неглубокое освоение российскими производителями сегмента таких форм, как таблетки, капсулы, пастилки и прочие корригированные формы, среди которых сегодня преобладает продукция импортного происхождения. Данное направление может рассматриваться отечественными производителями как перспективное для инвестиций, что подтверждается результатами анализа средневзвешенной стоимости продуктов отдельных стадий технологического процесса преобразования растительного сырья в лекарственный препарат. Так, средневзвешенная стоимость одного грамма лекарственного растительного сырья на российском рынке сегодня составляет 1,45 руб./г, одного грамма сбора – 1,46 руб./г, одного миллилитра простой настойки – 1,46 руб./мл, интегральный показатель таблеток, микстур, сиропов и капель за одну условную единицу (у.е. – г, мл, таблетка) достигает величины 2,83 руб./у.е.

Нельзя обойти вниманием тот факт, что средневзвешенная стоимость брендированных препаратов в 10 раз превышает аналогичный параметр, зафиксированный у лекарственного растительного сырья, сборов и настоек, и составляет 14,21 руб./у.е. [8, 9].

Изучение распределения общего ассортимента фитопрепаратов согласно ГРЛС по фармакотерапевтическому действию позволяет отметить средства, влияющие на пищеварительный тракт и обмен веществ (19,87%); средства, влияющие на нервную систему (15,24%); средства, влияющие на дыхательную систему (13,43%); средства для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы (11,15%) и средства, используемые в дерматологии (9,85%). Фитопрепараты, обладающие другими видами фармакотерапевтического действия, суммарно составляют чуть больше 14,5% (рисунок 5) [8].

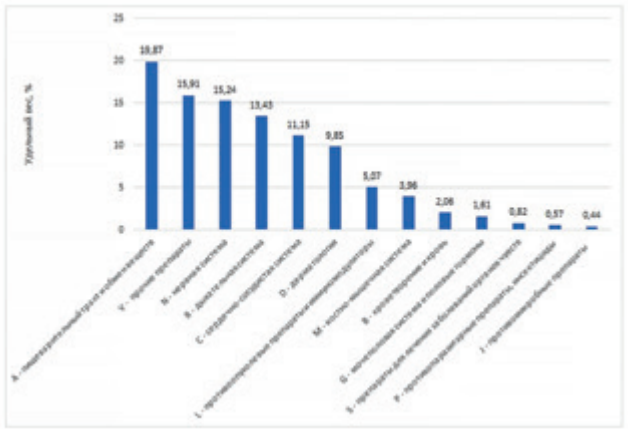


Рисунок 5. Структуризация предложения фитопрепаратов по фармакотерапевтическому действию

Данные реестра позволяют утверждать, что наибольшее количество ЛП представлено в группах A, C, N, R. Широта ассортимента в группе A указывает на высокую социальную значимость фитопрепаратов в вопросах лечения заболеваний метаболического генеза [8].

Оценка репрезентативности отдельных стадий производства растительных ЛП (рисунок 6) позволяет заключить, что держатели регистрационного удостоверения в большинстве (72%) случаев анонсируют наличие всех производственных стадий (от смешения/измельчения компонентов до контроля качества и выпуска серии). При этом для 21% препаратов предусмотрена также процедура выпускающего контроля на производстве. Производство «in bulk» зафиксировано для 3% препаратов (рисунок 6). Схожая картина наблюдается и при сравнительной оценке импорта (рисунок 7) [8].

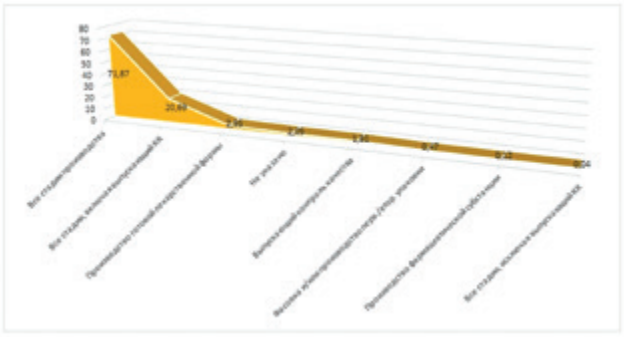


Рисунок 6. Структуризация предложения российских фитопрепаратов по особенностям производства

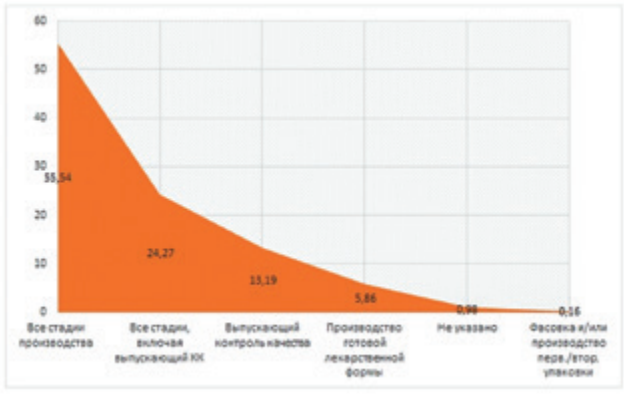


Рисунок 7. Структуризация предложения импорта по особенностям производства

Основные параметры ассортимента и характеристики макроконтура рынка фитопрепаратов демонстрируют, что на анализируемом уровне российское предложение требует изменения направления вектора традиционных фармацевтических разработок в сторону формирования номенклатуры инновационных конкурентоспособных лекарственных средств растительного происхождения, производство которых не зависит от закупки сырья за рубежом (рисунок 8).

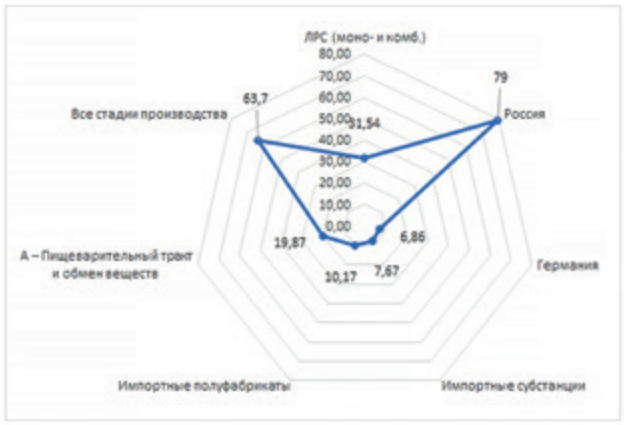


Рисунок 8. Ассортиментный макроконтур российского рынка фитопрепаратов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, после обобщения всего вышеизложенного есть основания утверждать, что абсолютное большинство зарегистрированных на российском рынке фитопрепаратов представляют собой лекарственные средства в форме ЛРС для лечения заболеваний пищеварительно тракта и нарушений обмена веществ. Привлекательностью для национального производителя в первую очередь обладают сегменты субстанций и полуфабрикатов, а также капсул, таблеток и корригированных форм, которые сегодня заполняются преимущественно препаратами импортного происхождения, что подтверждается результатами анализа средневзвешенной стоимости растительных ЛП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Национальная технологическая инициатива HealthNet. URL: http://www.nti2035.ru/markets/healthnet (дата обращения 05.07.2017).
2. О.Д. Немятых, А.В. Акамова. Производство фитопрепаратов: опыт и перспективы в России // Сборник материалов научного симпозиума в рамках VIII национального съезда фармацевтов Украины «Социальная фармация: Стан, проблеми та перспективи». – Харьков. 2016. С. 222.
3. D.J. Newman, G.M. Cragg. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 // Journal of Natural Products. 2016. № 79. P. 629–661. URL: http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jnatprod.5b01055 (дата обращения 07.06.2017).
4. А.В. Акамова. Актуальные аспекты российского рынка фитопрепаратов // Сборник материалов VII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». Санкт-Петербург, 24-25 апреля 2017 г. – СПб.: СПХФА, 2017. С. 813–814.
5. И. Широкова. Рынок фитопрепаратов – тенденции, проблемы, прогнозы // Ремедиум. журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. 2013. № 4. С. 26–32.
6. Т.Г. Афанасьева. Разработка методических основ управления бизнес-процессами в аптечном сегменте фармацевтического рынка (на примере лекарственных растительных препаратов): автореферат дис. ... д.фарм.н. – М.: РУДН, 2014. 48 с.
7. Д. Шубина. Объем рынка фитопрепаратов за 5 лет вырастет до $35,4 млрд // Vademecum. 2015. URL: http://www.vademec.ru/news/2015/10/30/obem_rynka_fitopreparatov_za_pyat_let_vyrastet_do_35_4_mlrd/ (дата обращения 05.07.2017).
8. Государственный реестр лекарственных средств. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx (дата обращения 25.07.2016).
9. ФАРМ-ИНДЕКС. Справочная аптек Санкт-Петербурга. URL: https://www.pharmindex.ru/ (дата обращения 07.06.2017).

ФАРМКОНТРАКТ ИНЖИНИРИНГ: ВМЕСТЕ МЫ СОЗДАЕМ БУДУЩЕЕ РОССИЙСКОЙ ФАРМАЦЕВТИКИ!

Pharmcontract group of companies

ВЕДУЩИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ХОЛДИНГ РОССИИ

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

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

www.phct-engineering.ru

info@phct-engineering.ru

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

стр. 356

! 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

УДК 338; 339

ТРЕНДЫ МИРОВОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА: НЕРЕАЛИЗОВАННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РАЗВИТИЯ

Д.А. Демидёнок[1]*, Т.А. Петрова[1], И.А. Наркевич[1], В.А. Маркова[1]

Резюме. Мировые расходы на здравоохранение достигнут к 2022 году 1,12 трлн долларов, что на 370 млрд долларов превысит уровень расходов в 2016 году. Текущие тенденции мирового фармацевтического рынка основаны на прорывных технологиях (disruptive technology), таких как редактирование генома, персонализация лекарственной терапии, инвестиции в нишевые области изучения и разработки лекарственных средств (орфанные препараты), увеличение сектора биотехнологий, использование системы обработки больших объемов данных (Big Data) и др.

Ключевые слова: мировой фармацевтический рынок, персонализированная медицина, Big Data, биотехнологии, биофармпрепараты, орфанные препараты, прорывные технологии.

GLOBAL PHARMACEUTICAL MARKET TRENDS: OPPORTUNITIES FOR DEVELOPMENT

D.A. Demidyonok[1]*, T.A. Petrova[1], I.A. Narkevich[1], V.A. Markova[1]

Abstract. Global medicine spending will reach nearly $1.12 trillion by 2022 on an invoice price basis, up nearly $370 billion from the 2016 estimated spending level. Current trends are based on disruptive technologies including gene-editing, precision medicines and digital technologies, Big Data etc. The characteristics of biopharmaceutical innovation have also evolved over the past two decades, with increases in the share of cancer treatment launch, orphan indications.

Keywords: global pharmaceutical market, personalized (precision) medicine, Big Data, biotechnology, biopharmaceuticals, orphan drugs, disruptive technologies.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical Academy of the Ministry of Healthcare, 14 A, Prof. Popova str., St. Petersburg, 197376, Russia

* **адресат для переписки:**
E-mail: Daria.demidenok@pharminnotech.com
Тел.: 8 (911) 981 84 14

ВВЕДЕНИЕ

Объем мирового фармацевтического рынка в 2016 году составил 800 млрд долларов. Согласно прогнозам EvaluatePharma, темпы его ежегодного роста будут составлять 6,3% и к 2022 году объем рынка составит 1,12 трлн долларов. Основным драйвером роста выступает новая волна инновационной терапии, одобренная регуляторами в течение последних нескольких лет [1].

Рост фармацевтического рынка будут определять прежде всего появление новых лекарственных препаратов на развитых рынках и увеличение объема их продаж на развивающихся рынках. Число новых лекарственных препаратов (ЛП), удовлетворяющих потребности пациентов, станет исторически значительным, учитывая рост патологии в области онкологии, аутоиммунных заболеваний, заболеваний обмена веществ, нарушений работы нервной системы и других [2].

Ландшафт мирового фармацевтического рынка на период 2015–2022 гг. представлен одиннадцатью основными терапевтическими областями (рисунок 1, таблица 1).

Согласно данным рисунка 1 и таблицы 1 терапевтической областью с самой большой долей рынка (14–19%) и процентом прироста (13%) является онкология, что подтверждается количеством поданных в Европейское агентство лекарственных средств (European Medicines Agency, EMA) заявок на регистрацию новых лекарственных препаратов (рисунок 2).

За последние 20 лет было зарегистрировано более 700 новых активных веществ, одобренных регулирующими органами. Текущие тенденции мирового фармацевтического рынка основаны на прорывных технологиях (disruptive technology), таких как редактирование генома, персонализация лекарственной терапии, широкое использование цифровых технологий и др. Согласно прогнозам экспертов, только в 2016 г. Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (Food and Drug Administration, FDA) утвердило более десяти новых лекарственных препаратов, ежегодные объемы продаж которых в ближайшие шесть лет превысят 1 млрд долларов (рисунок 3) [1].

Таблица 1.

Топ-5 терапевтических областей 2015–2022 гг.

Терапевтическая область	Доля рынка, %	Средний процент прироста, %	Ключевые препараты	Препараты, выходящие из под патентной защиты
онкология	14–19	13	«Опдиво», «Ревлимид», «Кейтруда», «Ибранс», «Перьета», «Тецентрик»	«Гливек», «Ритуксан», «Алимта», «Герцептин»
противодиабетические ЛП	4–7	7	«Лантус», «Янувия», «Хумалог»	Vivezus
противовирусные ЛП	3–6	0	«Дескови», «Генвойа», «Биктегравир», «Триумек»	«Харвони», «Сольвади», «Трувада», «Атрипла»
иммуносупрессанты	1–3	13	«Стелара», «Дупиксент», «Озанимод» (ожидается в 2018 г.)	–

Источник: построено по данным рисунка 1.

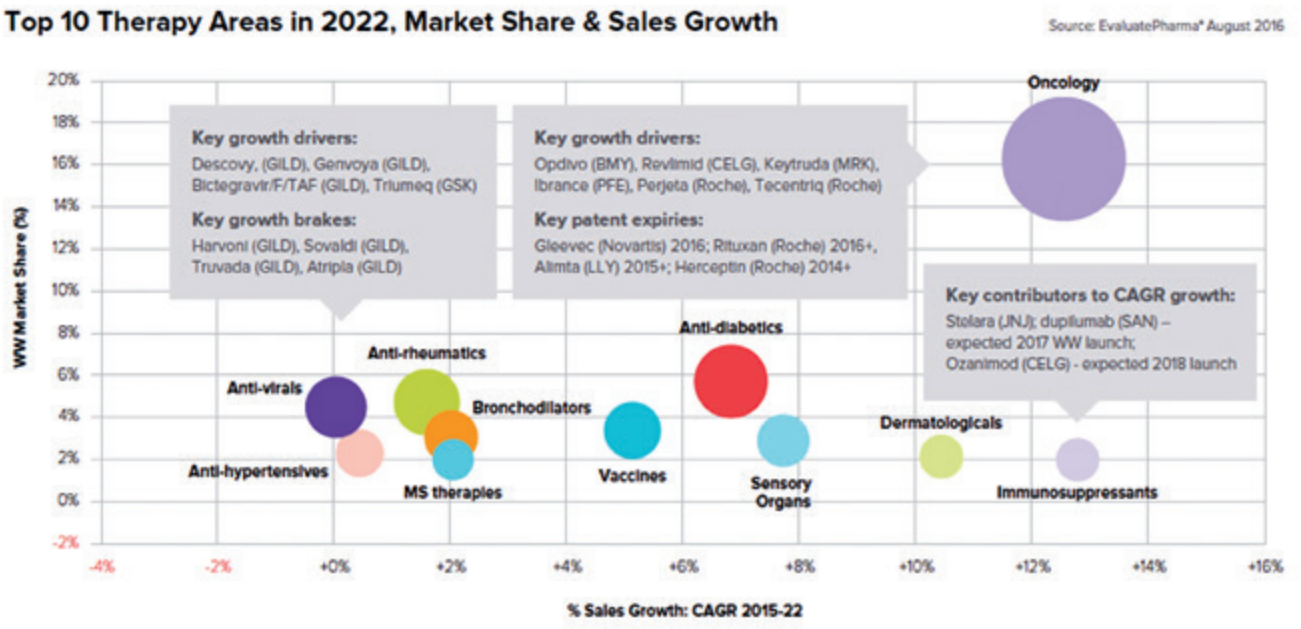


Рисунок 1. **Ландшафт мирового фармацевтического рынка 2015–2022 гг. Источник: EvaluatePharma, август 2016**

Рисунок 2. **Заявки, поданные в EMA, на регистрацию новых лекарственных препаратов за период 2016–2017 года. Источник: 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2017**

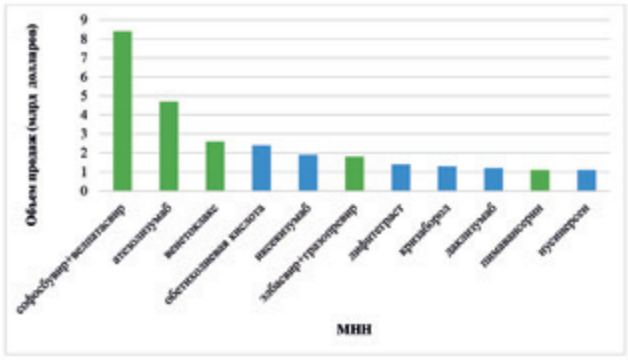


Рисунок 3. **Потенциальные блокбастеры, утвержденные FDA в 2016 г. (согласно усредненным экспертным оценкам объемов продаж к 2022 г.). Источник: 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2017**

***Зеленым цветом представлены революционно новые препараты (breakthrough therapy)**

В последнее время наблюдается целый ряд инициатив в секторе здравоохранения:

- значительные инвестиции в сектор биотехнологий;
- инициатива прецизионной (персонализированной) медицины;
- преференции для изготовителей (разработчиков) орфанных препаратов;
- использование системы обработки больших объемов данных (Big Data) в клинической практике для повышения эффективности и безопасности лекарственной терапии;
- содействие со стороны регуляторных органов в разработке передовых методов лечения, включая использование клеточной терапии, тканевой инженерии, аддитивных технологий (3D-печать), преодоление антимикробной резистентности и др.;
- создание условий для интеграции результатов научных исследований в практику фармацевтической промышленности;
- усовершенствование процесса непрерывного изготовления лекарств (большинство лекарств в настоящее время производится сериями);
- создание дизайна исследования и использование уровней доказательности;
- возможность использования незарегистрированного препарата (находящегося в стадии клинических исследований) в связи с исключительными обстоятельствами (жизнеугрожающее состояние, терминальная фаза заболевания) – «right to try» [3, 7, 11].

СЕКТОР БИОТЕХНОЛОГИЙ

На биофармпрепараты в настоящее время приходится третья часть ежегодно получаемых регистрационных удостоверений. К биофармпрепаратам относят молекулы, полученные рекомбинантными способами производства, а также более новые методы лечения, включая генную, вирусную и клеточную терапию. Особенностью большинства биологических препаратов является необходимость использования парентеральных способов введения (инъекция, инфузия или имплантат) для достижения адекватного системного воздействия, а также для обеспечения их стабильности в процессе хранения. Парентеральный способ введения обеспечивает требуемый уровень эффективности и безопасности при одновременном достижении эффективных затрат.

За период 1986–2014 гг. FDA было зарегистрировано 719 химически синтезируемых и 125 биологических лекарственных препарата, которые относятся к трем группам: 1) First-in-class – препараты, впервые вышедшие на рынок; 2) Advance-in-class – препараты, обладающие значительными преимуществами в своем классе; 3) Addition-to-class – все остальные препараты (рисунок 4) [4].

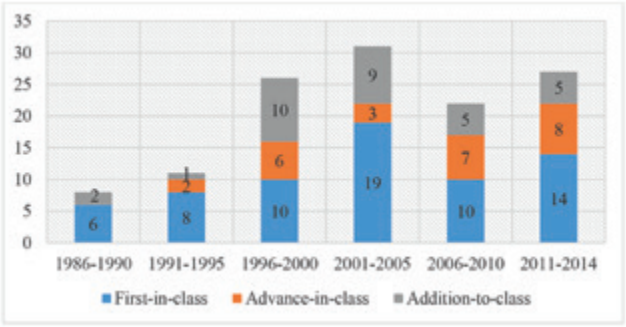


Рисунок 4. Количество зарегистрированных биологических лекарственных препаратов за период 1986–2014 гг. Источник: 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2017

Согласно данным, представленным на рисунке 4, за исследуемый период в секторе биофармпрепаратов наблюдается неуклонный рост препаратов из группы «First-in-class». За период 1986–2014 гг. прорывными среди биофармпрепаратов стали 54% зарегистрированных прератов, в то время как среди химически синтезированных (small-molecule) только 24% относятся к категории «First-in-class» (рисунок 5).

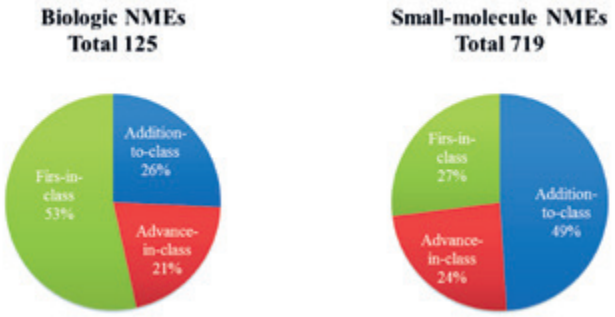


Рисунок 5. Биологические и химически синтезированные лекарственные препараты, вышедшие на рынок за период 1986–2014 гг. Источник: 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2017

Коммерческий успех биотехнологических продуктов еще один ключевой параметр, обеспечивающий неуклонный интерес к данной области. В 2002 г. продажи биотехнологической продукции составили менее 40 млрд. долларов (около 8% от общего объема продаж лекарственных препаратов), в 2007 г – 90 млрд долларов (около 13% от объемов продаж), в 2012 г. – 165 млрд долларов (19% от общего объема продаж). В 2014 г. продажи биотехнологических лекарственных

препаратов составили около 195 млрд долларов, что соответствует 18% от мировых объемов продаж лекарственных препаратов.

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА

В течение последних лет наблюдаются значительные успехи в адресной терапии. В 2016 г. 27% новых лекарств, одобренных FDA, – это персонализированные лекарственные препараты.

Несмотря на существующие сложности в области научных открытий, регуляторной политики, возврата стоимости лечения и интеграции новых технологий в клиническую практику, наблюдается тенденция перехода от традиционной медицины, в основе которой лежит метод проб и ошибок, к системе здравоохранения, которая использует молекулярную информацию для улучшения результатов лечения и повышения эффективности системы здравоохранения [1].

Персонализированная медицина является динамично развивающейся областью, в сфере которой врачи используют диагностические тесты для определения способа лечения, наилучшим образом подходящего каждому пациенту. Объединив данные тестов с историей болезни, внешними обстоятельствами, лечащие врачи и клинические фармакологи могут разработать индивидуальные планы лечения и профилактики заболевания. Таким образом, персонализированные лекарства воздействуют на конкретные биологические маркеры, идентифицированные различными диагностическими тестами.

В 2016 г. персонализированные лекарства составили более 20% всех новых молекулярных субстанций (NME), одобренных FDA (рисунок 6) [5].

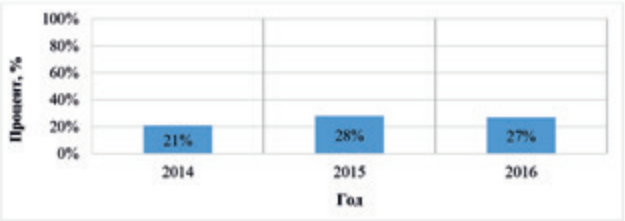


Рисунок 6. Число одобренных FDA персонализированных лекарственных препаратов за период 2014–2016 гг. [5]

В 2016 г. FDA зарегистрировало шесть персонализированных лекарственных препаратов.

1. «Рубрака» (рукапариб) для лечения прогрессирующего рака яичников.
2. «Эксондис 51» (этеплирсен) для лечения мышечной дистрофии Дюшенна.
3. «Эпклуса» (софосбувир и велпатасвир) для лечения хронического гепатита С.
4. «Тецентрик» (атезолизумаб) для лечения прогрессирующего или метастатического уротелиального рака и метастатического немелкоклеточного рака легкого.
5. «Венклекста» (венетоклакс) для лечения хронического лимфоцитарного лейкоза.
6. «Зепатир» (элбасвир и гразопревир) для лечения хронической инфекции гепатита С.

Три препарата используются для лечения онкозаболеваний, два препарата – для лечения гепатита С и один препарат – для лечения мышечной дистрофии.

Примером персонализированной медицины является CRISPR/Cas9-технология, которая позволяет редактировать геном человека с целью лечения наследственных заболеваний. Совместное предприятие Bayer и CRISPR Therapeutics изучает возможность использования этой технологии в прорывной терапии ряда серьезных заболеваний [1].

К сожалению, использование персональных данных в процессе проведения диагностических тестов затрагивает проблемы защиты данных и конфиденциальности пациентов, что вместе с недостаточным уровнем интеграции информационных наук является ограничивающим фактором для широкого использования данного подхода в клинической практике [6].

Ярким представителем внедрения персонализированной медицины является динамично развивающийся рынок орфанных препаратов. Согласно мнению экспертов, объемы продаж орфанных препаратов практически удвоятся в период между 2016–2022 гг. и достигнут 217 млрд долларов к 2022 г. Данная тенденция демонстрирует факт того, что программы исследований и разработок все чаще ориентируются на более узкие группы пациентов, характеризующиеся большей неудовлетворенной потребностью, что облегчает выход нового препарата на рынки. Инициативы в указанной исследовательской области активно поддерживаются регулирующими органами посредством:

- снижения пошлин;
- добавления рыночной эксклюзивности препарату (продление срока действия патента);
- бесплатных научных рекомендаций (EMA для педиатрических исследований);
- сокращения времени рассмотрения заявки (50% в Японии).

Основными целевыми областями применения орфанных препаратов являются гематоонкология, онкология и ферментная заместительная терапия (ERT) [1].

Кроме того, потребности в персонализированной медицине явились толчком для развития новых способов производства лекарственных препаратов. Одним из таких способов является 3D-печать, которая является точным аддитивным способом производства, что позволяет изготовить препараты любой дозировки. Согласно мнениям экспертов, к 2026 г. процент инвестиций в 3D-печать, направленных на медицинские проекты, достигнет 21%, хотя на сегодняшний день из 700 млн долларов «трёхмерных» вложений им достаётся только 1,6 млн долларов (0,2%) [7].

СИСТЕМА ОБРАБОТКИ БОЛЬШИХ ОБЪЕМОВ ДАННЫХ (BIG DATA)

Технологические достижения как в области науки, так и в области информационных технологий порождают все больший объем данных о здоровье и лекарственных препаратах.

В регулировании лекарственных средств и здравоохранении влияние Big Data ощущается поразному. Доступность электронных медицинских записей от миллионов пациентов обеспечивает лучшее понимание использования, эффективности и безопасности лекарственных средств в клинической практике. Данные геномики являются причиной пересмотра знаний о болезнях в соответствии с геномным профилем. Кроме того, недавно обнаруженные биомаркеры облегчают раннюю диагностику заболеваний, а также позволяют отслеживать ответы организма на лечение. Вместе с тем широкое распространение мобильных устройств и социальных сетей обеспечивает беспрецедентный доступ к данным о пациентах, образу их жизни, что позволяет отслеживать болезни и в режиме реального времени. Все эти примеры иллюстрируют потенциал Big Data в интересах пациентов и возможность учета индивидуальных особенносте пациентов при принятии решений о назначаемой лекарственной терапии.

Основная цель использования Big Data в клинической практике состоит в том, чтобы совместить области компетенций людей (взаимодействие человека с человеком, креативность, сострадание) и компьютеров (быстрая обработка большого количества данных, поиск совпадений) для улучшения системы здравоохранения.

Использование Big Data позволит персонализировать медицину, получать доступ к доказательствам, основанным на лечении, в режиме реального времени, а также даст новые инструменты для эффективного контроля за пациентами [8–9].

ПЕРЕДОВЫЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ

В течение последующих пяти лет ожидается выход на рынок перспективных инновационных классов продуктов/технологий, таких как

- CAR-T-терапия – терапия с использованием генетически модифицированных Т-клеток, которые нацелены на ассоциированный с опухолью антиген, позволяющий Т-клетке распознавать и уничтожать опухолевые клетки;
- генная терапия – введение пациенту молекулы ДНК для лечения генетического заболевания. Новая ДНК обычно корректирует или вставляет функционирующую копию мутированного гена, ответственного за развитие болезни;
- клеточная терапия, включающая в себя введение живых клеток пациенту для замены/восстановления поврежденной ткани для улучшения функционирования органов и тканей;
- комбинированные терапевтические схемы обещают обеспечить превосходные результаты по сравнению с монотерапией благодаря сочетанию различных механизмов действия;
- использование антибактериальных антител, которые связывают и нейтрализуют высокоэволюционно-консервативные патогенные бактериальные поверхностные белки или секретируемые токсины и активируют иммунную систему, чтобы непосредственно убивать бактерии. Антибактериальные антитела дают возможность использования нового терапевтического подхода для лечения конкретных типичных и устойчивых штаммов бактериальных инфекций, что является альтернативой антибиотикотерапии. Данное направление исследований является крайне важным, так как при сохранении нынешней тенденции устойчивости бактерий к антибиотикам, антибиотикорезистентность станет причиной смерти 300 млн человек в течение следующих 35 лет [10].

СОЗДАНИЕ УСЛОВИЙ ДЛЯ ИНТЕГРАЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ПРАКТИКУ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

В развитых странах накоплен огромный опыт по интеграции результатов научных исследований в практику фармацевтической промышленности. В данном аспекте важную роль играет привлечение частного сектора, так как объем бюджета любого государства

ограничен. Общими механизмами привлечения коммерческих организаций к финансированию научной деятельности являются [11]:

- экономическое стимулирование исследовательской кооперации в частном секторе и исследовательской кооперации частного сектора с государственным и университетским секторами, в том числе налоговое стимулирование кооперации, льготное кредитование совместных проектов, долевое финансирование со стороны государства крупных научно-технических проектов;
- безвозмездная передача или предоставление на льготных условиях в постоянное или временное пользование государственного имущества для проведения исследований и разработок компаниям частного сектора;
- создание спроса со стороны государства на результаты исследований и разработок через механизмы государственного заказа;
- развитие государственно-частного партнерства;
- создание и поддержка европейских технологических платформ;
- использование потенциала малых фирм как источника инноваций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фармацевтическая промышленность и регулирующие органы стремятся обеспечить доступ к новым лекарственным средствам на ранних этапах лечения на глобальном уровне. Механизмы ускоренного доступа к новым препаратам в США, Европейском союзе и Японии играют ключевую регуляторную роль в ускорении разработки новых инновационных лекарственных препаратов. Достижения в области глобализации регулирования фармацевтического рынка способствуют глобальному развитию лекарственных средств.

Однако в настоящее время существует несколько основных угроз для данного оптимистического прогноза развития мирового фармацевтического рынка.

1. Продажи объемом 249 млрд долларов подвержены риску в период между 2016 и 2022 гг. вследствие нахождения фармацевтической промышленности во второй волне патентного обвала, в которой биосимиляры находятся в конкуренции с биологическими блокбастерами, что является крайне сдерживающим фактором для роста объемов продаж.
2. Пейзаж доступа к рынкам быстро трансформируется, и критерии, установленные плательщиками, становятся гораздо более жесткими. Кроме того, имеет место тенденция к увеличению количества препаратов, исключенных из списка льготных, расходы на которые частично или полностью покрываются страховыми компаниями.
3. Фокус разработчиков в области редких болезней для преодоления неудовлетворенных медицинских потребностей связан с более ограниченной информацией при регистрации нового лекарственного препарата, что создает дополнительные риски и существенно повышает важность постмаркетингового мониторинга лекарственных препаратов [1–3, 8].
4. Все большее число лекарственных препаратов с механизмом действия, воздействующим на геном человека и/или геномные биомаркеры, создают проблемы законодательного регулирования и защиты персональных данных пациентов [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. JC. Scheeren. New approaches of regulating innovative medicines. Industry perspectives on regulating innovative medicines // 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2017. Швеция, Стокгольм.
2. Lifetime Trends in Biopharmaceutical Innovation // QuintilesIMS Institute. URL: http://www.imshealth.com/en/thought-leadership/quintilesims-institute/reports/lifetime-trends-in-biopharmaceutical-innovation (дата обращения 26.07.2017).
3. L. Liberti. Exploring Innovative Regulatory Pathways: A US Perspective // 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2017. Швеция, Стокгольм.
4. HC. Mahler. Biologics Drug Product Development & Manufacture: Current Challenges & Innovation // 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2017. Швеция, Стокгольм.
5. Personalized Medicine Coalition. Personalized Medicine at FDA, 2016. Progress Report.
6. T. Salmonson. Future medicines: regulatory sciences // 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2017. Швеция, Стокгольм.
7. Д.А. Демидёнок, В.А. Маркова. Перспективы использования метода 3D-печати для производства термолабильных лекарственных препаратов // Сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия. – Санкт-Петербург. 2016. С. 294–298.
8. European Medicines Agency. Identifying opportunities for «big data» in medicines development and regulatory science. Report from a workshop held by EMA on 14–15 November 2016. P. 3–9.
9. A. Cave. Opportunities and Challenges for Big Data to Support Regulatory Decision Making // 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2017. Швеция, Стокгольм.
10. T. Allvin. The Innovative pipelines of the pharmaceutical industry // 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2017. Швеция, Стокгольм.
11. А.А. Сёмин. Анализ отечественного и зарубежного опыта по планированию и регулированию исследований в области фармацевтики // Кубанский научный медицинский вестник. 2017. № 3(24). С. 149–159.

УДК 615.12; 615.15

РАЗРАБОТКА ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ПРОВЕДЕНИЯ МЕРОПРИЯТИЙ В АПТЕЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЯХ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ФАРМАКОНАДЗОРА

Г.Я. Ибрагимова[1], А.Х. Гайсаров[1]*

Резюме. В статье проанализированы действующие нормативные правовые акты Российской Федерации в области фармаконадзора. Показано, что в настоящее время отсутствует правовое регулирование множества аспектов проведения конкретных мероприятий фармацевтическими работниками в аптечных организациях, необходимых для дальнейшего осуществления фармаконадзора. Представлена разработанная нами функциональная модель проведения мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора. Выявлена необходимость наличия в аптечных организациях стандартных операционных процедур, регламентирующих порядок проведения мероприятий для осуществления фармаконадзора.

Ключевые слова: фармаконадзор, аптечные организации, стандартные операционные процедуры.

THE DEVELOPMENT OF THE FUNCTIONAL MODEL OF THE CONDUCTING ACTIVITIES IN PHARMACIES FOR IMPLEMENTATION OF PHARMACOVIGILANCE

G.Ia. Ibragimova[1], A.Kh. Gaisarov[1]*

Abstract. In this article the current state of the legal regulations in Russian Federation for pharmacovigilance has been analyzed. The lack of legal regulations of a lot of aspects of holding concrete actions by pharmacists in pharmacies, necessary for further implementation of pharmacovigilance, has been shown. Our functional model of the conducting activities in pharmacies for implementation of pharmacovigilance has been presented. Necessity of presence of the standard operating procedures in pharmacies regulating an order of conducting activities for implementation of pharmacovigilance has been revealed.

Keywords: pharmacovigilance, pharmacies, standard operating procedures.

1 – ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450008, Россия, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3

1 – Bashkir State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 3, Lenina str., Ufa, 450008, Russia

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

ВВЕДЕНИЕ

Согласно действующему российскому законодательству фармаконадзор представляет собой вид деятельности по мониторингу эффективности и безопасности лекарственных препаратов, направленный на выявление, оценку и предотвращение нежелательных последствий применения лекарственных препаратов и осуществляемый Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения (далее – Росздравнадзор) [1]. При этом среди субъектов обращения лекарственных средств, обязанных информировать Росздравнадзор о фактах и обстоятельствах, представляющих угрозу жизни или здоровью человека при применении лекарственных препаратов, важную роль играют фармацевтические работники аптечных организаций. Однако в настоящее время в действующих нормативных правовых актах Российской Федерации не отражены многие аспекты проведения конкретных мероприятий фармацевтическими работниками в аптечных организациях, реализация которых, несомненно, способствовала бы дальнейшему осуществлению фармаконадзора Росздравнадзором. Это обстоятельство вызывает необходимость проведения исследований в целях определения основных элементов, обусловливающих эффективное проведение подобных мероприятий в аптечных организациях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходными материалами являлись тексты нормативных правовых актов Российской Федерации [1, 2]. В процессе исследования применялись грамматический и логический способы толкования нормативных правовых актов, а также была использована методология $IDEF_0$ [3], позволяющая создать функциональную модель, отображающую структуру и функции системы, а также потоки информации и материальных объектов, связывающие эти функции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время фармаконадзор осуществляется Росздравнадзором путем анализа представляемой субъектами обращения лекарственных средств (в том числе фармацевтическими работниками аптечных организаций) информации:

1) о побочных действиях лекарственных средств;
2) о нежелательных реакциях, серьезных нежелательных реакциях, непредвиденных нежелательных реакциях при применении лекарственных препаратов;
3) об индивидуальной непереносимости лекарственных препаратов;
4) об отсутствии эффективности лекарственных препаратов;
5) об иных фактах и обстоятельствах, представляющих угрозу жизни или здоровью человека при применении лекарственных препаратов [1, 2].

В случае аптечных организаций источниками информации о вышеуказанных осложнениях фармакотерапии, как правило, являются их посетители. Очевидно, что для дальнейшего осуществления фармаконадзора необходимо первоначальное проведение в аптечных организациях комплекса мероприятий по получению максимально подробной информации о возникшей ситуации от посетителя аптеки.

По общему правилу, субъекты обращения лекарственных средств (в том числе фармацевтические работники аптечных организаций) для предоставления полученных сведений в Росздравнадзор должны заполнить извещение о нежелательной реакции или отсутствии терапевтического эффекта лекарственного препарата, форма которого утверждена приложением № 1 к Порядку осуществления фармаконадзора [2]. При этом пункт 11 данного порядка предусматривает возможность предоставления рассматриваемых сведений в Росздравнадзор в произвольной форме, если их характер не соответствует содержанию полей формы вышеуказанного извещения [2].

Пункт 38 Порядка осуществления фармаконадзора устанавливает следующие основные сведения о нежелательной реакции или другой особой ситуации:

1) информация, позволяющая идентифицировать юридическое или физическое лицо, выявившее нежелательную реакцию или особую ситуацию;
2) информация, позволяющая идентифицировать физическое лицо, у которого наблюдалась нежелательная реакция;
3) информация, позволяющая идентифицировать лекарственный препарат;
4) информация, позволяющая идентифицировать симптомы нежелательной реакции [2].

Однако необходимо отметить, что в связи с определенной юридической конструкцией вышеуказанной правовой нормы она распространяется только на медицинские организации. Тем не менее не вызывает сомнений, что перечисленная выше информация является принципиальной для дальнейшего осуществления фармаконадзора и, следовательно, ее могут принимать во внимание и фармацевтические работники при заполнении извещения для последующей отправки в Росздравнадзор.

С учетом вышеизложенного нами была разработана функциональная модель проведения мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора. Для этой цели использовалась методология $IDEF_0$, позволяющая создать функциональную модель, отображающую структуру и функции системы, а также потоки информации и материальных объектов, связывающие эти функции [4].

Использование данной методологии подразумевает первоначальное описание системы в целом, а также ее взаимодействий с окружающим миром, что представляет собой контекстную диаграмму модели. После этого проводится функциональная декомпозиция контекстной диаграммы с разделением системы на несколько подсистем, что обеспечивает возможность отдельного описания каждой из подсистем [5]. Конечная цель разработки данной модели состоит в определении основных элементов эффективного проведения мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора.

На рисунке 1 представлена контекстная диаграмма вышеуказанной функциональной модели, отображающей комплекс объектов, материальных и информационных ресурсов, которые в совокупности обеспечивают достижение поставленной цели. Подробное описание элементов данной контекстной диаграммы представлено в таблице 1.

Далее нами в соответствии с методологией $IDEF_0$ была проведена детализация контекстной диаграммы разработанной модели на ряд функциональных блоков, отражающих основные элементы эффективного проведения мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора, и приведены соответствующие им материальные и информационные ресурсы (рисунок 2).

На первом этапе (первый функциональный блок) отражено поступление информации к фармацевтическим работникам аптечной организации от посетителей об имеющемся факте возникновения нежелательных реакций и/или отсутствия терапевтического эффекта у лекарственного препарата. Необходимо отметить, что возникновение у лиц данных осложнений может быть обусловлено особенностями проводимой фармакотерапии, в том числе индивидуальными особенностями человека, включая детский возраст [6].

На данном этапе основная задача фармацевтических работников заключается в получении максимально полной информации о случившемся осложнении фармакотерапии, в том числе путем задания

Рисунок 1. Контекстная диаграмма функциональной модели проведения мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора

дополнительных уточняющих вопросов посетителю аптеки, сообщающему эту информацию. Это обусловливается спецификой обращения лиц в аптечные организации, так как в отличие от медицинских организаций в аптеке в подавляющем большинстве случаев изначально имеется минимум медицинских (рецепт на лекарственный препарат) и личных (например, полученных в ходе маркетинговых кампаний) данных об этих лицах либо такие данные полностью отсутствуют (например, если это лицо не приобретало в данной аптечной организации лекарственный препарат, вызвавший какое-либо осложнение фармакотерапии, и при этом посещает ее впервые).

В связи с тем, что в настоящее время процесс получения рассматриваемой информации подробно не регламентируется нормативными правовыми ак-

Таблица 1.

Элементы контекстной диаграммы функциональной модели проведения мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора

Элемент	Тип	Описание
Особенности проводимой у лиц фармакотерапии с соответствующей структурой нежелательных реакций и возможностью отсутствия терапевтических эффектов	Вход (input)	Имеющиеся особенности фармакотерапии, которые привели к возникновению у лиц (в т.ч. посетителей аптеки) нежелательных реакций и/или отсутствию терапевтического эффекта у лекарственного препарата.
Нормативные правовые акты	Управление (control)	Нормативные правовые акты Российской Федерации, регламентирующие порядок осуществления фармаконадзора.
Стандартные операционные процедуры аптечных организаций	Управление (control)	Локальные нормативные акты аптечных организаций, регламентирующие непосредственный порядок проведения мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора.
Посетители аптечных организаций	Механизм (mechanism)	Лица, информирующие фармацевтических работников аптечной организации об имеющемся факте возникновения нежелательных реакций и/или отсутствия терапевтического эффекта у лекарственного препарата.
Заведующий аптечной организацией	Механизм (mechanism)	Общее руководство проводимыми мероприятиями в аптечной организации для осуществления фармаконадзора, а также утверждение соответствующих стандартных операционных процедур.
Другие фармацевтические работники (за исключением заведующего аптечной организацией)	Механизм (mechanism)	Непосредственное участие в получении информации от посетителя аптечной организации об имеющемся факте возникновения нежелательных реакций и/или отсутствия терапевтического эффекта у лекарственного препарата, а также в обработке данной информации и ее отправке в Росздравнадзор.
Эффективное проведение мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора	Выход (output)	Представляет собой конечную цель разработки данной модели и заключается в юридически корректном и максимально полном получении информации от посетителей аптечных организаций об имеющемся факте возникновения нежелательных реакций и/или отсутствия терапевтического эффекта у лекарственного препарата, а также последующая обработка полученной информации и ее отправка в Росздравнадзор.

Рисунок 2. Детализация контекстной диаграммы разработанной функциональной модели, отражающая основные элементы эффективного проведения мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора

тами, большое значение приобретают соответствующие стандартные операционные процедуры, которые должны быть разработаны в аптечных организациях самостоятельно и заблаговременно.

На втором этапе (второй функциональный блок) фармацевтические работники обрабатывают полученную от посетителей аптеки информацию и приводят ее в форму, пригодную для внесения сведений в извещение о нежелательной реакции или отсутствии терапевтического эффекта лекарственного препарата. Кроме этого, если речь идет о лекарственном препарате, приобретенном в данной аптечной организации, то на этом этапе возможно проведение в ней дополнительных мероприятий (силами сотрудников аптеки) по проверке правильности соблюдения условий хранения рассматриваемого лекарственного препарата, условий его отпуска и т.п. Следовательно, как и на предыдущем этапе, при осуществлении вышеуказанных мероприятий большую роль играют стандартные операционные процедуры аптечных организаций.

На третьем этапе (третий функциональный блок) представлена заключительная стадия проведения мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора – отправка обработанной информации (в виде извещения) в Росздравнадзор. Действующий порядок осуществления фармаконадзора предусматривает возможность отправки сообщений через автоматизированную информационную систему Росздравнадзора (при наличии к ней доступа в аптечной организации) либо по электронной почте [2]. Кроме этого, в приложении № 1 к вышеуказанному порядку, устанавливающем форму извещения, указана возможность его отправки через факс, а также в бумажном виде по почте [2].

Выходом для данной модели является эффективное проведение мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанная нами функциональная модель отражает основные элементы проведения мероприятий в аптечных организациях для осуществления фармаконадзора, представленные в составе трех функциональных блоков, соответствующих определенному этапу действий фармацевтических работников (получение исследуемой информации от посетителей аптечных организаций, ее обработка и отправка обработанной информации в Росздравнадзор). Использование данной модели позволит обеспечить эффективность вышеуказанных мероприятий в аптечных организациях, а сама модель может служить основой для дальнейших исследований в области совершенствования порядка их проведения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 № 61-ФЗ.
2. Об утверждении порядка осуществления фармаконадзора: приказ Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения от 15.02.2017 № 1071.
3. Р 50.1.028-2001. Рекомендации по стандартизации. Информационные технологии поддержки жизненного цикла продукции. Методология функционального моделирования: постановление Госстандарта России от 02.07.2001 № 256-ст.
4. С.В. Маклаков. BPwin и ERwin. CASE-средства разработки информационных систем. – М.: ДИАЛОГ-МИФИ, 2001. 304 с.
5. Р.В. Насыров, Г.Я. Ибрагимова, А.Х. Гайсаров. Разработка функциональной модели формирования запасов медицинского имущества для оказания медицинской помощи лицам детского возраста, пораженным в условиях чрезвычайных ситуаций // Медицинский вестник Башкортостана. 2015. Т. 10. № 5. С. 5–9.
6. Г.Я. Ибрагимова, А.Х. Гайсаров, Р.В. Насыров. Перспективы использования реестра типовых инструкций взаимозаменяемых лекарственных препаратов в целях улучшения лекарственного обеспечения пациентов детского возраста // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 3. С. 190–193.

УДК 339.13; 615.23; 616-002-053.2

КОМПЛЕКСНАЯ МАРКЕТИНГОВАЯ ОЦЕНКА РЫНКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПНЕВМОНИИ У ДЕТЕЙ

Д.Д. Сиукаева[1]*, О.Д. Немятых[1], И.А. Наркевич[1], Н.И. Павленко[1]

Резюме. Полученные в работе данные демонстрируют, что наибольшая (52%) доля препаратов для этиотропной терапии пневмонии у детей представлена зарубежными предприятиями-производителями. При этом в структуру импорта максимальный вклад вносят азиатские страны, в первую очередь Индия (38,45%) и Китай (6,46%). Наибольший удельный вес на рынке имеют препараты в формах порошков и лиофилизатов (43,20%), таблеток (36,66%), а также растворов для инъекций (11,72%). Значительная (83,75%) доля импортных субстанций в общей структуре предложения указывает на зависимость отечественного производителя от поставок сырья из-за рубежа. Абсолютное большинство репрезентованных на российском рынке препаратов (45,70%) и фармацевтических субстанций (36,98%) относится к группе бета-лактамных антибиотиков. Анализ предложения в разрезе возрастных ограничений позволяет утверждать, что детям до трех лет разрешены к применению лишь 50% ассортимента зарегистрированных лекарственных средств. Результаты мониторинга побочного действия меронема, цефтриаксона, ципрофлоксацина и цефтазидима в педиатрической практике указывают на высокую вероятность развития нежелательных реакций со стороны пищеварительной и нервной систем.

Ключевые слова: фармацевтический рынок, пневмония, педиатрия.

COMPREHENSIVE ASSESSMENT OF THE MARKET DRUGS FOR TREATMENT OF PNEUMONIA IN PEDIATRICS

D.D. Siukaeva[1]*, O.D. Nemyatyh[1], I.A. Narkevich[1], N.I. Pavlenko[1]

Abstract. The results of present work show that the largest (52%) share of drugs for etiotropic therapy of pneumonia in pediatrics is represented by foreign manufacturers. Asian countries (India (38,45%) and China (6,46%) bring the most contribution into the structure of import. Drugs in form of powders and lyophilizates (43,20%), tablets (36,66%), and injections (11,72%) have the largest specific weight on market. The fraction of substances (83,75%) in the structure of import supply indicates the dependence of local manufacturers on raw material from abroad. The presentation of beta-lactam antibiotics (drugs – 45,70%, pharmaceutical substances – 36,98%) is most frequent. It's important to notice that only 50% of drugs for pneumonia therapy may be allowed to use for children under 3 years. The monitoring of side effects in pediatrics results (meronem, cephtriaxon, ciprofloxacin and cephtazidim) shows high probability of developing of adverse effects from digestive and nervous systems.

Keywords: pharmaceutical market, pneumonia, pediatrics.

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

1 – St. Petersburg Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Healthcare, 14A, Prof. Popov str., St. Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: siukaeva.dina@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистике ВОЗ, пневмония входит в перечень десяти наиболее распространенных причин летальности во всем мире и ежегодно уносит жизни примерно 1,1 млн детей, обуславливая при этом смертность в 17,5% случаев у пациентов в возрасте до 5 лет [1].

По данным Минздрава России, патологии органов дыхания у детей в возрасте до 17 лет занимают третье место в структуре причин смертности, а заболеваемость внебольничной пневмонией составляет 354,1 случаев на 100 тыс. населения. При этом уровень заболеваемости детей в возрасте до 15 лет превышает аналогичный показатель, регистрируемый у взрослых, более чем в 2 раза, что обусловлено морфофункциональной незрелостью формирующегося организма ребенка при воздействии широкого спектра потенциальных возбудителей [2–4].

На сегодняшний день неоспоримым представляется тот факт, что эффективность фармакологической коррекции острого воспаления легочной ткани и связанных с ним состояний определяется этиотропной терапией, базирующейся на рациональном применении антибактериальных препаратов и/или их комбинаций. При этом возможности для фармакотерапии во многом лимитированы требованиями стандартов оказания медицинской помощи в педиатрии, а также ассортиментом лекарственных средств, репрезентованных на фармацевтическом рынке [2, 5, 6].

Цель работы – оценить современное состояние российского рынка препаратов категории J «Противомикробные препараты для сис-

темного использования» (Anatomical Therapeutic Chemical Classification System), применяемых в качестве этиотропной терапии у детей с внебольничной пневмонией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались методы контент-анализа, агрегирования данных, сравнительного анализа. Информационную базу исследования составили данные Государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС) по состоянию на 6 марта 2017 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Исследование ассортимента лекарственных средств категории J «Противомикробные препараты для системного использования», внесенных в ГРЛС, по состоянию на начало 2017 г. позволило установить, что в обращении на фармацевтическом рынке России находятся лекарственные препараты 1912 наименований, среди которых 48% отечественного и 52% импортного происхождения. Существенный вклад в структуру импорта вносят 15 стран, формируя таким образом более 40% ассортимента (рисунок 1). При этом обращает на себя внимание тот факт, что подавляющее число продуцентов расположено в России (таблица 1) [7].

Данные ГРЛС демонстрируют, что выпуск отечественных антибактериальных средств обеспечивают 212 предприятий, в том числе ООО «АБОЛмед» (38 наименований), ОАО «Красфарма» (35 наименований), ОАО «АВВА РУС» (31 наименование), АО «Фармасинтез» (28 наименований), ОАО «Акционерное Курганское общество медицинских препаратов и изделий «Синтез» (28 наименований). При этом продукция остальных производителей охватывает лишь 16% российского предложения.

Таблица 1.

Ведущие страны-поставщики препаратов

Страна	Количество предприятий-производителей
Россия	212
Индия	153
Китай	29
Великобритания	28
Турция	24
Словения	23
Республика Беларусь	16
Италия	15
Германия	9

Сравнительная оценка вклада отдельных форм выпуска в общую структуру ассортимента указывает на тот факт, что наибольший удельный вес в исследуемом разрезе имеют порошки и лиофилизаты (43,20%), таблетки (36,66%) и растворы для инъекций (11,72%). Другие формы выпуска в структуре предложения суммарно охватывают всего 8,42% (рисунок 2). Обращает на себя внимание отсутствие на рынке корригированных форм, предпочтительных для использования в педиатрической практике.

Исследование распределения ассортимента лекарственных средств, применяемых для лечения пневмонии у детей, по особенностям химического строения и биологической активности позволило выделить группы антибактериальных средств с наибольшим удельным весом в общей структуре, а именно: цефа-

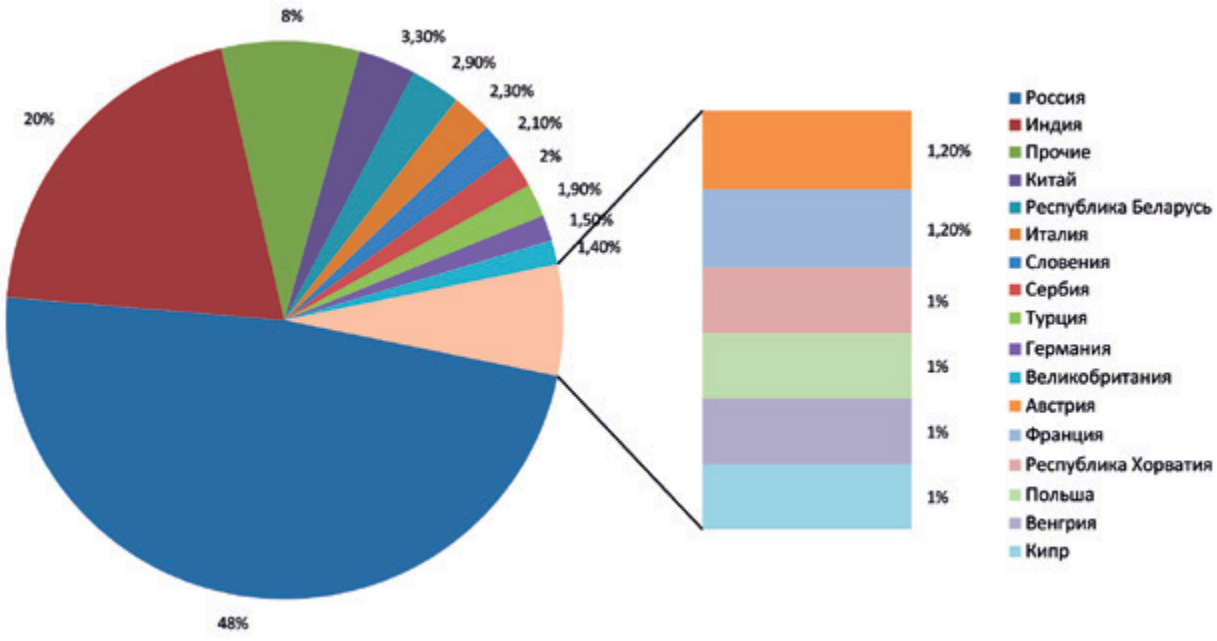


Рисунок 1. **Структуризация ассортимента антибактериальных средств по странам-поставщикам**

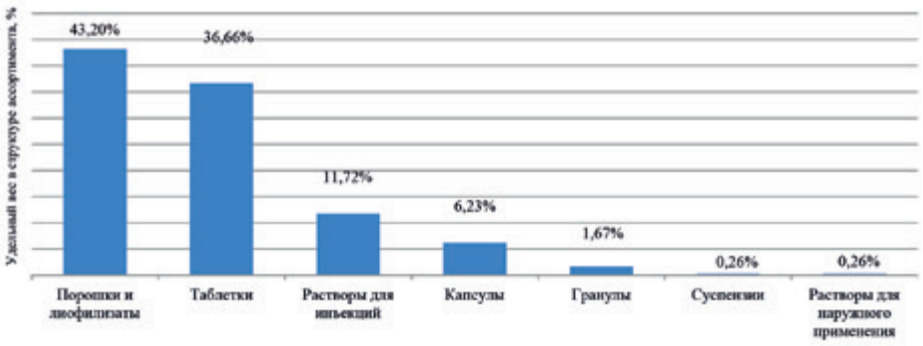


Рисунок 2. Структуризация предложения антибактериальных средств по формам выпуска

лоспорины, фторхинолоны, макролиды, пенициллины. Примечательно, что все остальные фармакотерапевтические группы суммарно охватывают менее 20% ассортимента. При этом ширина ассортимента в группе J01D указывает на приоритетность использования лекарственных препаратов в разрезе фармакологической коррекции пневмонии в педиатрии (рисунок 3).

Рисунок 3. Структуризация предложения антибактериальных средств по особенностям химического строения и биологической активности

Следует отметить, что в исследуемом сегменте фармацевтического рынка преобладают препараты на основе азитромицина (6,78%), левофлоксацина (6,74%), ципрофлоксацина (6,42%), кларитромицина (5,48%), цефтриаксона (5,22%), метронидазола (5,22%), комбинации «амоксициллин + клавулановая кислота» (4,65%), офлоксацина (3,5%), цекфотаксима (3,24%), меронема (3,19%), амоксициллина (3,08%). Вклад лекарственных препаратов, фармацевтическая разработка которых базируется на иных МНН, сравнительно невелик и составляет менее 3% для отдельного наименования.

Результаты проведенного анализа демонстрируют, что возможность применения препарата в педиатрической практике в значительной степени определяется возрастом маленьких пациентов с внебольничной пневмонией. Важно подчеркнуть, что у больных до 18 лет запрещены к применению 585 позиций антибактериальных средств, а ответственность за включение в тактику терапии детей более раннего возраста лекарственных препаратов из группы фторхинолонов может принять на себя исключительно консилиум врачей (рисунок 4) [2].

Анализ международных баз по мониторингу побочных реакций лекарственных средств в плоскости исследуемой проблемы позволил прийти к заключению, что нежелательные эффекты, возникающие на фоне приема антибактериальных препаратов у детей, преимущественно связаны с морфо-функциональными преобразованиями пищеварительной и нервной систем (рисунок 5) [8, 9].

Оценка предложения фармацевтических субстанций на российском рынке в рассматриваемом разрезе позволяет утверждать, что подавляющее (44,60%) число позиций представлено китайскими производителями. При этом 107 предприятий поставляют свою продукцию на российский рынок (рисунок 6). Стоит отметить, что наибольшую (29,5%) долю зарегистрированных субстанций охватывает группа J01D «Бета-лактамные антибактериальные препараты, прочие» (J01DA «Цефалоспорины», J01DF «Монобактамы», J01DH «Карбапенемы») [рисунок 7].

Результаты маркетинговой оценки показывают, что выпуск отечественных субстанций обеспечивают 39 предприятий, в том числе ОАО «Синтез» (23 наименования), ЗАО «Активный компонент» (4 наименования), ОАО «Биосинтез» (4 наименования), ОАО «Акционерное курганское общество» (3 наименования) (таблица 2).

Таблица 2.

Ведущие страны-поставщики фармацевтических субстанций

Страна	Количество предприятий-производителей
Китай	107
Индия	45
Россия	39
Италия	12
Корея	10
Германия	5
Испания	5

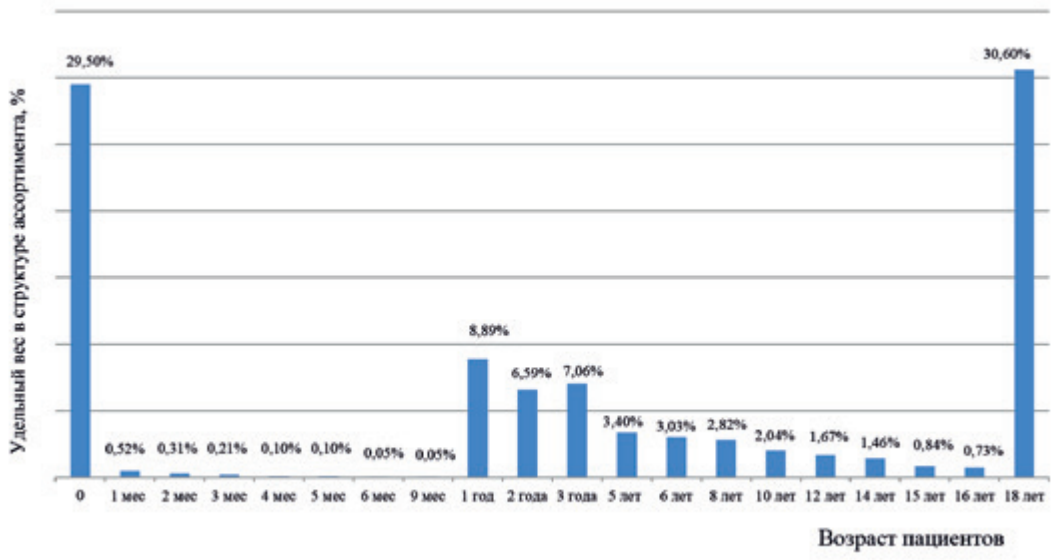


Рисунок 4. Структуризация предложения антибактериальных средств по особенностям применения в педиатрической практике

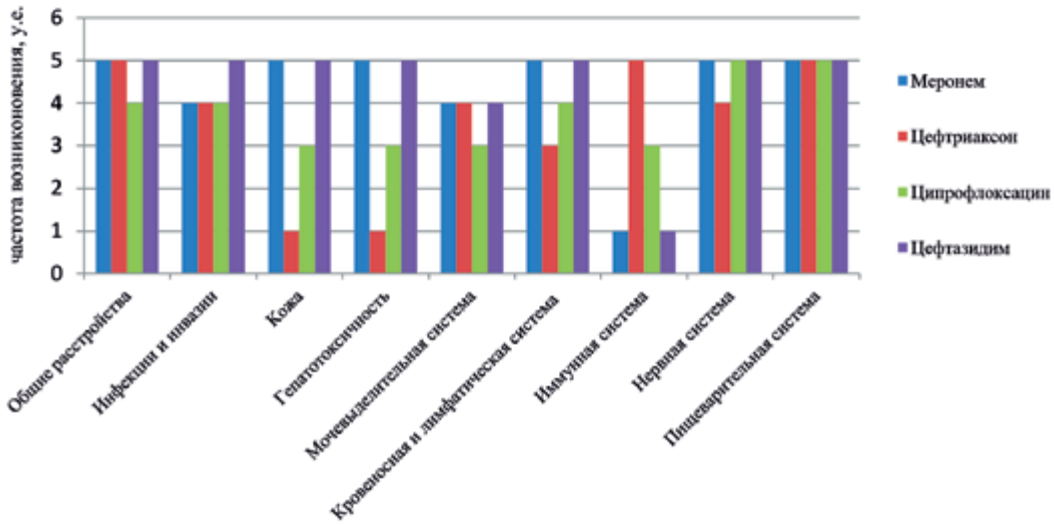


Рисунок 5. Направленность и вероятность развития нежелательных реакций, обусловленных воздействием антибактериальных средств на организм ребенка

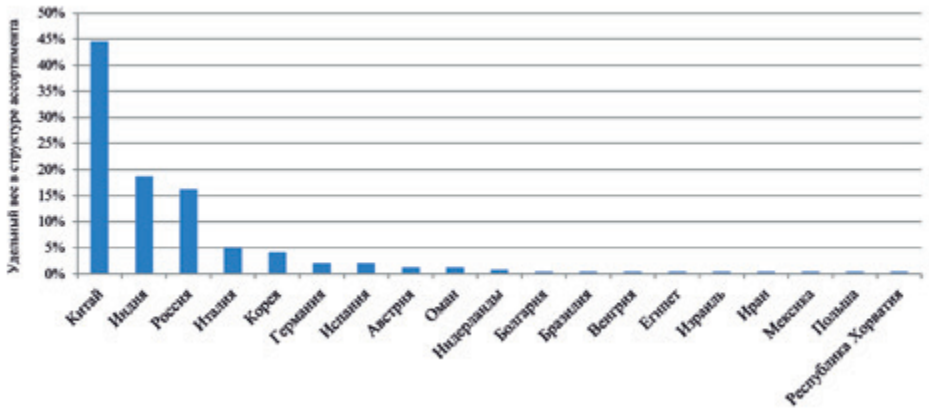


Рисунок 6. Структуризация фармацевтических субстанций по странам-производителям

Рисунок 7. Структуризация предложения фармацевтических субстанций по особенностям химического строения и биологической активности

Основные параметры ассортимента и характеристики макроконтура отечественного рынка лекарственных средств для этиотропной терапии пневмонии у детей демонстрируют необходимость изменения направления вектора традиционных фармацевтических разработок в сторону формирования номенклатуры инновационных конкурентоспособных лекарственных средств, в том числе в виде детских лекарственных форм, производство которых не зависит от закупки сырья зарубежом (рисунок 8).

Рисунок 8. Ассортиментный макроконтур фармацевтического рынка антибактериальных средств, применяемых для лечения пневмонии у детей

Примечание: * показатели макроконтура для фармацевтических субстанций

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты дают основания полагать, что заполнение отечественного фармацевтического рынка антибактериальными средствами для лечения пневмонии у детей сегодня осуществляется в основном препаратами зарубежных производителей. При этом репрезентованные позиции разработаны преимущественно на основе активных компонентов-представителей бета-лактамов, макролидов и фторхинолонов в формах порошков и лиофилизатов, таблеток и растворов для инъекций, что, в свою очередь, предоставляет врачу ограниченные возможности вариабельности фармакотерапии в условиях нарастающей пневмонии, соответствующей возрасту ребенка, микробному пейзажу и картине антибиотикорезистентности. Привлекательностью для национального производителя в первую очередь обладают сегменты фармацевтических субстанций, а также корригированных форм, что в конечном итоге позволит повысить эффективность деятельности по оптимизации лекарственного обеспечения детей с внебольничной пневмонией.

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. Информационный бюллетень (ноябрь 2016) URL: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/ru/ (дата обращения 11.03.2017).
2. Внебольничная пневмония у детей. Клинические рекомендации. – М.: Оригинал-макет, 2015. 64 с.
3. И.А. Наркевич, О.Д. Немятых, И.И. Басакина, Д.Д. Сиукаева. Фармацевтическая разработка лекарственных препаратов для педиатрической практики: фундаментальные основы и специфические особенности // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 3(16). С. 194–201.
4. И.А. Наркевич, О.Д. Немятых, Е.В. Кулдыркаева, В.Е. Шумлянская, Д.Д. Сиукаева. Система фармаконадзора: международный опыт и перспективы в России // Фармация. 2016. № 7. Т. 65. С. 3–7.
5. Д.Д. Сиукаева, О.Д. Немятых. Внебольничная пневмония в педиатрии: тактика фармакологической коррекции и центральные аспекты фармакоэкономики // Медицинский вестник Башкортостана. 2016. Т. 11. № 6(66). С. 114–118.
6. Д.Д. Сиукаева, Д.А. Баяндуров, О.С. Емелина, Д.В. Савельева, Н.И. Павленко. Антибиотикотерапия внебольничной пневмонии в педиатрии: региональные аспекты // Молодая фармация – потенциал будущего. 2017. С. 912–917.
7. Государственный реестр лекарственных средств. URL: https://www.rlsnet.ru/ (дата обращения 06.03.2017).
8. European medicines agency. URL: http://www.ema.europa.eu/ema/ (дата обращения 10.03.2017).
9. Food and drug administration. 2017. URL: https://www.fda.gov/ (дата обращения 10.03.2017).

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 ёмкость 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

УДК 615.1/.4

АКТИВНЫЕ СУБСТАНЦИИ ДЛЯ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ЛЕКАРСТВ: ПРОШЛОЕ, НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ

К.О. Сидоров[1]*, А.А. Лин[1], Н.В. Марченко[1]

Резюме. В настоящее время в России прослеживается тенденция по переходу отечественных производителей лекарственных средств от системы закупок химических продуктов к собственному производству активных фармацевтических субстанций. В статье проведен обзор современного состояния производства активных фармацевтических субстанций в Российской Федерации. Рассмотрены исторические вехи производства фармацевтических субстанций в Советском Союзе и положение данного рынка в настоящее время. Помимо этого, представлен обзор действующего в международной практике контроля качества активных фармацевтических субстанций и сформулировано предположение о будущем состоянии рынка закупки фармацевтических субстанций в странах с низким уровнем контрольной системы. Проведен анализ структуры и ценовых показателей российского рынка активных фармацевтических субстанций.

Ключевые слова: АФС, фармацевтические субстанции, фармацевтическая промышленность.

ACTIVE SUBSTANCES FOR DOMESTIC MANUFACTURER OF MEDICINES: PAST, PRESENT AND FUTURE

K.O. Sidorov[1]*, A.A. Lin[1], N.V. Marchenko[1]

Abstract. At present, there is a tendency in Russia to switch domestic manufacturers of drugs from the system of purchases of chemical products to own production of active pharmaceutical ingredients. The article reviews the current state of production of active pharmaceutical substances in the Russian Federation. The historical milestones in the production of pharmaceutical substances in the Soviet Union and the current situation of this market are considered. In addition, it provides an overview of the current international practices of quality control of active pharmaceutical ingredients and formulated assumption about the future state of the purchase market of API in countries with a low level of the control system. The authors analyze the structure and price indicators of the Russian API market.

Keywords: APS, pharmaceutical substances, pharmaceutical industry.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – St. Petersburg Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Healthcare, 14 A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*** адресат для переписки:**
E-mail: kirill.sidorov@pharminnotech.com
Тел.: 8 (812) 499 39 00, доб. 2600

ВВЕДЕНИЕ

К началу 1980-х гг. прошлого века в СССР организационная структура и уровень производства, квалифицированный персонал, тесные контакты с учеными и специалистами в области синтеза химических веществ позволяли выпускать соответствующие мировым стандартам фармацевтические субстанции – лекарственные средства в виде действующих веществ биологического, биотехнологического, минерального или химического происхождения, обладающие фармакологической активностью, предназначенные для производства, изготовления лекарственных препаратов (ЛП) и определяющие их эффективность [1]. Отечественная фармацевтическая промышленность не только практически полностью обеспечивала активными фармацевтическими субстанциями (АФС) свои заводы по выпуску ЛП, но и экспортировала их, прежде всего в страны Совета экономической взаимопомощи. Ассортимент АФС, производимых в СССР, составлял 429 наименований, в том числе 350 – синтетических ЛС, 54 – антибиотиков и 25 – витаминов. Основное количество АФС (380) выпускалось на специализированных химико-фармацевтических заводах. В 1992 году в России производили 272 наименования АФС объемом 17,5 тыс. условных тонн [2].

Вместе с тем с начала 1990-х годов производство АФС стало резко снижаться. За период с 1992 по 2008 гг. объемы производства АФС в России сократились более чем в 20 раз [3].

Перестроечный период затронул и производство АФС. Это привело к тому, что с учетом мощностей, оставшихся в странах ближнего зарубежья, были демонтированы или утратили свое значение по другим причинам мощности по выпуску 132 наименований АФС. По оценке экспертов, в 1990–2000 гг. в РФ было ликвидировано до 90% производственных мощностей по синтезу фармацевтических субстанций [4]. В начале XXI века данный тренд имел продолжение.

Только в 2002–2004 гг. были выведены производственные мощности в объеме 2,935 условных тонн АФС. В 2005 году использование мощности по производству АФС составило 22,4% от прежних масштабов производства, в том числе по витаминам – 23,9%, по антибиотикам – 5,5%, по лекарственным средствам синтетического происхождения – 26,7% [2]. Особенно тяжелое положение сложилось в сфере научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ, направленных на создание и освоение производства новых высокоэффективных АФС. В этой сфере не только не произошло изменений к лучшему, а наоборот, продолжилась деградация научно-технического потенциала. Заводы по производству ЛП перешли на использование АФС, предложенных иностранными поставщиками, отдавая предпочтение продукции Китая и Индии как более дешевой и АФС из стран Европы как современным и высокоэффективным. Объем их поставок увеличивался пропорционально росту объемов выпуска ЛП. С позиции национальной безопасности страна в решении проблемы лекарственного обеспечения стала зависимой от иностранных поставщиков АФС.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ

Опыт последних двух десятилетий свидетельствует о том, что рыночные механизмы не могут обеспечить выход из кризиса производства отечественных АФС, и, следовательно, локализация производства АФС нуждается в государственной поддержке. Международный опыт таких стран, как Индия и Китай, показал, что эффективная государственная поддержка отечественных фармацевтических производителей позволила в исторически короткие сроки (в 60–90-е годы прошлого века) не только преодолеть импортозависимость, но и стать крупным экспортером не только ЛП, но и АФС на глобальном рынке.

Решение проблем обеспечения производства ЛП субстанциями в настоящее время связывается с инновационным сценарием, предусмотренным Стратегией развития фармацевтической промышленности на период до 2020 года. Одной из целей этой стратегии [3] и принятой на ее основе федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» [7] является обеспечение на основе технологической модернизации производства отечественными предприятиями синтетического и биотехнологического сырья АФС для производства готовых лекарственных препаратов [8]. Для реализации этой цели предусматривается:

a) рассмотрение возможности установления повышенных ставок ввозных таможенных пошлин с учетом действующего уровня указанных ставок на все лекарственные препараты, фармацевтические субстанции которых вышли из-под действия патента при условии полного обеспечения потребности внутреннего рынка отечественными аналогами и при уровне их качества, не уступающем импортным лекарственным средствам;

b) рассмотрение возможности установления повышенных ставок ввозных таможенных пошлин с учетом действующего уровня указанных ставок на импортируемые субстанции, в том числе химические реактивы, структурная формула и CAS-индекс которых совпадает с фармацевтическими субстанциями, не находящимися под патентной защитой при условии полного обеспечения потребности внутреннего рынка отечественными аналогами и при уровне их качества, не уступающем импортным аналогам;

c) внесение в нормативно-правовое регулирование в сфере обращения лекарственных средств дополнений, выравнивающих требования для отечественных и зарубежных фармпроизводителей в части порядка контроля качества субстанций; для этого предусмотреть аудит производителей импортных фармацевтических субстанций государственными экспертными организациями;

d) разработка программы приобретения государственных прав на использование патентов на наиболее инновационные продукты и технологии с предоставлением на конкурсной основе отечественным предприятиям прав на их использование;

e) создание эффективной схемы финансирования разработки инновационных лекарственных средств на всех ее этапах, включающей гранты, венчурное финансирование и финансирование фарминдустрией;

f) формирование научно-исследовательских центров и кластеров по разработке инновационных лекарственных средств. Реализация этих мероприятий по стимулированию организации производства фармацевтических субстанций на территории России в объеме, который должен обеспечить 50% выпуска ЛП в денежном выражении, включая не менее 85% по номенклатуре из списка стратегических лекарственных средств.

В условиях глобализации отечественный фармацевтический рынок тесно связан с мировым в силу высокой доли импортных ЛС на нем, к тому же возможности производства дженериков зависят от сроков истечения патентной защиты оригинальных ЛП иностранных компаний. На рисунке 1 приведены данные о тенденциях развития мирового фармацевтического рынка и прогноз его динамики на период до 2018 года.

Как следует из данных рисунка 1, в целом на мировом фармацевтическом рынке прогнозируется стабильный рост объема продаж на 3,8% ежегодно.

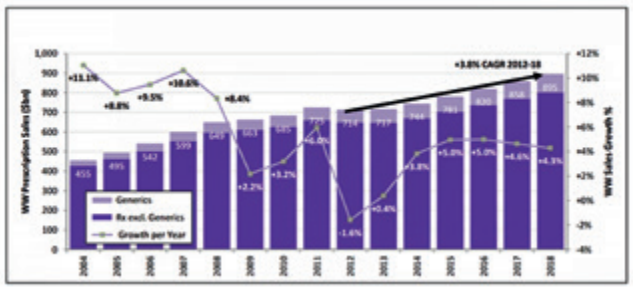


Рисунок 1. Данные об объемах продаж на мировом фармацевтическом рынке и прогноз их динамики на период до 2018 года [9]

На рисунке 2 представлены данные о мировых продажах ЛС и прогноз до 2018 года, а также объем и доля продаж препаратов, находящихся в зоне риска в связи с истечением срока патентной защиты.

Рисунок 2. Мировые продажи ЛС и прогноз до 2018 года, а также объем и доля продаж препаратов, находящихся в зоне риска в связи с истечением срока патентной защиты [9]

На рисунке 3 представлены сведения о прогнозируемых затратах на НИОКР 10 ведущих фармацевтических компаний мира. Как следует из приведённых данных, общий объем затрат на НИОКР 10 ведущих фармацевтических компаний мира составит $ 66,5 млрд, при этом наиболее высокие среднегодовые темпы роста расходов (3%) покажут компании Novartis, Roche, GlaxoSmithKline.

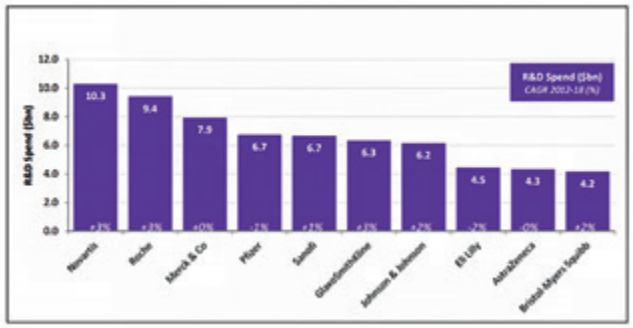


Рисунок 3. Прогноз расходов на НИОКР в сфере фармацевтики 10 ведущих фармацевтических компаний [9, 10–13]

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Оснований для предложений по усилению контроля за качеством АФС и вспомогательных материалов было несколько. Первопричиной, очевидно, следует считать обозначившуюся в 1980-х гг. тенденцию «перетекания» производства АФС из традиционных центров лекарственной индустрии и развитой регулярной практики (Центральная и Северная Европа, США) в страны со слабой контрольно-разрешительной системой, такие как Бразилия, Мексика, Таиланд, Тайвань, Южная Корея и в особенности Индия и Китай. Нередко активные фармацевтические ингредиенты в этих странах производились в нестерильных условиях, с нарушением технологий или с неполной стадией очистки. Ситуация осложняется сложившейся практикой поставок продукции из этих стран в Европу и Северную Америку через длинные цепочки посредников в сочетании с переупаковкой или заменой оригинальной маркировки. При этом подавляющее большинство перекупщиков работают без лицензий и не подвергается инспектированию.

Авторитетные зарубежные аналитики обеспокоены появлением на рынке химических продуктов неизвестного происхождения по очень низкой цене, но с неустановленной фармакологической активностью, которые будут использоваться для производства ЛП в качестве АФС. Это непременно создаст глобальные риски для жизни и здоровья граждан и, кроме того, сделает невозможным развитие собственного производства АФС. Чрезвычайным фактом являются АФС, ввозимые по поддельным документам, – продукция нелегального, нелицензированного производства. И все это несмотря на то, что регуляторные органы развитых стран тщательно контролируют качество ввозимых и используемых в производстве АФС.

В Евросоюзе контроль качества осуществляют не только регуляторные органы, но и потребители АФС, или фармкомпании, где налажен входной контроль сырья. Ни один препарат не будет зарегистрирован, если компания не предоставит мастер-файл АФС (Active Substance Master File, ASMF); полная информация о производстве АФС в составе регистрационного досье ЛП является обязательной, как и сертификация на соответствие требованиям Европейской фармакопеи.

В Европе процесс регистрации фармацевтической продукции регулируется правилами, описанными в Procedures for Marketing Authorisation, разработанными The European Agency for Evaluation of Medicinal Products. Агентством разработано Guidance for the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence, где, в частности, указано принятое ВОЗ положение о том, что исследование биоэквивалентности воспроизведенных ЛС для внутривенного введения не проводится. В общих чертах цель оценки качества АФС регуляторным органом – установление достаточности и адекватности методов контроля, предложенных производителем, но нередко прибегают к дополнительным методам контроля. В зависимости от специфики производства может потребоваться использование дополнительных методик контроля. Однако перечисленные процедуры никоим образом не отме-

няют входной контроль качества АФС производителем ЛП, ведь именно с него в конечном итоге потребитель спросит за допущенные огрехи.

Важнейшим разрешительным механизмом к применению АФС из любой страны мира в Европе и США являются результаты инспекций производственных площадок. Например, с 2000 по 2007 годы FDA провело примерно 200 осмотров заводов в Индии и Китае, и только некоторые из них закончились положительным решением, которое с большей долей вероятности гарантировало, что АФС, приобретенные с этих площадок, имеют высокое качество.

Согласно данным, представленным Philippe André, аудитора фармацевтических предприятий в Китае, в этой стране имеется более 5000 производителей АФС. Однако этот же автор свидетельствует, что китайские предприятия чрезвычайно разные по своему устройству и важнейшим производственным факторам, прежде всего химической и микробиологической чистоте. Поэтому риск получить некачественный продукт очень велик. Даже несмотря на регулярно проводимый аудит, американские и европейские компании не имеют информации о месте производства 39% ввозимых из Китая АФС.

Различные способы контроля качества, специфичные для каждого из 5000 производителей, сомнительные тесты, неунифицированная система контрольных величин (в том числе по сторонним примесям) и учета результатов крайне негативно сказываются на качестве АФС. Правилами GMP, в частности в Китае, часто игнорируется факт «ненадлежащего» производства как исходных компонентов АФС (raw material), так и самих АФС; основной акцент сделан на конечных стадиях изготовления АФС (фасовка) или собственно производстве ЛС. Обеспокоенность вызывает также тот факт, что из-за возможности приобретения АФС по предельно низкой цене фармкомпании закупают их у нелицензированных производителей (в Китае это производители, работающие без разрешения Chinese State Food and Drug Administration, SFDA). А итог такой работы – скандал с неочищенным гепарином, вызвавшим смерть нескольких десятков пациентов в США [14].

По данным того же Philippe André, только 70% европейских комиссий, проводящих аудит китайских производителей АФС, выдают положительное решение; но стоит добавить комментарий, что инспектора заведомо посещают только «надежные» заводы и фабрики. Тем не менее уже примечателен тот факт, что разрешение к применению АФС из любой страны мира в Европе и США базируется на результатах инспекций производственных площадок, а это сильный удар по фальсификату.

Обычная система для рынка АФС – это цепочка перекупщиков и посредников; часто представляется затруднительным установить изготовителя, соответствие его производства национальным или международным стандартам; решающим фактором попрежнему остается цена. Аналитики предсказывают, что, если заставить китайских и индийских производителей АФС работать по стандартам надлежащей производственной практики (GMP), цена на АФС возрастет. С другой стороны, нечестных производителей ЛП будет снабжать «черный рынок», но выборочный контроль со стороны регулирующих органов всегда будет пресекать попытки вывести на рынок фальсификат.

РЫНОК АФС В РОССИИ

В настоящее время российская фармацевтическая промышленность использует около 8 тыс. условных тонн АФС в год, из которых около 1,7–1,9 тыс. условных тонн производят российские предприятия. Промышленный выпуск фармацевтических субстанций осуществляют менее 20 предприятий по достаточно ограниченному перечню субстанций [4]. Доля высокотехнологичных АФС (более 6 стадий синтеза) составляет 35% (в том числе 15%, произведенных в РФ) в количественном выражении и 34% (в том числе 5%, произведенных в РФ) в денежном, а доля биотехнологических – 39% в денежном выражении, из которых в РФ производится всего 2%. Образующийся дефицит закрывается импортом АФС, при этом основными странами, из которых происходят поставки на российский рынок, являются Китай и Индия (суммарно около 70% от всего импорта АФС в 2007 году) [3]. Рынок АФС превратился в самый импортозависимый сегмент российского фармацевтического рынка. По разным оценкам, доля отечественных АФС на нем составляет от 8% до 18%, в то время как в коммерческом розничном секторе доля отечественных ЛП составляет 24,0%, соответствующая доля в секторе государственных закупок – 15%, в госпитальном секторе – 30,0%, в секторе льготного лекарственного обеспечения – 13,0% [5]. Критическая зависимость отечественного производства ЛП от импорта АФС может рассматриваться как проблема национальной безопасности. В Указе Президента РФ от 31.12.2015 года № 683 «О стратегии национальной безопасности РФ» подчеркивается, что необходимо «создание условий для развития фармацевтической отрасли, преодоления ее сырьевой и технологической зависимости от зарубежных поставщиков, а также доступность качественных, эффективных и безопасных лекарственных средств» [6].

В таблице 1 представлены данные об объемах отечественного производства ЛП и АФС и их долях на российском фармацевтическом рынке

Из данных, приведенных в таблице 1, следует, что доля российских производителей ЛП в 2014 году составляла всего 25%, а доля российского производства АФС – 15%.

На рисунке 4 представлена структура рынка АФС в РФ.

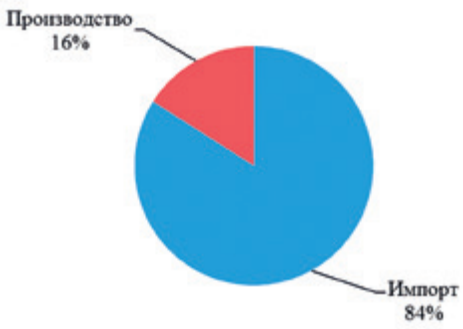


Рисунок 4. Структура рынка АФС в РФ [3]

Таблица 1.

Объемы отечественного производства ЛП и АФС в 2014 г.

Лекарственные препараты	Общий объем рынка, млрд руб.	919
	Объем производства препаратов, выпускаемых российскими производителями, млрд руб.	185
	Доля российских производителей, %	25,2
Фармацевтические субстанции	Общий объем рынка, млрд руб.	77,5
	Объем производства субстанций, выпускаемых российскими производителями, млрд руб.	10,2
	Доля российских производителей, %	16

Примечание: данные Минпромторга России.

В ценовых показателях весь рынок АФС в Российской Федерации оценивается приблизительно в 77,5 млрд руб., что составляет 8,4% от объема российского фармрынка в ценах конечного потребления. При этом на долю ввозимых АФС приходится 65 млрд руб. Импорт в Россию представлен 343 наименованиями АФС. Таким образом, в настоящее время рынок АФС представлен более чем на 80% импортными производителями (по некоторым оценкам, более 90%), что позволяет проводить анализ зависимости макроэкономического эффекта от поддержки отечественных производителей ЛС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведенного анализа мирового фармацевтического рынка, в том числе рынка АФС, установлено, что в целом на мировом фармацевтическом рынке прогнозируется стабильный рост объема продаж на 3,8% ежегодно. Анализ объемов продаж ЛС на мировом фармацевтическом рынке со сроком истечения патентной защиты 1 год показывает возможности по выводу на рынок новых дженериковых препаратов отечественными производителями. Доли продаж ЛС с истекающим сроком патентной защиты, по прогнозу, в 2017 году составят 3% от общего объема продаж, в 2018 – 4%.

Общий объем затрат на НИОКР 10 ведущих фармацевтических компаний мира составит $ 66,5 млрд, при этом наиболее высокие среднегодовые темпы роста расходов (3%) покажут компании Novartis, Roche, GlaxoSmithKline.

Главной причиной усиления контроля за качеством АФС и вспомогательных материалов следует считать обозначившуюся в 1980-х гг. тенденцию «перетекания» производства АФС из традиционных центров лекарственной индустрии и развитой регулярной практики (Центральная и Северная Европа, США) в страны со слабой контрольно-разрешительной системой, такие как Бразилия, Мексика, Таиланд, Тайвань, Южная Корея и в особенности Индия и Китай. Последовательное введение правил GMP в Индии и Китае должно привести к увеличению цен на экспортируемые ими АФС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 12.03.2014).
2. С. Романова, В. Захарова, Д. Журов. Надежда умирает последней // Ремедиум. 2006. № 3(109). С. 56–64.
3. Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года: приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 23.10.2009 г. № 956.
4. Современное состояние и перспективы развития российской фармацевтической промышленности / Государственная корпорация «Банк развития и внешнеэкономической деятельности (Внешэкономбанк)». URL: http://www.veb.ru/common/upload/files/veb/analytics/fld/20120816pharma.pdf (дата обращения 14.11.2014).
5. А.А. Лин, Д.М. Слепнев, М.С. Румянцева. Тотальная импортозависимость фармацевтического рынка – угроза национальной безопасности России // Экономическое возрождение России. 2014. № 1(39). С. 141–149.
6. Указ Президента РФ от 31.12.2015 года № 683 «О стратегии национальной безопасности РФ».
7. Федеральная целевая программа «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу: постановление Правительства Российской Федерации от 17 февраля 2011г. № 91.
8. И.А. Наркевич, А.А. Сёмин, Н.С. Карташова, А.А. Теслев. Сорбционно-хроматографические и мембранные пилотные и промышленные технологии выделения и очистки АФС из сырья растительного и животного происхождения // Химико-фармацевтический журнал. 2016. Т. 50. № 10. С. 54–60.
9. World Preview 2013 out look to 2018 By Evaluate Pharma. URL: http://wenku.baidu.com/view/847eeae1ce2f0066f53322b3.html (дата обращения 14.11.2014).
10. Продукция компании Pfizer. URL: https://www.pfizer.ru/products (дата обращения 24.11.2014).
11. Novartis Products. URL: http://www.novartis.com/products/index.shtml (дата обращения 24.11.2014).
12. Johnson & Johnson. Our Products. URL: http://www.jnj.com/healthcare-products (дата обращения 24.11.2014).
13. Merck Products. URL: http://www.merck.com/product/home.html (дата обращения 24.11.2014).
14. H. Gardiner. U.S. Identifies Tainted Heparin in 11 Countries // The New York Time. 2008. URL: http://www.nytimes.com/2008/04/22/health/policy/22fda.html?_r=1& (дата обращения 14.11.2014).

PTM mechatronics

Мешалки вовзрывобезопасном исполнении от **PTM mechatronics**

Отличительные особенности:
высокая пропускная способность
устойчивость к ацетону
нержавеющая сталь, IP68, взрывозащищенное исполнение
скорость вращения: max. крутящий момент (без передачи) - 30 - 300 об / мин 4 Нм
скорость вращения: max. крутящий момент (с передачей 1:2) - 60 - 600 об / мин 2 Нм
скорость вращения: max. крутящий момент (с передачей 3:1) - 10 - 100 об / мин 12 Нмvv
скорость вращения: max. крутящий момент (с передачей 9:1) - 3,3 - 33 об / мин 36 Нм

Механический лабораторный смеситель ATEX для вязких и жидких продуктов

Превосходное перемешивание, функциональная безопасность и легкая интеграция в любой лабораторной среде – это лишь начало обширного перечня преимуществ механического лабораторного смесителя ATEX!

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

РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Статья приведена в авторской редакции

УДК 615.1

АССОРТИМЕНТЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЁМОВ, КОТОРЫЕ ПРИМЕНЯЛИ ПЕРВЫЕ ВРАЧИ

К.С. Гузев[1]*

Резюме. В работе представлены сведения о том, чем лечили своих пациентов две тысячи и более лет назад шумеры, врачи Египта, Древней Греции и Римской империи. Сделана попытка анализа ассортиментов лекарственных средств и технологических приёмов, применяемых врачами различных государств и культур. Установлено, что эти лекарства имели много общих черт и состояли из представителей растительного и животного царств, а также мира минералов. Технология приготовления лекарств состояла из простых операций, которые, однако, со временем совершенствовались. Большинство применяемых древними врачами лекарственных средств утратили своё значение, хотя некоторые из них актуальны и по сей день.

Ключевые слова: ассортимент лекарств, технология приготовления лекарств, преемственность медицинских знаний, история фармации.

ASSORTMENTS OF DRUGS AND TECHNOLOGICAL RECEIVES, WHICH THE FIRST DOCTORS APPLIED

K.S. Guzev[1]*

Abstract. The paper presents information on how the Sumerians, doctors of Egypt, Ancient Greece and the Roman Empire treated their patients two thousand years or more ago. An attempt is made to analyze the assortments of medicines and technological methods used by physicians of different states and cultures. It is established that they had many similarities and consisted of representatives of the vegetable and animal kingdoms, as well as the world of minerals. The technology of preparation of medicines consisted of simple operations, which, however, improved over time. Most of the medicines used by ancient doctors have lost their meaning, although some of them are still valid today.

Keywords: assortment of medicines, technology of preparation of le-karsts, continuity of medical knowledge, history of pharmacy.

1 – ЗАО «Ретиноиды», 111123, Россия, г. Москва, ул. Плеханова, д. 2/46, стр. 5

1 – JSC «Retinoids», b. 5, 2/45, Plekhanova str., Moscow, 111123, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: guzev3@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

При написании работ по истории фармации мы знакомились с трудами врачей древности, имена которых сохранила история. Принадлежащие их перу трактаты свидетельствуют, что у каждого врачевателя был свой ассортимент лекарственных средств. Историки медицины, занимавшиеся изучением творческого наследия того или иного врача, как правило, описывали перечень лекарств, которые он применял в своей практике, однако работы, где ассортименты этих средств рассматривались бы в сравнительном аспекте, а также в некотором их развитии, нами не обнаружены. В связи с этим в данном исследовании мы поставили перед собой цель – изучить и сопоставить ассортименты лекарственных средств врачей древности, установить закономерности расширения этих ассортиментов в зависимости от исторического периода, а также выявить их особенности и приоритеты выбора.

Объектом исследования служили источники литературы, в которых представлены списки простых лекарственных средств или готовые рецепты лекарств, применяемых врачами Шумерского царства, Древнего Египта, Древней Греции, Римской империи.

ПЕРВЫЕ ДОКУМЕНТАЛЬНЫЕ УПОМИНАНИЯ О ЛЕКАРСТВАХ

В 1889 году в Ираке в городе Ниппуре (160 км от Багдада) в ходе раскопок археологами Пенсильванского университета был найден фрагмент глиняной таблички, относящийся к первой половине III тысячелетия до н.э. Спустя 60 лет появился первый перевод текста этой таблички, который в дальнейшем совершенствовался. В результате оказалось, что он представляет собой запись 15 рецептов лекарственных средств, которые по способу применения были разделены на три группы: 1-я группа – припарки (8 рецептов); 2-я группа – лекарства, применяемые внутрь (3 рецепта), и 3-я группа – средства, которые, по-видимому, в дальнейшем и были названы мазями, так как они прикладывались к больным местам, однако в то время эти средства так ещё не назывались (4 рецепта).

Интересен порядок изложения способа приготовления лекарств: вначале идёт перечисление компонентов, затем – что с ними надо сделать и в последнюю очередь – как их применить, чтобы получить лечебный эффект. Такая последовательность в точности соответствует порядку изложения современного рецепта.

Необходимо сказать несколько слов о простых средствах, входящих в состав этих рецептов, и о технологии их приготовления. Из перевода текста таблички следует, что для извлечения целебных веществ шумерский врач прибегал к растительным, животным и минеральным источникам. Его любимыми минеральными веществами были соль, речной битум (смола) и сырая нефть. Из продуктов животного мира он использовал шерсть, молоко, черепаховый панцирь, водяную змею. Но наибольшее количество препаратов из арсенала шумерского врача было изготовлено из растений (тимьяна, горчицы, сливы, груши, инжира, ивы, лебеды, разновидности мимозы, пихты, сосны), а также из готовых продуктов – пива, вина и растительного масла [1]. Из технологических приёмов чаще других рекомендовались растирание в пыль, смешивание, растворение, экстракция из смолы крепким пивом при нагревании.

В качестве примеров приводим описание приготовления рецептов 9, 12 и 13. Технология приготовления препарата по рецепту 9 звучит следующим образом: «Залить крепким пивом смолу… – растения; нагреть на огне, влить эту жидкость в речное смоляное масло (нефть) (и) дать выпить больному». Видны два этапа: сначала растворяли при нагревании древесную смолу в крепком пиве, а затем, смешав эту смесь с жидким речным асфальтом (нефтью), давали больному.

Технология приготовления и использования рецепта под номером 12 изложена так: «Просеять и смешать друг с другом черепаховый панцирь, ползучее (стелющееся) растение *нага* (это растение использовалось как источник соды и других щелочей), соль (и) горчицу. Промыть (больное место) качественным пивом (и) горячей водой, вычистить (отскоблить) (больное место) этим составом и затем смазать растительным маслом, покрыть (присыпать) порошком пихты и укутать больное место тканью или шерстью». Обращаем внимание на предварительную обработку больного места (раны) и на указание качества пива – оно должно было быть качественным.

Последовательность приготовления средства по прописи 13 состояла в следующем: «Залить водой сушёную и растёртую в пыль водяную змею, растение амамашумкаспал, корни терновника, размолотую нагу, толчёную живицу пихты и помёт летучей мыши; нагреть (смесь) и промыть больное место этой жидкостью, после чего натереть с растительным маслом и покрыть шаки» [2].

Как видно из представленных сведений, шумерский врач уже тогда в своём арсенале имел набор лекарственных средств растительного, животного и минерального происхождения, некоторые из которых применяются до настоящего времени. Его технологические приёмы, конечно, просты, но эффективны. А предварительная обработка ран пивом и растительным маслом, а также тёплое укутывание больного места, несомненно, способствовали очистке раны и более быстрому выздоровлению больного. К сожалению, описания рецептов шумерских врачей неполны, многие средства нельзя идентифицировать. Но вместе с тем даже анализ имеющейся информации позволяет сказать, что среди людей, живших пять тысяч лет назад, имелись врачи, которые готовили лекарства для облегчения страданий своих современников.

ФАРМАЦИЯ ДРЕВНЕГО ЕГИПТА

Медицинская информация, относящаяся к Древнему Египту, собрана в папирусах. Для нас особую ценность представляет папирус Эберса, названный в честь немецкого учёного-египтолога Георга-Морица Эберса.

Папирус был приобретён во время раскопок 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». Написан папирус около 1500 г. до н.э., т.е. примерно 3500 лет назад. В папирусе описаны 811 рецептов лекарственных средств. Многие из них состоят из 5–13 компонентов, а один рецепт – из 37 ингредиентов [3, 4].

Перечень используемых египетскими врачами растений, минеральных составляющих и средств, получаемых с помощью животных или из их внутренних органов, приведён в монографии Сирила П. Брайна «Папирус Эберса», вышедшей в Лондонском издательстве Geoffrey Bles в 1930 году [3]. Из этого труда следует, что список применяемых для приготовления лекарств 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. Чаще других в папирусе упоминаются лук, можжевельник, тмин, инжир, циперус, смола аканту-

са, зерно сорго, чеснок, а также продукты, получаемые из растений (растительное масло и ладан). Список животных, упомянутых в папирусе, состоит из 41 наименования. В него входят представители различных классов: млекопитающие, птицы, рыбы и насекомые. Среди животных встречаются и 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. Перечень насекомых состоит из 8 наименований. В него входят безобидные моль и муха, ядовитые скорпион и тарантул, прожорливая саранча и полезная пчела. Безоговорочным победителем по упоминанию в папирусе является мёд – дикий, сотовый и варёный, а также пчелиный воск. Среди минеральных средств (45 позиций) явное предпочтение отдано морской соли, зелёной глине и соде. Применялись также металлы (медь, свинец, сурьма), их оксиды и соли, полудрагоценные камни, глины, поваренная соль. Особо следует упомянуть нефть из Ефрата и её высушенную часть – битум. В качестве растворителей для лекарств широко использовали пиво, молоко (без указания животного), вино и, конечно, воду. Причём рекомендовано было брать простую воду, воду из колодца, родника, пруда, воду солёную, минеральную, льняную, щелочную и дождевую.

Судя по описанию, фармацевтическая техника состояла, по сути, из методов 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.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДРЕВНЕЙ ГРЕЦИИ (ГИППОКРАТ И ДРУГИЕ)

Сведения о лекарственных средствах, применяемых Гиппократом, почерпнуты из трёхтомника его трудов, вышедшего в свет под редакцией проф. В.П. Карпова в 1941 году, в переводе с греческого проф. В.И. Руднева [5]. В конце третьего тома представлен алфавитный список растений и животных, упоминаемых в книгах Гиппократа. Этот список насчитывает 255 видов растений и 52 вида животных. Среди представителей растительного царства встречаются как дикорастущие виды, так и виды, культивируемые человеком: травы, кустарники, деревья. Животных автор разделил на млекопитающих (8 видов), птиц (7 видов), рыб (20 видов) и беспозвоночных (17 видов). Информация о представителях минерального царства, использовавшихся при изготовлении лекарств, найдена в трактате Гиппократа «О ранах». Их перечень состоит из 15 наименований. А вот сведений о насекомых нами не обнаружено ни в представленном списке, ни в текстах трудов учёного. О причинах отсутствия в арсенале лекарственных средств Гиппократа данных о насекомых можно только гадать.

Если сравнить средства, применяемые Гиппократом, со средствами, содержащимися в папирусе Эберса, можно установить их общность. Перечень растений в основном соответствует тем, что применялись в Египте. Так же как и там, греческие врачи использовали их в свежем, сухом, варёном виде, прикладывали целиком, измельчали, вываривали в уксусе, вине, воде или в масле. Вероятно, от египетских врачей идёт и широкое использование в медицине мёда, вина, уксуса. Оттуда же пришла практика применения металлов (меди, свинца, железа, мышьяка), смолистых благовоний – ладана и мирры, а также кедрового и оливкового масел.

Для иллюстрации технологических приёмов, используемых Гиппократом, приводим рецепт приготовления «чёрного лекарства для ран»: «Выдавить через сито в вазу красной меди кислый белый виноград, поставить жидкость на солнце на день и внести её в дом на ночь, чтобы в неё не проникла роса; мешать её в течение дня беспрерывно, чтобы высушивание её было равномерно и чтобы она брала меди сколь возможно больше; выставлять жидкость на солнце до тех пор, пока она не сделается густой, как мёд; потом вылить её в медный горшок с первосортным мёдом и сладким вином, в котором была предварительно сварена терпентинная смола; варить этот терпентин в вине до тех пор, пока он не станет густым, как варёный мёд, потом вынуть его и влить в него вина; что касается количества, то брать сока кислого винограда больше, чем вина, и вина больше, чем мёда. Сверх того взять вытекшей каплями самой лучшей мирры, растереть её очень тонко и размешать, подливая к ней понемногу того же вина; потом сварить отдельно мирру с вином, размешивая её; наконец, когда она будет казаться соответствующей густоты, влить её в сок кислого винограда. Тогда поджарить наилучшего нитру и осторожно примешать его к лекарству вместе с цветом меди, взятым в меньшем количестве, чем нитр; смешав всё это, варить по меньшей мере в течение трёх дней на лёгком огне фигового дерева или на углях, но чтобы лекарство не подгорало. Все употреблённые вещества

должны быть безводными, и раны не следует увлажнять в тех местах, которые смазываются этим лекарством; пользуются этим лекарством для застарелых ран, для свежих ран, для крайней плоти, для ран головы и уха». Можно привести ещё несколько таких же сложных и многокомпонентных рецептов, но уже из приведённого становится понятным, что сам Гиппократ, а также его последователи обладали достаточным арсеналом технологических приёмов, которыми они пользовались при изготовлении своих лекарств. Кроме того, обращают на себя внимание и некоторые рекомендации по уходу за ранами. Так, для лечения застарелых или гноящихся ран Гиппократ советует растереть цвет донника, смочить его мёдом и использовать как пластырь. Для облегчения и ускорения заживления уже очищенных ран он рекомендует использовать мягчительные средства – гусиный жир, свежее или старое свиное сало, оливковое масло, белый воск и смолу.

Таким образом, анализ сведений о лекарственных средствах, рекомендованных Гиппократом, позволяет сказать следующее: медицинская наука в Древней Греции шагнула вперёд в сравнении с медициной Древнего Египта, однако налицо преемственность медицинских знаний врачей двух древнейших цивилизаций.

Определённый интерес для нас представляет и «Исследование о растениях» Феофраста.

Феофраст (Теофраст) из Эреса (Лесбос) (372–288 гг. до н.э.) – древнеэллинский философ и учёный, ученик и друг Аристотеля. В своё время Феофраст считался самым разносторонним учёным античности. Он написал труды по философии, риторике, поэтике, страноведению, политике, музыке, искусствоведению, религии и др. Его труд «Исследование о растениях» содержит описания и рекомендации по применению, в том числе в медицинских целях, известных в Древней Греции растений [6].

Этот труд Феофраста содержит указатель ботанических названий 481 вида и разновидности растений, известных в Элладе. Среди них есть деревья, кустарники, травы. Описаны полезные свойства листьев, стеблей, корней, корневищ, плодов, семян, соков, камедей, эфирных масел. Даны рекомендации по культивированию, времени сбора, болезням растений. Важной особенностью «Исследования о растениях» являются видовые описания растений, а также советы по их медицинскому применению. Феофраст не был врачом в современном понимании, но систематика растений, их описание и применение, несомненно, привлекали разностороннего учёного. В труде Феофраста наиболее подробно описаны аконит, бобы обыкновенные, виноград культурный, вяз, гранатник, груша, 9 разновидностей дуба, 4 вида ивы, кипарис, лавр благородный, ладан, липа крупнолистная, 5 видов лука, 5 видов мака, маслина, миндаль, мирт обыкновенный, можжевельник, мята, пихта, платан, 13 видов пшеницы, смоковница, сосна, финиковая пальма, чеснок, 4 вида шафрана, яблоня домашняя и 5 разновидностей ячменя. Видно, что большинство растений, описанию которых Феофраст уделил повышенное внимание, обладают свойствами лекарства, поэтому при их описании даны рекомендации и по их медицинскому применению [6].

ЛЕКАРСТВА РИМСКОЙ ИМПЕРИИ

Следующим выдающимся врачом древности, который в значительной степени повлиял на развитие медицины вообще и фармации в частности, является К. Цельс. Вклад Цельса в медицину общепризнан, однако мало кто знает, что этот врач большое внимание уделял не только фармакологии, но и фармацевтической технологии. Кстати, некоторые исследователи именно Цельсу приписывают первые описания лекарственных форм [7]. В единственном дошедшем до нас труде «О медицине» Цельс собрал все знания этого труда предмете, известные в то время. Так, в книге 5 подробно описаны лекарственные средства, которые Цельс рекомендует для остановки кровотечения, заживления ран, а также вещества, способствующие созреванию и выходу гноя, открывающие раневые отверстия в телах, смягчающие раны и очищающие их, вещества, возбуждающие аппетит, смягчающие раздражение и др. В этой же книге после описания свойств лекарственных веществ Цельс приступает к описанию технологических приёмов, причём начинает с самого начала – глава называется «О смешивании простых веществ и о весовых расчётах». А дальше Цельс описывает конкретные лекарственные формы: компрессы, пластыри, лепёшечки, акопы (смягчающие мази), пилюли, средства, которые мы употребляем в сухом виде (порошки). Фармация К. Цельса заслуживает отдельного исследования, но в настоящий момент нас интересует главным образом ассортимент его лекарственных средств.

Перечень лекарственных растений состоит из 172 наименований, и он в большинстве своём повторяет перечень растений, приведённых Гиппократом. Наибольший интерес представляет список веществ из минерального царства. В него входят такие наименования, как мел, сера, нашатырный спирт, битум (асфальт). Но считается, что основным достижением Цельса является введение в медицинскую практику препаратов металлов. К ним относятся оксиды и соли (сульфиды и ацетаты) таких металлов, как алюминий, серебро, цинк, мышьяк, медь и её сплавы (латунь и

бронза), железо, ртуть, свинец. Средства из животного царства немногочисленны (8 наименований). С нашей точки зрения, заслуживают внимание лишь «бобровая струя» и ланолин, известные уже в то время. Необходимо отметить, что Цельс делил все используемые им средства на 25 фармакологических групп, готовил 16 лекарственных форм и впервые ввёл, как бы сегодня сказали, авторизированные названия мазей и пластырей (мазь Асклепия [Asclepion], диахиловый пластырь [Diachylon]) [8].

Следующим выдающимся автором древности, чей ассортимент лекарственных средств целесообразно рассмотреть, является Плиний Старший (22/23–79 гг. н.э.). Этот римский учёный-энциклопедист творил в эпоху К. Цельса, был его последователем и довольно часто цитировал предшественника в своих книгах по медицине. Поэтому сравнение перечней средств, применяемых этими двумя авторами, даёт возможность наиболее полно раскрыть медицинские знания эскулапов I в. нашей эры.

Итак, перечень растений, рекомендуемых для лечения, практически одинаков. У Плиния Старшего он состоит из 129 наименований. Причём рекомендуются как свежие растения, так и их зола (10 растений). Эфирное масло для лечебных благовоний получают из 6 растений, сок – из 25. Имеется прямое указание на применение дёгтя и «колёсной мази», основным компонентом которой является дёготь. Средства из минерального царства также приближаются к количеству, рекомендованному Цельсом (30). Основное отличие Плиния от Цельса, на наш взгляд, состоит в широком использовании им средств из животного царства. Так, в ассортимент лекарственных препаратов учёного входит желчь 15 видов животных, жир 14 видов животных, сало 16 видов животных, (отдельно выделено сало гуся и змеи), кровь 19 видов животных и птиц, молоко 8 видов животных и отдельно – женское молоко, печень 6 видов животных и птиц. Особенно часто рекомендуются навоз (14 видов животных) и помёт (12 видов птиц). Причём эти два компонента рекомендуются как в сухом и растёртом виде, так и виде пепла. Часто в книге упоминаются улитки, черви, шерсть животных. Оба врача широко используют мёд, вино, уксус, воду различного качества [9]. В отличие от К. Цельса у Плиния Старшего в ассортименте имеются и весьма экзотические средства. Например, описаны верёвка, на которой была повешена гадюка, или верёвка от виселицы, веточка из гнезда коршуна, железный гвоздь или его шляпка, грязь из овечьих ушей и сосков, земля из кротовой норы или из норки сверчка, камешки из хвоста морского скорпиона, головы трески, из желудка диких голубей или ласточки. По непонятной для нас причине имеются упоминания о куриной печени и курином помёте, но среди яиц указано только яйцо вороны. Трудно объяснить наличие вышеперечисленных средств в ассортименте такого высокообразованного для своего времени учёного. Вероятно, основной целью энциклопедистов было фиксирование всех, даже самых странных, на наш взгляд, фактов и передача этой информации потомкам.

Для наглядности все вышеперечисленные лекарственные средства были классифицированы и размещены в таблице 1. Анализ представленных в ней данных свидетельствует, что врачи Древнего Египта использовали в своей практике примерно равное количество средств из растительного, минерального и животного царств. Однако необходимо иметь в виду, что этот вывод сделан нами на основании знакомства с текстом одного, пусть самого большого, хорошо сохранившегося и дошедшего до нас папируса. К сожалению, не представляется возможным быть окончательно уверенным, что в нём отражено максимальное количество средств, использовавшихся египтянами для борьбы с болезнями.

Таблица 1.

Количество простых медикаментов, используемых врачами древности в своей практике

	Растительное царство	Минеральное царство	Животное царство (млекопитающие, птицы, рыбы)	Препараты моря или солёных вод (беспозвоночные, молюски)	Итого
Врачи Древнего Египта (около 1600 лет до н.э.)	50	45	41	–	136
Гиппократ (460–356 гг. до н.э.)	255	15	35	17	322
Теофраст из Эреса (372–288 гг. до н.э.)	481	–	–	–	481
К. Цельс (25–30 гг. до н.э. – 45–50 гг. н.э.)	172	35	8	2	217
Плиний старший (22/23–79 гг. н.э.)	129	30	109	1	269

Применяя лекарства, Гиппократ исходил из двух своих основных постулатов: 1 – «лекарства находятся в природе в готовом виде» и 2 – «первым и самым полезным лекарством может быть еда». Таким образом, прослеживается его приверженность к средствам из растительного и животного царств. В его перечне много лекарственных растений, которые применяются до сих пор, но основная их часть – это фрукты, овощи, злаки, применяемые людьми в повседневной жизни. Среди животных много представителей как домашней,

так и дикой фауны. Теофраст – основоположник ботаники. Поэтому основной задачей своего труда он считал сбор и описание как можно большего количества растений. В своём трактате он, с нашей точки зрения, недостаточно внимания уделял их лекарственным свойствам, однако его знания о растениях для нас, несомненно, являются важными.

К. Цельс – энциклопедист. Мы считаем, что в его перечне лекарств наиболее рационально распределены приоритеты между представителями различных царств. Конечно, первое место занимают средства из растительного царства. Несомненно, они отражают сумму знаний, накопленных всеми предшествующими врачами. Общее количество растений при этом в сравнении с перечнем, приведённым Гиппократом, уменьшилось, что можно объяснить появлением новых знаний, которые позволили сохранить опыт применения растений с доказанным лечебным действием и не использовать растения с низким фармакологическим эффектом. Затем идут минералы, причём уже довольно широко применяются металлы и препараты из них. Средств, получаемых из внутренних органов животных, мало. Можно предположить, что при переходе от одной эпохи к другой врачи либо отделили «еду» от лекарств, либо установили её низкую фармакологическую активность.

Как мы отмечали ранее, Плиний Старший и К. Цельс творили в одно и и то же время. Поэтому арсенал их лекарственных средств очень похож. Основным отличием между ними является то, что первый уделял повышенное внимание средствам из животного царства (печень, почки, желчь, кровь и т.п.), что противоречило точке зрения Цельса.

Из таблицы 1 видно, что вначале, до нашей эры, список лекарственных растений быстро рос, однако впоследствии, вероятно, благодаря отбору и опыту применения этот перечень стабилизировался. Ассортимент средств из минерального царства на протяжении рассматриваемого исторического периода сохранялся на одном уровне, хотя при более детальном рассмотрении можно обнаружить замену одних веществ другими. Так, если врачи Древнего Египта и Гиппократ для лечения больных применяли камни и землю, то врачи первого века нашей эры заменили эти средства на металлы и их соли. Очевидным является снижение перечня средств из животного царства, а также из моря и солёных вод.

Что касается технологических приёмов приготовления лекарств, можно констатировать, что за указанный период фармацевтические технологические приёмы прошли огромный путь от измельчения, растворения и смешивания до расплавления, экстрагирования и прессования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Искусство врачевания возникло давно, и на каждом этапе исторического развития в распоряжении врачей имелся определённый набор способов обследования больного человека, постановки диагноза, лечения, ухода и, конечно, необходимых для этого лекарственных средств и технологических приёмов, используемых при их приготовлении. Оказалось, что ассортименты лекарственных средств, применяемых врачами различных государств и культур, имели много общих черт. Все они искали целебные свойства у объектов живой и неживой природы, а именно у представителей растительного и животного царств и мира минералов; при этом у каждого врача в ассортиментном портфеле были свои приоритеты. Приобретённые знания, наблюдения, опыт они обобщали в своих трудах для использования потомками, благодаря чему эти сведения дошли и до нашего времени. Большинство приведённых в цитированных трактатах лекарственных средств утратили своё значение, хотя некоторые из них (например, мёд, нефть) актуальны по сей день.

Фармация представляет собой науку динамичную, находящуюся в постоянном развитии. При этом каждое последующее поколение фармацевтов и врачей в своей деятельности опирается на опыт предшественников. В связи с этим надеемся, что приведённые в статье данные будут интересны современным медикам.

ЛИТЕРАТУРА

1. С.Н. Крамер. Шумеры. Первая цивилизация на Земле / Пер. А. Милосердова. – М.: Книга по требованию, 2011. 440 с.
2. С.Н. Крамер. История начинается в Шумере. – М.: Книга по требованию, 2012. 254 с.
3. C.P. Bryan. The Papirus Ebers. Translated from the German Version. – London. 1930. 167 p.
4. И.И. Левинштейн. История фармации и организация фармацевтического дела. – М.: Медицина, 1939. 223 с.
5. Гиппократ. Сочинения / Пер. с греч. проф. В.И. Руднева; ред. и примеч. проф. В.П. Карпова. Т. 3. – М.–Л.: Медгиз, 1941. 360 с.
6. Феофраст. Исследование о растениях. – Рязань: Александрия, 2005. 560 с. (Античная историческая библиотека).
7. Л.С. Капитула. Историко-этимологическая эволюция названий лекарственных форм во французской стоматологии // Актуальные проблемы романской филологии: роль языка в формировании многомерного социокультурного пространства: сб. науч. ст. / Редкол. Ф.Т. Михасенко (отв. ред.), Е.А. Булат, Н.М. Щенникова. – Минск: МГЛУ, 2012. С. 77–81.
8. Spenser W.G. Celsus. De medicina / in three volumes. – London. 1961.
9. Медицина Плиния // Медицина в памятниках латинской и греческой литературы. Труды Второго Московского государственного медицинского института имени Н.И. Пирогова. – М. 1966. С. 7–124.

Agilent
Trusted Answers

ICP-OES ДЛЯ АНАЛИЗА НА СОДЕРЖАНИЕ ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ

Материал предоставлен компанией Agilent Technologies

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире регулирующие органы несут ответственность за обеспечение эффективности и безопасности фармацевтических продуктов. Чтобы этого достичь, необходимо идентифицировать потенциально токсичные и вредные вещества, в том числе элементные примеси. Пределы содержания примесей устанавливаются в рамках максимально допустимого воздействия, которое они могут оказывать на человека. В феврале 2017 года была завершена разработка новых процедур анализа элементных (неорганических) примесей в фармацевтических продуктах и ингредиентах. На смену использовавшимся ранее колориметрическим методам и методам «мокрой» химии, требования к которым содержатся в главе 2.4.8 «Тяжелые металлы» Европейской Фармакопеи и общей главе <231> Фармакопеи США (USP), пришли инструментальные методы, которые способны определить точное количественное содержание отдельных элементных примесей в лекарственных продуктах и ингредиентах.

Фармакопея США (USP) параллельно с Международной конференцией по гармонизации (ICH) опубликовала новые стандарты для измерения неорганических примесей в фармацевтических препаратах и их ингредиентах. Новые общие главы USP <232> («Элементные примеси: Пределы») [1] и <233> («Элементные примеси: Процедуры») [2] должны вступить в действие в январе 2018 года. Аналогичный метод ICH определен в Руководстве по элементным примесям (Q3D) [3]. Сейчас он достиг шага 5 (реализация). ICH-Q3D действует с июня 2016 года, под действие данного документа попадают новые заявления на регистрацию лекарственных средств. Для ранее выданных разрешений на регистрацию препаратов срок действия истекает в декабре 2017 года.

Новые главы ICH Q3D и USP <232> также затрагивают катализаторы и другие неорганические контаминанты, которые могут попадать в лекарственный продукт вместе с сырьем во

Agilent Technologies

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

время процесса производства, из окружающей среды, из упаковки и систем укупоривания (CCS). Уровень максимально допустимой суточной дозы (ДСД) определяется по новым методам в соответствии с токсичностью вещества и путем его введения в организм. Возможности метода, как это было в случае старого колориметрического теста на осаждение сульфида, проводившегося в соответствии с USP <231>, в рамках обновленных нормативов уже не рассматриваются.

Рисунок 1. Потенциальные источники элементных примесей в лекарственных препаратах

Глава USP <233> рекомендует использовать современные инструментальные методы [оптическую эмиссионную спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ICP-OES) или масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS)] вместо колориметрических тестов, применявшихся по стандарту USP<231>. Могут использоваться и альтернативные процедуры, если будет продемонстрирован факт их соответствия требованиям, предъявляемым к эффективности и указанным в определенных в главах Фармакопеи США. Главой <233> USP также рекомендовано использование метода микроволновой пробоподготовки, когда твердые образцы укупориваются в сосуд и помещаются в печь, где происходит их расщепление. В таких условиях обеспечивается количественное восстановление всех аналитов, уровень содержания которых регулируется нормативными документами. К таким аналитам относятся, в частности, летучие элементы, например ртуть.

ПРЕДЕЛЫ СОДЕРЖАНИЯ ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ

Допустимые суточные дозы (ДСД) для элементных примесей, присутствующих в лекарственных средствах, предназначенных для перорального, парентерального и ингаляционного применения, установленные главами ICH и USP, приведены в таблице 1.

Потенциальная токсичность элементной примеси может быть разной. Ее уровень зависит от пути введения препарата в организм. Необходимо учитывать влияние элементных примесей при оценке риска продукта. Содержание примесей должно быть приемлемым для выбранного производителем способа введения конечного лекарственного продукта в организм. Также необходимо учитывать вероятность естественного присутствия элемента (например, элементы, связанные с минеральным сырьем), или элемент может быть добавлен намеренно или непреднамеренно (например, в качестве катализатора в химических реакциях или в результате попадания вместе с загрязнением, полученным от технологического оборудования). Наиболее токсичные и встречающиеся повсюду элементы класса 1 (Cd, Pb, As и Hg) должны учитываться при оценке риска, проводимого для всех лекарственных препаратов. Другие элементы, такие как примеси класса 3, необходимо учитывать только в том случае, если препарат предназначен для парентерального или ингаляционного введения. Три класса определяются на основе токсичности элементов и вероятности их появления в лекарственных продуктах, предназначенных для каждого пути введения в организм.

Таблица 1.

Пределы допустимой суточной дозы (ДСД) для элементных примесей, содержащихся в лекарственных препаратах, с учетом способа их введения. Элементы, отображенные в таблице на цветном фоне, должны учитываться при оценке риска продукта. Все перечисленные элементы должны включаться в оценку риска, если они содержатся в компоненте естественным образом или добавлены специально

Класс Фармакопеи США	Элемент	ДСД, оральные лекарственные средства (мкг/день)	ДСД, парентеральные лекарственные средства (мкг/день)	ДСД, ингаляционные лекарственные средства (мкг/день)
Класс 1	Cd – Кадмий	5	2	2
	Pb – Свинец	5	5	5
	As – Неорганический мышьяк	15	15	2
	Hg – Неорганическая ртуть	30	3	1
Класс 2A	Co – Кобальт	50	5	3
	V – Ванадий	100	10	1
	Ni – Никель	200	20	5
Класс 2B	Tl – Таллий	8	8	8
	Au – Золото	100	100	1
	Pd – Палладий	100	10	1
	Ir – Иридий	100	10	1
	Os – Осмий	100	10	1
	Rh – Родий	100	10	1
	Ru – Рутений	100	10	1
	Se – Селен	150	80	130
	Ag – Серебро	150	10	7
	Pt – Платина	100	10	1
Класс 3	Li – Литий	550	250	25
	Sb – Сурьма	1200	90	20
	Ba – Барий	1400	700	300
	Mo – Молибден	3000	1500	10
	Cu – Медь	3000	300	30
	Sn – Олово	6000	600	60
	Cr – Хром	11000	1100	3

Общая глава USP <232> содержит рекомендации по поводу того, как производитель должен проводить оценку риска, чтобы продемонстрировать соблюдение установленных нормативами пределов для любого из данных фармацевтических продуктов. В опции входит прямой анализ конечной лекарственной формы; измерение уровня примесей, содержащихся в каждом из компонентов, используемых в лекарственном материале; просмотр данных, полученных в результате анализа, или знакомство с оценкой риска, предоставляемой квалифицированным поставщиком сырья. Если проводится оценка риска, нужно следовать рекомендациям, которые даны в USP <232>. Обобщенная информация по этой процедуре приведена в таблице 1.

ЗНАЧЕНИЕ J

Максимальный уровень содержания элементных примесей в готовых лекарственных препаратах выражается в виде предельно допустимой суточной дозы (ДСД). Данный предел учитывает концентрацию элемента, присутствующего в лекарственных препаратах, и максимально допустимую суточную дозу препарата.

Для материалов, которым перед началом анализа требуется расщепление или разбавление в растворителе, предельно допустимая суточная доза (в мкг/день) должна быть преобразована в предельную концентрацию (в мкг/л). Измеряется подготовленный для анализа образец, затем вносится корректировка с учетом коэффициента разбавления. Она необходима для того, чтобы аналит (или аналиты) попали в диапазон измерений прибора. Также при выполнении анализа должна учитываться максимальная суточная доза.

Значение целевой концентрации в подготовленном образце, называемое J-значением, определяет максимально допустимый предел концентрации аналита в этом образце, где:

$$J = \frac{\text{ДСД}}{\text{Суммарное разбавление} \times \text{Макс. суточная доза}}.$$

Данный расчет показан в таблице 2. Он выполнялся для элементов класса 1 – Cd, Pb, As и Hg. Предполагаемая максимальная суточная доза составляет 1 г/день, а коэффициенты разбавления равны 10x (например, 50 г в 50 мл) и 50x (например, 2 г в 100 мл). Для сравнения также отображены типичные пределы обнаружения прибора (IDL) для Agilent 5100 ICP-OES.

Значение J также используется для определения уровней калибровки и концентрации контрольных образцов. Например, калибровочные растворы должны быть подготовлены при концентрациях от 0,5J до 1,5J, способность к обнаружению (для процедур определения предела) должна быть продемонстрирована на примере образца, у которого точное выделение пиков происходит при 80% от значения J (0,8J). И анализы на степень извлечения добавленного в пробу эталонного вещества также должны проводиться при концентрациях от 50% до 150% от значения J (то есть от 0,5J до 1,5J).

Таблица 2.

Пример расчета значений J и сравнение пределов обнаружения приборов (IDL)

Элемент	ДСД, оральное лекарственное средство (мкг/день*)	значение J разбав. 10x (мкг/ л)	значение J разбав. 50x (мкг/л)	Agilent 5110 ICP-OES Инструм. пределы обнаруж. (IDL)*** (мкг/ л)
Cd	5	50	10	0,1
Pb	5	50	10	2,2
As**	15	150	30	3,7
Hg**	30	300	60	1,0

Примечание: * Значения применимы к пероральным препаратам с суточной дозой ≤ 10 г
** Неорганические формы
*** Аксиальный вид

ПОЛНЫЙ РАБОЧИЙ ПРОЦЕСС AGILENT TECHNOLOGIES ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ТЕСТИРОВАНИЯ ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ

Подготовка пробы

В главе USP <233> приведены несколько методик, которые могут быть использованы для подготовки проб для анализа с помощью фармакопейных процедур ICP-MS и ICP-OES. К ним относится:

- прямой анализ;
- разбавление/солюбилизация в подходящем водном растворителе, таком как вода или разбавленная кислота;
- разбавление/солюбилизация в подходящем органическом растворителе, таком как 2-бутоксиэтанол : вода (25:75), диметилсульфоксид (DMSO) или моноэтиловый эфир диэтиленгликоля (DGME);
- непрямое решение, предпочтительно с использованием микроволнового расщепления сильными кислотами. При этом проба находится в закрытом сосуде.

Большинство твердых фармацевтических материалов можно расщеплять в азотной и соляной кислоте в закрытом сосуде и в условиях микроволновой печи. Тогда разложение проб будет обеспечено, а все элементы, попадающие под требования стандарта, стаби-

лизируются в растворе и после соответствующего разбавления могут быть проанализированы напрямую с помощью метода ICP-OES или ICP-MS.

ICP-OES-приборы Agilent Technologies устойчивы ко всем обычным матрицам кислот и органических растворителей, а также к другим сложным матрицам, например к тем, которые получают путем растворения твердых образцов. Как правило, их можно измерять без необходимости применения высоких коэффициентов разбавления. Системы Agilent ICP-OES также имеют надежную вертикальную плазменную горелку, обеспечивающую отличную стабильность и высокую чувствительность в отношении всех аналитов.

Конфигурация ICP-OES систем Agilent для введения стандартных образцов допускает использование самых разнообразных типов проб, для стабилизации которых применялась вода и кислота, включая и те образцы, которые содержат до 25% растворенных твердых веществ.

Точно так же для анализа образцов, требующих добавления фтористоводородной кислоты (HF), способствующей полному разложению, используется инертная система введения пробы. Подобные образцы для большинства фармацевтических лабораторий представляют собой необычное явление, но данное требование может иметь отношение к некоторым наполнителям на минеральной основе.

Понятия эффективности и пригодности прибора

Общая глава USP <233> («Элементные примеси: Процедуры») рекомендует использовать методы ICP-OES или ICP-MS для измерения уровней содержания элементных примесей в лекарственных препаратах и ингредиентах. Может использоваться альтернативный метод, такой как абсорбционная спектрофотометрия с пламенной атомизацией (FAAS), если этот метод прошел валидацию и соответствует критериям приемки. FAAS может быть подходящим методом для характеристики нескольких элементов, содержащихся в сырье в высоких концентрациях, но он не подходит для тестирования конечных лекарственных препаратов, где уровень требуемых аналитов слишком низок для того, чтобы точно определить его с помощью данного метода.

Выбор наилучшего подхода к проведению анализа элементных примесей будет зависеть от конкретных требований, установленных в отдельной лаборатории, начиная с решения о том, поручить ли проведение анализа квалифицированной сторонней лаборатории (воспользоваться аутсорсингом) или выполнить тестирование в собственных условиях. Если вы впервые выбираете и покупаете новые приборы для этого анализа, вам нужно будет разобраться в том, хватит ли функциональных возможностей у аппаратуры для того, чтобы результаты работы соответствовали требованиям метода.

ICP-OES ИЛИ ICP-MS?

Ключевыми отличиями в функциональности ICP-OES и ICP-MS являются:

Пределы обнаружения

ICP-MS умеет устанавливать пределы обнаружения (DL) гораздо лучше, чем ICP-OES: на 3 порядка ниже для большинства элементов. Это преимущество может быть частично компенсировано тем, что ICP-OES характеризуется более высокой устойчивостью к уровням матриц. Эта устойчивость примерно в 10 раз выше, чем у ICP-MS, поэтому образцам, тестируемым с помощью ICP-OES, может не потребоваться разбавление до начала анализа. ICP-OES ввиду не такого большого линейного диапазона подойдет для анализа сыпучих веществ (наполнители, связующие вещества и т.д.) и для пероральных лекарственных средств, где пределы ДСД выше. Приборы ICP-MS способны определять более низкие пределы обнаружения в диапазоне частей на триллион. Этого достаточно, для того чтобы точно определять все необходимые элементы во всех лекарственных формах, включая препараты, предназначенные для парентерального или ингаляционного введения, где уровни ДСД обычно на 1–2 порядка ниже, чем для пероральных препаратов. Для производств, выпускающих целый ассортимент фармацевтических продуктов, ICP-MS будет более подходящим инструментальным методом определения требуемых пределов для всех контролируемых стандартами элементов во всех типах образцов.

Разбавление

Степень разбавления также необходимо принимать в расчет. Если образцы нужно сильно разбавить, поскольку они имеют высокий уровень растворенных твердых веществ, например карбоната натрия, или имеется только небольшое количество пробы, в этих случаях может быть востребована повышенная чувствительность ICP-MS, благодаря которой в подготовленных разбавленных растворах будут успешно обнаружены любые элементные примеси.

Возможность работы с растворенными твердыми веществами

Приборы ICP-OES гораздо устойчивее к более высоким уровням растворенных твердых веществ, чем ICP-MS. Agilent 5110 ICP-OES может измерять образцы с содержанием растворенных твердых веществ до 25% от общего объема, поэтому это хороший выбор для лабораторий, которые измеряют сыпучие компоненты, предназначенные для использования в пероральных лекарственных средствах, где применяются более высокие пределы ДСД. Системы Agilent ICP-MS могут обрабатывать образцы, содержащие до ~2% от общего количества растворенных твердых веществ (TDS); по

этому параметру системы Agilent примерно в 10 раз превосходят аналогичные ICP-MS других производителей, для которых уровень матрицы ограничен обычно 0,2%.

Если необходим количественный анализ элементных примесей при более высоких пределах ДСД в образцах, содержащих высокий уровень растворенных твердых веществ, то более правильным будет выбор ICP-OES. Однако если требуется количественное определение элементных примесей, которые в небольшой степени содержатся в образце с высоким содержанием матрицы, например хрома в лактозе, обычно используемого для порошковых ингаляторов, нужно будет разбавить образец (для снижения уровня твердых веществ) и использовать метод ICP-MS.

Определение формы элемента

У некоторых элементов биодоступность и токсичность сильно зависят от химической формы элемента (состояния окисления, металлоорганического комплекса и т.д.).

Из аналитов, перечисленных в правилах ICH/USP, особое внимание уделяется мышьяку и ртути. Присутствие этих аналитов необходимо во всех фармацевтических продуктах. У этих двух элементов предел ДСД относится к неорганической форме, поскольку неорганический мышьяк наиболее токсичен, а неорганическая ртуть считается наиболее вероятной формой, присутствующей в фармацевтических материалах.

В случае, когда концентрация мышьяка (суммарная величина, учитывающая все формы) превышает целевую концентрацию, главой USP <232> предусматривается проведение вещественного анализа, чтобы обеспечить независимую количественную оценку содержания неорганического As.

Если неорганическая форма As окажется ниже предела, материал считается совместимым, даже если общая концентрация As превышает предел. Должна быть установлена форма ртути, если есть вероятность, что в исследуемом материале будут содержаться более токсичные формы метилртути, источником которых, как правило, служат морепродукты – рыба, водоросли и т.д. В противном случае соответствие требуемым нормам устанавливается путем определения общего уровня содержания Hg, и, скорее всего, ртуть будет в неорганической (2^+) форме.

Полностью интегрированная система Agilent LC-ICP-MS для проведения вещественного анализа

Для вещественного анализа обычно используются методы хроматографии, например жидкостная хроматография в комплексе с ICP-MS. Системы Agilent LC-ICP-MS широко используются и являются полностью автоматизированными, поэтому они представляют собой простой и надежный метод определения форм (видов), в которых мышьяк и ртуть присутствуют в фармацевтических материалах.

Скорость проведения анализа

ICP-OES – очень быстрый инструментальный метод, его пропускная способность примерно вдвое выше, чем у ICP-MS. ICP-OES может измерять до 2500 образцов в сутки, для ICP-MS максимальное количество обрабатываемых образцов составляет около 1000.

Таким образом, ICP-OES будет наиболее подходящим методом для лабораторий, которые измеряют чрезвычайно большое количество образцов, а именно пероральные дозированные лекарственные средства, для которых не требуется больших коэффициентов разбавления.

ПОЧЕМУ НУЖНО ВЫБИРАТЬ AGILENT ICP-OES?

Прибор Agilent 5110 ICP-OES хорошо подходит для анализа фармацевтических образцов, обеспечивая использование методологии, требуемой правилами USP и ICH. Данная модель имеет следующие характеристики и функциональность:

- Устойчивость к широкому спектру образцов, содержащих разнообразные матрицы, а также устойчивость к нагрузкам, которые дает общее высокое содержание матрицы в пробе (до 25% от общего количества растворенных твердых веществ). Это позволяет обрабатывать пробы, которые требуют небольшого разбавления, что соответствует требованиям точности и прецизионности, предъявляемым нормативами ICH/USP.
- Обеспечение отличной долговременной стабильности сигнала, что удовлетворяет требования главы USP <233> к повторяемости.
- Предоставление подтверждения концентрации каждого элемента, обеспечение уверенности в результатах.
- Специфичность целевых аналитов.

Вертикальная горелка для измерения сложных образцов

Конструкция горелки 5110 делает ее установку быстрой и повторяемой. Ее вертикальное расположение уменьшает скорость осаждения кристаллических частиц на инжектор, что обычно наблюдается при измерении сложных матричных образцов аппаратами с горизонтальными горелками. Это быстро снижает чувствительность прибора. Вертикальная горелка 5110 обладает высокой устойчивостью к образцам со сложными матрицами. Она обеспечивает отличную краткосрочную прецизионность и долговременную стабильность. Такая горелка не требует частой очистки от загрязнений.

Рисунок 2. Вертикальная горелка 5110 представляет собой идеальную конфигурацию для образцов с высоким содержанием растворенных твердых веществ, которые часто наносятся на горизонтально расположенные горелки

Оптика, созданная для получения точных результатов

Agilent 5110 ICP-OES имеет оптическую систему, выполненную на основе эшелле-решеток с твердотельным детектором с двумя портами Vista Chip II. Детектор измеряет >98% диапазона длин волн, от 167 до 785 нм за одно чтение. Это позволяет использовать несколько альтернативных длин волн для каждого элемента, что служит подтверждением «в методе» того, что измеряемая концентрация элемента не была затронута помехами. Для подтверждения используются данные, которые уже собрал детектор. Это и дает максимальную уверенность в точности результатов.

Максимальное время полезной работы аналитического прибора

Программное обеспечение ICP Expert служит для управления прибором 5110 и имеет интуитивно понятный интерфейс. На дисплей выводится основная панель управления и опции автоматической проверки качества работы. Это дает возможность следить за состоянием прибора в режиме реального времени, получая уверенность в том, что все поставленные аналитические задачи выполняются правильно.

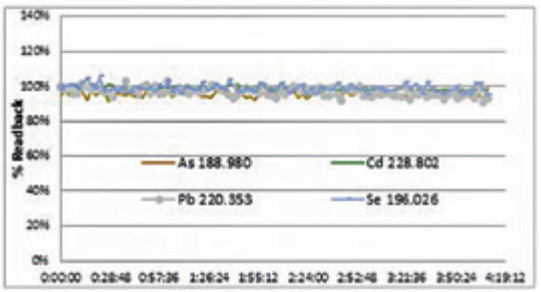


Рисунок 3. Вертикальная горелка 5110 обеспечивает отличную стабильность сигнала в течение длительного периода времени. То есть не нужно прерывать анализ проб для очистки горелки. Результат анализа – пик из 4 элементов в 25%-й NaCl-матрице, предел составляет 250 ppb (частиц на миллиард). Относительное стандартное отклонение (ОСО) <3% было достигнуто более чем за 4 ч

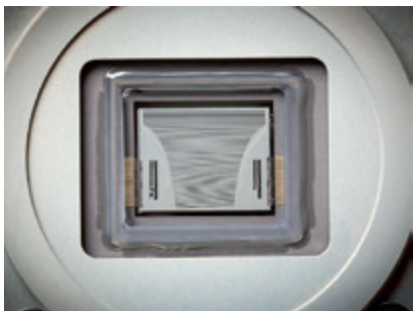


Рисунок 4. Детектор герметично закрыт, поэтому при измерении длин волн ультрафиолетового спектра не требуется продувка аргоном. Герметичность также увеличивает срок службы детектора

Чувствительный детектор 5110, охватывающий широкий диапазон длин волн, позволяет использовать другие эмиссионные линии для подтверждения измеренной концентрации каждого элемента. Это делается в рамках метода, без дополнительных затрат времени.

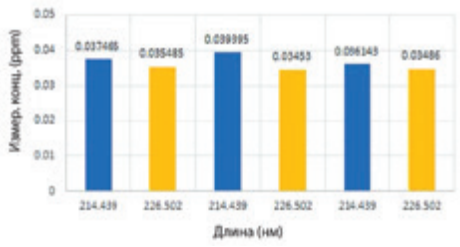


Рисунок 5. Трехмерное измерение следа Cd в растворе с линией длиной 226,502 нм. Данное измерение используется для подтверждения результата анализа, который показал линию длиной 214,439 нм

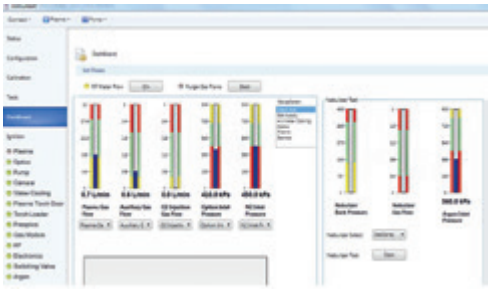


Рисунок 6. Пример декларации валидации продукта (сертификата), которая выдается вместе с ПО ICP Expert в соответствии с требованиями 21 CFR Part 11

ОЦЕНКА ПОСТАВЩИКА

Понимание технических возможностей прибора ICP позволит выбрать систему, подходящую для потребностей вашей лаборатории. Выбор – это решающий этап на пути создания возможностей для выполнения элементного анализа. В рамках этого процесса обычно проводится оценка квалификации поставщика. Необходимо учитывать опыт и достижения поставщика, а также удостовериться в том, что у поставщика имеется подходящая система менеджмента качества (СМК). СМК используется для управления качеством продукции, начиная от стадии проектирования до стадии устаревания/потребления продукта.

КВАЛИФИКАЦИЯ УСТАНОВКИ И КВАЛИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ

Выбор поставщика и оборудования является первым шагом в создании новых возможностей. Но способность поставщика доставить, установить и ввести в эксплуатацию прибор также является ключевым фактором обеспечения процесса плавной реализации. Квалификационные работы [квалификация установки (IQ) и квалификация функционирования (OQ)], а также обучение оператора являются важными шагами в процессе запуска в эксплуатацию аналитического объекта в регулируемой отрасли. После доставки на место нового прибора набор документации и профессиональный опыт Agilent Technologies гарантируют, что ваш новый инструмент будет готов к полноценной работе в самые короткие сроки.

Квалификационные услуги

Agilent предоставляет полный пакет услуг для поддержки фармацевтических лабораторий, получающих возможности тестирования элементных примесей.

Высокий уровень контроля качества производства в сочетании с опытом организации глобальной службы технической поддержки, в которой заняты высококвалифицированные инженеры, позволяет обеспечить быструю установку, а затем стабильную и надежную работу оборудования.

Agilent Technologies

Declaration of Software Validation

Рисунок 7. ПО ICP Expert выводит на экран текущую информацию о параметрах работы прибора, что служит подтверждением правильности его функционирования

После того как оборудование установлено, программная платформа автоматического нормативного соответствия Agilent CrossLAB (ACE) предоставляет услуги по проведению процедур IQ/OQ, которые выполняются с помощью автоматизированного безбумажного процесса Analytical Instrument Qualification (AIQ) – квалификация аналитических приборов.

ACE предоставляет полностью прослеживаемые, готовые к проверке разрешительные документы и отчеты по квалификации оборудования (EQR), что снижает риск несоблюдения правил и норм.

ШАБЛОНЫ МЕТОДА АНАЛИЗА ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ

Agilent 5110 поставляется с предустановленными методами для анализа элементных примесей в фармацевтических образцах. Данные методы обеспечивают соответствие требованиям ICH-Q3D и USP <232>/<233>. Их можно загрузить одним щелчком мыши, как и подробную информацию об образцах, и выполненный анализ (рисунок 8).

Предустановленные методы содержат настройки параметров, такие как условия плазмы; длины волн, испускаемые элементом; периоды интегрирования и внутренние стандарты. Это сокращает период времени, который проходит от анализа до отчетности.

Шаблон метода может быть изменен в соответствии с конкретными требованиями лаборатории и сохранен как новый шаблон для последующей настройки метода (рисунок 9).

Рисунок 8. **Документация по квалификационным требованиям CrossLab компании Agilent Technologies**

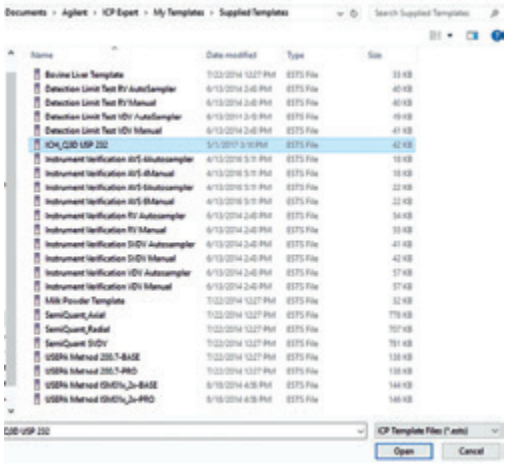


Рисунок 9. **Agilent 5110 поставляется с шаблонами методов для анализа элементных примесей, проводимого согласно USP <233>**

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ СЕРТИФИЦИРОВАННЫХ И ОТСЛЕЖИВАЕМЫХ СТАНДАРТОВ

Способность проверять качество аналитических результатов является важным требованием GMP. Демонстрация качества данных зависит от качества стандартов и эталонных материалов, используемых для калибровки аналитического оборудования и верификации рабочих характеристик прибора с использованием тестирования пригодности системы.

Эталонные материалы (CRM) Agilent – это предварительно подготовленные смеси элементов, в которых точно соблюдены относительные концентрации компонентов с учетом предельно допустимых суточных доз для пероральных препаратов, которые определены соответствующими главами ICH/USP. Эталонные материалы CRM, в которых концентрации выдержаны в пределах допустимых доз ДСД для других путей введения, находятся в стадии разработки.

CRM прослеживаются до стандартов NIST, что обеспечивает высокую степень уверенности в достоверности количественных результатов, которые дает ICP-MS Agilent. С ними нет необходимости готовить собственные стандартные растворы из отдельных эталонных элементов.

Рисунок 10. **У компании Agilent Technologies есть набор, содержащий стандарты, охватывающие полный набор регулируемых элементов**

CRM-материалы Agilent, предназначенные для анализа элементных примесей, доступны в виде набора, содержащего 5 отдельных стандартов (включая 1 внутренний стандарт), охватывающих полный диапазон регулируемых элементов.

СООТВЕТСТВИЕ НОРМАТИВНЫМ ТРЕБОВАНИЯМ, КАСАЮЩИМСЯ ЭЛЕКТРОННЫХ ЗАПИСЕЙ И ЭЛЕКТРОННЫХ ПОДПИСЕЙ (ERES)

FDA имеет ряд положений, регулирующих безопасность, целостность и прослеживаемость электронных документов. Среди нормативных актов также содержатся директивы, указывающие критерии, по которым надзорные органы будут судить, могут ли электронные записи и цифровые подписи быть приняты в качестве эквивалента бумажных документов и печатных (сделанных от руки) подписей. Эти правила описаны в 21 CFR Part 11. Европейская комиссия имеет аналогичные правила, как описано в приложении 11: «Компьютеризированные системы в свете соблюдения нормативных требований надлежащей производственной практики (GMP)». Аналогичные правила, которые применяются в других юрисдикциях, описаны в PIC/S. Данные правила также содержатся в нормативах GMP Китая и в главе о компьютерных системах GMP Бразилии.

Таблица 3.

Концентрация элементов в стандартах CRM Agilent для пероральных лекарственных препаратов

Класс Фармакопеи США	Элемент	ДСД, оральные лекарственные средства (мкг/день)	Концентрация в исходном продукте (мкг/мл)
Класс 1	Cd	5	5
	Pb	5	5
	As (неорганический)	15	15
	Hg (неорганическая)	30	30
Класс 2A	Co	50	50
	V	100	100
	Ni	200	200
Класс 2B	Tl	8	8
	Au	100	100
	Pd	100	100
	Ir	100	100
	Os	100	100
	Rh	100	100
	Ru	100	100
	Se	150	150
	Ag	150	150
	Pt	100	100
Класс 3	Li	550	550
	Sb	1200	1200
	Ba	1400	1400
	Mo	3000	3000
	Cu	3000	3000
	Sn	6000	6000
	Cr	11000	11000
	ICH/USP Целевые элементы, Стандарт A		
	ICH/USP Целевые элементы, Стандарт B		
	ICH/USP Целевые элементы, Стандарт C		
	ICH/USP Целевые элементы, Стандарт D		

Agilent Technologies может предоставить программное обеспечение, которое поможет вашей лаборатории в соблюдении правил части 11 / приложения 11. Вне зависимости от условий – от установки на управляющий прибором ПК до установки в распределенной среде на ваши серверы – наши решения предоставляют:

- защищаемый паролем доступ пользователей к программному обеспечению ICP-OES;
- настраиваемый многоуровневый доступ к программным функциям (он определяется уровнями привилегий пользователей);
- журнал контроля входа/выхода пользователя (пользователей) в систему, включая подробную информацию о действиях пользователя, выполнявшихся с программным обеспечением ICP Expert;
- протоколы электронной подписи (валидация пользователя и обоснование) для конкретных действий;
- безопасное хранение электронных записей с помощью программы Agilent Spectroscopy Database Administrator (SDA). Эта программа обеспечивает безопасное хранение в базе данных информации, созданной на одном устройстве Agilent ICP-OES. Программный компонент SDA может быть установлен на рабочей станции (ПК), управляющей прибором, или на сетевом сервере.

ЛИТЕРАТУРА

1. USP Chapter <232>. Elemental Impurities- Limits // Pharmacopeial Forum. 2016. № 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.

Agilent

Trusted Answers

Agilent

Trusted Answers

АНАЛИЗ ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ В ФАРМАЦЕВТИКЕ ICP-OES

Рассмотрение новых методов ICH и USP, разработанных для измерения содержания элементных примесей в фармацевтических препаратах

Материал предоставлен компанией Agilent Technologies

ВВЕДЕНИЕ

Контроль над содержанием примесей, включая элементные (неорганические) загрязнители, всегда имел особое 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 контаминантов. Метод USP <231> не был специальным или количественным, имел ограниченный охват и часто давал плохие результаты при извлечении летучих аналитов, которые терялись на стадии высокотемпературного озоления.

Чтобы решить эту проблему, Международная конференция по гармонизации технических требований для регистрации фармацевтических препаратов, используемых человеком (ICH), и Фармакопея США (USP) выпустили новые, согласованные методы, основанные на результативности 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>.

Двадцать четыре 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 лекарствах 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.

Методами эталонного анализа, предложенными в новых указаниях, являются ICP-MS и ICP-OES. Они заменяют колориметрический тест, использовавшийся в более ранних методах.

ICP-MS и ICP-OES могут 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 исходя из целевого предела ДСД в контрольном образце, скорректированного для разбавления образца; то есть значение J – это концентрация, эквивалентная ДСД в растворе анализируемого образца.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ICP-OES обладает преимуществами в плане чувствительности при наличии высоких матричных нагрузок, простоты эксплуатации и высокой пропускной способности.

ИЗМЕРЕНИЕ «ТРУДНЫХ» ОБРАЗЦОВ

Agilent 5110 ICP-OES – идеальный инструмент для фармацевтических лабораторий, делающих акцент на материалах для пероральных лекарственных средств и фармацевтических продуктах, требующих небольшого разбавления образца или не требующих его совсем. Его вертикальная горелка позволяет анализировать самые разные типы образцов, в том числе с общим количеством 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 Agilent 5110 ICP-OES в отношении органической матрицы для фармацевтического анализа: это образец масла, растворенный 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.

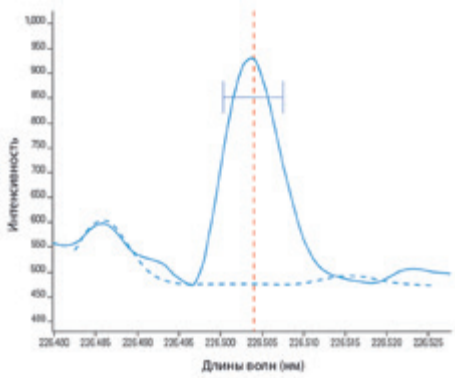


Рисунок 1. Сигнал эмиссии от 35 мкг/л Cd при 226,502 нм в образце масла, растворенного в керосине. Спектр Cd четко разрешен, несмотря на присутствие в образце 21 элемента

БЫСТРОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ТОЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Детектор Vista Chip II в Agilent 5110 ICP-OES имеет очень широкое покрытие по длине волны и высокую тактовую частоту. Он способен измерять все длины волн в диапазоне от 167 до 785 нм в одном измерении. 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. 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.

Таблица 1.

Измеренная концентрация 35 ppb Cd 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

Agilent 5110 ICP-OES имеет как метод поправки на фон с автоматической аппроксимацией, так и метод скоростной автоматической аппроксимации кривых (FACT), который представляет собой алгоритм спектральной деконволюции, используемый для коррекции спектрального перекрытия.

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 сложности для лаборанта. На рисунке 1 также показана пунктирная линия под спектром, которая иллюстрирует автоматическое размещение поправки на фон с автоматической аппроксимацией.

Метод FACT для вычисления 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 вычислить спектральные помехи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Agilent 5110 ICP-OES выводит аналитический метод ICP-OES 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 программного обеспечения облегчает анализ на содержание элементных примесей в лекарственных средствах. При комбинации детектора Vista Chip II с программным обеспечением ICP Expert процесс анализа получается простым и быстрым. Его можно воспроизводить от аналитика к аналитику, от лаборатории к лаборатории.

Agilent
Trusted Answers

ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРОДУКТАХ

Материал предоставлен компанией Agilent Technologies

АННОТАЦИЯ

Фармакопеи многих стран мира приняли обновленные стандарты контроля содержания элементных примесей в лекарственных препаратах и ингредиентах. В соответствии с новыми главами USP и ICH увеличилось количество элементов, которые требуют более тщательного мониторинга. Уровень их допустимого содержания по сравнению с нормативами прошлых лет стал заметно ниже. По этой причине для определения концентрации элементных примесей рекомендуются к использованию современные инструментальные (фармакопейные) аналитические процедуры.

ВВЕДЕНИЕ

Аналитические требования, указанные в главах USP/ICH, разнятся в зависимости от типа пробы и производственных процессов. Пределы допустимых суточных доз (ДСД), устанавливаемых для каждого элемента, зависят от их способа введения в организм (таблица 1).

Элементы, относящиеся к классам 1 и 2а, должны учитываться во всех оценках риска, возникающего при приеме препарата. В зависимости от способа введения лекарства следует учитывать и дополнительные элементы. В таблице они выделены цветным фоном. В оценку риска следует включать все элементы, регламентируемые ICH/USP, если они будут присутствовать в препарате естественным образом или в виде специально внесенной добавки.

Производители должны иметь возможность продемонстрировать полное соответствие производимых ими препаратов установленным для перечисленных элементов нормам содержания в окончательной рецептуре препаратов. Они могут тестировать либо конечный продукт, либо каждый компонент продукта либо использовать данные о содержании примеси, полученные от аттестованного поставщика компонента.

Таблица 1.

Допустимая суточная доза (ДСД), установленная для элементных примесей в зависимости от способа введения препарата в организм

Элемент	ДСД, оральные лекарственные средства (мкг/день)	ДСД, парентеральные лекарственные средства (мкг/день)	ДСД, ингаляционные лекарственные средства (мкг/день)
Класс 1 Фармакопеи США			
Cd – Кадмий	5	2	2
Pb – Свинец	5	5	5
As – Неорганический мышьяк	15	15	2
Hg – Неорганическая ртуть	30	3	1
Класс 2А Фармакопеи США			
Co – Кобальт	50	5	3
V – Ванадий	100	10	1
Ni – Никель	200	20	5
Класс 2В Фармакопеи США			
Tl – Таллий	8	8	8
Au – Золото	100	100	1
Pd – Палладий	100	10	1
Ir – Иридий	100	10	1
Os – Осмий	100	10	1
Rh – Родий	100	10	1
Ru – Рутений	100	10	1
Se – Селен	150	80	130
Ag – Серебро	150	10	7
Pt – Платина	100	10	1
Класс 3 Фармакопеи США			
Li – Литий	550	250	25
Sb – Сурьма	1200	90	20
Ba – Барий	1400	700	300
Mo – Молибден	3000	1500	10
Cu – Медь	3000	300	30
Sn – Олово	6000	600	60
Cr – Хром	11000	1100	3

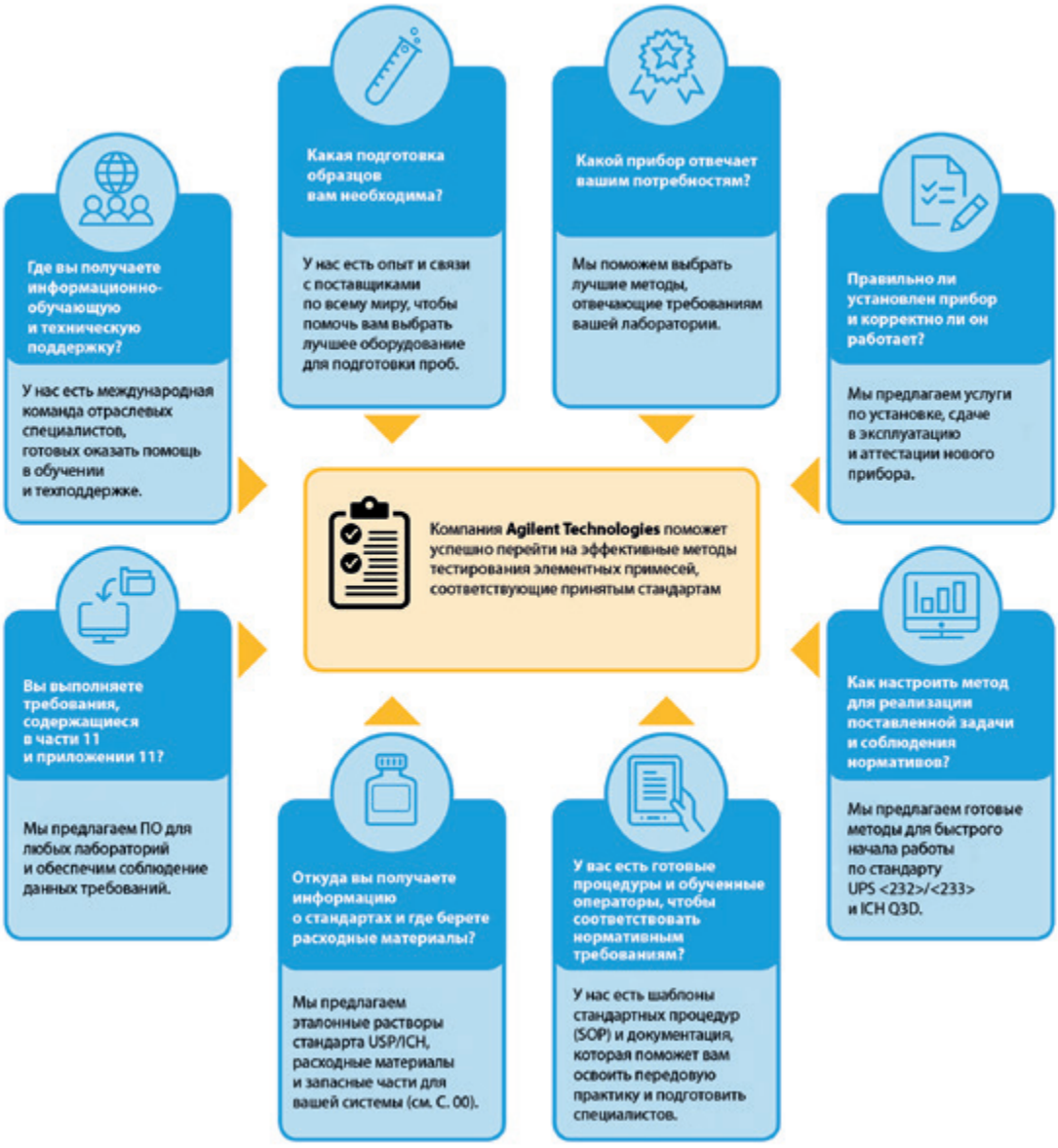
ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ОБОРУДОВАНИЕ AGILENT TECHNOLOGIES ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА НА СОДЕРЖАНИЕ ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ

AGILENT 5110 ICP-OES

Agilent 5110 ICP-OES идеально подходит для анализа элементных примесей в сыпучих ингредиентах (например, сырье и наполнители) или пероральных лекарствах, которые требуют быстрого анализа большого количества образцов. Этот прибор может измерять содержание всех 24 регулируемых элементов до уровня частиц на миллиард. Он также может анализировать образцы, в которых содержится до 25% раст-

Масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой и оптической эмиссией Agilent 5110 ICP-OES



Комплексное решение от Agilent
На каждом этапе перехода вашей лаборатории гарантирована поддержка

воренных твердых веществ, например карбоната натрия.

5110 ICP-OES обеспечивает высокую скорость работы и снижает себестоимость анализов. Он позволяет:

- получать воспроизводимые результаты в течение длительного времени даже для образцов с высоким содержанием матрицы. Вертикальная горелка не требует частой очистки;
- подтверждать точность анализа быстрым измерением всего диапазона длины волн; есть время для сравнения по нескольким эмиссионным линиям концентрации каждого элемента;
- пользоваться уникальными автоматическими алгоритмами – поправкой на фон с автоматической аппроксимацией и FACT (деконволюция спектра);
- упростить настройку прибора, анализ образцов и техническое обслуживание, пользуясь возможностями ПО и аппаратных опций, легко подключаемых к системе с помощью функции plug-and-play.

Методы определения элементных примесей зависят от результативности, поэтому можно использовать любую процедуру, которая прошла валидацию и соответствует критериям приемлемости.

Методика организации быстрого начала работы

Шаблон метода, соответствующего требованиям USP <232>/<233> и ICH Q3D, предустановлен на модель 5110 ICP-OES. В него внесены оптимальные длины волн для 24 элементов и надлежащие средства контроля качества. Данный шаблон великолепно поможет оператору, который впервые занимается настройкой методов.

AGILENT 7800 ICP-MS

Agilent 7800 ICP-MS идеально подходит для анализа широкого спектра лекарственных препаратов и ингредиентов. Он может легко измерить все 24 элемента на низких уровнях содержания, требуемых для парентеральных и ингаляционных лекарств, а также лекарственных форм для перорального применения. Данный прибор также незаменим для работы, когда количество проб ограничено или пробы с высоким содержанием матрицы требуют большого разведения.

Легкая настройка метода и возможность обработки проб с различными матрицами или широким диапазоном концентраций превращают 7800 ICP-MC в высокопроизводительную систему, идеально подходящую для лаборатории, занимающейся аналитической деятельностью на контрактной основе.

С 7800 ICP-MS вы можете:

- измерять самые различные типы проб, используя высокотемпературный плазменный ионный источник и систему ввода проб с высоким содержанием матричных компонентов (HMI);
- устранять все распространенные полиатомные интерференции в режиме с гелием, используя одиночную, простую октупольную коллизионно-реакционную ячейку ORS4;
- упростить настройку метода, минимизировать возможность повторных прогонов, возникающих из-за получения результатов, выходящих за рамки установленного диапазона, и измерять аналиты с высокой и низкой концентрацией за один прогон с помощью детектора, динамический диапазон которого достигает 10 порядков;
- расширить набор функциональных аналитических возможностей за счет настраиваемых опций введения проб для органических растворителей; определять виды As и Hg, производить автоматическое разведение и готовить стандартный раствор.

Легко созданные СОПы

В модель 7800 ICP-MS предустановлен метод, соответствующий нормативам USP <232>/ICH Q3D, встроенные средства для обработки и оформления результатов согласно требованиям USP и шаблон стандартной рабочей процедуры для возможности более быстрой разработки ваших собственных SOP. Эти инструменты упрощают настройку и тестирование пригодности системы, а также обеспечивают быстрое и надежное ее функционирование.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ НОРМАТИВНОГО СООТВЕТСТВИЯ НА ПРОТЯЖЕНИИ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА АНАЛИТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Приборы, изготовленные для обеспечения нормативного соответствия

Компания Agilent Technologies уделяет большое внимание соблюдению нормативных требований в отношении системы управления качеством, документации, касающейся жизненного цикла продукта, и декларациям валидации продукта, относящимся к разработке программного обеспечения.

Также может быть предоставлена декларация валидации ПО/продукта, указывающая, что программное обеспечение Agilent поддерживает требования к сертификации в соответствии с 21 CFR, часть 58 («Надлежащая лабораторная практика, GLP»), 21 CFR часть

Масс-спектрометр с индуктивно-связанной плазмой Agilent 7800 ICP-MS

210 («Надлежащая производственная практика, GMP»), или 21 CFR, часть 211 («Действующая надлежащая производственная практика, cGMP»).

Квалификация системы в вашей лаборатории

После доставки в лабораторию нового прибора служба проведения квалификации оборудования Agilent CrossLab поможет подтвердить правильность установки и корректную работу прибора согласно предъявляемым к нему требованиям.

Используя уникальное ПО Automated Compliance Engine (ACE), специалисты CrossLab проведут поэтапную процедуру по квалификации установки (IQ) и квалификации функциональности (OQ) с учетом применения широкого спектра оборудования Agilent Technologies, включая 7800 ICP-MS и 5110 ICP-OES.

Квалификация установки, проведенная CrossLab, служит подтверждением завершения процесса поставки и сертификации оборудования. Далее происходит проверка правильности установки системы и рабочего ПО до момента первого использования данного комплекса в условиях лаборатории.

После завершения этапов валидации IQ/OQ программное обеспечение Agilent ACE предоставляет подробный отчет о квалификации оборудования (EQR), подтверждающий характеристики продукта

Квалификация функционирования, выполняемая CrossLab, включает в себя набор стандартных тестов, направленных на проверку производительности/эффективности; полученные результаты сравниваются с контрольными показателями по таким параметрам, как чувствительность, стабильность, разрешение и т.д.

Квалификационная служба CrossLab снижает риск нарушения отраслевых стандартов, предоставляя:

- унифицированный процесс прохождения квалификации и отчеты по всем приборам;
- гибкость в настройке тестирования в рамках требований стандартной операционной процедуры (SOP);
- полную автоматизацию для обеспечения соблюдения протокола;
- готовый к проверке отчет по квалификации оборудования (EQR).

Программное обеспечение, гарантирующее соответствие 21 CFR Part 11 и приложению 11

Компания Agilent Technologies предоставляет разнообразные программные решения и документацию для обеспечения соответствия 21 CFR Part 11 и приложению 11 в отношении электронных записей и электронных подписей (ERES). Данные средства помогают обеспечить безопасность, целостность и прослеживаемость ваших аналитических данных.

Постоянное соответствие сертифицированным эталонным материалам (CRM)...

Компания Agilent Technologies предлагает набор эталонных материалов (CRM), благодаря использованию которых значительно упрощается проведение анализа на содержание неорганических загрязнителей в фармацевтических продуктах в соответствии с требованиями ICH Q3D и USP <232>/<233>.

В набор Elemental Impurities Kit от Agilent входят 5 эталонных материалов. В них содержатся элементы, которые были разделены на классы, прошли отбор по химической совместимости и относительной концентрации. CRM выпускаются на заводе, где производственный процесс соответствует требованиям ISO Guide 34. Сертификация эталонных материалов осуществляется в лаборатории, где внедрен стандарт ISO/IEC 17025.

К материалам выдается сертификат анализа, подтверждающий фактические концентрации элементов, неопределенность измерений и прослеживаемость значений до эталонов NIST.

УПРОЩЕНИЕ АНАЛИЗА ЭЛЕМЕНТНЫХ ПРИМЕСЕЙ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ЭТАЛОННЫХ МАТЕРИАЛОВ ОТ AGILENT TECHNOLOGIES

Материал предоставлен компанией Agilent Technologies

ВВЕДЕНИЕ

В новой редакции глав <232> и <2232> Фармакопеи США (USP) и Международной конференции по гармонизации (ICH, Q3D) были опубликованы новые пределы содержания элементных примесей в лекарственных средствах и пищевых добавках.

Процедуры количественного анализа элементных примесей по USP <233> устанавливают ICP-OES и ICP-MS в качестве эталонных аналитических методов. Они заменили устаревший колориметрический анализ, использовавшийся ранее в соответствии со стандартом USP <231>, применяемым для «анализа содержания тяжелых металлов». Новые главы благодаря внедрению более совершенных методик расширяют список аналитов, уменьшают максимально допустимые предельные значения воздействия и учитывают путь поступления препарата в организм (например, пероральный, парентеральный и ингаляционный).

НАБОР ELEMENTAL IMPURITIES KIT

Набор Elemental Impurities Kit, произведенный компанией Agilent Technologies и обеспечивающий соответствие стандартам, указанным в главах ICH Q3D/USP <233>, состоит из пяти сертифицированных эталонных материалов (CRM), которые сортируют элементы по классам ICH/USP, химической совместимости и относительной концентрации. Теперь у лабораторий нет необходимости в подготовке собственных стандартов калибровки, которые должны строго соответствовать установленным нормативам. Тем самым сокращается время подготовки оборудования к работе и минимизируются возможные ошибки.

В данный набор входит:

- Идеально подобранный ассортимент CRM-материалов для определения содержания элементных примесей в допустимой суточной дозе (ДСД) лекарственных препаратов, предназначающихся для перорального приема.
- Внутренний стандартный раствор, специально предназначенный для получения наилучших результатов при использовании методик ИСП-МС/ИСП-ОЭС при работе с обычными типами фармацевтических образцов.
- CRM выпускаются на заводе, где производственный процесс соответствует требованиям ISO Guide 34. Сертификация эталонных материалов осуществляется в лаборатории, где действует стандарт ISO/IEC 17025.
- Сертификат анализа лекарственного средства, подтверждающий фактические концентрации, неопределенность измерения и прослеживаемость значений до эталонов NIST.

Приборы ICP-OES и ICP-MS производства Agilent Technologies также дают возможность определять наличие неорганических загрязнений в рамках требований ICH Q3D и USP <233>.

Номер по каталогу	Описание лекарственного средства	Состав лекарственного средства	Матрица	Объем
5190-9771	Набор ICH Q3D/USP<233> Elemental Impurities Kit	Включает 1 из следующих стандартов (A, B, C и D), а также внутренний стандарт (р-р)		
5190-9766	ICH/USP Целевые элементы, Стандарт A	Hg @ 30; As @ 15; Cd, Pb @ 5 мкг/мл	2% HNO_3	100 мл
5190-9767	ICH/USP Целевые элементы, Стандарт B	Ni @ 200; Ag, Se @ 150; V @ 100; Tl @ 8; Co @ 50 мкг/мл	2% HNO_3	100 мл
5190-9768	ICH/USP Целевые элементы, Стандарт C	Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru @ 100 мкг/мл	15% HCl	100 мл
5190-9769	ICH/USP Целевые элементы, Стандарт D	Cr @ 11 000; Sn @ 6000; Cu, Mo @ 3000; Ba @ 1400; Sb @ 1200; Li @ 550 мкг/мл	5% HNO_3/ следовое кол-во HF	100 мл
5190-9770	Pharma Внутренний стандарт 1	Te @ 25; Sc @ 10; Ge, In, Lu, Bi @ 5 мкг/мл	2% HNO_3/ следовое кол-во HF	100 мл

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

BIACORE™: СИСТЕМЫ АНАЛИЗА КОНЦЕНТРАЦИИ И СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ НА ПОЗДНЕЙ СТАДИИ РАЗРАБОТКИ И ЭТАПЕ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА БИОПРЕПАРАТОВ

Материал предоставлен компанией GE Healthcare Life Science

Biacore T200

ВВЕДЕНИЕ

Биологические препараты, представленные антителами, цитокинами и гормонами, используются для лечения разных заболеваний, включая артрит, рак и диабет. В отличие от традиционных низкомолекулярных лекарственных средств структура биопрепаратов является сложной, а их действие может проявляться посредством высокоспецифичного связывания с несколькими молекулами-мишенями. На этапе разработки и контроля качества используется ряд аналитических технологий для определения свойств биологических препаратов, включая их структурную целостность и действие. В этой статье описывается использование технологии Biacore для измерения концентрации действующих веществ. Также рассматривается анализ связывания с молекулами-мишенями и Fc-рецепторами (FcR) для оценки эффективности и стабильности препаратов.

Жизненный цикл биологического препарата обычно составляет более 30 лет, как показано на рисунке 1. Продолжительность ранней стадии разработки может составлять бо-

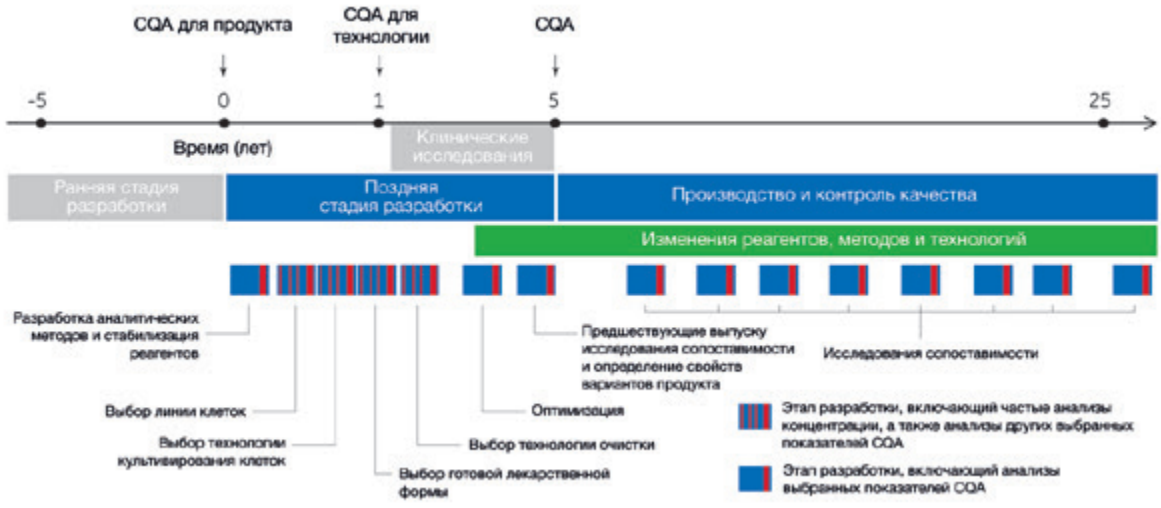


Рисунок 1. События в жизненном цикле биотерапевтического препарата. Каждый блок развития и сопоставимость исследования включают в себя анализ для CQA

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

лее 5 лет. Этап первоначальной разработки в рамках поздней стадии может быть завершен довольно быстро – приблизительно за год. Технология дорабатывается параллельно с началом первых клинических исследований. Поздняя стадия разработки может длиться 2–5 лет в зависимости от продолжительности клинических исследований. После утверждения первоначальных показаний к применению разрабатываемый продукт может оставаться на этапе производства и контроля качества более 20 лет. В этот период могут добавляться дополнительные показания. Примером вышесказанного служат такие успешно продаваемые биопрепараты, как Ритуксан™, Герцептин™, Энбрел™, Ремикейд™, Хумира™, Авастин™ и Лантус™, которые были одобрены к применению в 1997–2004 гг.

На ранних этапах разработки особое внимание уделяется лекарственной субстанции и предполагаемому механизму действия [1]. В этот период для разработки биологических препаратов используются преимущественно мишень-ориентированные методы [2]. Механизм действия терапевтических антител проявляется через связывание с мишенью (антителом), но также может быть представлен FcR-зависимым и комплементарным связыванием. Механизм действия цитокинов и гормонов реализуется посредством связывания с рецепторами. Базовое соединение (соединение-лидер) должно вызывать требуемый функциональный ответ целевой молекулы, характеризоваться достаточной биодоступностью и биораспределением, а также быть безопасным.

На поздней стадии для такого соединения определяется несколько критических показателей качества (Critical Quality Attributes, CQA), то есть свойств, которые обеспечивают его безопасность и клиническую эффективность (рисунок 2), включая данные о том, как оно взаимодействует с белками-мишенями. Важные показатели CQA, связанные с технологическими процессами (включая целостность белка, однородность, наличие белков клетки-хозяина, ДНК клетки-хозяина, а также веществ, высвобождаемых при производстве или из упаковочного материала), определяются путем оценки риска на основе предыдущего опыта и имеющихся знаний, а также с использованием методов контроля. Для каждого шага технологического процесса устанавливаются критические технологические параметры (Critical Process Parameters, CPP), которые могут влиять на показатели CQA [3]. Также определяется стратегия управления. Выполняемый в биотехнологической лаборатории анализ обеспечивает надлежащий процедурный контроль культивирования клеток [4] и очистки [5]. Определение параметров CPP и стратегии управления гарантирует соответствие параметрам CQA и упрощает верификацию. Чтобы обеспечить это, в нормативных руководствах [6] по производству биотехнологических и биологических продуктов прописаны требования к процедурам тестирования и критерии приемлемости.

Рисунок 2. Biacore, как правило, используется для связывания активности и концентрации измерения. В то время как они являются важными CQA в своем собственном праве, связывающая активность и концентрация также должны быть проверены, если наблюдаются изменения в других CQA, как показано красными линиями

Поздняя стадия разработки включает технологическую разработку, разработку состава и клинические исследования. В этой статье основное внимание уделяется этапу разработки, связанному с химическим производством и контролем (Chemical Manufacturing and Control, CMC) [7]. Анализы, обсуждаемые здесь, обычно выполняются в центральных лабораториях, которые получают образцы от групп, отвечающих за технологическую, фармацевтическую и производственную разработку.

Разработка начинается с определения и валидации [8] аналитических методов, а также стабилизации реагентов [9, 10], используемых в рамках программы анализа. Методы анализов CQA представлены самыми разными (50–60 вариантов) аналитическими технологиями [11]. Масс-спектрометрия (МС) позволяет установить идентичность препарата (первичную последовательность), а также определить профили распределения по размерам, связанные с посттрансляционными модификациями, включая гликозилирование [12]. МС также используется в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) и другими хроматографическими методами для обнаружения и локализации модификаций аминокислот [13]. Хроматографические методы широко используются для обнаружения и выделения образцов с разным зарядом и размером [14]. Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE или ДСН-ПААГ) и вестерн-блоттинг позволяют определить целостность белка, а в случае с антителами – присутствие комплексов HHL, HL и L [15]. Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA или ИФА) и поверхностный плазмонный резонанс (SPR или ППР)

обычно используются для подтверждения биологической активности *in vitro* посредством оценки взаимодействий с антигеном, рецептором, FcR или другими связывающими белками [11, 13].

Технологическая разработка на этапе CMC включает подбор линии клеток для экспрессии белка, разработку процесса культивирования клеток и очистки лекарственной субстанции. Фармацевтическая разработка предусматривает подбор эксципиентов для готового продукта. Задача технологической разработки – добиться высокого выхода продукта и экономичности процесса. Это помогает получить свойства, соответствующие исходным показателям CQA, а также обеспечить контроль над процессом и минимизировать содержание примесей. Этап фармацевтической разработки включает стабилизацию конечного продукта до необходимого уровня, выбор лекарственной формы и работу над фармакокинетическим профилем. На всех этапах поздней стадии разработки выполняется мониторинг исходных и анализ возможных новых показателей CQA. Перед переходом к производству определяется полный перечень показателей CQA и процедуры их контроля. Этап производства и контроля качества (QC) предусматривает разработку системы поставок продукта со стабильным качеством. При определении показателей CQA используется весь корпус актуальных научных знаний, которые впоследствии могут быть пересмотрены с учетом клинических данных, которые накапливаются с течением времени.

То, что этап производства может длиться больше десяти лет, связано как с определенными проблемами, так и с преимуществами. Проблема заключается в необходимости поддержки высокого и стабильного качества продукта на фоне развивающихся аналитических технологий, а также устаревания материалов и реагентов. Преимущества представлены возможностью оптимизации, которая упрощает технологические процессы и делает их более надежными и/или экономичными. Демонстрация сопоставимости [16] не обязательно обозначает полное соответствие показателей качества до и после модификации продукта. Тем не менее, используя полученные результаты и доступные знания о продукте, можно упредить любое негативное влияние на безопасность и эффективность препарата, обусловленное разницей в показателях качества. Изменения на этапе производства могут быть достаточно частыми [17], а время утверждения модифицированных продуктов – продолжительным.

Хотя исследования сопоставимости продолжают стимулировать развитие современных методик анализа, в гораздо большей степени это справедливо для более точной технологии фингерпринтирования, используемой для оценки биоэквивалентности [18–20]. Биоэквивалентные препараты – это дженерики, которые по составу, а также профилю безопасности и эффективности идентичны референтному (оригинальному) препарату. Хотя биоэквивалентный препарат должен наследовать свойства референтного продукта, процессы и технологии, используемые при производстве и контроле дженерика и оригинального продукта, могут отличаться. Результаты всесторонних сравнительных аналитических исследований референтного продукта могут указывать на масштаб клинических исследований, которые должны быть выполнены [18, 19, 21].

СИСТЕМЫ АНАЛИЗА BIACORE СОЗДАНЫ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ

Анализы на основе связывания лигандов – ключевая технология определения характеристик биологических препаратов. Она широко используется в таких лабораторных методах, как SPR и ELISA. Системы Biacore и анализы связывания лигандов, разработанные подразделением GE Healthcare Life Sciences, основываются на технологии SPR и используются для определения свойств антител уже более 20 лет.

Показания системы Biacore основаны на измерении молекулярной массы, и любое событие связывания может быть определено без использования меток.

Показания поступают непрерывно, гарантируя контроль качества на протяжении всего события связывания. Это также позволяет анализировать данные с учетом ответов на реакцию связывания, полученных в одной или нескольких определенных временных точках (анализ точек отчета), либо путем сравнения или даже подбора кривых связывания для определения показателей кинетики и аффинности.

Технология Biacore на основе связывания лигандов – это методика анализов прямого связывания [22], ориентированная на соответствующие взаимодействия [23], предоставляющая информацию о происходящих связываниях, а также способная определять даже очень слабые взаимодействия. Эта технология отличается от метода непрямого детектирования ELISA с использованием меченого вторичного реагента, в рамках которого показатели регистрируются при менее определенной точке времени, а слабые взаимодействия могут оказаться незамеченными.

Анализы ELISA и Biacore могут использоваться в прямом и конкурентном форматах в самых разных ситуациях, когда данные о связывании требуются для подтверждения и количественного определения присутствия аналита или определения свойств и подтверждения биологической активности. Определение свойств событий связывания незаменимо при подтверждении показателей CQA (рисунок 2) и проведении испытаний форсированной деградации. Кроме того, эти методики дополняют или даже являются основой для количественного определения действующего

вещества. Хотя аналитическое оборудование для анализов ELISA и Biacore часто очень похоже, нет никакой гарантии, что реагенты окажутся взаимозаменяемыми.

Технология Biacore позволяет исследователю представлять данные, полученные от нескольких образцов, путем наложения графиков, как показано на рисунке 3. Такое эффективное отображение данных делает результаты анализов Biacore относительно легко интерпретируемыми. Данные Biacore часто являются более точными, чем данные ELISA [24], – возможно, благодаря тому, что анализы Biacore включают меньшее количество этапов и предусматривают более строгий контроль времени и температуры.

СИСТЕМЫ BIACORE ОБЕСПЕЧИВАЮТ ВЫСОКОТОЧНОЕ ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ

Анализы концентрации незаменимы на следующих этапах процесса разработки: при определении выхода в культурах клеток с течением времени; при определении подходящих условий для хроматографии; при мониторинге процессов финальной очистки; при фармацевтической разработке.

Самые простые методы определения концентрации основаны на показателях поглощения света с длиной волны 280 нм (значения A_{280}), но для этого должны подавляться помехи, вызываемые другими веществами, поглощающими УФ-излучение. Значения A_{280} часто используются при исследованиях ВЭЖХ. Но гораздо больший интерес представляют возможности получения данных о концентрации, которые описывают не только общее содержание белка, но также концентрацию конкретного белка, характеризуя его функцию или действие. Следовательно, анализы связывания антител или рецепторов крайне важны.

На рисунке 4 представлены показатели динамического диапазона и точности анализа концентрации с использованием системы Biacore. Показатели регистрируются начиная от точки отчета в конце ввода образца. В этих примерах антитело с человеческими Fc-фрагментами иммобилизировалось на поверхности сенсора. На рисунке 6A омализумаб в концентрации от 2 нг/мл до 1 мг/мл вводился в течение 3 мин. После инъекции следовал ответ на самые низкие значения концентрации (2–8 нг/мл). Этот метод позволяет корректировать время выполнения анализа в зависимости от диапазона целевых уровней концентрации. На рисунке 6B время ввода образца сокращено до 20 с, а целевой диапазон концентрации – от 0,5 до 50 мкг/мл. На графике представлены результаты повторных инъекций стандартного, контрольного и одного выбранного образца в ходе более 1000 циклов анализа, выполненных на одной и той же поверхности. Заметно, что стандартный и контрольный образцы оставались стабильными с течением времени, а коэффициент вариации (Coefficient of Variation, CV) для повторных проб составил 1,3%.

Очевидно, что анализы Biacore являются чувствительными, поддерживают широкий динамический диапазон и обеспечивают быстрые результаты. Кроме того, благодаря конструкции системы Biacore они могут выполняться в мультиплексном режиме с возможностью проведения нескольких анализов параллельно.

Валидация методики анализов Biacore для оценки свойств антител с описанием процедур иммобилизации и регенерации, характеристик буферных растворов, требований к хранению сенсорного чипа, коэффициентов вариации для серии анализов, предела об-

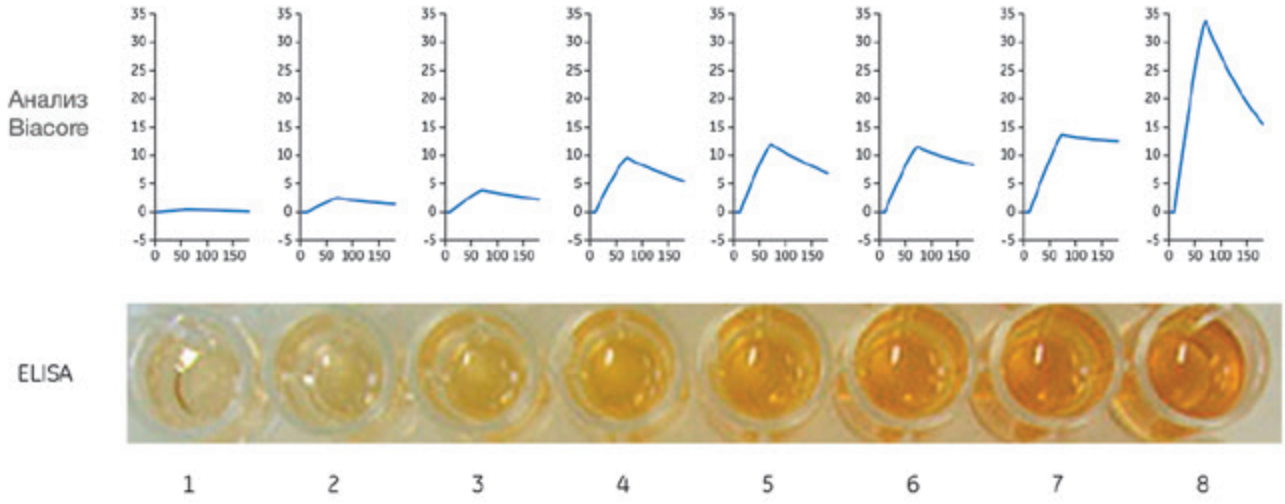


Рисунок 3. Гипотетический ELISA- и Biacore-анализ ответов. Увеличение ELISA-ответов в скважинах от 1 до 8, с кривые связывания Biacore отображаются выше скважин. Чем выше уровень связывания первоначально наблюдается в анализе Biacore для образца в лунке 8, тем выше стабильность образца 7. Это примеры информации, которая не может быть выведена из экспериментов ELISA

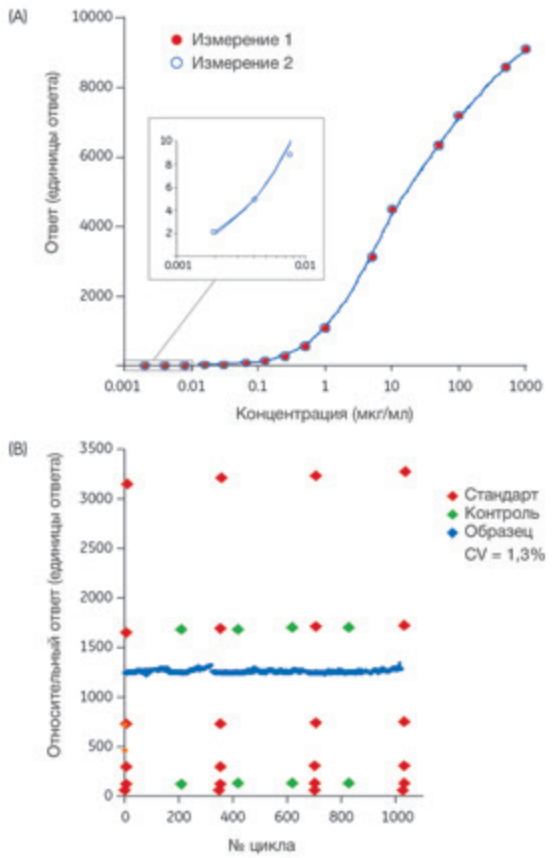


Рисунок 4. Данные о концентрации, полученные с помощью системы Biacore T200

наружения и способа количественного определения рассмотрена в справочном источнике [25], где дополнительно разбирается использование системы Biacore в среде GMP.

Анализ связывания по технологии Biacore позволяет оценить механизм действия активных веществ и может использоваться для их количественного определения

СВЯЗЫВАНИЕ С КЛЕТКАМИ-МИШЕНЯМИ

Антитела, цитокины и гормоны обычно взаимодействуют с соответствующими рецепторами. Хотя цитокины и гормоны, как правило, сохраняют свою естественную последовательность, они могут быть оптимизированы для улучшения показателей стабильности или периода полураспада. Биопрепараты на основе антител, с другой стороны, разработаны для взаимодействия с соответствующими молекулами-мишенями, включая антигены, FcR и факторы комплемента. Профили связывания, представленные на рисунке 5, демонстрируют связывание цитокина со своим рецептором, а также связывание двух антител со своими мишенями.

Как видно из графиков, свойства связывания значительно отличаются, а установленный период полураспада составляет от 50 с (ИФНα-2a) до 12 ч (бевазизумаб). В настоящее время разрабатывается несколько форматов оценки свойств с упором на биспецифические антитела – соединения, в которых две разные целевые функциональные группы объединены в одной молекуле. Примеры использования системы Biacore для определения свойств включают следующие объекты: биспецифические Т-клетки, связывающиеся с рецепторами клеток-мишеней [28]; биспецифическое антитело, связывающееся с FIXa и FX для имитации естественной функции фактора FVIII [29]; биспецифическое антитело, связывающееся с функциональными группами VEGF и Ang-2 для контроля васкуляризации опухолевой ткани [30].

Показатель связывания с мишенью, несомненно, является важным показателем CQA, следовательно, он должен контролироваться на этапах разработки, а затем и QC для обеспечения однородности характеристик продукта от серии к серии. В то время как анализы высвобождения традиционно связан с исследо-

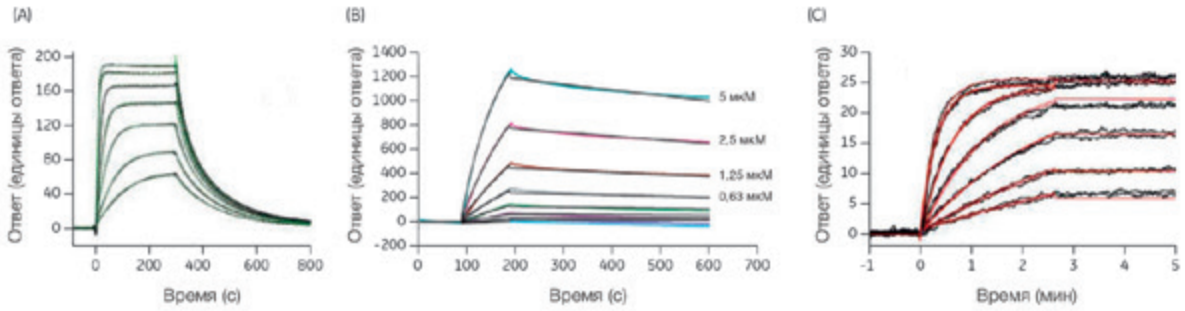


Рисунок 5. Связывание интерферона альфа-2a (IFN & alpha; 2a) к (A) IFNAR2 (25), (B), CD20 на ритуксимаб [26] и (C) сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), к bevazizumab [27]. Участки наложения графика измеренных данных и кинетических кривых связывания, полученных с 1: модели связывания 1. [Перепечатаны с разрешения (рисунок 5A) C. Dhalluin и др. Структурные, кинетические и термодинамический анализ связывания 40 кДа ПЭГ-интерферона альфа-2a и отдельных его позиционных изомеров во внеклеточный домен рецептора IFNAR2 // Bioconjug. Chem. 2005. № 16. С. 518–527 [25]; (рисунок 5B) Дж.А. Эрнст и др. Выделение и характеристика B-клеточного маркера CD20 // Biochem. 2005. № 44. С. 15150–15158 [26]; (рисунок 5C) Н. Пападопулос и др. Связывание и нейтрализация фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и связанных с ними лигандов VEGF Trap, ранибизумаба и бевацизумаба, ангиогенез. 2012. [27]

ваниями биопроб, анализы связывания лигандов [20, 31] могут использоваться в ситуациях, когда механизм действия определен, при условии, что анализы отражают этот механизм действия (Mechanism of Action, MOA).

При этом показатели кинетики используются для внутрипроизводственного определения свойств вещества, а также для сравнения показателей от серии к серии, а для оценки высвобождения требуется, чтобы анализы связывания лигандов определяли концентрацию продукта, которая отражает фармакологическую активность (количественное определение действующего вещества). Анализы высвобождения часто основываются на относительных сравнениях в рамках параллельной линии анализов с определенными условиями для определения эквивалентности [32].

Анализ двойной специфичности антител к факторам VEGF-Ang-2, описанный в справочном источнике [30], был впоследствии переработан в анализ количественного определения действующего вещества [23], как показано на рисунке 6. VEGF иммобилизировался на поверхности сенсора. Биспецифические антитела CrossMAb (Roche) к Ang-2/VEGF вводились с последующей второй инъекцией ангиотензина (Ang-2, рисунок 6A). Были получены два значения ответа, R1 и R2, соответствующие связыванию VEGF и Ang2 соответственно (рисунок 6B). На основе значений R2 затем был создан график логарифма концентрации CrossMAb (рисунок 6C); аналогичные графики были получены из экспериментов с использованием отклоняющихся значений концентрации CrossMAb и образцов, подвергшихся стрессовому воздействию. Результаты параллельной линии анализов (Parallel Line Analysis, PLA) этих кривых демонстрируют, что анализ применим для количественного определения действующего вещества в диапазоне от 60% до 140% от номинальной концентрации.

СВЯЗЫВАНИЕ С Fc-РЕЦЕПТОРАМИ

Рецепторы Fcγ (FcγR) экспрессируются клетками разных типов. Они могут быть активирующими (FcγRI, FcγRIIa и FcγRIIIa), ингибирующими (FcγRIIb) или не иметь специфического действия (FcγRIIIb) в контексте антителозависимой клеточно-обусловленной цитотоксичности (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC). Механизм действия нескольких противораковых антител, представленный ADCC и реализуемый посредством взаимодействий с FcγRIIIa, присутствующих на натуральных клетках-киллерах, представляет особую важность. Анализы Biacore широко используются в исследованиях антител, разработанных либо для оптимизации взаимодействий с FcγR [34], либо для устранения иммунных эффекторных функций при разработке моноклональных антител (MAT), не задействованных в иммунных процессах.

Неонатальный Fc-рецептор (FcRn) взаимодействует с антителами при более низких значениях pH. Как полагают, он играет важную роль при спасении антител от лизасомальной деградации и продлении периода полураспада антител [35, 36]. На поздней стадии разработки задача заключается в поддержке определенных функций FcγR и FcRn, и в этом контексте технология Biacore широко используется в исследованиях сопоставимости [11].

Несколько форматов анализа использовались для изучения взаимодействий между FcR и антителом, включая ковалентное связывание FcR [37–39]; захват гистидинмеченого FcR на иммобилизованном антителе к гистидину [34, 40, 41]; захват антител на белке L [42] и белке A [43]. Форматы захвата сочетают преимущества ориентации захваченных молекул и условий общей регенерации в рамках всего диапазона взаимодействий. Для анализа FcγR использовались два формата, как показано на рисунке 7A. Оба формата дают стабильный захват и высоковоспроиз-

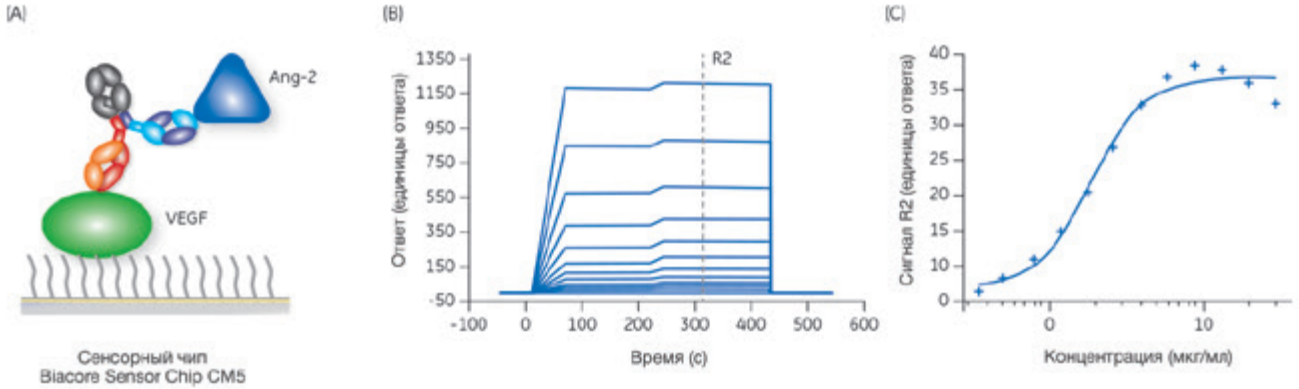


Рисунок 6. Настройка анализа «Потенция» для VEGF-Ang-2 CrossMAb. (A) Взаимодействие Ang-2 и VEGF с биспецифическими CrossMab анализируют с помощью ОПИ с использованием системы Biacore. (Б) Накладка sensograms, записанных с концентрацией CrossMab от 0,35 до 30 г/мл (1:1,5) серии разведений с 1 г/мл Ang-2-связывания. (C). Кривая «доза – ответ» (Ang-2-связывания ответа R2 в зависимости от концентрации CrossMab, логарифмическая шкала) связывающего сигнала CrossMab. [Перепечатано из Gassner и др. Разработка и проверка на ППР на основе нового принципа анализа для биспецифических молекул // J. Pharm. Биом. Анал. 2014. V. 102. С. 144–149 [23]

водимые данные. Кроме того, они могут использоваться в рамках всего диапазона FcγR без необходимости изменения конфигурации оборудования, тем самым упрощая фингерпринтирование, как показано на рисунке 7B. Здесь представлены результаты фингерпринтирования характеристик взаимодействий между ритуксимабом и FcγR.

Взаимодействия с FcRn обычно изучаются при низких (~6,0) и высоких (~7,4) уровнях pH для имитации условий, когда FcRn защищает антитело от лизосомальной деградации (низкий pH) и когда антитело высвобождается на поверхность клетки (высокий pH). Роль структуры Fc и Fab в связывании FcRn интенсивно изучается. МАТ с идентичными последовательностями Fc может связываться с FcRn разными способами [44], и антитела предварительно инкубируются антигенами для более плотного связывания с FcRn [36]. Анализы FcRn обычно проводятся с иммобилизованными рецепторами, а для получения воспроизводимых результатов рекомендуется строго придерживаться условий анализа, так как на результаты могут оказывать влияние уровень иммобилизованных рецепторов [37]. Типичные кривые связывания при низком pH и кривые высвобождения при высоком pH представлены на рисунке 8.

Хотя анализы FcR с использованием систем Biacore имеют важное значение при определении свойств антител, этот подход также предлагается применять при количественном определении антител, когда взаимодействие с FcγRIIIa обуславливает механизм действия. Harrison et al. [41] использовали гистидинмеченые рецепторы и алемтузумаб для разработки метода количественного определения на основе точек отчета для нескольких уровней концентрации антитела. В этом методе использовался алгоритм 5PL; результаты продемонстрировали хорошую линейность, а измеренное количество составило 9% от номинальных значений. Авторы отмечают, что технология SPR является более точной с более воспроизводимыми результатами в долгосрочной перспективе в сравнении с традиционными анализами ADCC на основе клеток.

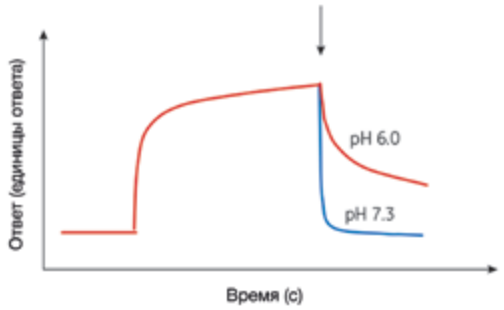


Рисунок 8. Связывание и диссоциации антитела к FcRn при pH 6,0 (красный) и диссоциации антитела, pH сдвигается до 7,4 (синий)

СВЯЗЫВАНИЕ КОМПОНЕНТА C1q СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА С АНТИТЕЛАМИ

Первым шагом в каскаде комплемента является связывание C1q с антителом [45]. Молекула C1q имеет шесть головок, соединенных коллагеном подобно то-

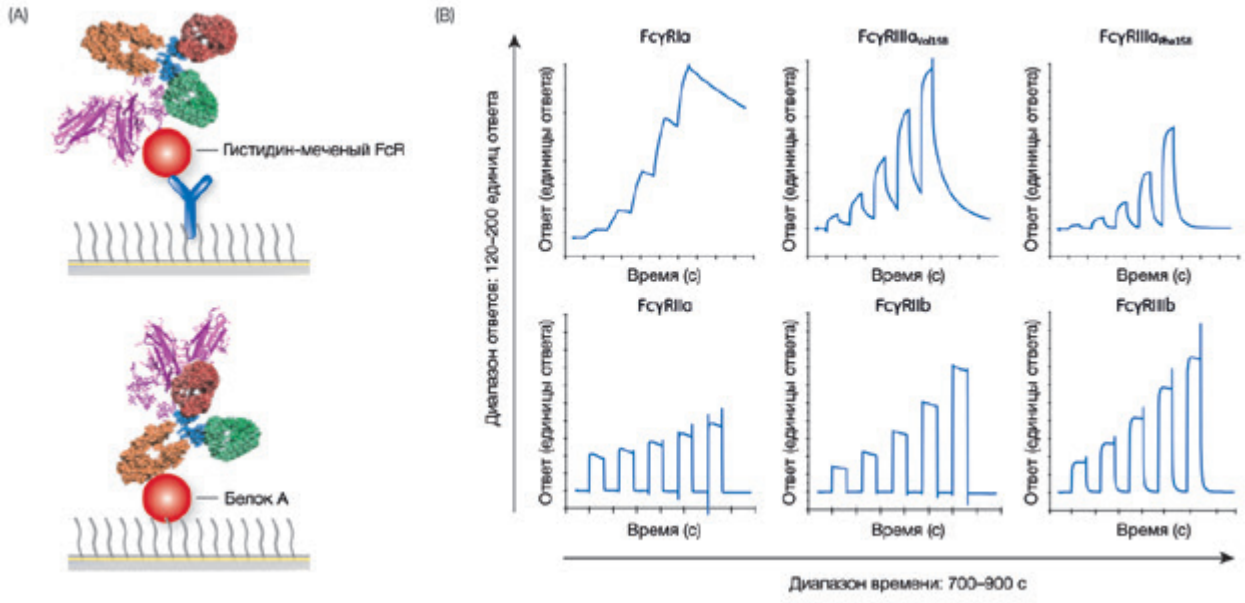


Рисунок 7. (A) Проиллюстрированы две процедуры анализа FcγR на основе захвата. Верхняя панель: обездвижен antihistidine захвата антитела гистидинмеченый FcR и связывание антитела. Нижняя панель: белок A, захват антитела и связывание FcR. (B) Связующие профили для связывания ритуксимаба в диапазоне FcγR. [Печатается с разрешения J.M. Hayes и др. Гликозилирование Fc гамма-рецептор модулирует связывание IgG гликоформ – требование для устойчивого взаимодействия антител // Протеом Res. 2014. № 13(12). С. 5471–5485 [40]

му, как ветки присоединены к стеблю. Выделенные головки связываются с CH2-доменом антитела. Blanquet-Grossard et al. [46] продемонстрировали связывание IgG с иммобилизированным компонентом C1q. На рисунке 9 сенсограмма отображает медленную ассоциацию и медленную диссоциацию. Обратите внимание на концентрацию антитела (1,5 мкМ) и на медленную скорость связывания. Хотя эти результаты указывают на то, что анализы C1q вполне можно выполнять с помощью системы Biacore, более открытые данные внесут больше ясности в этот вопрос.

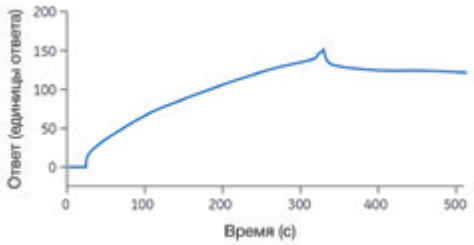


Рисунок 9. Связывание 1,5 мкМ IgG кролика с иммобилизированным компонентом C1q. [Перепечатано с разрешения F. Blanquet-Grossard et al. Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein // Biochem. 2005. № 44. P. 4349–4356 [46]

СИСТЕМЫ BIACORE В ИСПЫТАНИЯХ СТАБИЛЬНОСТИ И ФОРСИРОВАННОЙ ДЕГРАДАЦИИ

Изменения в структуре высшего порядка потенциально могут изменять иммуногенный профиль биологического препарата, оказывая тем самым негативное влияние на его безопасность. Модификации аминокислот и изменения в гликозилировании можно определить с помощью комбинации таких аналитических методов, как МС, электрофорез и хроматография, с возможностью выделения и оценки вариантов продукта.

Стрессовое воздействие на белок может привести к окислению метионина, гликозилированию и деаминированию. Сопровождаются ли такие изменения изменением конформации, доподлинно неизвестно. Интересно отметить, что в стрессогенных условиях (включая повышение температуры и уровня pH, а также добавление перекиси водорода) можно наблюдать не только модификации аминокислот, но и снижение связывания с клетками-мишенями на 25–50%, что определяется с помощью анализа Biacore [47]. Сходным образом окисление метионина в IgG2 приводит к нарушениям связывания с FcRn [48]. Изменения в связывании с клетками-мишенями и FcRn в образцах, подвергнутых стрессовым воздействиям, указывают на то, что анализ взаимодействий может применяться для обнаружения незначительных изменений реактивности антител. Следовательно, анализ взаимодействий с клетками-мишенями и FcR может иметь важное значение при проведении исследований стабильности и форсированной деградации.

Чтобы получить расширенные результаты фингерпринтирования при оценке реактивности антител, мы определили несколько домен-специфических антител и бактериальных белков, которые способны связываться с IgG, а также различать дикий тип (Wild-Type, WT) и вариант, подвергнутый стрессовому воздействию. На рисунке 10 вариант, подвергнутый стрессовому воздействию, экспонировался в 0,2% растворе перекиси водорода в течение 18 ч. Анализ методом МС продемонстрировал 20-кратное повышение уровня окисления метионина: от 1–2,5% до 20–50% в зависимости от расположения метионина. Четыре общих связывающих компонента IgG развернуты к Fc. Шарниры могут отличать дикий тип (WT, красные кривые на рисунке 10) и образцы, подвергнутые форсированному окислению (синие кривые). Схожим образом с помощью трех реагентов были определены изменения, связанные с уровнем pH в зависимости от стресса, вызвавшие дезамидирование, а два других реагента различили WT-антитела и антитела, подвергнутые легкому стрессовому воздействию. Последние были более склонны к агрегации и в сравнении с WT-типом продемонстрировали различия в профилях гидрофобности и заряда.

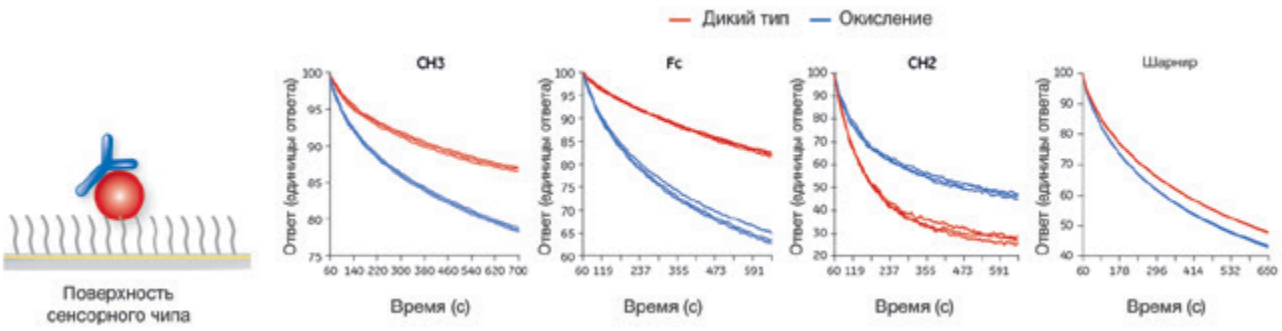


Рисунок 10. Антитела-реагенты, реагирующие с Fc, и шарнирные области связывают по-разному в окисленных образцах по сравнению с WT-антителами. Разобщение напряженного антитела отличался от БТ. Для одного реагента, реагирующего с доменом CH_2, скорость диссоциации была снижена; с другими реагентами более быстрая диссоциация наблюдалась при напряженном антителе

Эти данные позволяют предположить, что системы Biacore можно использовать для быстрого анализа изменений в реакциях связывания, связанных с домен-специфическими функциями клеток-мишеней, FcR и IgG. Кроме того, они свидетельствуют в пользу применения методики Biacore для скрининга изменений в реакционной способности как в испытаниях форсированной деградации, так и в стандартных тестированиях стабильности.

ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ BIACORE УПРОЩАЮТ ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ СОПОСТАВИМОСТИ И БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

Сравнение сенсограмм для объективной оценки кривых связывания по технологии Biacore

Анализ показателей кинетики и аффинности очень удобен для сравнения данных о взаимодействии. Несоответствие между показателями разных образцов явно указывает на произошедшее изменение. При этом оценка кинетических и аффинных характеристик основывается на том предположении, что взаимодействие может быть описано посредством механизма связывания, а модель может быть согласована с наблюдаемыми данными для получения соответствующих значений этих параметров. Как показано на рисунке 5, так часто и происходит. При этом механизм связывания не всегда известен, партнеры реакции взаимодействия могут быть гетерогенными, а кинетические показатели – неопределенными. Пример тому – взаимодействие между ритуксимабом и FcγRIIIa$_{Val158}$, проиллюстрированное на рисунке 11.

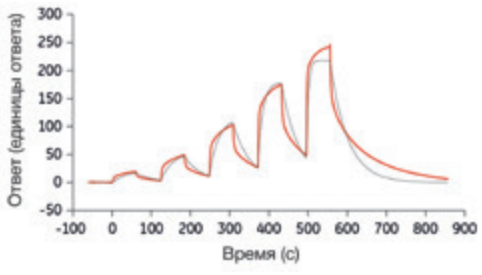


Рисунок 11. Связывание ритуксимаба с FcγRIIIa$_{Val158}$ (красная кривая); данные согласованы с моделью связывания 1:1 (черная кривая)

Это взаимодействие не может быть представлено простой моделью взаимодействия: расширенный анализ демонстрирует сложную модель, обусловленную гетерогенностью рецептора и антитела [40]. Тем не менее этот анализ является воспроизводимым, и при нормализации данных, полученных для разных уровней рецептора (рисунок 12A), в соответствии с амплитудой ответа форма кривых связывания становится похожей (рисунок 12B). На рисунке 12C представлено окно ответа, определенное усредненной сенсограммой плюс/минус три стандартных отклонения. Новый образец ритуксимаба теперь, предположительно, в значительной степени попадает в рамки этого окна. Если все точки данных находятся в пределах окна стандартного отклонения, новый образец оказывается эквивалентным на 100%. Если точки данных выходят за пределы окна анализа, степень эквивалентности уменьшается, и чем дальше данные будут от границ окна, тем эта степень будет меньше. Этот статистический подход к анализу сенсограмм позволяет сравнивать сенсограммы даже тогда, когда механизм связывания неизвестен, взаимодействие слишком сложное для моделирования или когда существует большая неопределенность в зарегистрированных константах скорости.

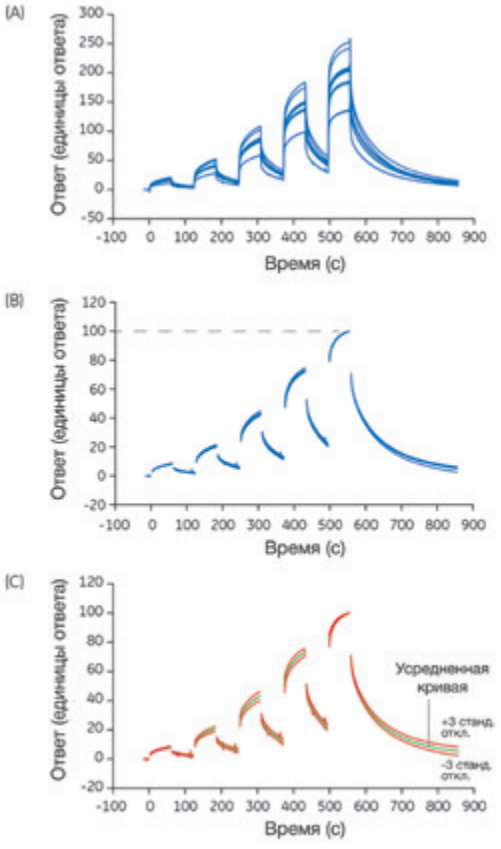


Рисунок 12. Связывание ритуксимаба 25–2000 нМ с FcγRIIIa$_{Val158}$. (A) Показатели связывания, полученные на разных уровнях захвата; (B) нормализованные показатели связывания; (C) отношение «ответ – время», определенное сенсограммами со средним значением и стандартным отклонением

При сравнении показателей связывания с FcγRIIIa$_{Val158}$ инфликсимаба, омализумаба, трастузумаба и ритуксимаба последний продемонстрировал эк-

вивалентность в 75%, а человеческие антитела (омализумаб и трастулизумаб) – в 50%.

При использовании надежных технологий анализа методика сравнения сенсограмм представляет собой удобную альтернативу для сопоставления характеристик связывания, которая также может оказаться полезным инструментом при сравнении показателей от серии к серии в ходе исследований сопоставимости и биоэквивалентности. Преимущество этой методики заключается в скорости расчетов и отсутствии необходимости согласовывать данные. При этом важно тщательно указать стандартные данные, используемые для расчета окна изменений, так как полученные результаты всегда основываются на стандартных вводных.

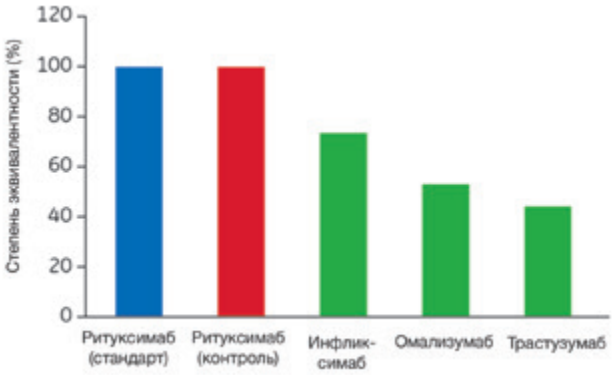


Рисунок 13. Сходные показатели связывания с $FcγRIIIa_{Val158}$ для стандартного образца с ритуксимабом (синий столбец), контрольного образца с ритуксимабом (красный столбец), инфликсимабом, омализумабом и трастузумабом

АНАЛИЗ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЗ КАЛИБРОВКИ ДЛЯ БЫСТРОГО ИЗМЕРЕНИЯ АБСОЛЮТНОЙ И ОТНОСИТЕЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ

Анализ концентрации на основе связывания лигандов, как правило, предполагает использование стандартного препарата с известной концентрацией действующего вещества. Тем не менее такой препарат может быть не всегда доступен, например, если белок экспрессируется в первый раз или если показатели концентрации стандартного препарата отображают общую концентрацию белка, а не концентрацию действующего вещества. В таких обстоятельствах системы анализа Biacore могут использоваться для прямой оценки концентрации действующего вещества. Эта возможность была описана в 1993 г. [49] и впоследствии усовершенствована благодаря применению современных средств численного интегрирования для анализа данных [50]. Анализ концентрации без калибровки (Calibration-Free Concentration Analysis, CFCA), продемонстрированный на рисунке 14, позволяет достоверно оценить абсолютную концентрацию при условии известного значения коэффициента диффузии аналита и зависимости наблюдаемой скорости связывания от скорости потока.

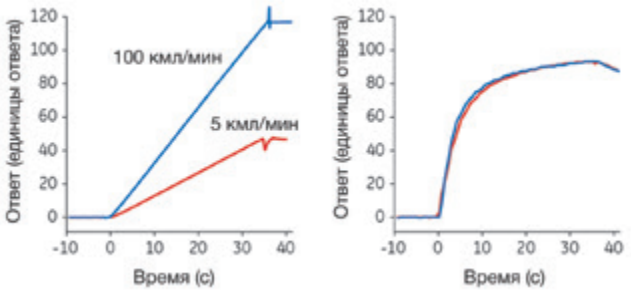


Рисунок 14. CFCA основана на начальных обязательных ставках. Если ставки обязательные, скорость потока зависима, как в A, и CFCA возможно, но при привязке ставки скорость потока становится независимой, как в B, и CFCA не представляется возможным

CFCA – очень полезный и удобный инструмент для сравнения показателей концентрации и определения свойств реагента. Кроме того, CFCA дополняет аналитические методы по оценке показателей кинетики и сравнению сенсограмм, когда полученные результаты указывают на то, что изменения в реакции взаимодействия могут быть обусловлены изменением концентрации действующего вещества. Использование технологии CFCA для анализа хроматографических фракций и определения методов очистки [51].

С учетом того, что анализ CFCA позволяет легко получить показатели относительной концентрации, этот метод также можно использовать при сравнительных исследованиях и (в качестве вспомогательного средства) при количественном определении действующего вещества.

СИСТЕМЫ BIACORE РАЗРАБОТАНЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РЕГУЛИРУЕМОЙ СРЕДЕ

Регулирующие органы определяют для компаний, занимающихся фармацевтической разработкой и производством, высокие стандарты, предусматривающие использование оборудования гарантированного качества и следование подробным и тщательно составленным аналитическим и производственным протоколам. Целью этих усилий является обеспечение высокого и стабильного качества фармацевтической продукции, поступающей на рынок.

Предложение Biacore T200 GxP Package включает квалификационные испытания устанавливаемой и обслуживаемой системы Biacore T200, обеспечивая пользователей необходимой документацией по квалификации оборудования. Права доступа к ПО Biacore T200 GxP реализуются через роли пользователей Windows®, представленные тремя группами: BIAadministrator, BIAdeveloper и BIAuser.

В рамках ПО Biacore T200 доступ группам предоставляется следующим образом.

BIAadministrator (администратор). Полный доступ к системным операциям и измерениям. Так как управление настройками папок могут выполнять только администраторы, они отвечают за определение этих параметров для остальных пользователей.

BIAdeveloper (разработчик). Доступ ко всем системным операциям и измерениям, за исключением настройки параметров ПО. BIAdevelopers отвечают за разработку и публикацию процедур для использования в установленном порядке. Опубликованные процедуры включают протоколы выполнения и методы выполнения оценок. Это обеспечивает создание и обработку данных в соответствии с определенными стандартами.

BIAuser (пользователь). Доступ только к опубликованным протоколам системных операций и анализа данных, а также возможность управления функциями, необходимыми для эксплуатации и технического обслуживания оборудования. Роль BIAuser позволяет работать с системой только в рамках опубликованных протоколов. Также эта роль позволяет только открывать файлы с результатами и расчетами, полученными в ходе выполнения опубликованных протоколов. Роль BIAuser предусматривает некоторые возможности, но изменения, вносимые в такие файлы, регистрируются в журнале аудита независящий от оператора способом.

Жизненный цикл биологических препаратов может составлять 20–30 лет. На протяжении этого времени производитель должен разрабатывать и выпускать продукт стабильного качества. В качестве вспомогательной меры регулирующие органы (FDA и EMA) издают руководства, которые призваны обеспечить эффективность разрабатываемых биологических препаратов. Так как механизм действия антител, цитокинов и гормонов реализуется посредством взаимодействия с соответствующими молекулами-мишенями, анализ связывания лигандов позволяет получить точное представление о свойствах препарата.

Для определения показателей CQA, особенно на ранней стадии разработки, применяется технология SPR на базе систем Biacore. На поздней стадии разработки технология SPR может использоваться для анализа концентрации в рамках рабочих процессов культивирования клеток, очистки и фармацевтической разработки, для кинетического анализа взаимодействий между препаратом и мишенью, для анализа FcR-зависимого связывания, а также для определения изменений в образцах, подвергнутых стрессовым воздействиям. Объединенные данные о взаимодействиях можно использовать для анализа методом фингерпринтирования, чтобы получить более широкое представление о том, как препарат связывается со своей мишенью и насколько он стабилен при стрессовых воздействиях.

SPR – это технология прямого связывания, которая позволяет измерять последовательные события связывания. Это, в свою очередь, делает возможным выполнение оценки специфичности мишеней, включая биспецифические антитела, в рамках одной конфигурации системы. В этом документе также описываются методы количественного определения действующего вещества для оценки взаимодействий между препаратом и мишенью и FcR-зависимых взаимодействий на этапе QC. Сравнение сенсограмм и методов CFCA представляет новые возможности оценки сопоставимости и биоэквивалентности в рамках количественного определения действующего вещества.

ЛИТЕРАТУРА

1. H.H. Shih. Discovery process for antibody-based therapeutics in Development of Antibody-Based Therapeutics. – New York: Springer Science+Business Media, 2012.
2. D.C. Swinney, J. Anthony. How were new medicines discovered? // Nat. Rev. Drug Discov. 2011. № 24. P. 507–519.
3. M. Mitchell. Determining criticality-process parameters and quality attributes. Part I: Criticality as a continuum // BioPharm International. 2013. № 27. P. 38–47.
4. F. Li et al. Cell culture processes for monoclonal antibody production // mAbs. 2010. № 2(5). P. 466–477.
5. H.F. Liu. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production // mAbs. 2010. № 2(5). P. 480–499.
6. European Medicines Agency ICH Topic Q 6 B. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological / Biological Products. 2006.
7. S.D. Jones et al. CMC activities for Development of Mabs, Critical steps to reach IND with a therapeutic antibody // Contract Pharma. 2010. P. 60–63.
8. FDA Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation. 2001.
9. D.M. O'Hara et al. Recommendations for characterization and supply of critical reagents. Ligand binding assays in the 21st century laboratory // J. AAPS J. 2012. № 14. P. 316–328.
10. R.F. Staack et al. Quality requirements for critical assay reagents used in bioanalysis of therapeutic proteins: What bioanalysts should know about their reagents // Bioanalysis. 2011. № 3. P. 523–534.

11. M.F.A. Lubiniecki et al. Analytical lessons learned from selected therapeutic protein drug comparability studies // Biologicals. 2013. № 41. P. 131–147.
12. A. Beck et al. Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins. TrAC, Trends in Anal // Chem. 2013. № 48. P. 81–95.
13. J. Visser et al. Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab // BioDrugs. 2013. № 27(5). P. 495–507.
14. L.C. Santora et al. Characterization of noncovalent complexes of recombinant human monoclonal antibody and antigen using cation exchange, size exclusion chromatography and BIAcore. Anal // Biochem. 2001. V. 299. P. 119–129.
15. Application note: Analysis of therapeutic antibodies using Amersham™ WB system, GE Healthcare, 29-1140-27, Edition AA.
16. European Medicines Agency ICH Topic Q 5 E Comparability of Biotechnological / Biological Products. 2005.
17. C.K. Schneider. Biosimilars in rheumatology: the wind of change // Ann. Rheum. Dis. 2013. № 72(3). P. 315–318.
18. FDA Guidance for Industry: Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. 2012.
19. FDA Guidance for Industry: Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Protein Product. 2012.
20. FDA Guidance for Industry: Clinical Pharmacology Data to Support a Demonstration of Biosimilarity to a Reference Product. 2014.
21. S. Kozlowski et al. Developing the nation's biosimilars program. New Engl // J. Med. 2011. V. 365(5). P. 385–388.
22. R. Karlsson, H. Roos. Reaction kinetics, in Principles and Practice of Immunoassays / Macmillan Reference Limited. 1997.
23. C. Gassner. Development and validation of a novel SPR-based assay principle for bispecific molecules // J. Pharm. Biom. Anal. 2014. V. 102. P. 144–149.
24. Application note: Rapid development of a GMP-compliant assay for the determination of antibody concentration, 28-9214-21 AA, GE Healthcare.
25. C. Dhalluin et al. Structural, kinetic, and thermodynamic analysis of the binding of the 40 kDa PEG-interferon-alpha2a and its individual positional isomers to the extracellular domain of the receptor IFNAR2. Bioconjug // Chem. 2005. № 16. P. 518–527.
26. J.A. Ernst et al. Isolation and characterization of the B-cell marker CD20 // Biochem. 2005. № 44. P. 15150–15158.
27. N. Papadopoulos et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab // Angiogenesis. 2012. № 15. P. 171–185.
28. P.A. Moore et al. Application of dual affinity retargeting molecules to achieve optimal redirected T-cell killing of B-cell lymphoma // Blood. 2011. V. 117(17). P. 4542–4551.
29. T. Kitazawa et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model // Nat. Med. 2012. № 18(10). P. 1570–1574.
30. W. Schaefer et al. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108(27). P. 11187–11192.
31. N. Rieder et al. The Roles of bioactivity assays in lot release and stability testing // BioProcess Int. 2010. P. 33–42.
32. <USP> 1032. Design and Development of Biological Assays. The United States Pharmacopeial Convention. 2010.
33. X-R. Jiang et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies // Nat. Rev. Drug Discov. 2011. № 10. P. 101–110.
34. O. Vafa et al. An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations // Methods. 2014. V. 65(1). P. 114–126.
35. D.C. Roopenian, S. Akilesh. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age // Nat. Rev. Immunol. 2007. № 7(9). P. 715–725.
36. T. Suzuki et al. Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR // J. Immunol. 2010. V. 184(4). P. 1968–1976.
37. T. Schlothauer. Fc receptor neonatal (FcRn) interaction studies in therapeutic antibody development, Biologics Research Penzberg, pRED, CASSS Bioassays. URL: http://c.ymcdn.com/sites/www.casss.org/resource/resmgr/Bioassays_Speaker_SIides/2011_BA_Schlothauer_Tilman.pdf (дата обращения 10.10.2016).
38. W.F. Dall'Acqua et al. Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: biological consequences. J. Immunol. 169(9), 5171–5180 (2002).
39. P. Bruhns et al. Specificity and affinity of human Fcreceptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses // Blood. 2009. V. 113. P. 3716–3725.
40. J.M. Hayes et al. Fc gamma receptor glycosylation modulates the binding of IgG glycoforms – a requirement for stable antibody interactions // Proteome Res. 2014. № 13(12). P. 5471–5485.
41. A. Harrison et al. Methods to measure the binding of therapeutic monoclonal antibodies to the human Fc receptor FcγRIII (CD16) using real time kinetic analysis and flow cytometry // J. Pharm. Biomed. Anal. 2012. V. 63. P. 23–28.
42. F. Mimoto et al. Novel asymmetrically engineered antibody Fc variant with superior FcγR binding affinity and specificity compared with afucosylated Fc variant // mAbs. 2013. № 5(2). P. 1–8.
43. K.H. Heider et al. A novel Fc-engineered monoclonal antibody to CD37 with enhanced ADCC and high proapoptotic activity for treatment of B-cell malignancies // Blood. V. 118(15). P. 4159–4168.
44. W. Wang et al. Monoclonal antibodies with identical Fc sequences can bind to FcRn differentially with pharmacokinetic consequences // Drug Metab. Dispos. 2011. № 39. P. 1469–1477.
45. A.R. Duncan, G. Winter The binding site for C1q on IgG // Nature. 1988. V. 332(6166). P. 738–740.
46. F. Blanquet-Grossard et al. Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein // Biochem. 2005. № 44. P. 4349–4356.
47. M. Haberger et al. Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies. Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes. mAbs 6(2), 327–339 (2014).
48. Pan, H. K. et al. Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn // Protein Sci. 2009. № 18. P. 424–433.
49. R. Karlsson et al. Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters //. J. Immunol. Methods. 1993. V. 166(1). P. 75–84.
50. E. Pol The importance of correct protein concentration for kinetics and affinity determination in structure-function analysis // J. Vis. Exp. 2010. № 17. P. 17–46.
51. Application note: Accurate comparability assessment of a biosimilar interferon in process development, GE Healthcare, 29-1154-78, Edition AC. 2014.

ПРИНЦИП ПРОТОЧНОГО ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

АВТОРЫ

M. Dorin,
J. Cummings,

Beckman Coulter, Inc.,
Индианаполис, США

ВВЕДЕНИЕ

Чтобы осадить материал в центрифужном роторе, необходимо выполнить ряд последовательных шагов: загрузить образец в ротор, разогнать центрифугу до рабочей скорости, центрифугировать образец через определенный промежуток времени, остановить ротор, извлечь образец. Эти шаги следует повторять до полной обработки всего образца. Если его много, скорость осаждения низкая, время разгона/торможения ротора долгое, а емкость ротора маленькая, то процесс центрифугирования будет трудоемким и времязатратным.

Проточное центрифугирование экономит время работы оператора, исключая необходимость постоянно заполнять и опорожнять многочисленные центрифужные бутыли, а также запускать и останавливать процесс. Например, в зависимости от выбранного ротора 10 л образца, содержащего частицы с коэффициентом седиментации 500 S, можно осадить методом проточного центрифугирования за 4 ч или даже быстрее, тогда как обычное центрифугирование с загрузкой нескольких партий образца потребует 12–21 ч. [*Примечание*: Коэффициент седиментации обычно выражается в сведбергах (S), где

$$1\ S=1\times10^{-13}\ с.$$

Таким образом, если коэффициент седиментации частицы равен $500 \cdot 10^{-13}$ с, то говорят, что он имеет значение 500 S. Коэффициент седиментации s выражается формулой

$$s=v/\omega^2 r,$$

где v – скорость седиментации частиц (см/с), ω – угловая скорость вращения ротора (рад/с), r – расстояние от оси вращения (см). Определяемый таким образом коэффициент седиментации *sobs* зависит от растворителя и температуры в отличие от коэффициента седиментации $s_{20,w}$, который определяется для частиц в воде при 20 °C.] Такая комбинация большой центробежной силы и высокой производительности позволяет использовать проточное центрифугирование для масштабного сбора вирусов (как для исследовательских целей, так и для коммерческого производства вакцин), осаждения бактерий и субклеточных фракций. Кроме того, применение проточного центрифугирования не ограничивается биомедицинс-

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

кими приложениями. Его можно иметь в виду в тех случаях, когда необходимо выделить частицы любого типа с коэффициентом седиментации 50 S и выше из жидкости объемом 2 л и больше.

Роторы для проточного центрифугирования существенно ускоряют осаждение материала по двум причинам:

1. В них длина пути осаждения частиц уменьшается по сравнению с длиной пути в угловых роторах, что приводит к уменьшению времени центрифугирования. Поэтому твердые частицы, присутствующие в потоке, эффективно осаждаются на стенки ротора, а супернатант с пониженным содержанием частиц вытекает из ротора.
2. Большая вместимость, которая исключает необходимость запускать и останавливать центрифугу так же часто, как в случае углового ротора. Это позволяет ускорить процесс за счет сокращения времени на загрузку и извлечение образца между запусками центрифуги и на разгон/торможение ротора.

ТРЕБОВАНИЯ К ОБРАЗЦУ

Роторы для проточного центрифугирования имеют значительные преимущества перед обычными роторами в тех случаях, когда образец имеет следующие свойства:

1. Коэффициент седиментации частиц, которые необходимо собрать, не меньше 50 S. Роторы для проточного центрифугирования имеют высокую эффективность осаждения и позволяют выделить твердый материал из жидкой среды быстрее, чем бакетные и угловые роторы.
2. Отношение количества твердых частиц к жидкости невелико (5–15%). При отношении выше 15% ротор будет слишком эффективным, то есть осадок будет образовываться настолько быстро, что ротор будет мгновенно наполняться. А это означает, что его надо будет останавливать и извлекать образец настолько часто, что будет теряться слишком много времени на разгон/торможение и очистку ротора между запусками центрифуги.

ПРОТОЧНОЕ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

При помощи двух роторов компании Beckman Coulter – CF-32 Ti и JCF-Z – осуществляют проточное центрифугирование. В процессе вращения ротора при выбранной рабочей скорости через него постоянно прокачивается образец. Частицы, содержащиеся в образце, осаждаются на стенки ротора, а осветленный эффлюент вытекает из ротора. Этот процесс продолжается до тех пор, пока не закончится исходный материал (образец) или не будет исчерпана способность ротора удерживать частицы. Таким образом, количество материала, которое можно загрузить для одного цикла центрифугирования определяется его объемом и концентрацией частиц. По окончании проточного центрифугирования можно собрать осадок и/или обедненный эффлюент, так же как после дифференциального центрифугирования в обычном угловом или бакетном роторе можно собрать осадок и/или супернатант.

Роторы CF-32 Ti и JCF-Z состоят из корпуса, вставляемого в него сердечника и крышки (рисунок 1). Поток жидкости протекает через сердечник по радиальным каналам. В сердечник вставляются 4 перегородки, через каналы которых происходит загрузка и в некоторых случаях разгрузка ротора. Важным элементом для осуществления проточного центрифугирования является вращающийся уплотнительный узел, который позволяет трубкам, по которым в ротор поступает жидкость, оставаться подсоединенными во время работы. Уплотнительные элементы предотвращают контакт образца с окружающей средой, что минимизирует возможность его контаминации. Переключая направление потока жидкости в трубках, можно легко перейти из режима загрузки в режим разгрузки ротора.

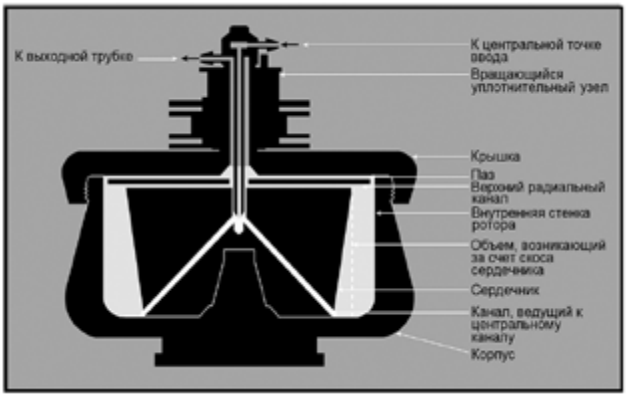


Рисунок 1. Поперечное сечение сердечника для проточного центрифугирования

Подготовка ротора к центрифугированию осуществляется во время вращения при малых скоростях. Буферный раствор, подушка жидкости или слои раствора для формирования градиента, например сахарозы, закачивают через выходную трубку. Затем ротор разгоняют до рабочей скорости и через центральный вход уплотнительного узла при помощи того же насоса закачивают суспензию. По каналам сердечника она достигает дна корпуса.

Движение в таком вертикальном герметизированном канале практически исключает нежелательное пенообразование (рисунок 2). По мере того как жидкость движется вверх вдоль скоса сердечника, происходит осаждение частиц по направлению к стенкам корпуса. Образующийся обедненный эффлюент движется по верхнему радиальному каналу и покидает ротор через выходную трубку уплотнительного узла.

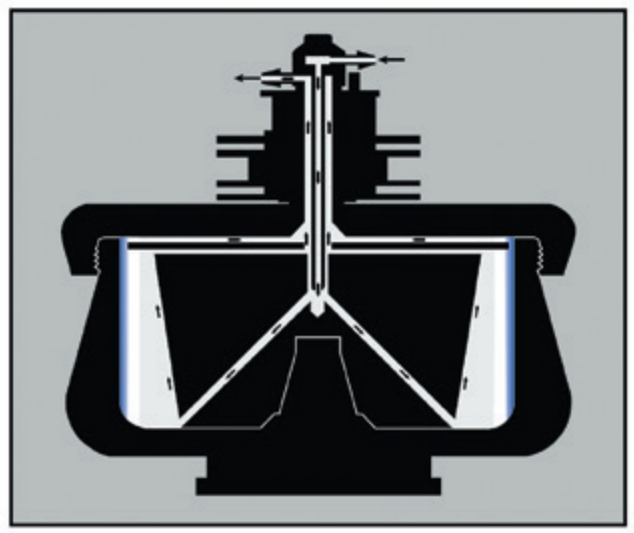


Рисунок 2 . Проточное центрифугирование. Стрелками на схеме показаны направления потоков жидкости во время проточного центрифугирования. Образец закачивается через центральный вход ко дну сердечника. Скорость потока подбирается таким образом, чтобы целевые частицы успели разделиться и осесть на подушку плотной жидкости (или на стенки ротора) за время, которое требуется для перемещения от дна сердечника до верхнего радиального канала

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Концентрировать частицы можно тремя способами: осаждая их на стенки ротора, на подушку плотной жидкости, например сахарозы, или разделяя в градиенте плотности. Первые два метода наиболее часто используются для сбора частиц или повторного центрифугирования обедненного эффлюента. В случае, когда необходимо отделить частицы от примесей различных плотностей, разделение в градиенте плотности позволит получить наилучший результат.

Осаждение и осветление

Осаждение подходит для частиц, которые не могут быть повреждены при вдавливании в стенки ротора. Это самый быстрый метод проточного центрифугирования, который позволяет обработать большие объемы исходного материала.

При малых скоростях ротор заполняется буферным раствором или исходным материалом. Затем его разгоняют до выбранной рабочей скорости и через центральный канал уплотнительного узла закачивают исходный материал. Процесс продолжается до тех пор, пока не закончится образец или пока не будет исчерпана способность ротора удерживать частицы. (Наступление второго условия легко определить: вытекающий из ротора эффлюент становится мутным.) Ротор вращается при рабочей скорости необходимое время для того, чтобы все частицы достигли стенок ротора, в то время как через центральный канал прокачивается раствор буфера или воды. Затем ротор постепенно останавливают, супернатант, оставшийся в роторе, сливают, а осадок соскребают со стенок. Иногда проточное центрифугирование проводят в 2 этапа.

Сначала материал осветляют путем удаления крупных частиц при малой скорости вращения. На втором этапе получившийся эффлюент прокачивают через ротор, вращающийся на высокой скорости, собирая маленькие частицы. Таким образом, например, можно осветлять вирусосодержащие культуральные среды, осаждая клеточный дебрис. Осветленный эффлюент можно повторно центрифугировать для осаждения или разделения вирусных частиц.

Осаждение на жидкостную подушку

Частицы, которые теряют биологическую активность при осаждении на стенки ротора (например, некоторые вирусы), можно осаждать на подушку плотного раствора, такого как раствор сахарозы. Этот метод следует использовать в любом случае, когда кажется более целесообразным собирать частицы из раствора, нежели соскребать их со стенки ротора. Разумеется, в таком случае емкость ротора для частиц пониженна из-за присутствия жидкостной подушки.

При таком типе центрифугирования загрузка ротора происходит во время вращения при малых скоростях (рисунок 3). Сначала через выходную трубку поверх перегородок сверху сердечника в него закачивается буфер или вода. Затем таким же способом в ротор закачивают жидкостную подушку (например, 60% раствор сахарозы). Центробежные силы прижимают ее к стенке, и она размещается по периферии, поскольку имеет большую плотность, чем вода или буфер. Во время разгона ротора до рабочей скорости через

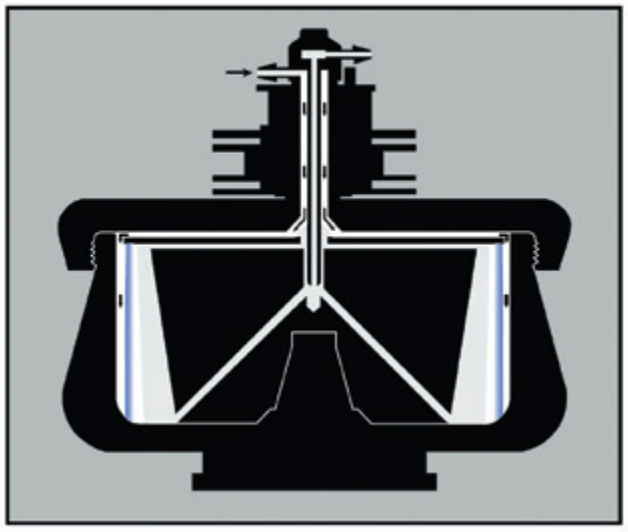


Рисунок 3. Формирование подушки или градиента в роторе. Стрелками показаны направления движения жидкостей во время загрузки. Во время вращения ротора на низкой скорости подушку или градиент (сначала самый легкий раствор) закачивают в ротор через выходную трубку. Воздух вымещается и выходит через центральный вход. Центробежные силы удерживают подушку или градиент прижатыми к стенкам ротора

центральный канал прокачивают раствор буфера. При достижении рабочей скорости через центральный канал начинают закачивать образец. По окончании осаждения разгрузку ротора (так же, как и загрузку) осуществляют на низких скоростях. Через выходную трубку в ротор закачивают воздух, который блокирует радиальные каналы, как показано на рисунке 4. (Это предотвращает перемещение жидкости по этим каналам и разрушение подушки, нагруженной частицами, во время процесса разгрузки.) Затем через выходную трубку поверх перегородок в ротор закачивают плотный раствор, что заставляет содержимое ротора вытекать наружу через центральный канал.

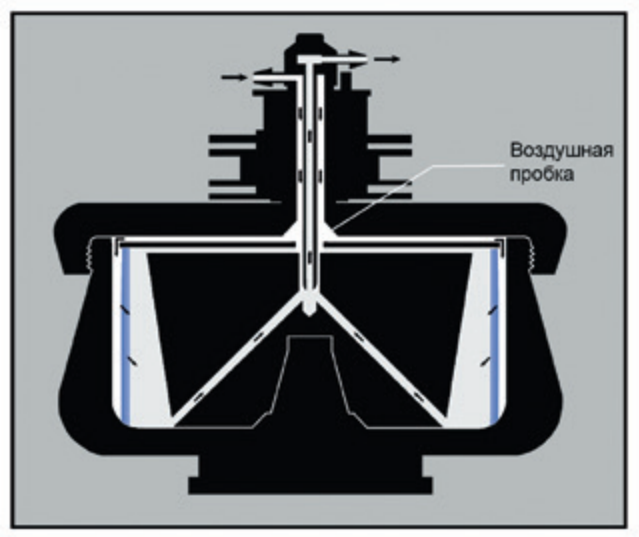


Рисунок 4. Извлечение подушки или градиента. Если частицы осаждали на подушку или в градиент, при разгрузке важно не перемешать содержимое ротора. При маленькой скорости вращения ротора через выходной канал в него закачивают воздух. Формируется воздушная пробка, которая блокирует верхние радиальные каналы. Затем через выходную трубку в систему закачивается плотный раствор, который выталкивает подушку или градиент из ротора по центральному каналу

Разделение в градиенте

Этот метод чаще всего используют для очистки вирусов. Поскольку в роторах для проточного центрифугирования частицы имеют короткую длину пробега (около 10 мм), нет нужды использовать линейный градиент. Во время загрузки и ускорения ротора ступенчатый градиент в достаточной степени диффундирует до линейного. Как правило, раствор для формирования градиента, например раствор сахарозы, используют в 2 или 3 разных концентрациях, которые зависят от плотности разделяемых частиц. Последний, самый плотный раствор выполняет роль подушки, предотвращающей осаждение на стенки ротора. Короткая длина пробега позволяет разделять частицы достаточно быстро. Однако возможность полностью разделить и собрать несколько полос в таком узком градиенте зависит от плавучей плотности частиц.

Последовательность действий для разделения в градиенте похожа на последовательность действий при осаждении на подушку. Во время вращения ротора на низкой скорости через выходную трубку в него закачиваются жидкости в следующей последовательности: буфер или вода, ступенчатый градиент (сначала самый легкий раствор), подушка. Оставшаяся часть протокола совпадает с аналогичной частью протокола, описанной в предыдущем разделе. В данном случае, однако, центрифугирование следует выполнять настолько долго, насколько это нужно для разделения частиц.

ВЫБОР СКОРОСТИ ПОТОКА

Коэффициент седиментации собираемых частиц определяет скорость потока и вращения. Маленькие частицы требуют либо приложения больших центробежных сил, либо более длительного осаждения по сравнению с большими частицами. Перед центрифугированием необходимо определить рабочую скорость вращения, при которой центробежная сила будет достаточно высока, чтобы осадить интересующие частицы, и скорость потока, при которой частицы успеют осесть до его выхода из ротора. Для наивысшей эффективности центрифугирования стараются устанавливать скорость потока предельно близкую к теоретическому максимуму. Номограммы зависимости между теоретическим максимумом скорости потока и скорости вращения ротора для частиц с известными коэффициентами седиментации представлены на следующих страницах.

Метод А

Следующее уравнение позволяет определить примерную скорость потока F или скорость вращения ротора для определенных образцов и построить номограммы:

$$F = \pi s_r h \omega^2 \left(\frac{r_{max}^2 - r_i^2}{\ln} (r_{max} / r_i^h) \right), \quad (1)$$

где π=3,1416; h – высота сердечника ротора; ω=0,10472x RPM (угловая скорость вращения); r_{max} – максимальный радиус сердечника; $r_i = \frac{r_t - r_b}{\ln(r_t - r_b)}$; r_t – радиус верхней части сердечника; r_b – радиус нижней части сердечника; s_r – коэффициент седиментации частицы в сведбергах, приведенный к условиям центрифугирования

F выражается в мл/мин. Стандартный сердечник для ротора JCF-Z имеет r_t=7,6 см, r_b=7,1 см соответственно r_i=7,35 см, а уравнение (1) можно преобразовать в уравнение (2а):

$$F = 2{,}23 \times 10^{-10} s_r (RPM)^2. \quad (2а)$$

Сердечник для большого осадка имеет r_t=5,6 см, r_b=5,1 см, соответственно r_i=5,35 см, а уравнение (1) можно преобразовать в уравнение (2b):

$$F=1{,}69 \times 10^{-10}\, s_r\, (\mathrm{RPM})^2. \qquad (2b)$$

Примечание: Представленные выше уравнения справедливы при условии, что плотность и вязкость жидкости, в которой суспендированы частицы, примерно равны плотности и вязкости воды при 20 °C. В противном случае следует привести коэффициент седиментации s_r в соответствие с характеристиками жидкости.

$$s_r = \frac{D^2(\rho_p - \rho_r)}{18\eta_r}, \qquad (3)$$

где ρ_p – плотность частиц в г/мл; ρ_r – плотность жидкости, в которой суспендированы частицы, в г/мл; η_r - вязкость жидкости в мПа·с или в сП.

Если известен коэффициент седиментации $s_{20,w}$, то:

$$s_r = s_{20,w}\left(\frac{\rho_p - \rho_r}{\rho_p - \rho_{20,w}}\right)\left(\frac{\eta_{20,w}}{\eta_r}\right). \qquad (4)$$

Метод B

Легко определить скорость потока в роторах для проточного центрифугирования, зная скорость осаждения в другом роторе и k-факторы обоих роторов. k-фактор – это характеристика ротора, которая определяет эффективность осаждения. Его можно посчитать, используя уравнение:

$$k = \frac{\ln(r_{max} / r_{min})}{\omega^2} \times \frac{10^{13}}{3600},$$

где r_{max} – макс. радиус ротора от оси вращения; r_{min} – мин. радиус ротора от оси вращения; ω=0,10472 x RPM (угловая скорость вращения).

Предположим, было выполнено центрифугирование при помощи ротора JA-10. Время осаждения при полной загрузке на максимальной скорости составило 5 мин. Эту информацию можно использовать для определения времени осаждения в роторе JCF-Z, применив соотношение:

$$\frac{t_1}{t_2} = \frac{k_1}{k_2},$$

где t_1 – время осаждения в первом роторе; t_2 – время осаждения во втором роторе; k_1 – k-фактор первого ротора; k_2 – k-фактор второго ротора.

Подставляя в это уравнение экспериментально определенные значения переменных:

$$\frac{300}{t_2} = \frac{3700}{294},$$

определяем, что время осаждения в роторе JCF-Z t_2=24 с. Если объем ротора JCF-Z составляет 1 л, это значит, что мы можем осадить жидкость объемом 1 л за 24 с. Следовательно, мы можем использовать скорость потока 41 мл/с (2,4 л/мин). Если отношение количества твердых частиц к жидкости составляет 2%, мы можем отцентрифугировать 50 л образца (за 21 мин), перед тем как потребуется остановить и собрать осадок. По сравнению с этим с ротором JA-10 мы можем осадить частицы из 1,5 л жидкости за 5 мин, соответственно для центрифугирования 50 л нам потребуется 2 ч 47 мин. Ротор для проточного центрифугирования позволяет осаждать частицы как минимум в 8 раз быстрее, чем обычный ротор большого объема, например JA-10.

РОТОРЫ, СЕРДЕЧНИКИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

В настоящий момент компания Beckman Coulter предлагает два ротора для проточного центрифугирования: JCF-Z и CF-32 Ti. Ротор JCF-Z используют на центрифугах серии Avanti. Максимальная скорость вращения составляет 20000 об/мин. Ротор JCF-Z можно использовать с 3 типами взаимозаменяемых сердечников для проточного центрифугирования (сердечник для стандартного осадка, сердечник для большого осадка, сердечник для малого осадка) и 2 типами сердечников для зонального центрифугирования (стандартный сердечник и сердечник с переориентацией градиента). В этом разделе мы будем обсуждать сердечники только для проточного центрифугирования. (На рисунке 5 представлена фотография ротора JCF-Z, на рисунке 6 – фотографии его сердечников). Для ротора CF-32 Ti производится один тип сердечников только для проточного центрифугирования. Максимальная скорость вращения – 32000 об/мин. Ротор CF-32 Ti можно использовать на большинстве ультрацентрифуг серии Model L и на ультрацентрифугах серии Optima X.

Корпус и крышка роторов JCF-Z и CF-32 Ti сделаны из титана. Сердечники выполнены из пластика Noryl, который можно безопасно использовать с большинством растворов для создания градиентов и буферов. (Списки материалов, к которым устойчив пластик Noryl, представлены в руководствах пользователя роторов и центрифуг.) Все сердечники, кроме сердечника JCF-Z для малого объема осадка, имеют коническую форму и 4 съемных перегородки из пластика Noryl, которые разделяют полость ротора на отсеки и стабилизируют жидкость внутри него во время вращения. (Сердечник JCF-Z для малого объема осадка имеет 6

отдельных полостей, в которые устанавливаются контейнеры для сбора осадка.)

Пространство между сердечником и корпусом определяет общую емкость ротора. Определенную часть этой емкости на периферии занимают осадок, градиент или подушка. Оставшаяся часть емкости, прилегающая к сердечнику, называется объемом, возникающим за счет скоса сердечника. Это область, через которую протекает исходный материал и в которой происходит осаждение на стенки ротора, градиент или подушку.

Рисунок 5. Ротор JCF-Z для проточного центрифугирования

В таблице 1 представлены спецификации различных комбинаций ротор – сердечник.

Ротор JCF-Z

Ротор JCF-Z с сердечником для проточного центрифугирования подходит для осаждения бактерий, больших субклеточных частиц, таких как мембраны, митохондрии и т.д., вирусов и других частиц с коэффициентом седиментации больше 500 S. Его также используют для очистки вирусосодержащей культуральной среды от клеточного дебриса перед финальным сбором вируса путем осаждения или разделения в градиенте в том же самом роторе или роторе CF-32 Ti. При вращении ротора JCF-Z с сердечником для стандартного осадка со скоростью 20000 об/мин на дне сердечника развивается центробежное ускорение 32000 г, а на внутренней поверхности стенок – 39900 г. Скорость потока может лежать в диапазоне от 3 до 45 л/ч (вращающийся уплотнительный узел требует скорости по-

Таблица 1.

Роторы и сердечники для проточного центрифугирования компании Beckman Coulter

Характеристики	CF-32-Ti	JCF-Z		
		Стандартный сердечник	Малого объема сердечник	Большого объема сердечник
Максимальная скорость вращения ротора	32000 об/мин[1]	20000 об/мин	20000 об/мин	20000 об/мин
Максимальное центробежное ускорение на дне сердечника	86100 г	32000 г	25000 г	23000 г
Максимальное центробежное ускорение в верхней части сердечника	91950 г	34000 г	25000 г	25000 г
Максимальное центробежное ускорение на стенке ротора	102000 г	39900 г	36300 г	39900 г
Общая емкость ротора	430 мл	660 мл	240 мл	1250 мл
Максимальный объем осадка	330 мл	400 мл	204 мл	800 мл
Максимальная скорость потока – стандартный уплотнительный узел	9 л/ч	45 л/ч	45 л/ч	45 л/ч
Максимальная скорость потока – уплотнительный узел для высокой скорости	–	100 л/ч	100 л/ч	100 л/ч
Максимально допустимая средняя плотность содержимого ротора при максимальной скорости[2]	1,20 г/мл	1,45 г/мл	1,45 г/мл	1,45 г/мл
Допустимый диапазон pH растворов	4–10 pH	4–10 pH	4–10 pH	4–10 pH

Примечанин: [1]После 1000 запусков или 2500 ч работы максимальную скорость центрифугирования в роторе CF-32-Ti следует снизить до 29000 об/мин.

[2]Если плотность самой тяжелой фракции в градиенте превышает 1,20 г/мл для ротора CF-32-Ti или 1,45 г/мл для ротора JCF-Z, то максимально допустимая скорость центрифугирования будет ниже. Для ротора CF-32-Ti максимально допустимая скорость с поправкой определяется по формуле:

$$\sqrt{\frac{12\ \text{г/мл}}{\text{максимальная плотность у стенки ротора}}} \times \text{максимальная скорость ротора.}$$

Для ротора JCF-Z:

$$\sqrt{\frac{1{,}45\ \text{г/мг}}{\text{максимальная плотность у стенки ротора}}} \times 20000\ \text{об/мин.}$$

При формировании чрезвычайно тяжелого осадка, например при центрифугировании жидкостей, содержащих металлические или глинистые частицы, максимально допустимая скорость тоже потребует внесения поправки.

тока не менее 3 л/ч). В случаях, когда высокая скорость потока более целесообразна, лучше использовать специальный уплотнительный узел, который рассчитан на перекачивание жидкости со скоростью до 100 л/ч.

Ротор JCF-Z можно использовать с некоторыми центрифугами серии Avanti. В случаях, когда контроль температуры образца критичен, следует заранее охлаждать сам ротор. Жидкости, которые будут прокачиваться через ротор, тоже должны быть холодными, поскольку они будут в некоторой степени нагреваться при прохождении по трубкам и через уплотнительный узел. Емкость с образцом следует хранить на льду или в охлаждающей водяной бане, а длина трубок должна быть максимально короткой.

Тип сердечника для ротора JCF-Z, который следует использовать, определяется количеством предполагаемого осадка и тем, есть ли необходимость разделения в градиенте или осаждения на подушку.

Рисунок 6. Ротор JCF-Z для проточного центрифугирования и сердечники для него

Стандартный сердечник. Общая емкость стандартного сердечника составляет 660 мл. Примерно 400 мл от этого объема может занимать осадок, ступенчатый градиент или жидкостная подушка. Этот сердечник подходит для осаждения на стенки ротора или подушку, для осветления жидкостей или разделения частиц в градиенте.

Сердечник для большого объема осадка подходит только для осаждения. Его общая емкость составляет 1250 мл, из которых осадок может занимать 800 мл. Этот сердечник отлично подходит для центрифугирования жидкостей с большим содержанием частиц. Отношение количества твердых частиц к жидкости может достигать 1:2. Разумеется, это означает, что до момента, когда придется остановить центрифугу для разгрузки ротора, получится отцентрифугировать меньшее количество материала.

Сердечник для малого объема осадка также подходит только для осаждения. Его общая емкость составляет 240 мл, из которых осадок может занимать около 200 мл. Этот сердечник предназначен для центрифугирования большого количества материала с низким соотношением количества твердых частиц к жидкости (например, воды, содержащей водоросли или глинистые частицы). Чтобы минимизировать возможность ресуспендирования осажденного материала, сердечник имеет 6 отдельных отсеков, в каждый из которых вставляется контейнер в форме каноэ для сбора осадка.

Для ротора JCF-Z также выпускается 2 типа сердечников для зонального разделения: стандартный сердечник и сердечник с переориентацией градиента.

Ротор CF-32 Ti

Ротор CF-32 Ti предназначен для концентрирования частиц, размеры которых лежат в широком диапазоне значений. Из-за высокой скорости вращения (до 32000 об/мин) он особенно подходит для разделения вирусов или других маленьких частиц с коэффициентами седиментации около 50 S. При вращении с максимальной скоростью на дне сердечника развивается центробежное ускорение 86100 г, а на внутренней поверхности стенок – 102000 г. Скорость потока может достигать 9 л/ч.

Общая емкость ротора составляет 430 мл, из которых осадок может занимать около 330 мл. Если используется жидкостная подушка или ступенчатый градиент, каждый из которых будет занимать около 300 мл, места для осадка будет меньше. Ультрацентрифуги, с которыми используется ротор CF-32 Ti, могут охлаждаться. Поскольку уплотнительный узел ротора CF-32 Ti имеет водяную рубашку из нержавеющей стали, нормальная температура этого элемента может поддерживаться при более низких скоростях потока, чем в роторе JCF-Z. До тех пор, пока не требуется температура 10 °C и ниже, достаточно подводить к водяной рубашке водопроводную воду. В противном случае следует использовать водоохладитель с насосом, а исходный материал и ротор охлаждать заранее.

Рисунок 7. Ротор CF-32 Ti для проточного центрифугирования с сердечником

ДРУГИЕ НЕОБХОДИМЫЕ ИНСТРУМЕНТЫ

В дополнение к роторам JCF-Z или CF-32 Ti и соответствующим центрифугам понадобятся перечисленные ниже инструменты.

1. Перистальтический насос, способный работать с противодавлением 138 кПа (20 psi), необходим для закачивания в ротор жидкостной подушки или ступенчатого градиента, а также исходного материала.
2. Манометр, который поможет проверить скорость потока между насосом и уплотнительным узлом.
3. Проточный фотометр понадобится для мониторинга эффлюента на предмет эффективности осаждения и оценки разделения материала при извлечении из ротора жидкостной подушки и градиентного раствора.
4. Входные и выходные трубки, имеющие такой же диаметр, как трубки ротора.
5. Коллектор фракций.
6. Емкости для образца и эффлюента.
7. Аксессуары для охлаждения.

ЧАСТО ЗАДАВАЕМЫЕ ВОПРОСЫ О ПРОТОЧНОМ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИИ И ОТВЕТЫ НА НИХ

В: Мне часто бывает нужно осадить частицы из большого количества исходного материала, и я не уверен, какой ротор лучше использовать – для зонального или проточного центрифугирования.

О: Если вы успешно осаждали свои частицы с помощью обычного углового или бакетного ротора, с подушкой или без нее, то ротор для проточного центрифугирования позволит вам масштабировать этот процесс. То же самое можно сказать, если вы успешно проводили изопикническое разделение, в результате которого около интересующей вас полосы не было примесей.

Если вы хотите разделить на составляющие многокомпонентный образец, то лучше будет выбрать один из роторов для зонального центрифугирования. Хотя способность удерживать частицы у зональных

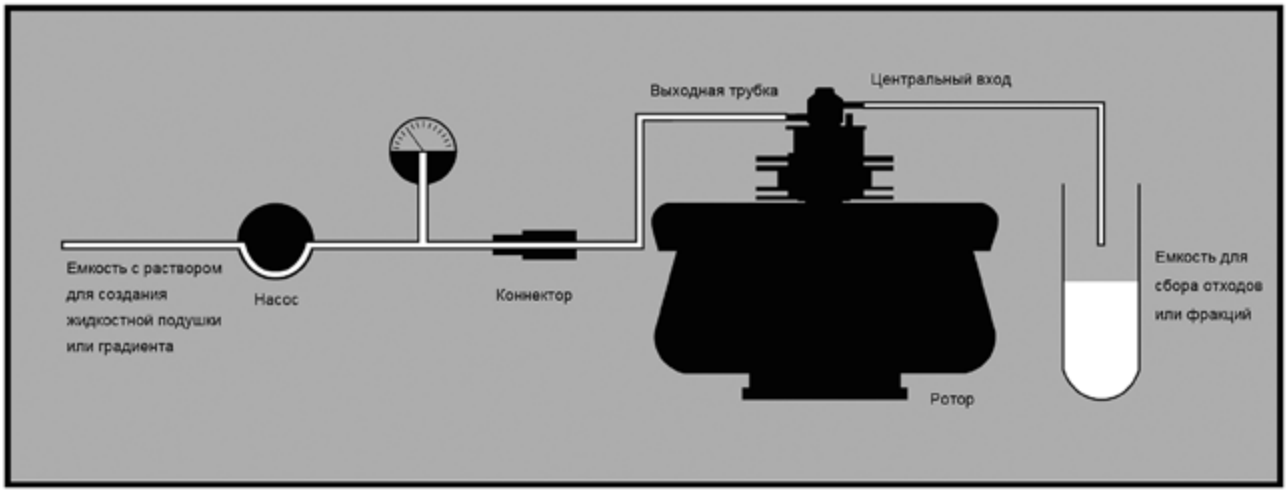


Рисунок 8. **Установка для загрузки и извлечения жидкостной подушки или ступенчатого градиента**

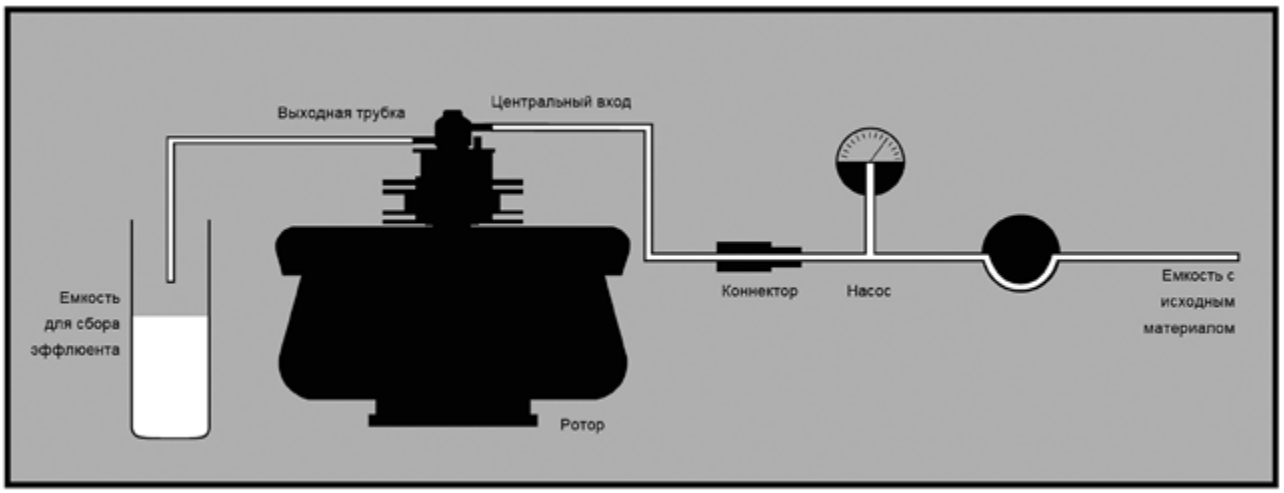


Рисунок 9. **Установка для проточного центрифугирования**

роторов гораздо ниже (20-200 мл) по сравнению с роторами для проточного центрифугирования, она в 50-100 раз выше по сравнению с бакетными роторами.

Если вы выделяли ваши частицы путем зонально-скоростного осаждения или если вам нужно определить коэффициент седиментации ваших частиц, вам также потребуется ротор для зонального центрифугирования. Роторы для проточного центрифугирования не подходят для зонально-скоростного центрифугирования.

В: Сейчас я использую для осаждения угловой ротор и хотел бы получать тот же результат методом проточного центрифугирования. Как мне определить подходящую скорость потока?

О: Для того чтобы определить необходимую скорость потока, вам нужно сначала рассчитать приблизительное значение коэффициента седиментации ваших частиц. Удовлетворительную грубую оценку можно сделать при помощи формулы:

$$s=k/t,$$

где s – коэффициент седиментации в сведбергах; k – это k-фактор углового ротора, который сейчас используется (его значение вы сможете найти в руководстве для вашего ротора); t – время (в часах), за которое в вашем роторе формируется осадок. Если вы центрифугируете в вашем роторе при скорости меньшей максимально допустимой, то:

$$s=\frac{k}{t}\left(\frac{\text{максмальная скорость вращения}}{\text{реальная скорость вращения}}\right)^2.$$

Рассчитанный коэффициент седиментации вы можете теперь использовать для определения скорости потока при помощи номограмм, представленных на следующих страницах.

В: Насколько критичны пузырьки воздуха в системе?

О: Пузырьки воздуха будут причиной высокого противодавления. При низких скоростях, например во время загрузки, это не проблема. Однако при рабочей скорости подъемная сила, действующая на пузырьки, преумножается относительной центробежной силой. Входящий поток образца не сможет сместить такой пузырек. Если давление выше 173 кПа (25 psi), выполните инструкции по удалению воздуха из системы, приведенные в руководстве пользователя. Возможно, между насосом и входом в ротор придется установить ловушку для пузырьков, которые могут появиться в образце из-за его дегазации.

В: Как определить условия центрифугирования?

О: Условиями центрифугирования называют сочетание скорости центрифугирования и скорости потока. Если вы центрифугируете образец с очень маленькими частицами, то, чтобы их осадить, нужно задать максимально возможную скорость вращения и минимальную скорость потока. В противном случае комбинаций скорость вращения/скорость потока может быть много, и каждая из них подходит для осаждения частиц определенного размера. Обычно скорость потока выбирают исходя из количества образца, который нужно отцентрифугировать, и из того, как много времени вы можете на это потратить. Скорость вращения уже будет зависеть от выбранной скорости потока.

В: Как извлечь образец из ротора?

О: Некоторые образцы, например бактерии или дрожжи, могут прилипать к стенкам ротора. В таком случае сначала при помощи большого шприца или отсоса отберите супернатант, а затем соскребите осадок. Если вы использовали сердечник JCF-Z для малого объема осадка, просто выньте контейнеры в форме каноэ и соскребите осадок. Другие образцы, например клеточные мембраны и клетки, не будут прилипать к стенкам, а будут формировать очень концентрированную кашицу. В этом случае, чтобы получить осадок, необходимо будет выполнить дополнительное центрифугирование с помощью обычного ротора.

В: Как следует очищать ротор после использования?

О: После каждого использования все части ротора, которые были в контакте с образцом, и уплотнительный узел следует промыть в растворе мягкого детергента, а затем в дистиллированной воде. Затем их следует высушить теплым воздухом. Все детали можно автоклавировать при температуре до 125 °C, за исключением снимаемых перегородок из пластика Noryl и контейнеров в форме каноэ для малого объема осадка, которые при такой температуре могут деформироваться. Влага может сократить время жизни деталей ротора JCF-Z, поэтому при автоклавировании их следует поместить в паронепроницаемый контейнер.

В: Как следует выполнять проточное центрифугирование патогенных материалов?

О: Во всех руководствах по эксплуатации роторов для проточного центрифугирования компании Beckman Coulter встречается следующее предупреждение: «Центрифугирование больших объемов патогенных материалов в этих роторах может привести к тому, что концентрация этих материалов окажется чрезвычайно высокой. Агенты, относительно безвредные в естественном разведенном состоянии, при концентрировании могут стать инфекционными. Необходимо точно оценить биологическую опасность центрифугируемых материалов и принять соответствующие меры предосторожности». Для многих центрифуг предлагаются панели для удаленного контроля, а также HEPA-фильтры для размещения между вакуумной камерой и вакуумным насосом. Следует уделить внимание направлению воздушных

потоков в помещении и посоветоваться со специалистом по технике безопасности.

При исследовании очень опасных агентов следует работать в боксе биологической безопасности III класса на модифицированной центрифуге.

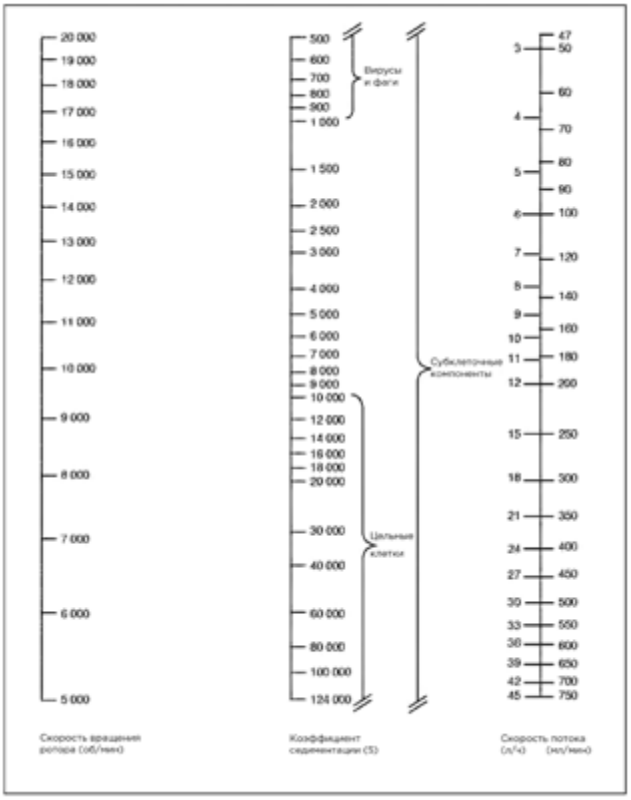


Рисунок 10. Номограмма для ротора JCF-Z. Теоретическая максимальная скорость потока для 100% осаждения при использовании стандартного сердечника. Положите линейку на страницу таким образом, чтобы она пересекала среднюю шкалу в точке, соответствующей коэффициенту седиментации ваших частиц. Если поворачивать линейку вокруг этой точки, то на двух оставшихся шкалах можно определить все комбинации значений скорости вращения ротора и скорости потока, которые можно применять на практике при осаждении интересующих частиц

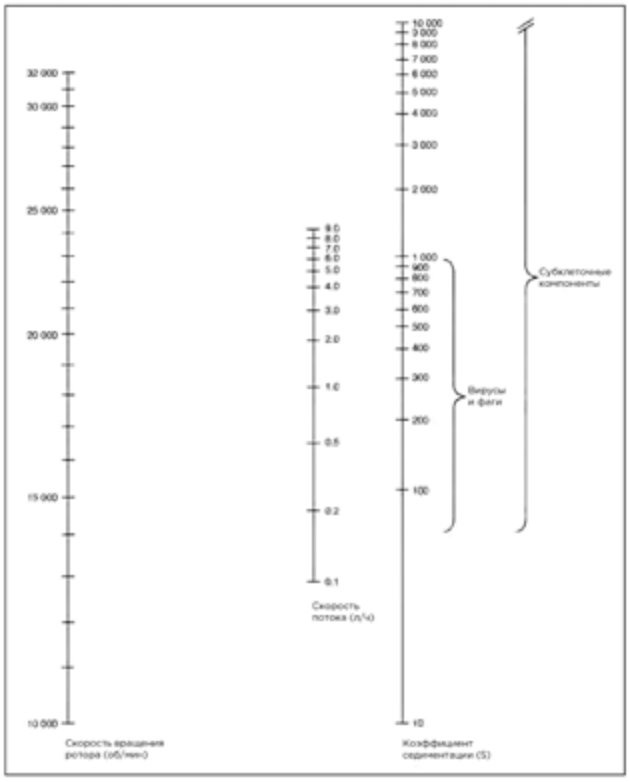


Рисунок 11. Номограмма для ротора CF-32 Ti. Теоретическая максимальная скорость потока для 100% осаждения. Положите линейку на страницу таким образом, чтобы она пересекала правую шкалу в точке, соответствующей коэффициенту седиментации ваших частиц. Если поворачивать линейку вокруг этой точки, то на двух оставшихся шкалах можно определить все комбинации значений скорости вращения ротора и скорости потока, которые можно применять на практике при осаждении интересующих частиц

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Schleicher, T.J. Lukas, D.M. Watterson. Isolation and characterization of calmodulin from the motile green alga Chlamydomonas reinhardtii // Arch. Biochem. Biophys. 1984. V. 229. P. 33–42.
2. P.J. Newman, L.A. Sherman. Isolation and characterization of photosystem I and II membrane par ticles from the blue-green algae, Synechococcus cedrorum // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 503. P. 343–361.
3. P-O. Eriksson, L. Rilfors, A. Wieslander, A. Lundberg, G. Lindblom. Order and dynamics in mixtures of membrane glucolipids from Acholeplasma laidlawii studied by 2H NMR // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 4916–4924.
4. D. Opheim, R.W. Bernlohr. Purification and regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from Bacillus licheniformis // J. Bacteriol. 1973. V. 116. P. 1150–1159.
5. D. Opheim, R.W. Bernlohr. Purification and regulation of fructose-1, 6 bisphosphatase from Bacillus licheniformis // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. P. 3024–3033.
6. D.J. Opheim, R.W. Bernlohr. Fructose-1,6-bisphosphatase from Bacillus licheniformis. Methods in Enzymology. – New York: Aca demic Press, 1982. P. 384–391.
7. W. Leyk, H. Krauss. Zur Reinigung von Coxiella burneti- Antigen mittels Dichtegradienten-zentrifugation. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg., Abt. 1: Orig. // Reihe A. 1975 V. 230. P. 508–517.
8. M. Meyers, F. Blasi, C.B. Bruni, R.G. Deeley, J.S. Kovach, M. Levinthal, K.P. Mullinix, T. Vogel, R.F. Goldberger. Specific binding of the first enzyme for histidine biosynthesis to the DNA of the histidine operon // Nucleic Acids Res. 1975. V. 2. P. 2021–2036.
9. E. Scherzer, B. Auer, M. Schweiger. Identification, purification, and characterization of Escherichia coli virus T1 DNA methyl-transferase. J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 15225–15231.
10. T. Wagenknecht, V.A. Bloomfield. *In vitro* polymerization of bacteriophage T4D tail core subunits // J. Mol. Biol. 1977. V. 116. P. 347–359.
11. M.J. Zidwick, G. Keller, P. Rogers. Regulation and coupling of argECBH mRNA and enzyme synthesis in cell extracts of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1984. V. 159. P. 640–646.
12. D.E. Robertson, P.A. Kroon, C. Ho. Nuclear magnetic resonance and fluorescence studies of substrateinduced conformational

changes of histidine-binding protein J of Salmonella typhimurium // Biochemistry. 1977. V. 16. P. 1443–1451.

13. B.P. Livermore, R.C. Johnson. Lipids of the Spirochaetales: comparison of the lipids of several members of the genera Spirochaeta, Treponema, and Leptospira // J. Bacteriol. 1974. V. 120. P. 1268–1273.

14. P.K. Peterson, B.J. Wilkinson, Y. Kim, D. Schmeling, S.D. Douglas, P.G. Quie, J. Verhoef. The key role of peptidoglycan in the opsonization of Staphylococcus aureus // J. Clin. Invest. 1978. V. 61. P. 597–609.

15. C.M. Cunningham, E.L. Barsumian, D.W. Watson. Fur ther purification of group A streptococcal pyrogenic exotoxin and characterization of the purified toxin. Infect // Immun. 1976. V. 14. P. 767–775.

16. C.A. Radebaugh, J.L. Matthews, G.K. Geiss, F. Liu, J-M. Wong, E. Bateman, S. Camier, A. Sentenac, M.R. Paule. TATA box-binding protein (TBP) is a constituent of the polymerase I-specific transcription initiation factor TIF-1B (SL1) bound to the rRNA promoter and shows differential sensitivity to TBP-directed reagents in polymerase I, II, and III transcription factors // Mol. Cell. Biol. 1994. V. 14. P. 597–605.

17. D.J. Steenkamp. The purine-2-deoxyribonucleosidase from Crithidia luculiae. Purification and trans-N-deoxyribosylase activity. Eur. // J. Biochem. 1991. V. 197. P. 431–439.

18. N. Barrett, A. Mitterer, W. Mundt, J. Eibl, M. Eibl, R.C. Gallo, B. Moss, B.F. Dorner. Large-scale production and purification of a vaccinia recombinant-derived HIV-1 gp160 and analysis of its immunogenicity. AIDS Res. Hum // Retroviruses. 1989. V. 5. P. 159–173.

19. W. Uckert, V. Wunderlich, E. Bender, G. Sydow, D. Bierwolf. The protein pattern of PMF virus, a type-D retrovirus from malignant permanent human cell lines // Arch. Virol. 1980. V. 64. P. 155–166.

20. L.E. Henderson, J.F. Hewetson, R.F. Hopkins III, R.C. Sowder, R.H. Neubauer, H. Rabin. A rapid, large scale purification pro- cedure for gibbon interleukin 2 // J. Immunol. 1983. V. 131. P. 810–815.

21. K.K. Iwata, C.M. Fryling, W.B. Knott, G.J. Todaro. Isolation of tumor cell growth-inhibiting factors from a human rhabdomyosar- coma cell line // Cancer Res. 1985. V. 45. P. 2689–2694.

22. H. Marquardt, G.J. Todaro. Human transforming growth factor. Production by a melanoma cell line, purification, and initial characterization // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. P. 5220–5225.

23. H. Marquardt, G.L. Wilson, G.J. Todaro. Isolation and characterization of a multiplication-stimulating activity (MSA)-like polypeptide produced by a human fibrosarcoma cell line // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 9177–9181.

24. H. Marquardt, G.L. Wilson, G.J. Todaro. Isolation and characterization of a multiplication-stimulating activity (MSA)-like polypeptide produced by a human fibrosarcoma cell line // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 9177–9181.

25. S.B. Prusiner, M.P. McKinley, K.A. Bowman, D.C. Bolton, Bend- heim PE, Groth DF, Glenner GG. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods // Cell. 1983. V. 35. P. 349–358.

26. E. Turk, D.B. Teplow, L.E. Hood, S.B. Prusiner. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. Eur. // J. Biochem. 1988. V. 176. P. 21–30.

27. S.B. Prusiner, M.P. McKinley, D.C. Bolton, R.A. Bowman, D.F. Groth, S.P. Cochran, E.M. Hennessey, M.B. Braunfeld, J.R. Baringer, M.A. Chatigny. Prions: methods for assay, purification, and characterization // Methods in Virology. 1984. V. 8. P. 293–345.

28. P.M. Reid, A.E. Wilkinson, E Tipping, M.N. Jones. Determination of molecular weights of humic substances by analytical (UV scanning) ultracentrifugation. Geochim // Cosmochim. Acta. 1990. V. 54. P. 131–138.

29. S.B. Prusiner, M.P. McKinley, D.C. Bolton, K.A. Bowman, D.F. Groth, S.P. Cochran, E.M. Hennessey, M.B. Braunfeld, J.R. Baringer, M.A. Chatigny. Prions: methods for assay, purification, and characterization // Methods in Virology. 1984. V. 8. P. 293–345.

30. E. Turk, D.B. Teplow, L.E. Hood, S.B. Prusiner. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. Eur. // J. Biochem. 1988. V. 176. P. 21–30.

31. E.L. Hertzberg, N.B. Gilula. Isolation and characterization of gap junctions from rat liver //J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 2138–2147.

32. C-H. Heldin, A. Johnsson, B. Ek, S. Wennergren, L. Rönnstrand, A. Hammacher, B. Faulders, A. Wasteson, B. Westermark. Purification of human platelet-derived growth factor // Methods in Enzymology. 1987. V. 147. P. 3–13.

33. I. Kahane, H. Furthmayr, V.T. Marchesi. Isolation of membrane glycoproteins by affinity chromatography in the presence of detergents // Biochim. Biophys. Acta. 1976. V. 426. P. 464–476.

34. V.T. Marchesi. Isolation of spectrin from er y throcy te membranes // Methods in Enzymology. 1974. V. 32. P. 275–277.

35. P.J. Laipis, W.W. Hauswirth, T.W. O'Brien, G.S. Michaels. A physical map of bovine mitochondrial DNA from a single animal // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 565. P. 22–32.

36. R. Brambl. Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination. Biosynthesis and assembly of cytochrome c oxidase in Botryodiplodia theobromae // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 7673–7680.

37. M. Josephson, R. Brambl. Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination. Purification, properties and biosynthesis of cytochrome c oxidase from Botryodiplodia theobromae // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 606. P. 125–137.

38. M.G. Cacace, R. Nucci, H. Reckert. Large scale preparation of calf liver nuclei by continuous flow centrifugation // Experientia. 1977. V. 33. P. 855–857.

39. P. Rosen, B. Ehrich, E. Junger, H.J. Bubenzer, L. Kühn. Binding and degradation of insulin by plasma membranes from bovine liver isolated by a large scale preparation // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 587. P. 593–605.

40. H.E. Meyer, H-J. Bubenzer, L. Herbertz, L. Kuehn, H. Reinauer. Purification of the insulin receptor protein from porcine liver membranes. Hoppe-Seyler's Z. // Physiol. Chem. 1981. V. 362. P. 1621–1629.

41. E.L. Hertzberg. Isolation and characterization of liver gap junctions // Methods in Enzymology. 1983. V. 98. P. 501–510. .

42. D.A. Goodenough. Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin // J. Cell Biol. 1974. V. 61. P. 557–563.

43. R.I. Sharpee, C.A. Mebus, E.P. Bass. Characterization of a calf diarrheal coronavirus. Am. // J. Vet. Res. 1976. V. 37. P. 1031–1041.

44. G.P. Shibley, M. Manousos, K. Munch, I. Zelljadt, L. Fisher, S. Mayyasi, K. Harewood, R. Stevens, K.E. Jensen. New method for large-scale growth and concentration of the Epstein-Barr viruses. Appl. Environ // Microbiol. 1980. V. 40. P. 1044–1048.

45. J. Hoekstra, F. Deinhardt. Simian sarcoma and feline leukemia virus antigens: isolation of species- and interspecies-specific proteins // Intervirology. 1973–1974. V. 2. P. 222–230.

46. R.A. Salerno, V.M. Larson, A.H. Phelps, M.R. Hilleman. Infection and immunization of cats with the Kawakami – Theilen strain of feline leukemia virus. Proc. Soc. Exp. // Biol. Med. 1979. V. 160. P. 18–23.

47. K.R. Harewood, P. Chang, C. Higdon, D. Larson. The endogenous reverse transcriptase activity of gibbon ape lymphoma virus: characterization of the DNA product // Biochim. Biophys. Acta. 1975. V. 407. P. 14–23.

48. W.P. Parks, E.M. Scolnick. *In vitro* translation of Harvey murine sarcoma virus RNA // J. Virol. 1977. V. 22. P. 711–719.

49. C.M. Wheeler, B.H. Robertson, G. Van Nest, D. Dina, D.W. Bradley, H.A. Fields. Structure of the hepatitis A virion: peptide mapping of the capsid region // J. Virol. 1986. V. 58. P. 307–313.

50. T. Takahashi, S. Nakagawa, T. Hashimoto, K. Takahashi, M. Imai, Y. Miyakawa, M. Mayumi. Large-scale isolation of Dane particles from plasma containing hepatitis B antigen and demonstration of a circular double-stranded DNA molecule ex truding directly from their cores // J. Immunol. 1976 . V. 177. P. 1392–1397.

51. F. Tsuda, T. Takahashi, K. Takahashi, Y. Miyakawa, M. Mayumi. Determination of antibody to hepatitis B core antigen by means of immune adherence hemagglutination // J. Immunol. 1975. V. 115. P. 834–838.

52. W.J. McAleer, W. Hurni, E. Wasmuth, M.R. Hilleman. High resolution flow-zonal centrifuge system // Biotechnol. Bioeng. 1979. V. 21. 317–321.

53. A.P. Mistretta, P. Crovari-Cuneo, G. Giacometti, G. Sacchi, F. Strozzi. Purification and concentration of influenza inactivated viruses by continuous-flow zonal centrifugation // Boll. Ist. Sieroter. 1975. V. 54. P. 45–56.

54. C.E. Mountford, G. Grossman, A.W. Hampson, K.T. Holmes. Influenza virus: an NMR study of mechanisms involved in infection // Biochim. Biophys. Acta. 1982. V. 720. P. 65–74.

55. J. Olpin, S. Oroszlan, R.V. Gilden. Biophysical-immunological assay for ribonucleic acid type C viruses // Appl Microbiol. 1974. V. 28. P. 100–105.

56. S. Oroszlan, D. Bova, R.J. Huebner, R.V. Gilden. Major group-specific protein of rat type C viruses // J. Virol. 1972. V. 10. P. 746–750.

57. S. Oroszlan, M.R. Summers, C. Foreman, R.V. Gilden. Murine type-C virus group-specific antigens: interstrain immunochemical, biophysical, and amino acid sequence differences // J. Virol. 1974. V.14. P. 1559–1574.

58. R.V. Gilden, S. Oroszlan, R.J. Huebner. Antigenic differentiation of M-MSV(O) from mouse, hamster, and cat C-type viruses. // Virology. 1971. V. 43. P. 722–724.

59. W. Drohan, R. Kettmann, D. Colcher, J. Schlom. Isolation of the mouse mammary tumor virus sequences not transmitted as germinal provirus in the C3H and RIII mouse strains // J. Virol. 1977. V. 21. P. 986–995.

60. W.N. Burnette, C.H. Riggin, W.M. Mitchell. Physical and chemical properties of an oncornavirus associated with a murine adrenal carcinoma cell line // J. Virol. 1974. V. 14. P. 110–115.

61. C.J. Sherr, G.J. Todaro. Purification and assay of murine leukemia viruses // Methods in Enzymology. 1979. V. 58. P. 412–424.

62. S.K. Chattopadhyay, J.W. Hartley, M.R. Lander, B.S. Kramer, W.P. Rowe. Biochemical characterization of the amphotropic group of murine leukemia viruses // J. Virol. 1978. V. 26. P. 29–39.

63. S.K. Chattopadhyay, G. Jay, M.R. Lander, A.S. Levine. Correlation of the induction of transcription of the AKR mouse genome by 5-iododeoxyuridine with the activation of an endogenous murine leukemia virus // Cancer Res. 1979. V. 39. P. 1539–1546.

64. P.A. Johnson, M.R. Rosner. Characterization of murine- specific leukemia virus receptor from L cells // J. Virol. 1986. V. 58. P. 900–908.

65. R.L. Levy, R.A. Lerner, F.J. Dixon. Enhancement of infectivity and oncogenicity of a murine leukemia virus in adult mice by X-irradiation // Cancer Res. 1976. V. 36. P. 2090–2095.

66. R.K. Zwerner, K.S. Wise, R.T. Action. Harvesting the products of cell growth // Methods in Enzymology. 1979. V. 58. P. 221–229.

67. R.W. Johnson, A. Perry, O.R. Robinson Jr., G.P. Shibley. Method for reproducible large-volume production and purification of Rauscher murine leukemia virus. Appl. Environ // Microbiol. 1976. V. 31. P. 182–188.

68. H. Okabe, R.V. Gilden, V. Hatanaka. RD114 virus-specific sequences in feline cellular RNA: detec tion and characterization // J. Virol. 1973. V. 12. P. 984–994.

69. O. Faff, B.A. Murray, V. Erfle, R. Hehlmann. Large scale production and purification of human retrovirus-like par ticles related to the mouse mammary tumor virus // FEMS Microbiol. Lett. 1993. V. 109. P. 289–296.

70. W. Uckert, G. Sydow, I. Hertline, M. Rudolph, V. Wunderlich. Comparison of different methods for large volume concentration of a type D retrovirus (PMF V) // Arch. Geschwulstforsch. 1982. V. 52. P. 541–549.

71. K.P. Anderson, M.L. Low, Y.S. Lie, G-A. Keller, M. Dinowitz. Endogenous origin of defective retroviruslike par ticles from a recombinant Chinese hamster ovary cell line // Virology. 1991. V. 181. P. 305–311.

72. J. Hoekstra, F. Deinhardt. Simian sarcoma and feline leukemia virus antigens: isolation of species- and interspecies-specific proteins // Intervirology. 1973–1974 V. 2. P. 222–230.

73. S. Jensik, J. Hoekstra, S. Silver, R.L. Northrop, F. Deinhardt. The 60 to 70S RNA and reverse transcriptase of simian sarcoma and simian sarcoma-associated viruses // Intervirology. 1973. V. 1. P. 229–241.

74. C-H. von Bonsdorff, S.C. Harrison. Hexagonal glycoprotein arrays from Sindbis virus membranes // J. Virol. 1978. V. 28. P. 578–583.

75. M. Schwenen, K.H. Richter. Isolierung von Vaccinia-Viren aus Tierhaut-Impfstoff. Eine vergleichende Untersuchung moderner Präparationsmethoden für die Impfstoffproduktion. II. Zonen-Zentrifugation im Sucrose-Dichtegradienten und Differentialzentrifugation. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg., Abt. 1: Orig. // Reihe A. 1974. V. 228. P. 415–442.

76. El-Baradi TTAL, H.A. Raue, V.C.H.F. De Regt, R.J. Planta. Stepwise dissociation of yeast 60S ribosomal subunits by LiCl and identification of L25 as a primary 26S rRNA binding protein. Eur. // J. Biochem. 1984. V. 144. P. 393–400.

77. P.M. Kane, C.T. Yamashiro, T.H. Stevens. Biochemical characterization of the yeast vacuolar H+-ATPase // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 19236–19244.

BECKMAN COULTER
Life Sciences

МОНИТОРИНГ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗАТОРА VI-CELL MetaFLEX

АВТОРЫ

M. Ablutz,
A. Dean,
R. Morris,
S. Flickinger,
L. Lee,

Beckman Coulter, Inc.

Анализатор Vi-Cell MetaFLEX

ВВЕДЕНИЕ

Получение максимального количества продукта самого высокого качества – общая цель любого биологического производства. Для ее достижения необходимо осуществлять контроль и мониторинг сред в биореакторах.

Vi-Cell MetaFLEX – это автоматизированный бионализатор, используемый для анализа среды, в которой осуществляется культивирование клеток млекопитающих и насекомых. Он позволяет измерять самые важные для жизнеспособности культур клеток параметры: pH, pCO_2, pO_2, концентрацию глюкозы, лактата и электролитов. Мощная технология Vi-CELL MetaFLEX разработана на основе технологии анализаторов газов крови для клинической диагностики компании Radiometer.

Для проведения измерения с помощью анализатора MetaFLEX достаточно 65 мкл образца, а результаты готовы уже через 35 с. Проба, предназначенная для подачи в систему, может находиться в шприце, капиллярной пробирке, чашечке или другом подобном контейнере. Образец отбирается из емкости с помощью иглы входного модуля анализатора. Анализ выполняется сразу после забора. Образец пропускается через сменную кассету миниатюрных датчиков, в которой осуществляются измерения. Все необходимые для этого жидкости находятся в сменном контейнере с растворами. Здесь же находятся растворы, необходимые для выполнения внутреннего контроля качества и калибровок, а также емкость для отходов. Анализатор сообщает пользователю, когда расходные материалы следует заменить по причине достижения максимального числа тестов и/или истечения срока годности.

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ

Кассета датчиков анализатора MetaFLEX содержит датчики/электроды для каждого измеряемого параметра, в том числе электрод сравнения (рисунок 1).

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Электрод сравнения имеет стабильный фиксированный, не зависящий от состава пробы потенциал, относительно которого можно измерить потенциал электродов для измерения pH и концентрации электролитов. Он выполнен из серебряного стержня, покрытого AgCl, что обеспечивает равновесие Ag/Ag^+ в растворе с постоянной концентрацией Cl^- и, как следствие, стабильность потенциала электрода сравнения.

Схема строения электрода сравнения представлена на рисунке 2.

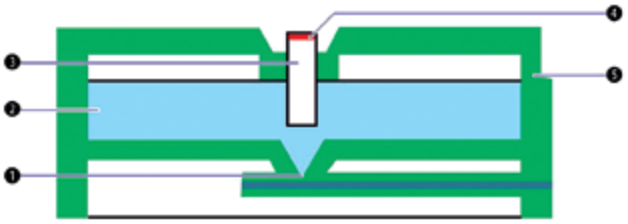


Рисунок 2. Схема электрода сравнения

1. Мембрана взаимодействует с пробой
2. Раствор электролита действует как солевой мостик, который поддерживает электрический контакт между электродом и пробой
3. Электрод – посредник между раствором электролита и электрическим контактом
4. Электрический контакт – точка электрического соединения между электродом и анализатором
5. Корпус кассеты датчиков с интегрированным электродом сравнения

Для определения интересующих параметров в анализаторе применяется несколько методов.

Потенциометрия: измерение электрического потенциала используется для определения pH, pCO_2 и концентрации электролитов.

Амперометрия: измерение силы электрического тока используется для оценки концентрации глюкозы и лактата.

Оптический датчик pO_2 для определения pO_2.

Спектрофотометрия: анализ спектра поглощения гемолизированной пробы крови используется для расчета параметров оксиметрии.

Датчики pH, электролитов и pCO_2 имеют твердотельную конструкцию с ПВХ-мембраной (поливинилхлоридной). Исключение представляет датчик Cl^-, содержащий эпоксидную мембрану. В этих датчиках используется потенциометрический метод и измеряется разница потенциалов между твердотельным контактом и электродом сравнения. Конструкция потенциометрических датчиков немного различается, но принцип устройства один и тот же.

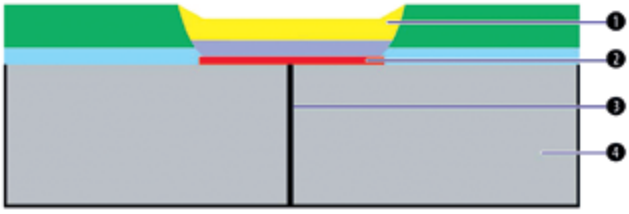


Рисунок 3. Схема потенциометрического датчика

1. Мембрана – ионселективная мембрана, находящаяся в прямом контакте с пробой или калибровочным раствором и чувствительная к специфическому иону, например к ионам H^+
2. Твердотельный контакт – точка электрического и ионного контакта с мембраной
3. Электрический контакт – точка электрического соединения между датчиком и анализатором
4. Основание датчика – конструкционная платформа, на которой расположен датчик

Для определения концентраций глюкозы и лактата используется амперометрия. Согласно теории сила электрического тока, протекающего в электродной цепи, пропорциональна концентрации вещества, окисляющегося или восстанавливающегося на аноде или катоде.

К электродной цепи прикладывают постоянное поляризационное напряжение и с помощью амперметра измеряют силу протекающего тока. Когда глюкоза и лактат попадают в кассету датчиков, они взаимодействуют с H_2O_2 и превращаются в глюконовую кислоту и пируват соответственно. Когда к электродной цепи прикладывают напряжение, происходит окисление H_2O_2. Сила электрического тока пропорциональна количеству H_2O_2, которое напрямую зависит от количества глюкозы/лактата.

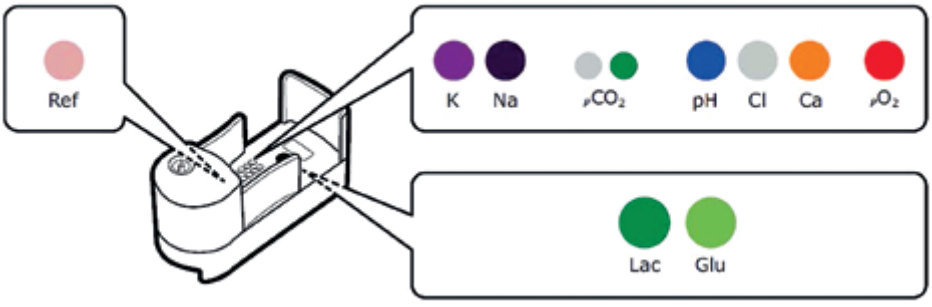


Рисунок 1. Схема кассеты датчиков

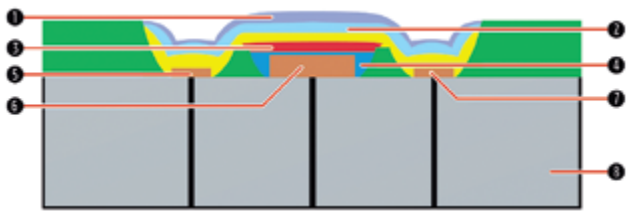


Рисунок 4. Схема датчиков глюкозы и лактата

1. Биосовместимый слой
2. Внешняя мембрана, проницаемая для глюкозы/лактата (контроль диффузии)
3. Слой ферментов содержит глюкооксидазу/лактатоксидазу
4. Внутренняя мембрана – ацетат целлюлозы
5. Электрод сравнения – электрод Ag/AgCl
6. Анод – платиновый электрод
7. Катод – платиновый электрод
8. Основание датчика – конструкционная платформа, на которой расположен датчик

Датчик pO_2 существенно отличается от других датчиков и представляет собой оптическую систему. Принцип измерения основан на способности кислорода снижать интенсивность и константу времени фосфоресценции фосфоресцентного красителя, находящегося в контакте с пробой.

Свет, излучаемый зеленым светодиодом, отражается дихроическим зеркалом на датчик pO_2. Излучаемый в ходе фосфоресценции на датчике красный свет проходит через дихроическое зеркало и попадает на фотодетектор. Электрические сигналы фотодетектора, пропорциональные интенсивности света, передаются на аналого-цифровой преобразователь и устройство обработки данных, которое рассчитывает величину pO_2.

ФОРМАТ РЕЗУЛЬТАТОВ MetaFLEX

Анализатор предоставляет результаты в легко читаемом формате на экране монитора и/или на распечатке. В памяти прибора сохраняются журналы данных об образцах, контроле качества, калибровках и действиях, выполняемых анализатором. Результаты и журналы данных можно экспортировать в .csv-формате, что обеспечивает широкий выбор программ для чтения файлов.

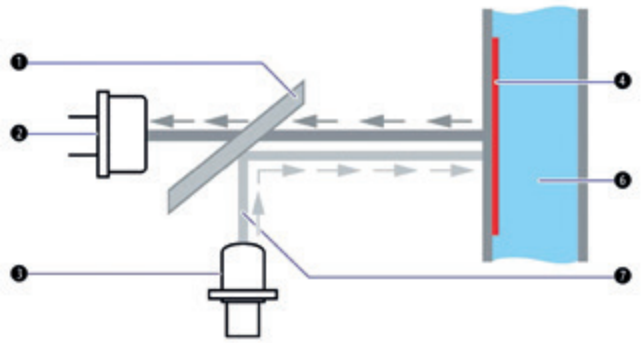


Рисунок 5. Схема датчика pO_2

1. Дихроическое зеркало
2. Фотодетектор
3. Зеленый светодиод
4. Датчик pO_2
5. Фосфоресценция
6. Образец
7. Возбуждающий свет

НАДЕЖНОСТЬ, ТОЧНОСТЬ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Для выполнения внешнего контроля качества и оценки точности и воспроизводимости результатов, предоставляемых анализатором MetaFLEX, можно использовать растворы Qualicheck 5+. Они поставляются в ампулах объемом 2 мл, а измеряемые анализатором параметры имеют известные значения и лежат в допустимых пределах. Конкретная информация представлена в спецификациях, прикладываемых к растворам. Очень важно для выполнения каждого внешнего контроля качества использовать новую ампулу Qualicheck, потому что взаимодействие раствора с воздухом может повлиять на значения pO_2, pCO_2 и pH.

Для демонстрации эксплуатационных качеств и высокой корреляции между инструментами осуществили внешний контроль качества двух приборов Vi-CELL MetaFLEX с помощью растворов Qualicheck 5+ уровень 1–3. Для растворов каждого уровня измерения выполняли трижды и каждый раз использовали новые ампулы. Затем посчитали средние значения всех параметров на каждом уровне и определили, попало ли каждое среднее значение в ожидаемый диапазон (+) или нет (–). Для демонстрации воспроизводимости результатов посчитали коэффициенты вариации (CV) всех параметров.

Результаты анализа растворов Qualicheck 5+ на приборе 1 приведены в таблицах ниже.

Таблица 1.

Результаты для раствора Qualicheck, уровень 1 – прибор 1

Qualicheck, уровень 1 – партия 144				Годен до: 09-2017				
Параметры		Середина диапазона	Мин.	Макс.	Результат	Среднее значение	SD	%CV
pH	–	7,07	7,05	7,09	+	7,07	0,001	0,01%
pCO_2	мм рт. ст.	71,0	66,0	76,0	+	67,90	0,100	0,15%
pO_2	мм рт. ст.	152	142	162	+	157,67	1,528	0,97%
cK^+	ммоль/л	1,8	1,5	2,1	+	1,70	0,000	0,00%
cNa^+	ммоль/л	162	158	166	+	162,00	0,000	0,00%
cCa^{2+}	ммоль/л	1,00	0,90	1,10	+	0,98	0,000	0,00%
cCl^-	ммоль/л	121	115	127	+	123,00	0,000	0,00%
cGlucose	г/л	0,26	0,18	0,36	+	0,29	0,006	2,01%
cLactate	г/л	0,38	0,32	0,43	+	0,40	0,000	0,00%

Таблица 2.

Результаты для раствора Qualicheck, уровень 2 – прибор 1

Qualicheck, уровень 2 – партия 147				Годен до: 09-2017				
Параметры		Середина диапазона	Мин.	Макс.	Результат	Среднее значение	SD	%CV
pH	–	7,395	7,375	7,415	+	7,39	0,001	0,01%
pCO_2	мм рт. ст.	40,9	37,9	43,9	+	40,53	0,252	0,62%
pO_2	мм рт. ст.	101	93	109	+	106,33	0,577	0,54%
cK^+	ммоль/л	3,7	3,4	4	+	3,70	0,000	0,00%
cNa^+	ммоль/л	142	138	146	+	141,00	0,000	0,00%
cCa^{2+}	ммоль/л	0,53	0,43	0,63	+	0,52	0,000	0,00%
cCl^-	ммоль/л	96	90	102	+	98,00	0,000	0,00%
cGlucose	г/л	1,02	0,88	1,17	+	1,01	0,006	0,57%
cLactate	г/л	0,15	0,10	0,19	+	0,15	0,006	3,94%

Таблица 3.

Результаты для раствора Qualicheck, уровень 3 – прибор 1

Qualicheck, уровень 3 – партия 143				Годен до: 01-2018				
Параметры		Середина диапазона	Мин.	Макс.	Результат	Среднее значение	SD	%CV
pH	–	7,583	7,558	7,608	+	7,58	0,001	0,01%
pCO_2	мм рт. ст.	22,6	20,1	25,1	+	22,20	0,000	0,00%
pO_2	мм рт. ст.	54,6	44,6	64,6	+	55,40	0,954	1,72%
cK^+	ммоль/л	5,5	5,2	5,8	+	5,40	0,000	0,00%
cNa^+	ммоль/л	127	123	131	+	127,00	0,000	0,00%
cCa^{2+}	ммоль/л	0,37	0,27	0,47	+	0,37	0,006	1,55%
cCl^-	ммоль/л	65	59	71	+	64,00	0,000	0,00%
cGlucose	г/л	2,40	2,07	2,72	+	2,45	0,006	0,24%
cLactate	г/л	0,93	0,82	1,05	+	0,97	0,006	0,60%

Результаты анализа растворов Qualicheck 5+ на Приборе 2

Таблица 4.

Результаты для раствора Qualicheck, уровень 1 – прибор 2

Qualicheck, уровень 1 – партия 144				Годен до: 04-2018				
Параметры		Середина диапазона	Мин.	Макс.	Результат	Среднее значение	SD	%CV
pH	–	7,067	7,047	7,087	+	7,07	0,002	0,03%
pCO_2	мм рт. ст.	71,3	66,3	76,3	+	68,00	0,557	0,82%
pO_2	мм рт. ст.	154	144	164	+	154,67	0,577	0,37%
cK^+	ммоль/л	1,5	1,2	1,8	+	1,70	0,000	0,00%
cNa^+	ммоль/л	162	158	166	+	161,67	0,577	0,36%
cCa^{2+}	ммоль/л	0,99	0,89	1,09	+	0,97	0,000	0,00%
cCl^-	ммоль/л	122	116	128	+	122,33	0,577	0,47%
cGlucose	г/л	0,27	0,18	0,36	+	0,28	0,000	0,00%
cLactate	г/л	0,.38	0,29	0,43	+	0,39	0,006	1,47%

Таблица 5.

Результаты для раствора Qualicheck, уровень 2 – прибор 2

Qualicheck, уровень 2 – партия 147				Годен до: 02-2018				
Параметры		Середина диапазона	Мин.	Макс.	Результат	Среднее значение	SD	%CV
pH	–	7,401	7,381	7,421	+	7,40	0,001	0,01%
pCO_2	мм рт. ст.	40,5	37,5	43,5	+	40,27	0,208	0,52%
pO_2	мм рт. ст.	100	92	108	+	100,33	0,577	0,58%
cK^+	ммоль/л	3,8	3,5	4,1	+	3,70	0,000	0,00%
cNa^+	ммоль/л	141	137	145	+	141,00	0,000	0,00%
cCa^{2+}	ммоль/л	0,53	0,43	0,63	+	0,52	0,000	0,00%
cCl^-	ммоль/л	97	91	103	+	98,00	0,000	0,00%
cGlucose	г/л	1,01	0,86	1,15	+	1,00	0,006	0,58%
cLactate	г/л	0,14	0,10	0,19	+	0,15	0,006	3,94%

Таблица 6.

Результаты для раствора Qualicheck, уровень 3 – прибор 2

Qualicheck, уровень 3 – партия 143				Годен до: 01-2018				
Параметры		Середина диапазона	Мин.	Макс.	Результат	Среднее значение	SD	%CV
pH	–	7,581	7,556	7,606	+	7,58	0,001	0,01%
pCO_2	мм рт. ст.	22,7	20,2	25,2	+	22,70	0,173	0,76%
pO_2	мм рт. ст.	55,7	45,7	65,7	+	54,13	0,306	0,56%
cK^+	ммоль/л	5,5	5,2	5,8	+	5,40	0,000	0,00%
cNa^+	ммоль/л	127	123	131	+	127,00	0,000	0,00%
cCa^{2+}	ммоль/л	0,37	0,27	0,47	+	0,37	0,000	0,00%
cCl^-	ммоль/л	65	59	71	+	65,67	0,577	0,88%
cGlucose	г/л	2,45	2,13	2,77	+	2,42	0,000	0,00%
cLactate	г/л	0,94	0,83	1,05	+	0,96	0,006	0,60%

На рисунках 6–10 представлены гистограммы средних значений pH, pCO_2, pO_2, концентраций глюкозы и лактата, измеренных на двух анализаторах MetaFLEX.

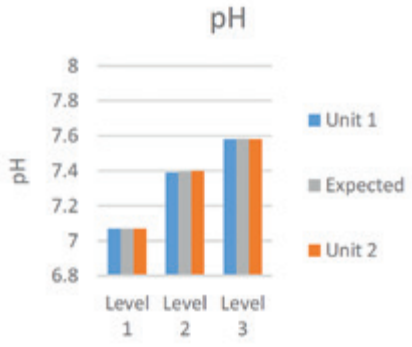


Рисунок 6. Сравнение результатов измерения pH растворов Qualicheck 5+

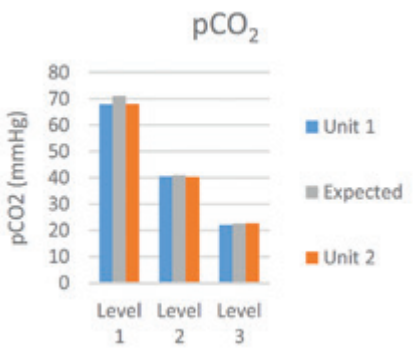


Рисунок 7. Сравнение результатов измерения pCO_2 в растворах Qualicheck 5+

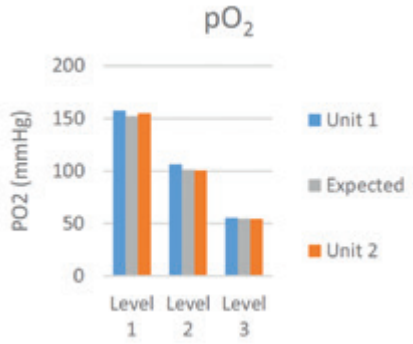


Рисунок 8. Сравнение результатов измерения pO_2 в растворах Qualicheck 5+

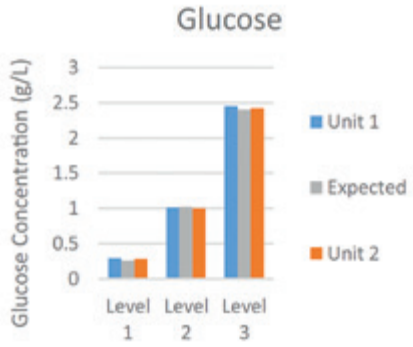


Рисунок 9. Сравнение результатов измерения концентрации глюкозы в растворах Qualicheck 5+

Низкие значения CV каждого параметра в сочетании с высокой корреляцией результатов, полученных на двух приборах, подтверждают достоверность и воспроизводимость измерений, выполняемых анализаторами Vi-CELL MetaFLEX.

Помимо тестирования растворов Qualicheck, был выполнен анализ гравиметрических растворов глюкозы и лактата в среде DMEM. Растворы глюкозы проанализировали на двух приборах Vi-CELL MetaFLEX (прибор A и B), а растворы лактата – только на одном (прибор C). Затем посчитали процентное различие между результатами и выполнили ли-

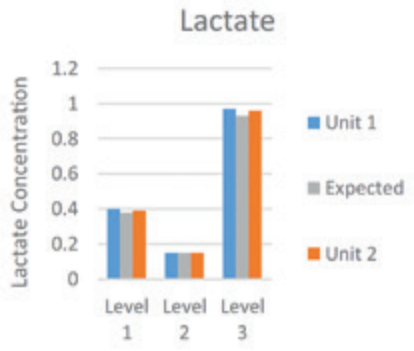


Рисунок 10. Сравнение результатов измерения концентрации лактата в растворах Qualicheck 5+

нейную аппроксимацию, чтобы оценить линейность и последовательность результатов (таблицы 7, 8 и рисунки 12, 13).

Таблица 7.

Линейность результатов измерения концентрации глюкозы

Глюкоза					
Концентрация раствора, г/л	Измеренная концентрация		Среднее значение концентрации	Среднее значение %CV	Процентное различие
	Прибор А	Прибор Б			
1,0	0,96	0,96	0,96	2,93	0,00
2,0	1,91	1,91	1,91	1,25	0,00
4,0	3,94	3,95	3,94	0,25	0,25
8,0	7,18	7,24	7,21	2,76	0,74

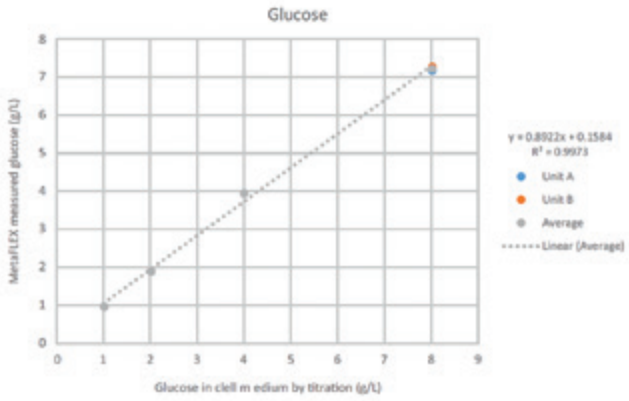


Рисунок 12. Линейная аппроксимация результатов измерения концентрации глюкозы

Согласно полученным данным, зависимость результатов измерений от концентрации метаболитов носит линейный характер. Угловой коэффициент прямой, полученной в результате линейной аппроксимации, составляет 0,89 для глюкозы и 0,92 для лактата, R^2 в обоих случаях равно 0,99. Значения %CV для обоих приборов были меньше 3%, а значения процентных различий – меньше 10%.

Таблица 8.

Линейность результатов измерения концентрации лактата

Лактат					
Концентрация раствора, г/л	Среднее значение концентрации	%CV	Процентное различие	Среднее значение %CV	Процентное различие
0,5	0,535	1,08	6,54	2,93	0,00
0,7	0,705	0,82	0,71	1,25	0,00
1,4	1,34	1,06	4,48	0,25	0,25
2,0	1,908	0,68	4,82	2,76	0,74

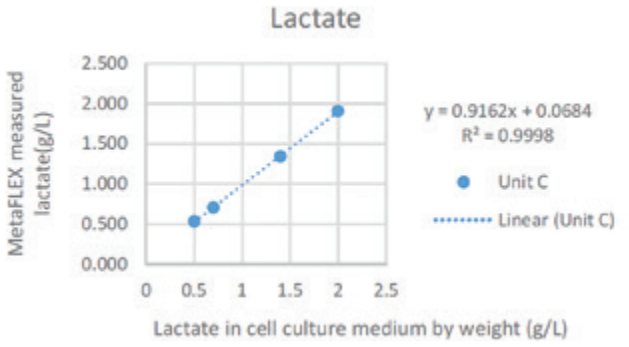


Рисунок 13. Линейная аппроксимация результатов измерения концентрации лактата

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗМЕРЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ

Чтобы продемонстрировать применимость Vi-CELL MetaFLEX к культуральным средам, был выполнен анализ среды, в которой культивировали клетки линии яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP). Образцы среды забирали ежедневно в течение 10 дней из растущей культуры клеток. С помощью Vi-CELL MetaFLEX анализировали изменения характеристик среды с течением времени. Особое внимание уделяли измерению концентраций глюкозы, лактата и pH.

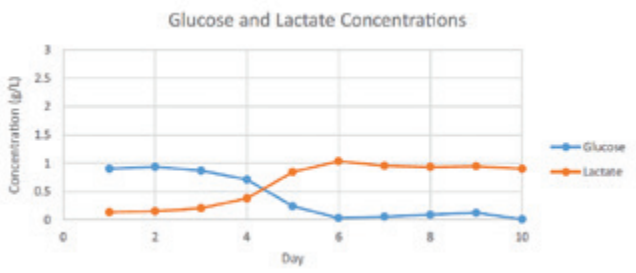


Рисунок 14. Изменение концентраций глюкозы и лактата в среде с клетками GFP CHO с течением времени

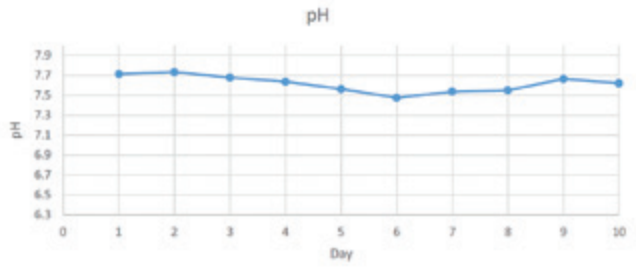


Рисунок 15. Изменение pH среды с клетками GFP CHO с течением времени

Согласно полученным графикам, концентрация глюкозы с течением времени уменьшалась, а концентрация лактата возрастала, что было ожидаемо. Изменения pH не столь заметны, поскольку ожидаемое уменьшение этого параметра невелико. Таким образом, была продемонстрирована применимость Vi-CELL MetaFLEX для анализа культуральных сред.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Автоматизированный биоанализатор Vi-CELL MetaFLEX – эффективный инструмент для анализа сред, в которых культивируются клетки млекопитающих и насекомых. Он измеряет самые важные для культур клеток параметры: pH, pCO_2, pO_2, концентрацию глюкозы, лактата и электролитов. Подходит для культур разного размера, для анализа достаточно 65 мкл образца, а результаты готовы уже через 35 с. Проба, предназначенная для подачи в систему, может находиться в шприце, капиллярной пробирке, чашечке или другом подобном контейнере.

ЛИТЕРАТУРА

1. Инструкция по эксплуатации. 2016. Beckman Coulter Inc. Indianapolis, IN.

BECKMAN COULTER
Life Sciences

КАКОЙ ПРЕСС-ИНСТРУМЕНТ БУДЕТ ДЛЯ ВАС САМЫМ ЛУЧШИМ?

Материал предоставлен компанией Natoli

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении более 40 лет компания Natoli Engineering занимает ведущие позиции в области проектирования и производства оснастки для таблеточных прессов. Появление инновационной серии многопозиционных (multi-tip) пуансонов более трех десятилетий назад оказало значительное влияние на изменение направления и процесса изготовления таблеток. Специализированный пресс-инструмент Natoli превратился в эталон отрасли, у компании появилось много подражателей, но так и нет настоящих конкурентов.

Компания Natoli Engineering специализируется на разработке и производстве широкого спектра многопозиционных пуансонов, точно соответствующих спецификациям заказчиков, изготавливая все типы оснастки для прессования таблеток: стандартные и укороченные, цельные и сборные пуансоны для круглых, фигурных и нестандартной формы таблеток.

Многопозиционный пресс-инструмент компании Natoli Engineering отвечает требованиям сегодняшнего дня и удовлетворяет растущую потребность в увеличении производства таблеток.

СКОЛЬКО НАСАДОК?

В таблице 1 указано максимальное количество насадок, которые подходят к наиболее распространенной оснастке B и D, предназначенных для стандартных сборных и цельных многонасадочных пуансонов. Также доступны специальные многонасадочные конструктивные решения для инструмента другого типа и другого размера.

Рекомендуется применять в матрицах отверстия цилиндрической формы, для того чтобы уменьшить оказываемое усилие сжатия и, более того, снизить усилие выталкивания.

Уровень производства и производительности зависит от типа оснастки, размера и формы таблетки, характеристик порошка, конфигурации таблетки, усилия сжатия, состояния и скорости вращения турели, а также от опыта оператора.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Таблица 1.

Максимальное количество насадок для одного пресс-инструмента

Размер матрицы		Насадки для цельного пуансона				Насадки для сборного пуансона			
дюймы	мм	Пуансон B	Пуансон B с пылезащитным колпачком	Пуансон D	Пуансон D с пылезащитным колпачком	Пуансон B	Пуансон B с пылезащитным колпачком	Пуансон D	Пуансон D с пылезащитным колпачком
0,0394	1,00	†	†	†	†	37*	37*	65*	65*
0,0591	1,50	†	†	†	†	29*	23*	43*	43*
0,0787	2,00	†	†	†	†	19	19	35*	35*
0,0984	2,50	†	†	†	†	9	9	20	20
0,1181	3,00	†	†	†	†	9	9	20	20
0,1378	3,50	†	†	†	†	7	7	14	14
0,1575	4,00	†	†	†	†	7	7	14	14
0,1772	4,50	†	†	†	†	4	4	8	8
0,1969	5,00	5	5	6	6	4	4	8**	8**
0,2165	5,50	4	4	6	6	3	3	7	7
0,2362	6,00	4	4	6	6	4	3	5**	5**
0,2559	6,50	4	4	6	6	3	3	5	5
0,2756	7,00	3	3	5	5	2	2	5	5
0,2953	7,50	2	2	4	4	1	1	4	4
0,3150	8,00	2	2	4	4	1	1	3	3
0,3346	8,50	2	2	3	3	1	1	3	3
0,3543	9,00	1	1	3	3	1	1	3	3
0,3740	9,50	1	1	3	3	1	1	2	2
0,3937	10,00	1	1	3	3	1	1	2	2
0,4134	10,50	1	1	3	3	1	1	1	1
0,4331	11,00	1	1	2	2	1	1	1	1

Примечание: † – Насадки размером 4,50 мм и менее не рекомендуется использовать для пуансонов цельного типа. Маленькие насадки легко деформируются и получают повреждения, но их можно заменять в индивидуальном порядке на пресс-инструменте сборного типа.

*Возможно максимальное количество насадок. Однако для достижения оптимального функционирования пресса не рекомендуется приобретать максимальное количество насадок.

**Максимальное количество насадок при использовании стандартных конфигураций инструмента/насадок. Возможно приобретение большего количества насадок при использовании специальных конфигураций инструмента/насадок. Однако следует подчеркнуть, что это увеличит затраты и время на подготовку к работе.

Зависит от потока порошка, конфигурации фидера, требуемых усилий сжатия и выталкивания.

Увеличение количества насадок – это не самое лучшее решение.

СБОРНЫЕ ПУАНСОНЫ ПРОТИВ ЦЕЛЬНЫХ МНОГОНАСАДОЧНЫХ ПУАНСОНОВ

Сборный многонасадочный пуансон

Сборные многонасадочные пуансоны состоят из корпуса, наконечника и индивидуальных насадок.

Характерные особенности:

- можно заменить только наконечники пуансонов;
- материал для изготовления насадки и корпуса пуансона можно подбирать отдельно в зависимости от характеристик грануляции и сжатия.

Цельный многонасадочный пуансон

Как следует из самого названия, цельные пуансоны изготавливаются из цельной заготовки из высококачественной стали. Такие пуансоны не требуют много времени на чистку и техническое обслуживание.

Характерные особенности:

- не требует сборки или разборки;
- упрощает процесс очистки;
- снижает риск загрязнения;
- можно использовать более разнообразные и большие по размеру насадки.

УКОРОЧЕННЫЕ ПУАНСОНЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МИКРОТАБЛЕТОК

Маленькие, но крепкие

Пресс-инструмент укороченной формы применяется в специальных конфигурациях. Более короткие наконечники верхнего и нижнего пуансона **увеличивают механическую прочность, что позволяет выдерживать силу сжатия.** В то же время снижается вероятность деформации и получения повреждений другого типа. Укороченные пуансоны рекомендуется использовать для прессования таблеток диаметром 5 мм и менее. Используются исключительно для сборных пуансонов и при прессовании как круглых, так и фигурных таблеток.

Рисунок 1. Цельные пуансоны в сравнении со сборными многонасадочными пуансонами

МАТРИЦЫ С ВНУТРЕННЕЙ ВЫТОЧКОЙ

Увеличивает прочность, снижает вероятность деформации

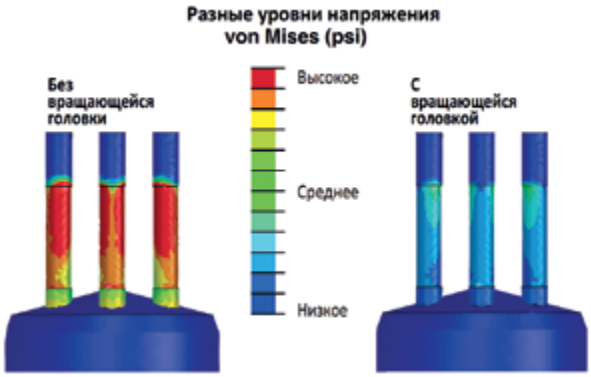
Укороченные пуансоны с насадками маленького диаметра часто деформируются и ломаются из-за механических нагрузок – усилий сжатия и силы вращения турели. Уникальная матрица с канавкой является решением данной проблемы. Цилиндрический корпус нижнего пуансона частично вставляется внутрь матрицы с канавкой, куда входит и где размещается укороченная насадка пуансона. Это увеличивает прочность и долговечность насадок, что влияет на качество изготавливаемых таблеток. Они получаются более плотными и однородными. Для матриц с канавками требуется использовать неглубокие наполняющие копиры и качественные держатели / стопорные элементы или надпрессовочные плиты.

Рисунок 2. Укороченные пуансоны / матрицы с внутренней выточкой

ВРАЩАЮЩИЕСЯ ГОЛОВКИ ПУАНСОНОВ

Вращающиеся головки пуансонов имеют двухкомпонентную конструкцию, позволяющую значительно продлить срок службы многонасадочного пресс-инструмента. Эта конструктивная особенность позволяет головке пуансона вращаться независимо от его корпуса, что обеспечивает равномерное распределение износа головки и уменьшает абразивное истирание. Для оснастки небольшого или укороченного размера данная опция является наиболее предпочтительным вариантом.

Опция с вращающейся головкой пуансона устраняет крутящий момент и значительно уменьшает трение, которому подвергаются наконечники пуансона. Для того чтобы обеспечить беспроблемное вращение головки в течение всего цикла сжатия, пуансон необходимо выставить ровно, без уклонов.



Вследствие особых требований к выравниванию наконечника нижнего пуансона установка пуансонов с вращающимися головками может представлять дополнительную сложность.

Применение вращающихся головок пуансонов не только экономично, но и имеет ряд преимуществ для производственного процесса:

- снижается вероятность деформации, изгиба и поломки наконечника нижнего пуансона;
- износ заднего угла значительно уменьшается;
- появляется возможность легкой замены головки, что также сокращает материальные издержки;
- скорость работы таблеточного пресса может быть увеличена.

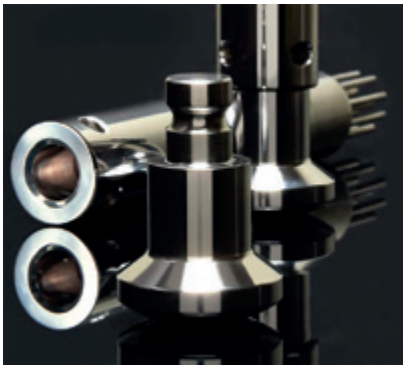


Рисунок 3. Вращающиеся головки пуансонов

Рисунок 4. Колпачки с отверстиями для более легкой очистки

КОЛПАЧКИ С ОТВЕРСТИЯМИ ДЛЯ СБОРНЫХ МНОГОПОЗИЦИОННЫХ ПУАНСОНОВ

Используя колпачки с отверстиями, проводить техническое обслуживание и чистить многопозиционный пуансон можно гораздо проще и быстрее. Пуансон при этом не требует разборки, достаточно просто почистить, сполоснуть и просушить.

Колпачки имеют 3–4 боковых отверстия, выполненных машинным способом. Через эти отверстия моющие растворы могут легко проникать внутрь и выливаться обратно.

Для просушки можно использовать сжатый воздух.

Рисунок 5. Колпачки с отверстиями

СЕГМЕНТЫ МАТРИЦЫ С НЕСКОЛЬКИМИ ОТВЕРСТИЯМИ

Качество + Прецизионность = Повышенная производительность и экономичность

Сегменты с несколькими отверстиями позволяют менять конфигурации оборудования путем увеличения количества станций в прессе, что в результате приводит к увеличению объема производства, так как позволяет прессовать большее количество таблеток.

Сегменты матрицы заменяют обычные матричные столы, матрицы и штамповые замки для специально изготовленных прессов. Когда многонасадочные пуансоны комбинируются с матричными сегментами с несколькими отверстиями, объемы производства таблеток резко возрастают. Также для продления ресурса износостойкости и срока службы пресс-инструмента предлагается вариант с вольфрам-карбидной, а также высокотехнологичной керамической облицовкой сегментов.

Рисунок 6. Сегмент матрицы с несколькими отверстиями

СРЕДСТВО ПРОВЕРКИ ПРОДУКЦИИ НА СООТВЕТСТВИЕ СТАНДАРТУ

Если система отбраковки продукции не прошла калибровку, можно столкнуться с проблемой снижения производительности. Но имеется простой способ проверки вашей системы отбраковки. Выполнить эту проверку можно самим, без использования дорогостоящих сторонних услуг.

Для проведения процедуры валидации системы отбраковки на таблеточном прессе используется специально разработанный инструмент Multi-tip Reject Verification Tool (инструмент проверки системы отбраковки на прессе с многопозиционным пуансоном). Многопозиционный верхний пуансон, который используется системой отбраковки, изначально спроектирован так, чтобы быть короче или длиннее всех остальных установленных пуансонов. Та-

ким образом моделируется ситуация с таблетками, имеющими массу выше или ниже установленной нормы. Эти таблетки, характеристики которых выходят за рамки спецификации, служат триггером для системы отбраковки, которая направляет их в желоб для сброса дефектных таблеток. Эти таблетки легко узнать по маркировке X или RT, которую ставит на них специальное устройство.

Рисунок 7. Инструмент верификации Multi-Tip Reject Verification Tool

КОМПЛЕКТЫ ДЛЯ ТЕХНИЧЕСКОГО ОБСЛУЖИВАНИЯ И РЕМОНТА СБОРНЫХ ПУАНСОНОВ

В комплекты для обслуживания входит все специальное оборудование, необходимое для правильного выполнения демонтажа и сборки многопозиционного пресс-инструмента, упрощения процесса наладки и экономии средств.

Сборные многонасадочные пуансоны состоят из нескольких частей, включая наконечники, колпачки, корпуса и в некоторых конфигурациях вращающиеся или заменяемые головки. Колпачки и головки закреплены с помощью винтовых пружинных штифтов, которые предназначены для придания конструкции прочности и удерживающей способности. Их снятие и замена без использования надлежащего оборудования может вызывать определенные сложности.

На рисунке 8 представлен один из трех комплектов для технического обслуживания и ремонта. Инструменты комплекта для ТО подбираются индивидуально в зависимости от конфигурации конкретного оборудования. В комплект входит обучающий диск DVD.

СТАЛЬ NATOLI

Выбор стали имеет решающее значение для корректного и успешного выполнения технологического процесса. Использование самой твердой стали не всегда является лучшим выбором, поскольку твердость не всегда может обеспечить максимальную прочность на разрыв, которая может потребоваться при применении многонасадочной оснастки.

Поскольку в производстве Natoli применяется самый большой набор разнообразных марок инструмен-

Рисунок 8. Комплект для технического обслуживания сборных пуансонов

тальной стали, в компании знают, какой материал выбрать для изготовления пресс-инструментов, чтобы они наилучшим образом удовлетворяли требованиям заказчика.

Таблица 2.

Карта требований Natoli к качеству стали

Тип стали	Марка стали	Тип оснастки		Твердость Rockwell C	Преимущества			
		Пуансон	Матрица		Износостойкость	Улучшенная вязкость	Коррозионная стойкость	Общая прочность
S-7	Стандарт	•	–	56–58	–	•	–	•
S-1	Стандарт	•	–	56–58	–	•	–	•
3Ni	Стандарт	•	–	53–55	–	•	–	•
DC-53	Премиум	•	–	59–61	•	•	•	•
A-2	Премиум	•	•	58–60	–	•	–	–
M-2	Премиум	•	•	58–60	–	•	–	–
K-340	Премиум	•	–	57–59	•	•	–	•
D-3	Премиум	–	•	59–61	•	•	–	•
440C	Премиум	•	•	54–56	–	–	•	–
M-340	Премиум	•	•	56–58	•	–	•	–
PM-3V	Специальная	•	–	56–58	•	•	–	•
PM-9V	Специальная	•	•	53–55	•	•	–	–
PM-10V	Специальная	•	•	58–60	•	•	–	–
PM-15V	Специальная	–	•	59–61	•	•	–	–
PM-M4	Специальная	•	–	60–62	•	•	–	–

Примечание: The ASTM E45 International Steel Testing Procedure – это метод испытаний, используемый для определения качества и чистоты инструментальной стали.

Вся сталь Natoli проверяется на качество и чистоту, а затем измеряется в соответствии со строжайшими стандартами.

На своих складах компания Natoli держит годовой запас 16 стандартных марок инструментальной стали:

- Стандартная марка: S-7, S-1, 3Ni.
- Марка премиум-класса: D-2, DC-53, A-2, M-2, K-340, D-3.
- Премиум-класс, отличная устойчивость к коррозии / высокое содержание хрома: 440C, M-340.
- Премиум-класс, специализированная марка: PM-3V, PM-9V, PM-10V, PM-15V, PM-M4.

Процедуры контроля качества стали разработаны для обеспечения максимального срока службы инструмента.

ПОКРЫТИЯ СТАЛИ

Многие распространенные проблемы, возникающие в процессе прессования таблеток, например такие, как прилипание и дефекты поверхности, могут быть сведены к минимуму посредством применения специального покрытия инструментальной оснастки. Natoli разработала много вариантов покрытия, применение которых базируется на рецептуре прессуемых таблеток. Покрытия способствуют повышению качества и эффективности процесса изготовления таблеток.

Для увеличиния объема выпуска продукции или повышения износостойкости компания Natoli предлагает различные варианты покрытия. Например, покрытие из хрома или нитрида хрома уменьшит степень прилипания порошков к поверхности пуансона. Также компания предлагает собственное запатентованное покрытие Natoli Ultracoat, которое превосходит покрытие из хрома, нанесенного на поверхность стали гальваническим способом. Данный тип покрытия улучшает износостойкость и смазывающую способность пуансона, что снижает уровень прилипания порошка к инструменту и делает его более долговечным.

ЧАСТО ЗАДАВАЕМЫЕ ВОПРОСЫ

В. Все ли пуансоны изготавливаются Natoli по индивидуальным заказам?

О. Да. Весь пресс-инструмент изготавливается в соответствии с точными спецификациями заказчика.

В. Какой размер имеет самая маленькая насадка?

О. 1,0 мм – для круглого укороченного пуансона сборного типа, 5 мм – для круглого цельного многопозиционного пуансона. По специальному запросу может быть изготовлена оснастка с меньшими размерами. Возможности изготовления фигурной оснастки необходимо сначала оценить.

В. Сколько насадок может изготавливаться для одного пуансона?

О. Количество насадок зависит от размера и формы таблетки, размера инструмента, конфигурации многонасадочного пуансона и таких характеристик, как текучесть и прессуемость порошка.

В. Можно ли восстановить и отремонтировать многонасадочный пресс-инструмент?

О. В большинстве случаев, да. Сначала проводится тщательный осмотр и оценка, а затем определяется, можно ли отремонтировать инструмент или требуется заменить некоторые компоненты. При повреждении наконечника на цельном пуансоне обычно требуется замена всего пуансона полностью.

В. Как можно почистить многонасадочные пуансоны?

О. Рекомендуется использовать ультразвуковую систему очистки Natoli Ultrasonic Cleaning System вместе с соответствующим раствором для очистки и балансом pH, чтобы не допустить возможного обесцвечивания. Важное значение имеет немедленная и тщательная сушка. Отверстия колпачков пропускают внутрь чистящие растворы и способствуют полноценному высушиванию пресс-инструмента.

В. Как нужно полировать многонасадочные пуансоны?

О. Можно сделать автоматическую полировку, но этот способ может не восстановить нужный торец пуансона. Пуансоны также можно полировать специальной пастой и тонкими кисточками, чтобы получить более предсказуемый и точный результат. Предпочтительнее выполнять полировку на суконном круге, но данный метод требует специального обучения.

В. Какое максимальное усилие допустимо применять к многопозиционному пресс-инструменту?

О. Теоретически можно применить формулу, по которой усилие, применяемое к однонопозиционному инструменту, умножают на количество насадок и корректируют полученное значение, применяя коэффициент надежности, который учитывает ресурс инструмента по износу.

В. Нужно ли настраивать многопозиционный пресс-инструмент другим способом по сравнению с фигурным пуансоном в таблеточном прессе?

О. Нет. Процесс установки этих двух типов пуансонов совершенно одинаковый. Тем не менее рекомендуется использовать установочный набор инструментов Natoli Press Set-Up Toolbox, в котором есть специальные инструменты, предназначенные для пресса именно вашего бренда. Использование правильных инструментов сокращает время установки и наладки и предотвращает повреждение прессов и инструментов.

В. Турель на моем прессе изношена. Что делать?

О. Воспользуйтесь набором инструментов Natoli's Certified Inspection Kit, чтобы проверить, соответствует ли турель спецификациям производителя.

Все изделия компании Natoli производятся в США.

ПРИМЕНЕНИЕ БЫСТРОЙ ЦЕНТРОБЕЖНОЙ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (FCPC) ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ. ПРИМЕР МАСШТАБИРОВАНИЯ ПРОЦЕССА

АВТОРЫ

Н. Ксинос,

Kromaton (RousseletRobatel), Анноне, Франция

Н. Алигианис,
Л. Скальцунис,

Афинский университет, кафедра фармакогнозии

ВВЕДЕНИЕ

В настоящей статье представлены три практических примера выделения биологически активных веществ и спиртового экстракта горечавки желтой, сквалена и синтетических пептидов с помощью хроматографических систем RousseletRobatel и KROMATON. Все опыты включали помимо R&D-процесса еще и процесс масштабирования.

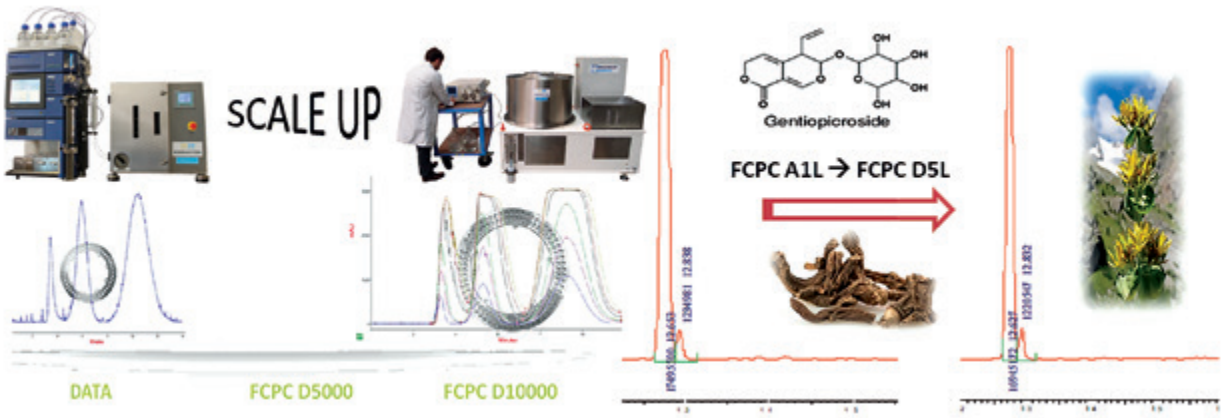
ОЧИСТКА ГЕНТИОПИКРОЗИДА ОТ ЭКСТРАКТА КОРНЯ ГОРЕЧАВКИ ЖЕЛТОЙ С ПОМОЩЬЮ БЫСТРОГО ЦЕНТРОБЕЖНОГО РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОГО ХРОМАТОГРАФА (FCPC™). МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА

Было выявлено, что гентиопикрозид (секоиридоид, в большом количестве содержащийся в корне горечавки желтой) оказывает фармакологическое действие на различные заболевания. Фитотерапевтические препараты, востребованные на рынке, часто содержат гентиопикрозид. Быстрая центробежная распределительная хроматография (FCPC™) входит в число самых современных, продуктивных и экономичных технологий выделения веществ. Технология не предполагает использования твердого наполнителя, который нуждается в удалении, полностью исключается необратимая абсорбция пробы. Также метод обладает более высокой производительностью по сравнению с препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией (HPLC).

Материалы и результаты

Для очистки гентиопикрозида от спиртового экстракта горечавки желтой, содержащего 11% гентиопикрозида, использовался препаративный быстрый центробежный распределительный хроматограф с ротором на 1 л. Система FCPC A была подключена к встроенной периферийной системе, состоящей из насоса для подачи элюента

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ



(250 мл/мин), автоматического впускного клапана, УФ/UV-детектора (200–600 нм), фракционного коллектора (192 колонки), программного обеспечения и встроенного ПК для автоматизированного управления. Гентиопикрозид определяли при 254 нм, а последующий количественный анализ проводили с помощью HPLC-UV. Чистота и степень извлечения гентиопикрозида составили 95,6 и 87% за короткий период разделения и с учетом приемлемого расхода растворителя, что позволило существенно повысить эффективность процесса. На следующем этапе масштабирование процесса осуществлялось на полупромышленном FCPC™ (с ротором на 5 л), оснащенном подобной встроенной периферийной системой. Результаты были оптимизированы путем масштабирования (чистота и степень извлечения гентиопикрозида составили 95,1% и 89% соответственно).

Параметры процесса и результаты FCPC A 1 л

Скорость элюирования	50 мл/мин
Скорость вращения ротора	1200 об/мин
Система растворителей	EtOAc: i-PrOH: H20 7/3/10
Объем вводимой пробы	15 г
Чистота	95,6%
Степень извлечения	87%
Расход растворителя	1,3 л
Период разделения	46 мин

Параметры и результаты процесса FCPC D 5 л

Скорость элюирования	250 мл/мин
Скорость вращения	1000 об/мин
Система растворителей	EtOAc: i-PrOH: H20 7/3/10
Объем вводимой пробы	90 г
Чистота	95,1%
Степень извлечения	89%
Расход растворителя	7,8 л
Период разделения	52 мин

ОЧИСТКА СКВАЛЕНА ОТ РАФИНИРОВАННОГО ОЛИВКОВОГО МАСЛА С ПОМОЩЬЮ БЫСТРОГО ЦЕНТРОБЕЖНОГО РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОГО ХРОМАТОГРАФА (FCPC™)

Сквален – важное химическое вещество, входящее в состав лекарственных препаратов, пищевых добавок и косметических средств. До недавнего времени основным источником сквалена был жир печени акулы, который богат этим ценным веществом. Однако использование такого неустойчивого источника для получения сквалена все меньше и меньше принимается множеством регулирующих органов. Таким образом, сейчас изучаются более экологичные и более долгосрочные источники. Оливковое масло и масло семян амаранта входят в число важнейших растительных источников сквалена. Исследуются более современные, эффективные и надежные технологии в целях обеспечения высокого уровня чистоты и выведения веществ во время процесса извлечения и выделения. Быстрая центробежная распределительная хроматография (FCPC™) входит в число самых современных, продуктивных и экономичных технологий выделения веществ. Технология не предполагает использование твердого наполнителя, который нуждается в удалении, полностью исключается необратимая абсорбция пробы, также метод обладает более высокой производительностью по сравнению с препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией (HPLC). FCPC™-метод является универсальным за счет использования неводных двухфазных систем растворителей, особенно в отношении неполярных соединений.

Материалы и результаты

Для очистки сквалена от оливкового масла (рафинированных побочных продуктов), содержащего 13% сквалена, использовался препаративный быстрый центробежный распределительный хроматограф с ротором на 1 л. Система FCPC была подключена к встроенной периферийной системе, состоящей из насо-

са для подачи элюента (250 мл/мин), автоматического впускного клапана, УФ/UV-детектора (200–600 нм), фракционного коллектора (192 колонки), программного обеспечения и встроенного ПК для автоматизированного управления. Определение сквалена проводилось при 218 нм, а последующий количественный анализ проводили с помощью газового хроматографа. Чистота и степень извлечения составили >95% и >90% за короткий период разделения и с учетом приемлемого расхода растворителя, что свидетельствует в пользу экономической эффективности процесса.

Параметры процесса

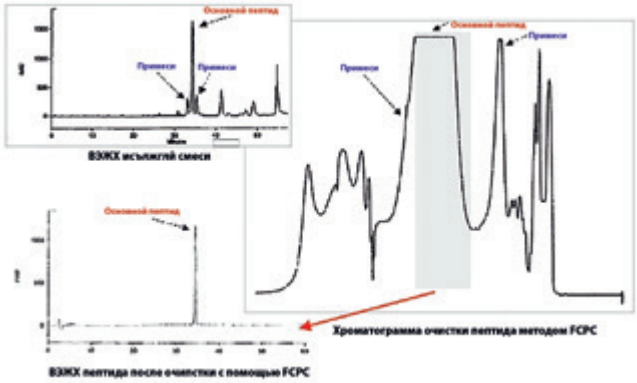
Скорость элюирования	50 мл/мин
Скорость вращения ротора	1200 об/мин
Система растворителей	Hept/ACN/BuOH 1,8:1,4:0,7
Объем вводимой пробы	15 г

Результаты

Чистота	>95%
Степень извлечения	>90%
Расход растворителя	3 л
Период разделения	34 мин

МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ОЧИСТКИ ПЕПТИДА С ПОМОЩЬЮ ЛАБОРАТОРНОГО И ПОЛУПРОМЫШЛЕННОГО БЫСТРОГО ЦЕНТРОБЕЖНОГО РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОГО ХРОМАТОГРАФА

Биологически активные синтетические пептиды оказывают различное терапевтическое действие, например антиоксидантное, противовоспалительное, антиВИЧ-действие и т.п. Процесс очистки пептидов от синтетических смесей может оказаться довольно сложным и затратным. Для повышения эффективности производства, степени извлечения и чистоты пептитодов в FCPC™ может применятся двухфазный растворитель бутанол/вода. В данной статье рассматривается масштабирование процесса очистки пептидов с помощью лабораторного FCPC™ A200, препаративного FCPC™ A1000 и полупромышленного FCPC™ D5000. Определение производилось с помощью детектора UV/Vis на 220 нм. Фракционный анализ на HPLC осуществляется на колонке C18.



Материалы и результаты

Объем колонки	FCPC 200 мл	FCPC 1000 мл	FCPC 5000 мл
Исходная смесь	Синтетическая смесь, содержащая 23% (w/w) пептидов		
Масштабирование	X1	Масштабирование X5	Масштабирование X25
Количество вводимого растворителя	1 г	5 г	25 г
Расход растворителя	0,7 л	3,2 л	19 л
Общий вес выделенного пептида	220 мг (95%)	1050 мг (91%)	5132 мг (90%)
% (w/w) пептида с чистотой >90%	74,5%	84,5%	85%
% (w/w) пептида с чистотой >95%	32%	49%	77%

Результаты масштабирования оказались почти линейными в части потребления растворителя и производительности, а результаты в части извлечения были затем оптимизированы на полупромышленном хроматографе.

FCPC A – универсальная установка: от аналитической до препаративной шкалы (настольная): сменные роторы объёмом от 50 мл до 1000 мл для производства в мультиграммах

FCPC C – аналитический хроматограф для разработки методики и исследований: сменные роторы объёмом 25 мл и 50 мл

FCPC D – хроматограф объёмом 5 или 10 л для получения больших объемов продукта (в кг): встроенное периферийное оборудование (насос, клапан-дозатор, детектор UV/ELSD, система сбора фракций, встроенное программное обеспечение для автоматизированного управления)

ROUSSELET ROBATEL

KROMATON

ЦЕЛОСТНОСТЬ ДАННЫХ И ЭФФЕКТИВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ДАННЫМИ С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ Q-DOC

Материал предоставлен компанией SOTAX

ВВЕДЕНИЕ

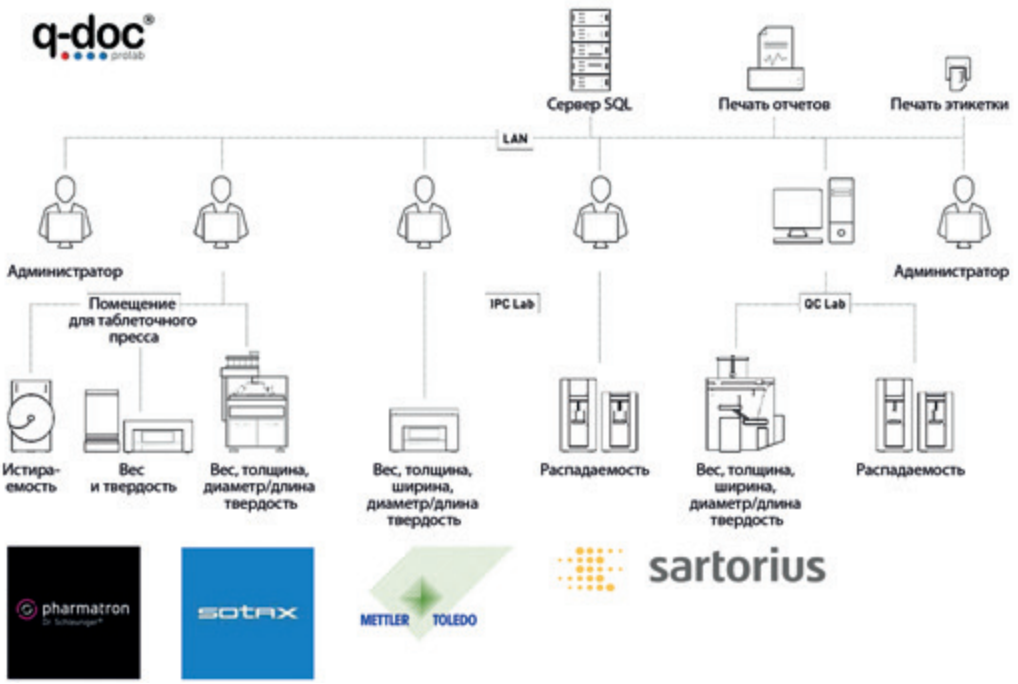
Целостность данных часто сводится к требованиям нормативной документации. Наряду с соответствием нормативным требованиям особое значение также имеет эффективность функционирования. Эти два фактора практически равнозначны в современных условиях. В дополнение к обычным рабочим станциям с одним ПК сетевое окружение позволяет реализовать рациональные решения для целых подразделений, от отдела исследований и научных разработок до отделов внутрипроизводственного контроля (IPC) и контроля качества (QC).

Все приборы от SOTAX и Dr. Schleuniger® Pharmatron, предназначенные для физических испытаний, а также дополнительное, сопутствующее лабораторное оборудование, такое как аналитические весы, толщиномеры и анализаторы влажности, могут быть объединены в сеть с одним программным обеспечением, посредством которого будет организован автоматический сбор, анализ и оценка результатов измерений.

Целостность данных обеспечивается автоматическим протоколированием данных измерений. При этом отпадает необходимость выполнения дополнительной работы по вводу / протоколированию данных и наблюдается существенное сокращение трудоемкого (и не гарантирующего отсутствие ошибок) ручного процесса сбора и оценки результатов измерений, выполнения испытаний для целой серии образцов, что значительно повышает общую производительность.

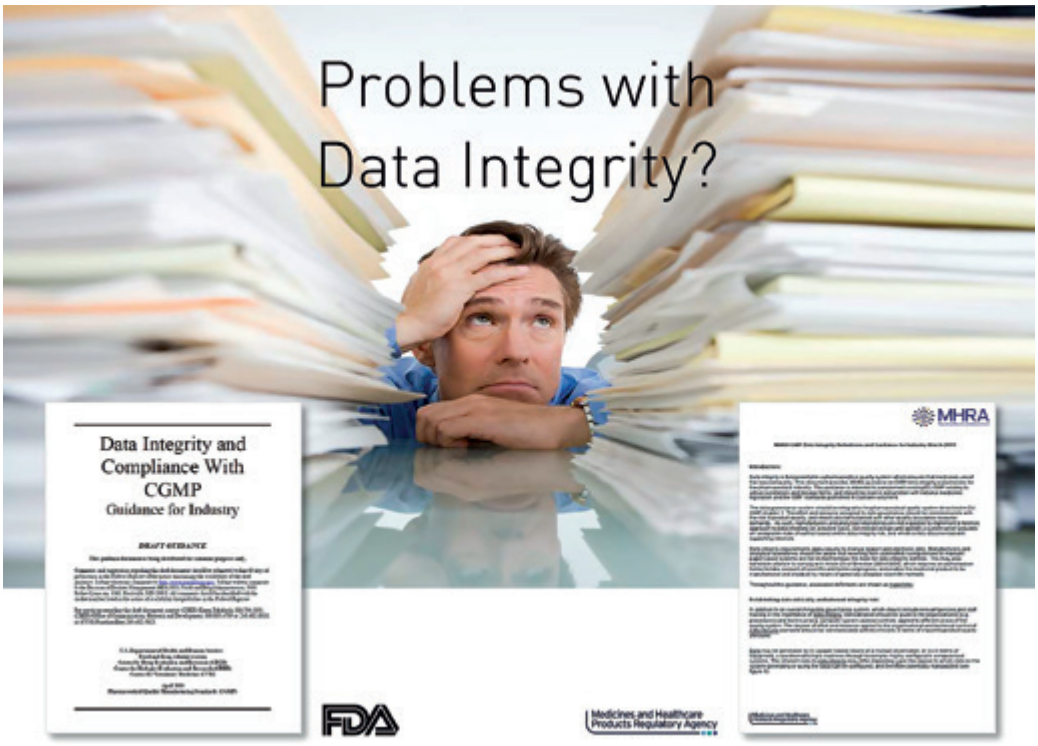
С точки зрения самого процесса целостность данных является побочным эффектом эффективного управления данными, которое осуществляется с помощью программного обеспечения q-doc.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ



Протоколирование и оценка результатов всех проведенных с серией (или партией) образцов испытаний, многократная запись данных и/или ручной перенос данных в другую систему часто представляют собой обычную практику. Очевидно, что при такой нерациональной организации процесса при записи и переносе собранных данных могут появиться ошибки. Так почему же такая практика до сих пор широко применяется? Принятие более эффективных способов управления процессами (и связанные с ними затраты) часто тормозится или вообще избегается из-за проблем, возникающих по причине несовместимости разнородных автоматизированных системных архитектур и уже отлаженных процессов. Кроме того, инициативы такого рода, как правило, невозможно внедрить в практику так быстро, как бы этого хотелось.

Но проблема все равно есть, и она становится все более и более актуальной. В дополнение к необходимости снижения затрат и противостоянию растущей конкуренции, заключающейся в применении более рациональных и сберегающих технологий, FDA и другие регулирующие органы объявили о новых нор-



мативных требованиях, касающихся вопроса целостности данных (и проведении контрольных проверок, выходящих за рамки правила 21 CFR, часть 11). Выпущены соответствующие руководящие принципы и рекомендации, такие как «Целостность данных и соответствие требованиям cGMP». FDA опубликовало этот нормативный документ в апреле 2016 года.

Благодаря модульной системной архитектуре программа q-doc позволяет поэтапно подойти к проблеме целостности данных и решить ее полностью в применении к конкретному технологическому процессу. Дополнительные рабочие станции, инструменты или функции, такие как импорт данных (например, для автоматической регистрации новой серии), а также автоматический экспорт данных [например, экспорт в систему контроля над лабораторной информацией (LIMS) всех подлежащих оценке данных, который проводится при завершении работы с серией], могут быть в любое время легко реализованы с помощью дополнительных разрешений, драйверов для стандартизированных приборов и настраиваемых модулей.

УСТРОЙСТВО-НЕЗАВИСИМЫЙ – ЧТО ЭТО?

Основным преимуществом программного обеспечения q-doc является то, что подбор методов всегда осуществляется независимо от устройства. На первый взгляд, преимущество иногда не является очевидным, и возникает вопрос «почему считается выгодным отделять метод тестирования и связанные с ним тестовые классы от конкретного устройства.

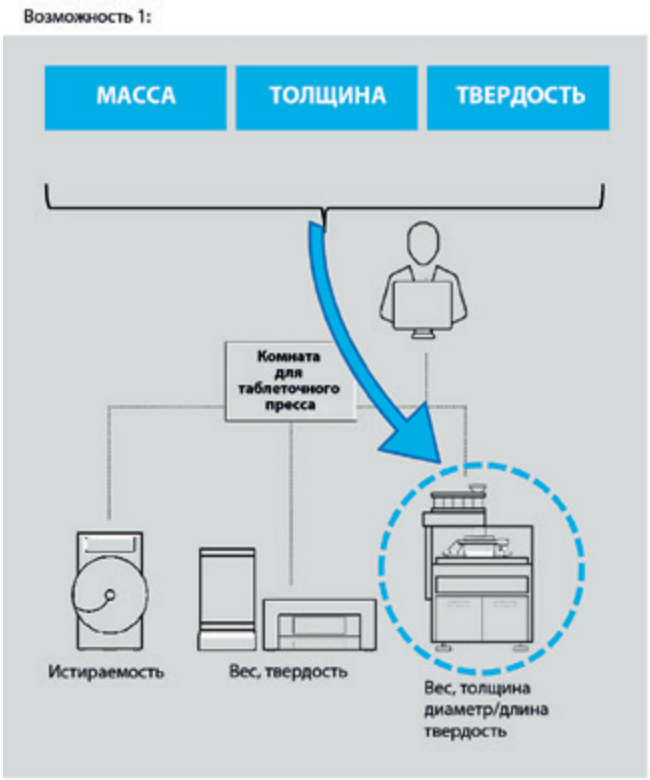
Почему выбираются устройство-независимые методы?

На первом этапе продукты и методы испытаний для продукта определяются без учета того, на каком типе прибора / модели будет позже выполнено испытание (например, метод с тестовыми классами «масса, толщина, твердость»). Решение о том, какой прибор должен использоваться, принимается непосредственно перед началом испытания.

Пример. Должен быть выполнен метод с тестовыми классами «Масса, толщина, твердость». В протокол внесено соответствующее аналитическое испытание, выполняемое для серии. В рамках сетевого окружения (или на рабочей станции с несколькими подключенными устройствами) теперь можно решить, какие приборы должны использоваться для выполнения испытания. При желании можно «разбить» тестовые классы на несколько приборов.

Эта вариативность имеет несколько преимуществ.

- Методы являются универсальными, то есть могут использоваться на любом подходящем приборе (прибор должен быть пригодным для выполнения испытания с учетом хотя бы 1 из требуемых тестовых классов).



- Время, требуемое на испытание, оптимизируется путем гибкого подхода в назначении заданий по выполнению испытания с учетом свободных на текущий момент приборов.
- Повторные испытания могут выполняться на другом приборе без необходимости программирования дополнительного и необязательного метода.
- Многоцелевое использование лабораторных весов: дополнительно к классическому определению массы (вес), весы также могут использоваться для автоматического протоколирования других тестовых классов (например, истираемости и/или насыпного объема утряски), для которых тоже требуется измерение веса.

Что может определить метод?

Метод определяет, какие тестовые классы должны быть проверены на соответствие требованиям / спецификациям. Следовательно, для одного продукта может потребоваться несколько методов (например, стандартный метод и метод повторной проверки). При регистрации нового аналитического испытания тестовые классы, содержащиеся в выбранном для анализа методе, регистрируются как исполняемые в независимом от устройства порядке.

Для чего нужны тестовые классы?

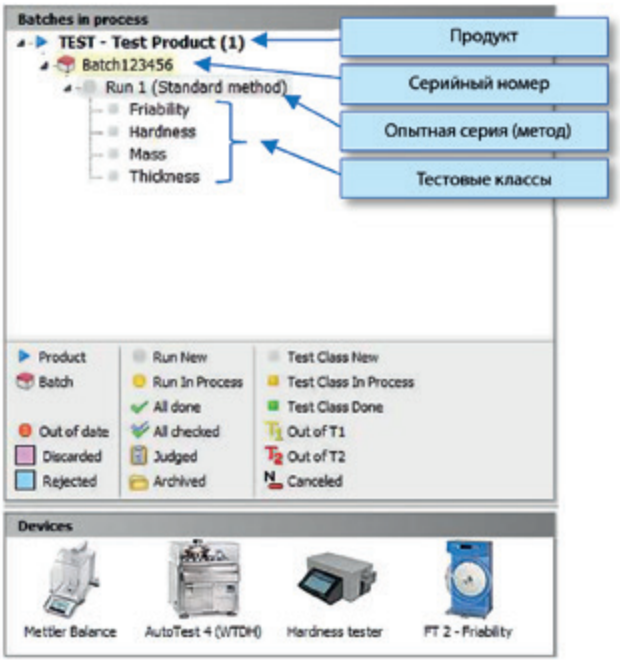
В пользовательских интерфейсах приборов тестовые классы часто упоминаются как «параметры». Независимая от устройства базовая структура q-doc позволяет использовать тестовые классы, составляющие метод, самым оптимальным способом: в зависимости от индивидуальных требований заказчика, которые он предъявляет к процессу.

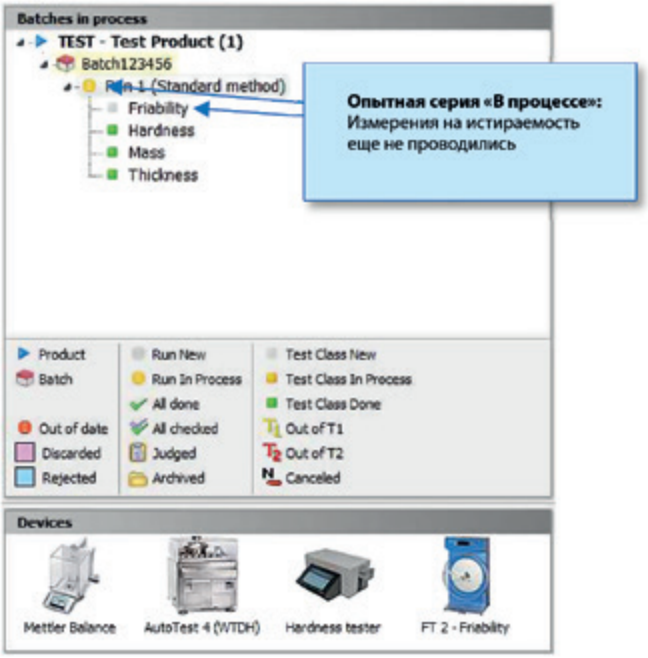
Пример. СОП требует, чтобы тестовые классы «масса, толщина, твердость, «истираемость» проверялись каждые 20 мин. Поскольку нет одного прибора, который может применяться для всех тестовых классов, обычное программное обеспечение, созданное для устройств, будет, как правило, выполнять испытание с применением двух отдельных методов:

- метод 1: «Масса, толщина, твердость»;
- метод 2: «Истираемость».

Затем оператор зарегистрирует два (2) отдельных аналитических испытания, проведет их и получит два (2) отдельных протокола испытаний. Позднее они снова будут объединены (например, в протокол испытаний серии). В программе q-doc такой способ выполнения испытания тоже возможен. Метод также может быть просто определен в соответствии с СОП: метод 1: «Масса, толщина, твердость, истираемость».

В ежедневной практике необходимо зарегистрировать только одно (1) испытание, которое может затем быть проведено оператором на разных приборах. Результаты измерений записываются в режиме реального времени. Интуитивно понятные значки, присутствующие в пользовательском интерфейсе («Job Center»), непосредственным образом показывают, был ли завершен анализ по всем тестовым классам, есть ли незавершенные измерения и соответствуют ли результаты исследования требуемым спецификациям.





Всегда ли все инструменты доступны для аналитического испытания?

Приложение q-doc автоматически гарантирует, что выбираются только те инструменты (приборы), которые могут выполнить анализ минимум по одному (1) тестовому классу, который требуется в соответствии с методом. В случае если конкретный продукт всегда тестируется с помощью специального прибора, программный модуль q-doc под названием Workgroup (рабочая группа) позволяет ограничиться использованием определенной рабочей станции ПК, прибором и/или группой пользователей. Имеется и другая возможность, особенно в отделах внутрипроизводственного контроля. Можно выделить отдельную рабочую группу для каждой комнаты, где проводится прессование. Если продукты не всегда изготавливаются на одном и том же таблеточном прессе, также можно зарегистрировать новую серию для конкретной рабочей группы вместо фиксированного назначения испытания продукта одной или нескольким рабочим группам.

ПРОТОКОЛИРОВАНИЕ ПРОТИВ АНАЛИТИЧЕСКОГО ОТЧЕТА

Автоматический сбор и запись данных в системе, соответствующей требованиям стандарта 21 CFR, Part 11, позволяют протоколировать, анализировать и оценивать все тесты, которые были выполнены с серией (или с партией) в одном программном обеспечении. Преимущества довольно значительны: все индивидуальные тесты могут оцениваться автоматически, и при этом можно очень легко узнать, какие испытания уже были выполнены и были ли они успешными (статус «PASSED»). В случае если испытание не имело успеха и получило статус «FAILED», q-doc может немедленно (и автоматически) зарегистрировать одно или несколько повторных испытаний в соответствии с критериями оценки годности, которые определены в СОП клиента.

Протоколирование и оценка аналитического испытания

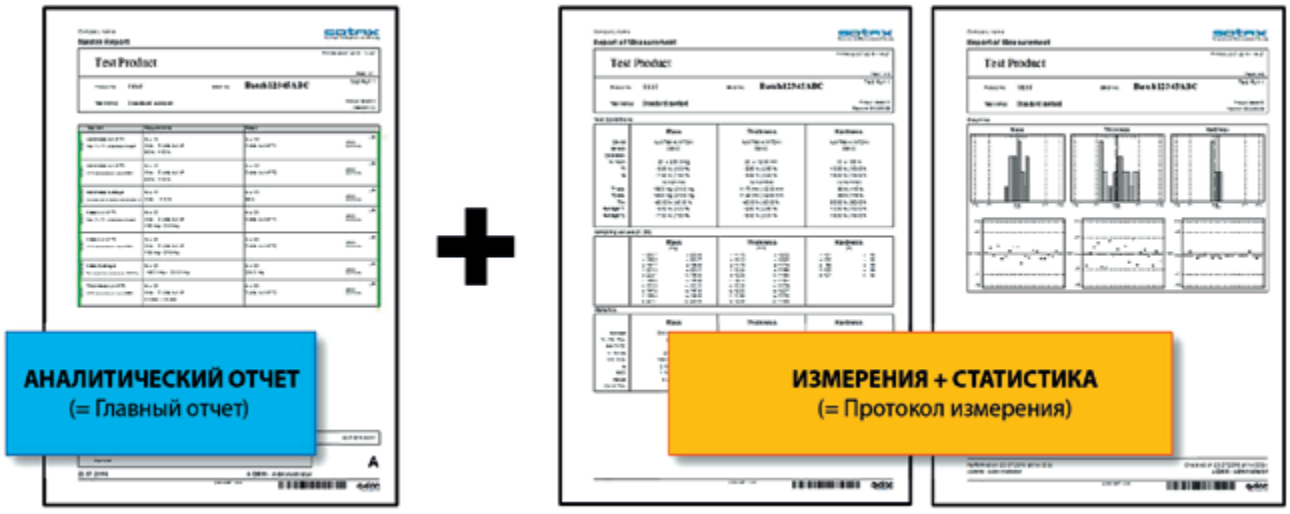
Запись измерений (включая статистику) может обрабатываться в q-doc отдельно от оценки результатов. Для каждого аналитического испытания могут быть созданы два (2) разных типа дополняющих друг друга протоколов:

- **Протокол измерения (измерения + статистика)**

  Запись всех индивидуальных измерений и статистика, учитывающая количество нарушений предельных величин (T1/T2/Tinv) для каждого аналитического испытания по каждому тестовому классу (например, «Масса, толщина, твердость»). Все нарушения предельных величин имеют четкое обозначение для быстрой идентификации. В этот протокол измерений (Measurement Report) обычно не включается оценка, то есть не указывается, приводит ли число автоматически обнаруженных нарушений предельных значений к получению статуса «PASS» (успешно) или «FAIL» (неуспешно).

- **Главный отчет (оценка + выпуск)**

  Главный отчет, он же мастер-отчет, является титульной страницей протокола измерений и наглядно представляет наиболее важные аспекты аналитического испытания. Здесь можно сразу увидеть, были ли проблемы во время выполнения испытания или нет. Другими словами, «мастер-отчет» – это оценка «протокола измерений». Он показывает, были ли удовлетворены все соответствующие критерии оценки годности при выполнении анализа. Если да, то испытание считается пройденными (статус «PASSED»). Если же нет, то испытание не пройдено (статус «FAILED»). Как и в некоторых стандартных операционных процедурах (СОПах), разработанных клиентами, критерии оценки годности могут охватывать гораздо боль-



шие рамки, чем просто соблюдение допустимых значений, а программное обеспечение q-doc позволяет программировать критерии оценки с учетом отдельных СОПов.

Имея под рукой главный отчет, больше нет необходимости смотреть полную статистику или даже отдельные результаты измерений, чтобы решить, успешно ли было пройдено аналитическое испытание и были ли удовлетворены критерии оценки годности. В главном отчете сразу отражен результат анализа и его оценка – PASSED (анализ пройден) или FAILED (анализ не пройден).

Пример. Критерии оценки годности (исследуемые параметры в q-doc).

- Средние значения веса, толщины, твердости находятся в указанном диапазоне.
- Нет нарушений для T2 по критериям веса, толщины, твердости.
- Было испытано требуемое минимальное количество образцов (N).
- Оператор провел дополнительную визуальную проверку (физический осмотр) 5 образцов.

Test Item	Requirements	Result	
T2 Average Weight	N = 10: 1.051 - 1.115 g	N = 10: 1.084 g	(P)
Weight out of T2	N = 10: Max. 0 pcs. out of 1.029 g - 1.137 g	N = 10: 0 pcs. out of T2	(P)
T2 Average Hardness	N = 10: 165 - 225 N	N = 10: 188 N	(P)
Hardness out of T2	N = 10: Max. 0 pcs. less than 135 N	N = 10: 0 pcs. less than T2	(P)
T2 Average Thickness	N = 10: 7.47 - 7.94 mm	N = 10: 7.71 mm	(P)
Thickness out of T2	N = 10: Max. 0 pcs. out of 7.47 mm - 7.94 mm	N = 10: 0 pcs. out of T2	(P)
Physical Examination	N = 5: Tablets Debossed with 2DE logo on one side Color: white to off-white, Shape: Oblong (bicon-ex)	complies	P

В этом примере все критерии оценки годности, применявшиеся к образцам в ходе аналитического испытания, были удовлетворены. Они автоматически отмечены зеленым цветом и получили оценку **(P)**, то есть «PASS» – анализ пройден. Отдельные измерения (они отображены протоколе измерений Measurement Report) тоже играют роль в принятии решения о выпуске, но для самого решения важно знать, было ли соответствие критериям оценки годности (исследуемые параметры) или нет.

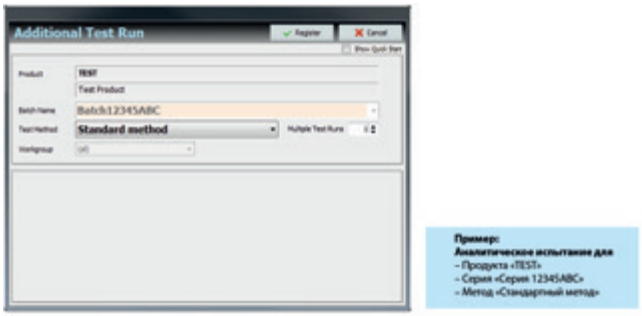
Если критерии оценки годности не были удовлетворены, анализ автоматически получает оценку **(F)**, то есть «FAILED» – анализ не пройден. Пометка делается красным цветом. Протокол измерения необходим для продолжения испытания и/или для выполнения действий, таких как исследование причин выхода результатов контроля за установленные пределы. Функция детализации данных в приложении q-doc позволяет беспрепятственно перейти из главного отчета к соответствующему протоколу измерений.

Test Item	Requirements	Result	
T2 Average Weight	N = 10: 1.051 - 1.115 g	N = 10: 1.104 g	(P)
Weight out of T2	N = 10: Max. 0 pcs. out of 1.029 g - 1.137 g	N = 10: 1 pcs. out of T2	(P)
T2 Average Weight Re-test #1	N = 10: 1.051 - 1.115 g	N = 10: 1.082 g	(P)
Weight out of T2 Re-test #1	N = 10: Max. 0 pcs. out of 1.029 g - 1.137 g	N = 10: 0 pcs. out of T2	(P)
T2 Average Weight Re-test #2	N = 10: 1.051 - 1.115 g	N = 10: 1.080 g	(P)

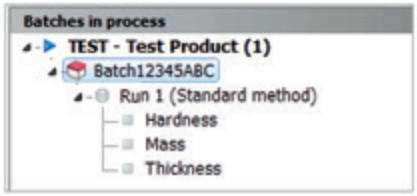
Пошаговый пример

Следующий пример служит показателем того, как поэтапно выполнить аналитическое испытание с использованием программы q-doc, включая протоколирование и оценку результатов.

1. Зарегистрируйте новый анализ



2. Новое аналитическое испытание отображается в разделе «Job Center» (статус «open» – открыто)



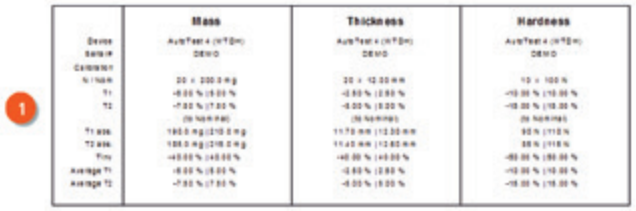
3. Оператор проводит испытание / выполняет требуемое количество (фактических) измерений.

Пример. Аналитические испытания по классам «масса, толщина, твердость», выполняемые с помощью автоматической системы испытаний для таблеток.

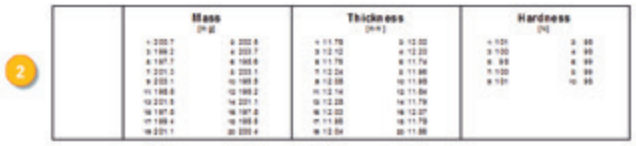
- Протокол измерения (Measurement Report) создается автоматически по окончании испытания.

- В протоколе измерения всегда содержится следующая основная информация:

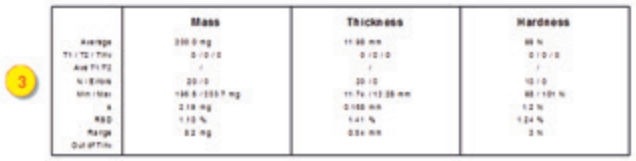
  a) Условия испытания (спецификации для каждого тестового класса)



  b) Измерения

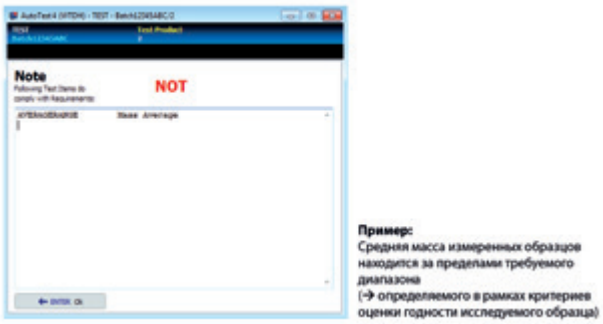


  c) Статистика (→ также показывает количество нарушений допустимых значений)

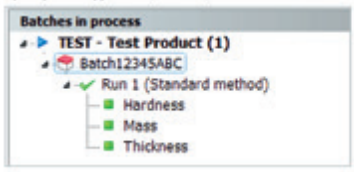


- По завершении испытания оператор автоматически уведомляется обо всех обнаруженных нарушениях предельных значений (T1/T2) и о несоответствиях критериям оценки (для тестовых классов, по которым проводился анализ), в результате которых данное испытание не могло быть успешно завершено. Эта автоматическая предварительная оценка дает возможность быстро принять решение и определиться по поводу способов исправления ситуации и/или автоматически запустить процедуру повторного тестирования в q-doc. Оценка всего испытания в целом (получит ли оно статус «PASSED» или «FAILED») отражается в главном отчете. Причина этого состоит в используемом для исследования методе: для него могут требоваться тестовые классы, для анализа которых потребуется не один (1), а несколько приборов.

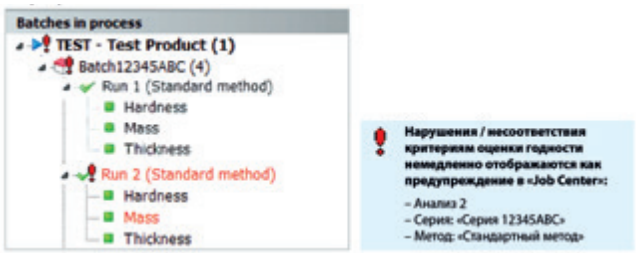
- В разделе «Job Center» сразу видно, были ли допущены предельные нарушения (T1/T2) или найдено несоответствие критериям оценки годности



✓ *Пример*: нет нарушений (Анализ 1).

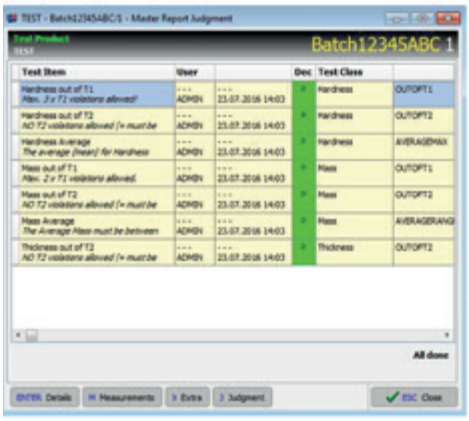


✓! *Пример*: Несоответствия **оценке годности** (Анализ 2) по критерию «масса».



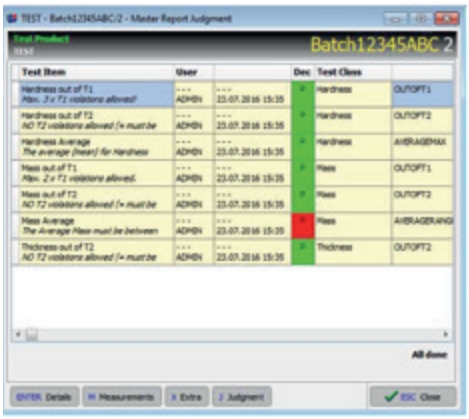
- **Автоматическая оценка** аналитического испытания теперь на проверке у уполномоченного лица. Ее можно выполнить непосредственно в программном обеспечении q-doc. Напечатать (еще неутвержденный) главный отчет (Master Report) можно в любое время, но это не требуется.

✓ *Пример*: нет нарушений (Анализ 1).



Пример:
результаты по всем критериям оценки годности автоматически получили статус «Passed – принято»

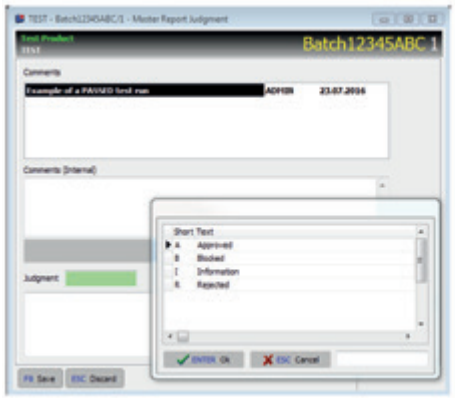
✓**!** *Пример*: Несоответствие оценке годности (Анализ 2) по критерию «масса».



Пример:
по одному (1) критерию оценки годности результату испытания был автоматически присвоен статус «Failed – не прошел»

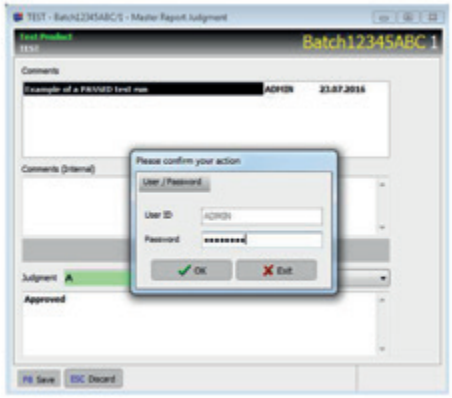
Уполномоченное лицо теперь может утвердить результаты всего испытания непосредственно в q-doc, поставив электронную подпись, или инициировать соответствующие действия в случае несоответствия результатов анализа установленным нормам.

✓ *Пример*: нет нарушений (Анализ 1)



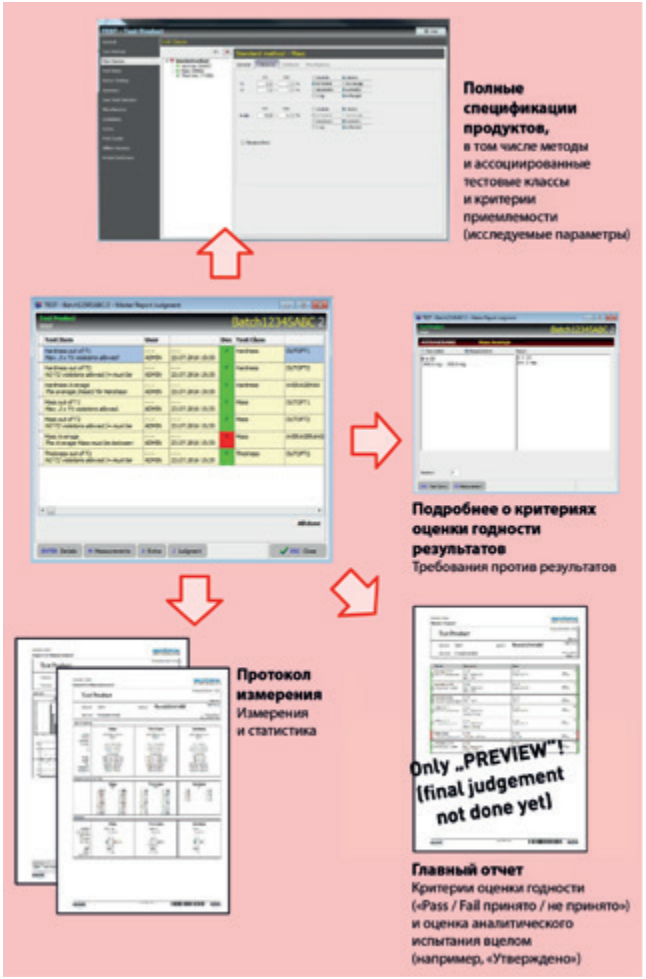
Пример:
все критерии оценки автоматически получили статус «Passed – принято»

Анализ 1 завершается процедурой утверждения с использованием электронной подписи (и получением статуса «*Approved*» – утверждено).



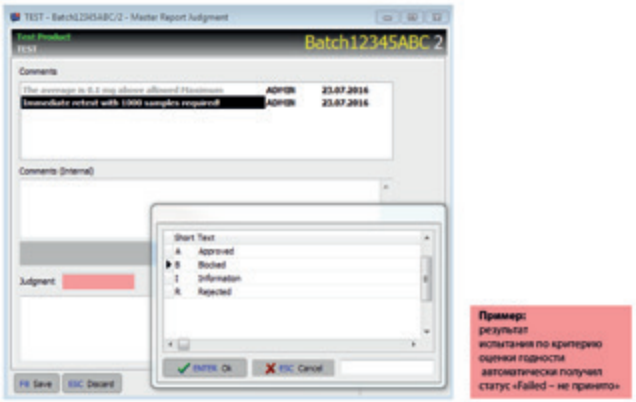
✓**!** *Пример*: Несоответствие **оценке годности** (Анализ 2) по критерию «масса»

В случае возникновения несоответствия перед принятием окончательного решения по результатам аналитического испытания обычно требуется проведение исследования причин выхода результатов контроля за установленные пределы и углубленный анализ сложившейся ситуации. На первом этапе программное обеспечение q-doc предлагает возможность углубленного просмотра подробных данных, а также создания развертки по индивидуальным измерениям и зафиксированным условиям испытаний.

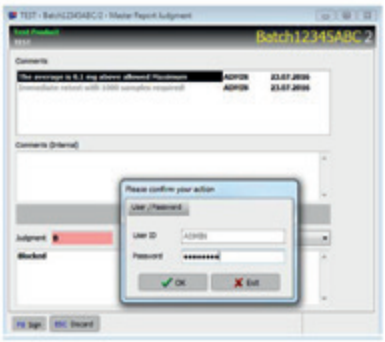


Действия, предпринимаемые в рамках исследования причин выхода результатов контроля за установленные пределы, могут сильно различаться в зависимости от отдельных СОП и значимости нарушения. Таким образом, программное обеспечение q-doc предлагает различные возможности для обработки исключений / нарушений 100% прослеживаемым образом. Ни при каких обстоятельствах данные измерений или записи в контрольном журнале никоим образом не изменяются / не редактируются и не удаляются.

Пример. Если контрольной проверкой установлено, что измерения были недействительными (например, в результате просмотра визуальных доказательств, таких как файлы видеонаблюдения) или имеются доказательства того, что нет дефектного продукта, аналитическое испытание может быть исключено из анализа серии (например, двумя (2) уполномоченными лицами и по принципу «4 глаз» и «двойной электронной подписи» вместе с подробными комментариями/пояснениями и записью в журнале регистрации событий). Аналитическое испытание, включающее все данные измерений, остается полностью доступным и может рассматриваться как забракованное испытание.

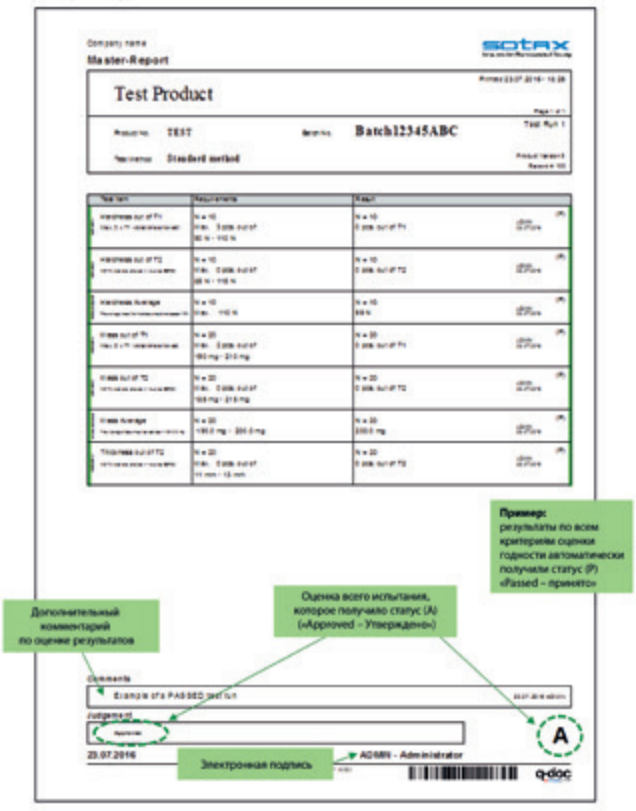


Анализу 2 дан статус «Заблокировано», и поставлена электронная подпись.

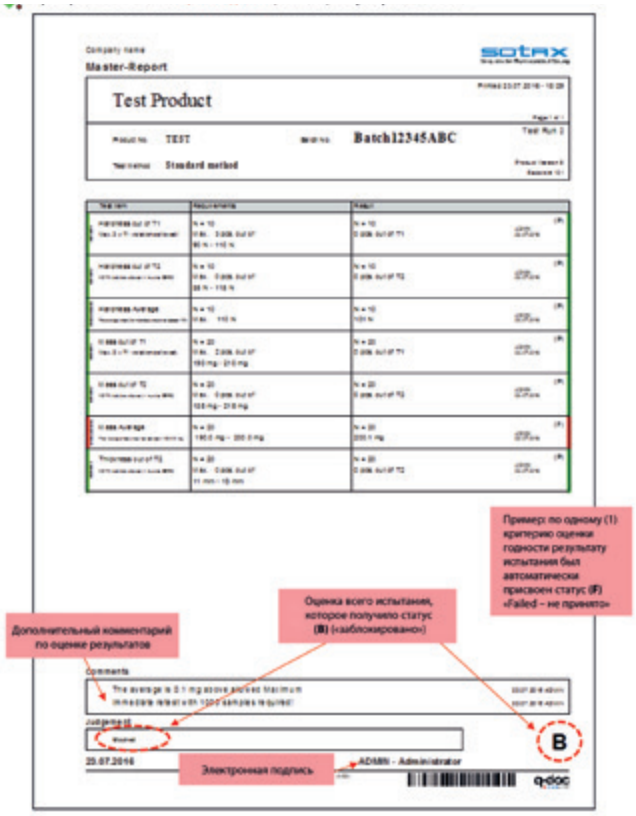


Как только аналитическое испытание получило оценку, автоматически может быть создан завершающий главный отчет (Master Report). Как правило, он представляет собой титульную страницу протокола результатов измерений.

✓ *Пример*: нет нарушений (Анализ 1).

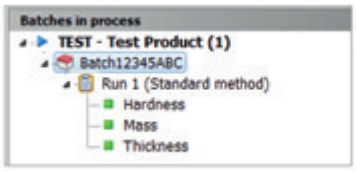


✓**!** *Пример*: несоответствие **оценке годности** (Анализ 2) по критерию «масса».

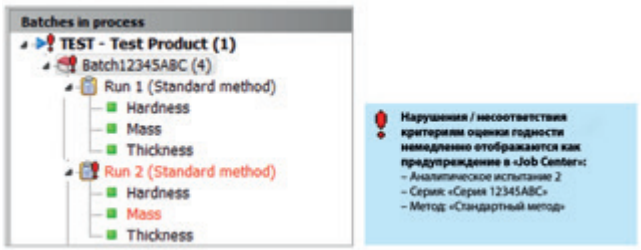


- Прошедший оценку результат аналитического испытания отмечается соответствующим образом в «Job Center» в режиме реального времени.

✓ *Пример*: нет нарушений (Анализ 1).



✓**!** *Пример*: Несоответствие **оценке годности** (Анализ 2) по критерию «масса».



Протоколирование и аналитическая оценка серии

Оценка всей партии (по результатам нескольких испытаний) проводится по такому же основному принципу, что и оценка отдельных испытаний. Все измерения, записанные во время различных аналитических испытаний, объединяются в единую сводку (Summary) и обрабатываются статистическими методами. Можно создать три (3) типа отчетов/протоколов, которые дополняют друг друга.

- **ОБОБЩЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ: Измерения + статистика**

Все индивидуальные измерения, выполненные для серии образцов, анализируются повторно, если необходимо применение различных допусков/пределов для каждого тестового класса (например, «масса, толщина, твердость»). Эта операция не производится во время одиночных аналитических испытаний (метод, который будет использоваться для сводного отчета, может быть определен как отдельный Summary Method – итоговый метод в спецификации продукта). Подобно протоколам измерений, оформляющимся в ходе индивидуальных испытаний, сводный отчет по партии не включает оценку того, какое количество обнаруженных несоответствий допустимым значениям повлияло на принятие окончательного решения, прошла серия испытание (PASS) или не прошла (FAIL).

- **ОБОБЩЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ: Главный отчет (= оценка + выпуск)**

В главном отчете (мастер-отчете) полной серии указывается «ПРОШЛА» ли партия испытания [PASSED – принята ли она (Approved)] или «НЕ ПРОШЛА» [FAILED – не принята (Not approved)]. Обычно главный отчет является одновременно титульной страницей сводного отчета с результатами измерений.

Другими словами, мастер-отчет – это оценка всех отдельных измерений, полученных во время проведения различных аналитических испытаний. Критерии оценки годности для всей партии обычно отличаются от критериев оценки годности, которые применяются в ходе отдельных испытаний, поэтому в программном обеспечении q-doc (в Summary method – итоговом методе) они могут определяться по-разному. Критерии оценки не ограничиваются количеством нарушений предельных значений – критерии оценки годности определяются в соответствии с существующими стандартными рабочими процедурами (СОПами).

- **Сжатый отчет (обзор всех проведенных аналитических испытаний)**

В сжатом отчете (Compact Report) представлен обзор всех тестовых испытаний, выполненных для серии, сгруппированной по тестовому классу (например, «*масса, толщина, твердость*»).

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ («МОДУЛИ»)

Дополнительные модули еще более расширяют (итак уже масштабные) рамки функциональных возможностей q-doc. При необходимости программу можно сделать более функциональной.

Трендинг данных / Сопоставление серий

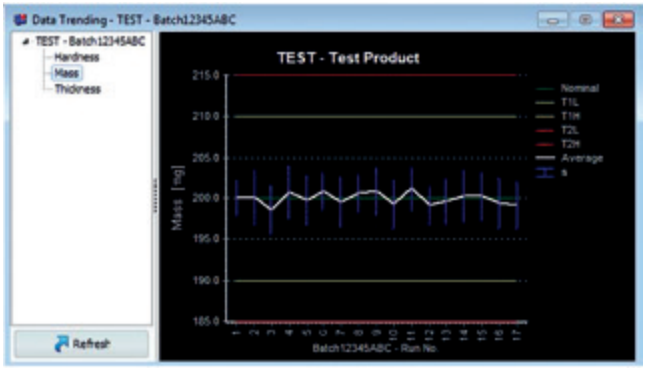
Модуль Data Trending (трендинг данных) позволяет анализировать запротоколированные данные как тренд (как тестовый класс):

- **Тенденция внутри серии / Анализ нескольких испытаний**

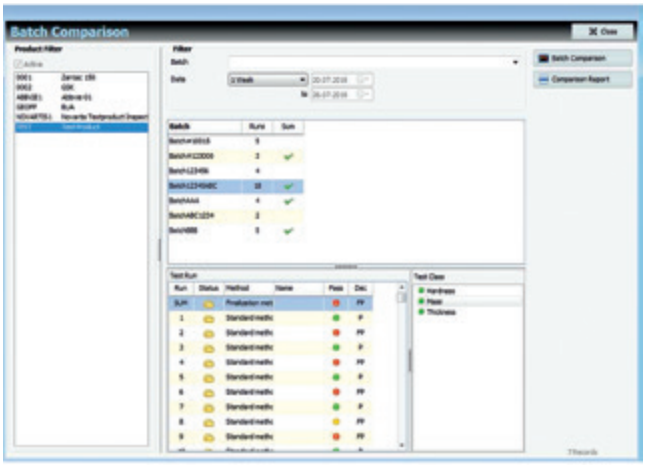
Обзор всех испытаний (среднее значение для тестового класса) как тренда в дополнение к сжатому отчету. Эту тенденцию можно просмотреть в режиме реального времени, пока серия находится в обработке.

- **Анализ нескольких серий (сопоставление серий)**

Программа q-doc предлагает множество возможностей для последующего анализа, включая создание отчетов. Можно выбирать серии, используя различные критерии или опираясь на временные интервалы (например, последние 6 месяцев). По мере необходимости собранные данные могут быть проанализированы.



Пример. **Тенденция, которая складывается на основе 17 испытаний, проводившихся по критерию «масса» в пределах одной и той же серии**

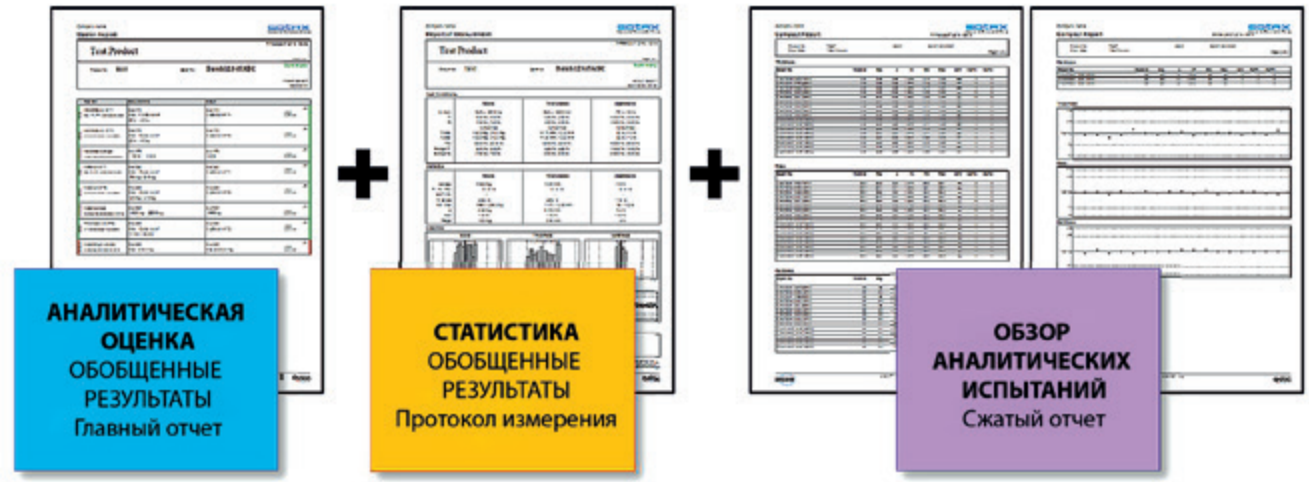


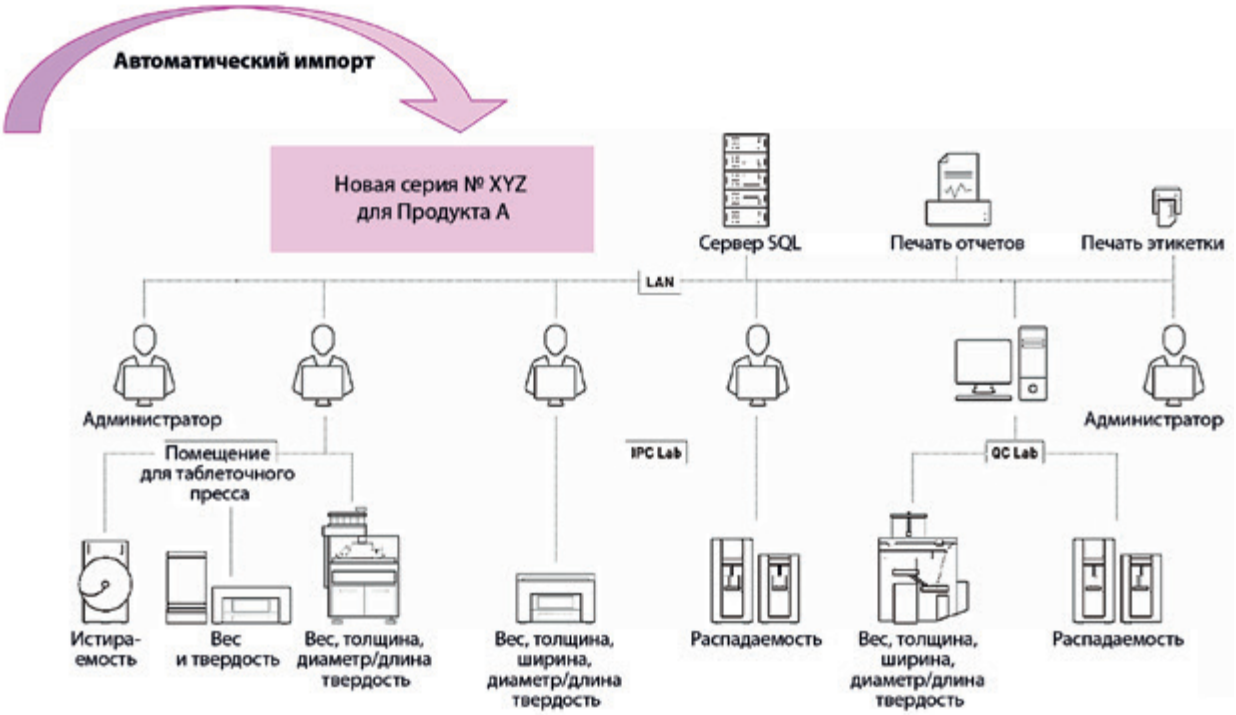
Сопоставление серий

Импорт данных (Job Import)

Автоматический импорт данных (например, автоматическая регистрация нового номера серии непосредственно из ERP-системы клиента) устраняет потенциальные источники ошибок, которые могут

ПРОТОКОЛИРОВАНИЕ И ОЦЕНКА ВСЕЙ ПАРТИИ:





возникнуть при переписывании данных в ручном режиме. Целостность данных значительно улучшается, весь процесс получается более эффективным.

Экспорт данных (LIMS Export)

Различные данные (например, оцениваемые партии или только статистика в конце каждого тестирования партии) могут быть автоматически экспортированы в разных форматах.

Рабочие группы (Workgroups)

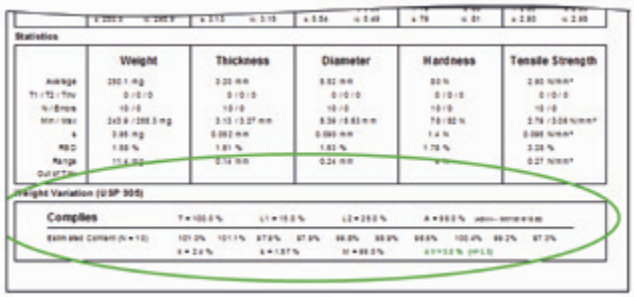
Модуль Workgroups помогает держать конкретных пользователей в курсе происходящих событий в более сложном сетевом окружении (так, чтобы не все пользователи могли постоянно видеть все серии / пробные партии). Workgroups также является мощным инструментом для ограничения пользования определенными продуктами и/или рабочими станциями ПК. Данное ограничение применяется к какой-либо опре-

деленной группе пользователей. Опция ограничения доступа имеет самое разнообразное применение: от «разделения» различных отделов до ограничения допуска к тестированию серии в пределах одной определенной рабочей группы (для работы над серией выбираются пользователи, чьи рабочие места располагаются в конкретной комнате).

Расширенный аналитический отчет

Модуль Extended Evaluation (расширенная оценка) предлагает дополнительные возможности для определения методов. Также доступны дополнительные тестовые классы (например, прочность при растяжении), заранее определенные процедуры испытаний, критерии оценки и процессы (например, автоматическая регистрация повторного испытания и составление сводной отчетности), соответствующие требованиям фармакопей США и ЕС.

- Разброс значений массы <USP 905>
- Прочность при растяжении <USP 1217>
- Однородность массы <Ph.Eur. 2.9.5>
- Автоматическая процедура повторного тестирования в соответствии с нормами <USP 701> и <Ph. Eur. 2.9.1>

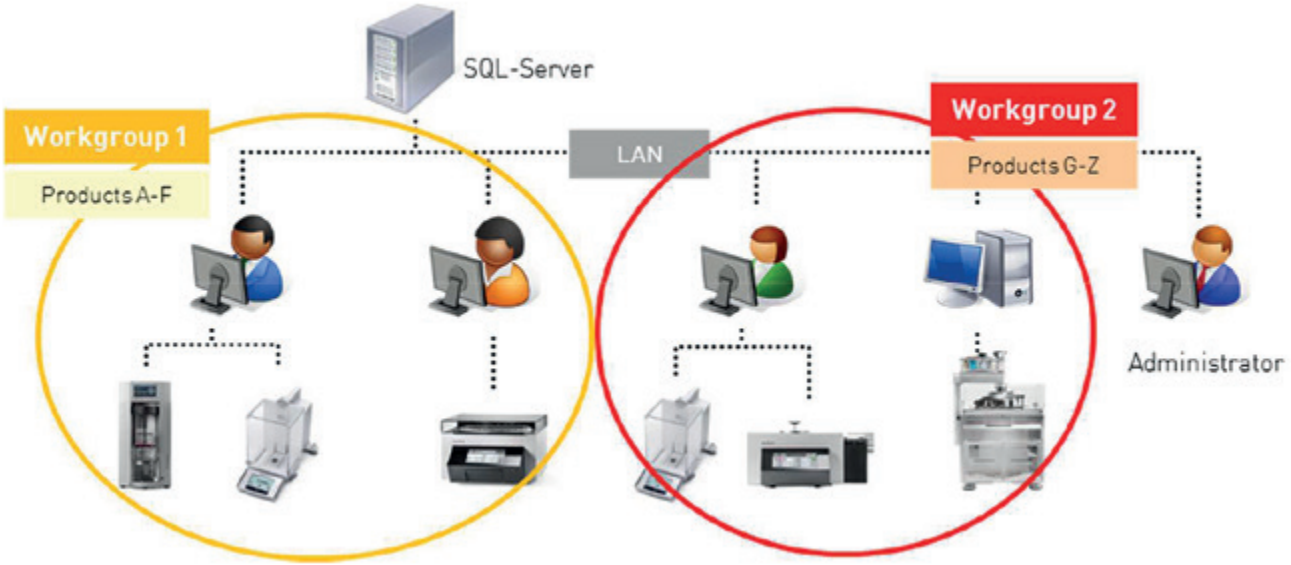


Интеграция протокола LDAP (служба каталогов Active Directory)

Вместо создания и управления пользователями локально (в рамках службы User Administration, имеющейся в q-doc) модуль LDAP Integration позволяет управлять пользователями посредством службы Active Directory (AD), настроенной в компании. Все пользователи пользовательской группы в Active Directory (AD) автоматически получают доступ к q-doc согласно правам доступа группы пользователей в q-doc. Не требуется особых действий по управлению отдельными пользователями (например, создание новых пользователей или удаление устаревших профилей пользователей). Также не нужно управлять их паролями и применять общие правила для паролей (например, истечение срока действия пароля, его длина, используемые символы и т.д.).

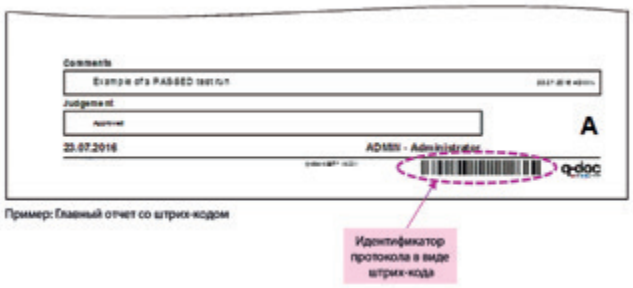
ШТРИХОВОЙ КОД – ДЛЯ ЧЕГО?

Программное обеспечение q-doc поддерживает использование штрих-кода как стандартную функцию, которая помогает упростить процесс и обеспечить це-



лостность данных. Примером обычной процедуры, применяемой для разных клиентов, является автоматическая печать штрих-кода при регистрации каждой новой пробной партии. Подключенный к локальной сети принтер штрих-кода может располагаться даже в помещении, где установлен таблеточный пресс. Оператор физически собирает образцы и наклеивает ярлычок со штрих-кодом на контейнер, который затем передается в лабораторию межоперационного контроля для тестирования. Оператор в лаборатории межоперационного контроля просто сканирует ярлычок, и соответствующая серия автоматически открывается в программе q-doc.

Другой доступной опцией является использование идентификатора, выполненного на напечатанных документах в виде штрих-кода. Такой метод значительно упрощает отслеживание документации при проведении контрольных проверок и исследований. Если требуется найти электронную версию распечатанного отчета, сканирование штрих-кода на распечатке автоматически откроет соответствующую версию непосредственно в q-doc.



Пример: Главный отчет со штрих-кодом

СООТВЕТСТВИЕ СТАНДАРТУ 21 CFR, PART 11

Программное обеспечение q-doc выполняет все требования, которые предъявляются к функционированию системы хранения электронных документов стандартом 21 CFR, Part 11.

- **Отсутствие возможности изменения данных измерений / исходных записей**

Данные измерений (сырые данные) автоматически сохраняются в центральной базе данных SQL и не могут быть отредактированы или удалены.

- **Журнал регистрации событий**

Все действия пользователей и вносимые изменения документируются и имеют вид читабельного для человека журнала регистрации событий. В случае проведения контрольных проверок можно без проблем произвести предварительный отбор записей по нескольким критериям (временной диапазон / пользователь / тип действия) и впоследствии найти их по сделанным меткам. Если требуется, результаты поиска могут быть напечатаны и/или экспортированы в виде файла.

- **Контроль версии**

Полная прослеживаемость любых производимых изменений посредством автоматического контроля версий продуктов и методов – Product & Methods («Основные данные»), включая настраиваемую процедуру деблокирования с использованием электронной подписи (не только протоколирование изменений в журнале регистрации событий).

- **Электронная подпись**

Программа q-doc может быть настроена на необходимость применения электронной подписи для выполнения определенных действий (например, для оценки пробных серий). Для действий, имеющих особую важность, таких как внесение изменений в данные о методах и продуктах (Product & Method), непосредственно в q-doc может быть реализован принцип «четырех глаз» с двойными сигнатурами.

- **Права доступа пользователей / управление пользователями**

Группы пользователей и их права доступа могут быть определены и настроены на основе требований отдельного процесса, чтобы обеспечить гарантии того, что только уполномоченные лица могут выполнять определенные действия.

- **Защита с помощью пароля с использованием или без использования службы Active Directory**

При использовании LDAP Integration (протокол LDAP) пользователи могут самостоятельно проходить аутентификацию (входить) в приложение q-doc, используя свой обычный пароль Windows. В этом случае автоматически применяется политика паролей Active Directory (AD) клиента, и дублирующая функция администрирования индивидуальных пользователей уже не требуется. Если опция LDAP Integration не нужна, служба управления пользователями (User Administration) q-doc позволяет определять правила защиты паролем в соответствии с индивидуальными требованиями.

- **Дополнительная защита с помощью функции автоматической блокировки Auto-Locking**

Если в течение определенного периода времени действий пользователя не отмечено, q-doc автоматически блокирует приложение.

- **Нет потери данных в случае сбоя в работе сети**

Данные измерений не пропадают при прерывании соединения с центральной базой данных SQL. Данные, собранные во время выполнения теста, локально буферизуются на рабочей станции ПК. Как только соединение восстановлено, данные, помещенные в буфер, переносятся в базу данных.

КВАЛИФИКАЦИЯ / ВАЛИДАЦИЯ КОМПЬЮТЕРНОЙ СИСТЕМЫ (CSV)

Квалификация / валидация является неотъемлемой частью реализации проекта, соответствующего принятым нормативам. Все подготовленные для валидации документы регулярно пересматриваются, обновляются и совершенствуются.

Стандартизированные модульные пакеты валидации позволяют проводить процедуры квалификации на основе реализованных программных функций и требований заказчика.

Пакет квалификационных протоколов аттестации	Краткое описание
Установочная квалификация (IQ)	Гарантирует правильную установку ПК
Базовая квалификация (OQ)	Квалификация основных функций согласно стандарту 21 CFR, Part 11
Расширенная квалификация (OQ)	Квалификация функций критериев оценки / основного отчета
Квалификация сетевой архитектуры (OQ)	Квалификация (нескольких) рабочих станций, объединенных в сеть, которые используют общую (центральную) базу данных по предназначению
Квалификация модуля (OQ)	Модуль расширяет функциональность программных средств q-doc. Для каждого типа модуля имеется отдельный пакет квалификационных протоколов аттестации, который гарантирует работу модуля соответственно предназначению
Квалификация драйвера (OQ)	Для каждого подключенного прибора (устройства) требуется соответствующий драйвер. Для каждого типа драйвера имеется отдельный пакет квалификационных протоколов аттестации. Квалификация гарантирует, что прибор (устройство) работает по назначению в сочетании с программным обеспечением

Выполнение процедуры квалификации / валидации

Все пакеты квалификационных протоколов доступны либо в качестве услуги (документы + уполномоченный специалист, который проводит квалификационные процедуры), либо как «только документы».

КОНФИГУРАЦИЯ СИСТЕМЫ

После окончания установки q-doc и прохождения процедуры квалификации с использованием стандартных протоколов систему необходимо настроить под нужды конкретного пользователя, начиная от создания общей конфигурации и заканчивая интеграцией базы данных по конкретным клиентам (Products & Methods – продукты и методы), а также настройкой прав доступа пользователей. Варианты предполагаемого использования системы требуют глубокого понимания как структуры и функционала ПО q-doc, так и внутрикорпоративных процессов и стандартных рабочих процедур, чтобы можно было должным образом организовать процесс внедрения высокоэффективного решения и использования всех функциональных возможностей q-doc.

sotax
Solutions for Pharmaceutical Testing

ВАКУУМНАЯ СУШКА ПРИ ТЕМПЕРАТУРАХ ВЫШЕ 0 °С – ЭФФЕКТИВНАЯ АЛЬТЕРНАТИВА ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Материал предоставлен компанией Memmert

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что лиофильная сушка – основной метод получения культур заквасок и пробиотиков, он имеет существенные недостатки в виде длительности процесса и крайне высокого потреблении энергии. Кроме этого, многие бактериальные культуры непригодны для приготовления лиофилизата из-за неустойчивости при температурах ниже 0 °С. Для ускорения процесса сушки и снижения потребления энергоресурсов специалисты из Технического университета Мюнхена провели исследования процесса сушки бактериальной массы без замораживания, в мягких условиях, используя универсальный вакуумный сушильный шкаф Memmert VO.

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РЕШЕНИЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПРОБИОТИКОВ

Потребительский спрос на натуральные средства для укрепления иммунитета, как и на средства для снижения уровня холестерина, ежегодно растет вместе с рынком функционального питания в целом. Добавки, содержащие бактерии, способствующие развитию иммунитета и предотвращению дисбактериоза кишечника, – один из наиболее востребованных видов биологических добавок, называемых пробиотиками.

Преобладающей микрофлорой желудочно-кишечного тракта являются лакто- и бифидобактерии, которые и обеспечивают нормальное функционирование кишечника и оказывают влияние на иммунную систему. Кроме этого, культуры этих бактерий используются в производстве колбас, молочных продуктов и хлебобулочных изделий для ферментации и стабилизации продуктов. До упаковки в продуктах, содержащих пробиотики, продолжают протекать процессы, влияющие на их стабильность и жизнеспособность, так же как и в самих культурах, особенно если они были приготовлены высушиванием и хранятся в порошке.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

ВАКУУМНАЯ СУШКА ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ ВЫШЕ 0 °С

Обычно пробиотические бактериальные культуры и закваски предварительно замораживаются для предотвращения их порчи и последующего использования. Второй этап получения культуры – лиофилизация, то есть высушивание в вакууме замороженной бактриальной массы. На практике подобный метод имеет два значительных недостатка. Во-первых, лиофилизация требует значительных энергозатрат на сам процесс, и, во-вторых, некоторые бактерии малоустойчивы при температурах ниже 0 °С. Доктор Петра Фёрст и профессор кафедры инжиниринга пищевых производств и технологии производства молочных продуктов Технического университета Мюнхена Ульрих Кулозик разработали методику вакуумной сушки при температурах выше 0 °С (Low Temperature Vacuum Drying, LVTD) применительно к производственным процессам в пищевой промышленности.

Благодаря высушиванию культур в вакууме при температурах выше 0 °С большинство бактерий сохраняют жизнеспособность без изменений в своей клеточной структуре. Команда ученых из Фрайзинга (Германия) в журнале Journal of Biotechnology опубликовала результаты работы с тремя бактериальными линиями [1]. Оптимальные условия высушивания зависят от конкретной культуры бактерии, например выход *Lactobacillus bulgaricus* после вакуумного высушивания при положительных температурах в 10 раз превышает аналогичный показатель после стандартной лиофилизации. В исследовании установлено, что другие бактерии ведут себя в тех же условиях иначе, что подтверждается определением различий в жирно-кислотном составе мембран исследуемых бактерий [2].

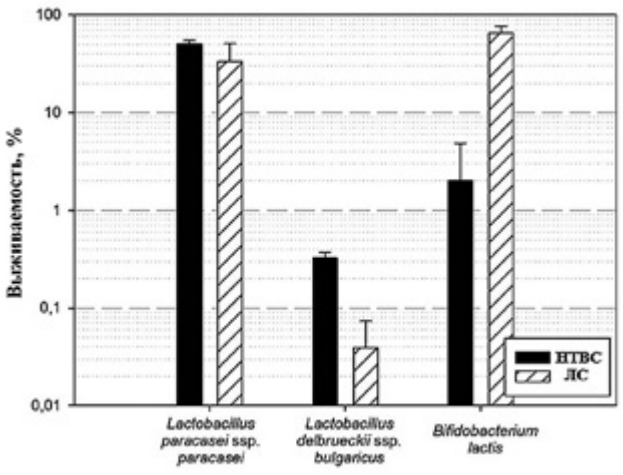


Рисунок 1. Максимальный показатель выживаемости при остаточной влажности от 6 до 7% в зависимости от способа высушивания (ЛФ – лиофилизированная культура, НТВС – культура, высушенная при температуре выше 0 °С в вакууме)

ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВАКУУМНОЙ СУШКИ

Инженер Симон Бауэр считает, что высушивание в вакууме при положительных температурах – перспективная технология, которая постепенно вытеснит лиофилизацию. Помимо сохранения клеточной структуры исследуемых бактерий, такой метод позволяет экономить до 40% расходуемой энергии по сравнению с лиофильной сушкой, где значительная часть электроэнергии тратится на замораживание. Более того, затраты на подобное оборудование ниже, процесс высушивания быстрее, а культуры, полученные таким способом, могут храниться дольше и при более высоких температурах [3].

ЛАБОРАТОРНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ВАКУУМНЫХ СУШИЛЬНЫХ ШКАФОВ

Для проведения дальнейших исследований в Техническом университете Мюнхена совместно с компанией Memmert был разработан вакуумный сушильный шкаф VO200. Целью экспериментов стало определение наиболее эффективного сочетания температуры и давления при сушке в вакууме. Испытания культур бактерий проводились в интервале температур от 0 °С до +35 °С и давлений от 10 до 30 мбар. Вакуумный сушильный шкаф оснащен программируемым цифровым контроллером, что позволяет задавать сложные профили давления и температуры, позволяющие без труда подобрать оптимальные условия для максимальной биологической активности и остаточной влажности конечного продукта. Датчик температуры,

который можно разместить непосредственно в образце гарантирует точное документирование условий эксперимента.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛАЖНОСТИ ГОТОВЫХ СРЕДСТВ И СУБСТАНЦИЙ

Фармацевтическая компания Farmacéutica Paraguaya (Fapasa) – крупнейший производитель лекарственных средств онкологического, урологического и гинекологического профилей. Помимо этого, значительную часть ассортимента компании составляют безрецептурные болеутоляющие препараты и биологически активные добавки в форме желатиновых капсул. В лаборатории компании применяется методика определения потери в массе при высушивании с помощью вакуумного сушильного шкафа VO Memmert в соответствии со стандартом USP 731 и содержания влаги в соответствии со стандартом USP 921. Из-за особенностей сушки в конвекционном сушильном шкафу результаты могут быть занижены и выйти за пределы 13–16%, поэтому процесс проводят в вакуумном сушильном шкафу.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ВАКУУМНЫХ СУШИЛЬНЫХ ШКАФОВ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ И ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Вакуумные сушильные шкафы Memmert открывают новые возможности для применения в пищевой и фармацевтической промышленности, например воздействие пониженного давления и температуры при испытании готовых продуктов, при их хранении и транспортировке. Компактные элементы Пельтье обеспечивают равномерное охлаждение, а система программирования сложных профилей давления и температуры позволяет высушивать даже самые чувствительные к изменениям внешней среды бактерии и вещества. Данные об установленных параметрах могут храниться во встроенной памяти системы управления шкафов VO, а могут быть переданы и обработаны с помощью программного обеспечения Celsuis на ПК, что позволяет максимально автоматизировать эксперимент или производственный процесс.

ЛИТЕРАТУРА

1. S.A.W. Bauer, S. Schneider, J. Behr, U. Kulozik, P. Foerst. Combined influence of fermentation and drying conditions on survival and metabolic activity of starter and probiotic cultures after low temperature vacuum drying // J. Biotechnology. 2012. V. 159. Is. 4. P. 351–357.
2. TUM researchers develop environmentally friendly process to improve storage stability of probiotic. Press release. 07.06.2011. Technical University of Munich – Chair for Food Process Engineering and Dairy Technology.
3. P. Foerst, U. Kulozik, M. Schmitt, S. Bauer, Ch. Santivarangkna. Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium Lactobacillus paracasei // Food Bioproduct Processing. DOI: 10.1016/j.fbp.2011.06.004.

memmert
Experts in Thermostatics

ПЕРЕДОВАЯ СИСТЕМА CE ДЛЯ АНАЛИЗА ЧИСТОТЫ И ГЕТЕРОГЕННОСТИ ИММУНОГЛОБУЛИНА G

АВТОРЫ

A. Prasad,
A. Boge,
F. Ramirez,
И. Казакова,

ProteinSimple, 3001 Orchard Parkway, San Jose, California 95134

ВВЕДЕНИЕ

Моноклональные антитела (mAbs), как правило, используются в качестве диагностических и терапевтических средств для выявления и лечения широкого спектра заболеваний. Для определения чистоты и качества антител регулирующие органы разработали рекомендации, содержащие указания к методам оценки чистоты продукта, которые должны применяться при производстве данного продукта. Одним из наиболее распространенных методов контроля чистоты и гетерогенности является метод CE-SDS-электрофореза. Но для определения гетерогенности моноклональных антител (mAb) по заряду одним из лучших методов считается метод изоэлектрофокусировки (IEF).

Эта статья посвящена прибору Maurice, самому новому представителю семейства устройств, функционирующих на платформе iCE. Благодаря данному прибору можно проводить оба анализа и получать результаты с высоким разрешением как с помощью IEF, так и с помощью CE-SDS. Использование Maurice и метода капиллярного CE-SDS дает полное разделение пиков восстановленной негликозилированной и гликозилированной тяжелой цепи IgG всего за 25 мин при относительных стандартных отклонениях площадей менее чем на 4%. Упрощенный рабочий процесс гарантирует непревзойденную простоту использования. После подготовки образцов и реагентов потребуется менее 10 мин на установку картриджа и запуск аналитического исследования. По окончании исследования проб простая процедура очистки и автоматическая обработка данных, проводимая с помощью программного обеспечения Compass для iCE, позволят быстро приступить к анализу следующей серии.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ

Maurice – это настольная система, которая позволяет получать как данные с IEF, так и данные CE-SDS, а Maurice S. используется для исследований по методу CE-SDS. Для анализа методом CE-SDS, выполняемого на аппаратах Maurice и Maurice S., потребуется картридж вместимостью до 100 проб (макс. 48 проб/серия). Перед анализом проводят кондиционирование образцов и уравновешивают систему, обеспечивая формирование однородного поверхностного заряда на поверхности капилляра. Сначала производится электрокинетическое введение проб в капилляр, а затем подается напряжение, чтобы осуществить разделение молекул по размеру. При детектировании анализируемых образцов определяется время выхода пика для определения относительного времени миграции. (RMT). Сравнение проводится относительно внутреннего стан-

Рисунок 1. Maurice

Рисунок 2. Картридж CE-SDS

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

дарта (10 кДа). Также может использоваться дополнительная панель маркеров молекулярных весов (MW), если нужна точная информация о молекулярной массе белков.

ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОЧЕГО ПРОЦЕССА

Рисунок 3. Схема рабочего процесса на аппарате Maurice

ВОССТАНОВЛЕНИЕ СТАНДАРТА IgG

Стандарт IgG анализировался на приборе Maurice в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Пики, соответствующие легкой цепи, негликозилированной тяжелой цепи и гликозилированной тяжелой цепи в восстановленном образце были разрешенны до базовой линии. Maurice с легкостью обнаруживал фрагменты IgG в невосстановленном стандарте IgG (>94% IgG в неизменном виде).

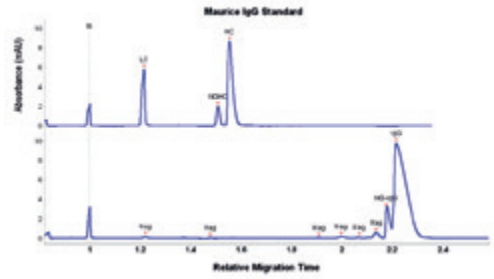


Рисунок 4. Разделение методом CE-SDS (вверху) восстановленных и (внизу) невосстановленных препаратов IgG в стандартном растворе. Стандарт IgG развели рабочим буфером (1x), содержащим SDS, до 1 мг/мл. Восстановленные образцы обработали β-ME, а невосстановленные алкилировали йодацетамидом перед денатурацией, проводившейся при 70 °C в течение 10 мин. На приборе Maurice было проведено разделение восстановленных и невосстановленных образцов в течение 25 и 35 мин

ЛИНЕЙНОСТЬ

БСА растворили в воде и провели ряд разведений, полученные площади пиков использовали для демонстрации линейности метода. Динамический диапазон измерения составил как минимум R^2=0,9998.

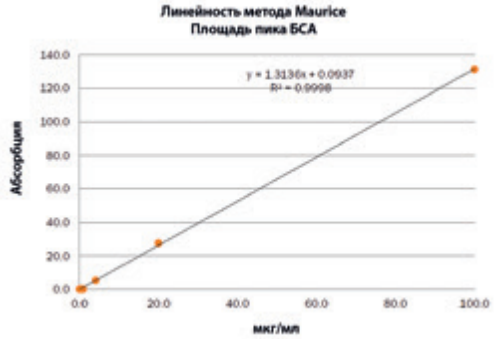


Рисунок 5. БСА растворили в буферном растворе (1x) и провели ряд разведений от 100 мкг/мл до 0 мкг/мл. Затем было проведено восстановление образцов с помощью β-меркаптоэтанола (β-ME) и с последующим нагреванием в течение 10 мин при температуре 70 °C

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для определения предела обнаружения (LOD) и предела количественного определения (LOQ) провели ряд разведений внутреннего стандарта.

Таблица 1.

Определение значений LOD и LOQ методом последовательного разбавления образцов внутреннего стандарта от 0 до 20 мкг/мл.

Проба	LOD	LOQ
Внутренний стандарт	0,21 мкг/мл	0,71 мкг/мл

Примечание: Показатели предела обнаружения (LOD) и предела количественного определения (LOQ) вычислялись по высоте пика.

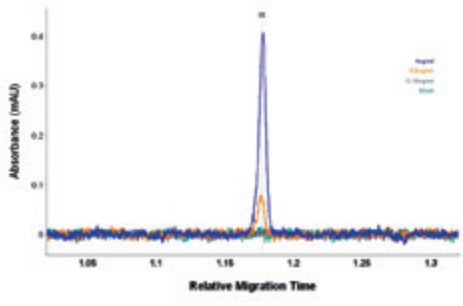


Рисунок 6. Внутренний стандарт IgG растворили в буферном растворе (1x) и провели ряд разведений с 4 мкг/мл до 0,16 мкг/мл. Затем было проведено восстановление образцов с помощью β-ME и их последующее нагревание в течение 10 мин при температуре 70 °C

СТАБИЛЬНОЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЕ ВРЕМЯ МИГРАЦИИ (RMT)

Относительные времена миграции (RMT) для гликозилированной тяжелой цепи, негликозилированной тяжелой цепи и легкой цепи отслеживались во всех 42 введенных пробах с целью установления стабильности времени миграции.

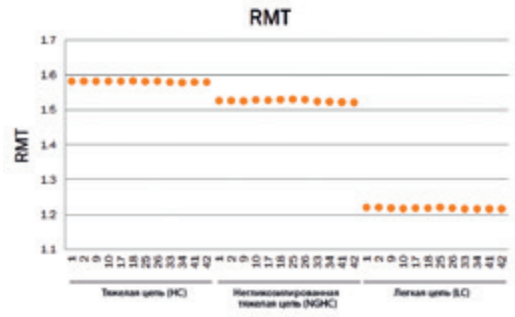


Рисунок 7. Показатели относительного времени миграции (RMT) для 42 введенных проб. Показаны данные для 12 введенных проб

Таблица 2.

Обобщенная статистика относительных времен миграции (RMT)

Пик	Средн. показ. RMT	ОСО (%)
Гликозилированная тяжелая цепь	1,581	0,106
Негликозилированная тяжелая цепь	1,526	0,191
Легкая цепь	1,218	0,191

Тем самым доказывается упорядоченная миграция пиков.

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ

Для демонстрации воспроизводимости результатов количественной оценки у 42 введенных проб отслеживались показатели отношения площади пика (%) и отношения HC/LC (тяж. цепь/легкая цепь).

Таблица 3.

Сводная статистика для процентного отношения площади пика подтверждает достоверность количественных данных

Пик	Средний % площади пика	ОСО (%)
Гликозилированная тяжелая цепь	62,9%	0,652
Негликозилированная тяжелая цепь	6,0%	3,975
Легкая цепь	31,1%	1,33

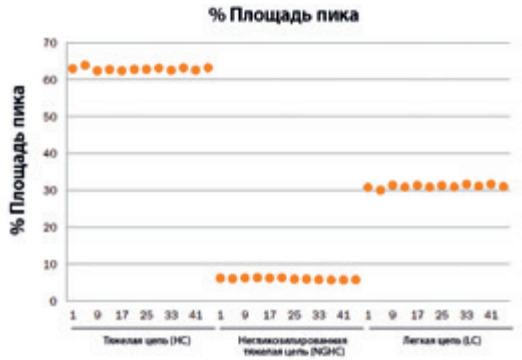


Рисунок 8. Процент отношения площади пика по 42 введенным пробам. Показаны данные для 12 введенных проб

Таблица 4.

Сводная статистика отношения цепей HC/LC

Пик	Средн. коэффиц.	ОСО (%)
Тяжелая цепь/ Легкая цепь	2,21	0,03

Данные таблицы 4 доказывают достоверность количественных данных.

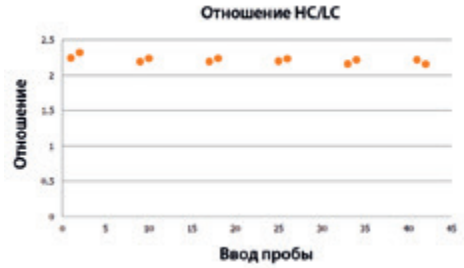


Рисунок 9. Отношение цепей HC/LC по всем 42 введенным пробам. Показаны данные для 12 введенных проб

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Данные CE-SDS-электрофореза высокого разрешения с полным разделением негликозилированной и гликозилированной тяжелой цепи.
- Применение метода CE-SDS выявляет чувствительность при пределе количественного определения (LOQ), равном 0,71 мкг/мл для внутреннего стандарта, и линейность к R2, равному 0,9998 для БСА с динамическим диапазоном не менее чем 2 log.
- Воспроизводимые данные:
  - RMT RSD (ОСО отн. времени миграции) < 0,2%
  - процент ОСО композиции < 4%
  - ОСО отношения HC/LC < 0,03%
- Для простого рабочего процесса результаты с помощью Maurice можно получить гораздо быстрее.

АНАЛИЗ МАТЕРИАЛОВ, ЭКСТРАГИРУЕМЫХ И ВЫМЫВАЕМЫХ ИЗ ПАКЕТОВ ДЛЯ В/В ИНФУЗИЙ, ПРОВОДИМЫЙ МЕТОДОМ ПРЯМОЙ ТЕРМАЛЬНОЙ ЭКСТРАКЦИИ И СОРБЦИОННОЙ ЭКСТРАКЦИИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ С ПЕРЕМЕШИВАНИЕМ В СОЧЕТАНИИ С ГХ С ТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕСОРБЦИЕЙ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

АВТОРЫ

A. Hoffmann, T. Albinus,

Gerstel GmbH & Co. KG, Eberhard-Gerstel-Platz 1, D-45473 Mülheim an der Ruhr, Германия

E. Almasi,

Agilent Technologies, 5301 Stevens Creek Boulevard, Santa Clara, CA 95051, США

K. Thaxton,

Gerstel, Inc., 701 Digital Dr. Suite J, Linthicum, MD 21090, США

АННОТАЦИЯ

Части пакета для в/в инфузии были исследованы на экстрагируемые вещества. Для анализа применялась прямая термическая десорбция / термическая экстракция и хромато-масс-спектрометрия, выполняемая с помощью газового хроматографа с масс-селективным детектором. Результаты анализа сравнивали с результатами по определению вымываемых веществ, которые были получены методом сорбционной экстракции (с перемешиванием) водного имитатора, хранившегося в пакете для в/в вливания точно такого же типа. И снова применялся газовый хроматограф / масс-селективный детектор для исследования вымываемых соединений. Кроме того, для подтверждения или опровержения некоторых результатов, полученных с помощью масс-селективного детектора (MSD), был задействован времяпролетный масс-анализатор (TOF) с высоким разрешением.

ВВЕДЕНИЕ

Упаковка, используемая для лекарственных препаратов, может содержать нежелательные химические соединения, которые могут контактировать с препаратами и вызывать их изменение. Для проведения исследований системы упаковки она может заполняться имитирующим средством, имеющим максимально приближенный к лекарственному средству химический состав. Могут использоваться более высокие температуры и/или более агрессивные условия имитации, для того чтобы ускорить процессы экстракции и переноса этих химических соединений в имитирующее средство. Химические соединения, извлекаемые из упаковки в этих условиях, называются экстрагируемыми веществами.

Если сам препарат исследуют на химические соединения, попавшие в него из упаковки после хранения в нормальных условиях, обнаруженные соединения называют продуктами вымывания. Поскольку предметом анализа обычно служит вся упаковка, для установления того, из какой ее части были экстрагированы или вымыты полученные материалы, требуется проведение дополнительных аналитических исследований.

В отраслевых инструкциях от 1999 года FDA классифицировало степень обеспокоенности по поводу вредного действия экстрагируемых / вымываемых из

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Таблица 1.

Модифицированный подход FDA / CDER / CBER, основанный на оценке риска, исходящего от вымываемых веществ

Примеры упаковки для обычных классов лекарственных препаратов, вызывающей обеспокоенность			
Степень обеспокоенности, связанной со способом применения	Вероятность взаимодействия компонентов упаковки с дозированной лекарственной формой		
	Высокая	Средняя	Низкая
Самая высокая	Ингаляционные аэрозоли и спреи	Инъекции и инъекционные суспензии; ингаляционные растворы	Стерильные порошки и порошки для приготовления растворов для инъекций; порошки для ингаляций
Высокая	Трансдермальные мази и пластыри	Офтальмологические растворы и суспензии; назальные аэрозоли и спреи	–
Низкая	Растворы и суспензии для наружного применения; аэрозоли для наружного и сублингвального применения; растворы и суспензии для перорального применения	–	Таблетки и капсулы (в твердой и мягкой желатиновой оболочке) для перорального применения; порошки для наружного применения; порошки для перорального применения

Примечание: Хотя эта таблица дает представление об уровне обеспокоенности регулирующих органов проблемой действия вымываемых из упаковки веществ на различные лекарственные формы, не следует полагать, что для лекарственных форм с низким уровнем риска (например, пероральных таблеток) проблем с воздействием вымываемых веществ не существует.

упаковки веществ на лекарственные препараты, относящиеся к общим классам [1]. Эта классификация впоследствии была с незначительными изменениями оформлена в виде главы USP 1664 [2]. В таблице 1 указана вероятность взаимодействия компонентов упаковки и лекарственного препарата, а также степень обеспокоенности, связанная со способом применения (введения) препарата. Самую большую проблему для регулирующих органов представляют те ситуации, когда имеется наибольшая степень обеспокоенности в отношении способа введения препарата и одновременно присутствует наивысшая вероятность того, что материалы упаковки вступят во взаимодействие с препаратом.

Согласно USP 1664 такая ситуация возникает с определенными типами лекарств и их упаковкой: ингаляционные аэрозоли и спреи, инъекции и инъекционные суспензии, ингаляционные растворы и трансдермальные мази и пластыри. Для этих типов лекарств существует одновременная необходимость строгой квалификации экстрагируемых и вымываемых веществ и установления низких уровней этих веществ при проведении их количественной оценки.

Водные растворы часто используются в вышеупомянутых лекарственных формах (за исключением трансдермальных мазей и пластырей). Растворы, находящиеся в инфузионных пакетах, вводятся в значительных количествах непосредственно в вены пациента.

По этой причине исследования материалов, полученных путем экстракции и выщелачивания непосредственно из пакетов, содержащих водные среды, имеют чрезвычайную важность. Эти пакеты также могут наполняться разнообразными лекарственными средствами в аптеке при больнице. И тогда традиционный эксперимент с вымываемыми веществами (тест только на одном лекарственном препарате) становится менее актуальным и более сложным для выполнения. Следовательно, результаты экспериментов с экстрагируемыми веществами представляют еще большую важность.

Для тех экстрагируемых материалов, которые являются неполярными или умеренно полярными, анализ с применением GC/MS (газовой хроматографии/масс-спектрометрии) будет более успешным, чем с LC/MS (жидкостной хромато-масс-спектрометрией). Однако проведение GCMS-исследования водных растворов затруднено, поскольку:

- вода несовместима с традиционной газовой хроматографией;
- необходимых пределов обнаружения (иногда выраженных в субчастях на миллиард) трудно достичь даже с применением самых чувствительных приборов;
- низкие концентрации или введение в практику новых соединений делают идентификацию на основании атомной массы вещества с использованием масс-спектральных библиотек довольно сложной задачей.

Первые две проблемы могут быть решены с использованием метода сорбционной экстракции с перемешиванием (SBSE). Она, как правило, используется в фармацевтике и других отраслях, где необходима концентрация аналитов и экстракция аналитов из водной матрицы [3, 4]. Аналиты абсорбируются и концентрируются на магнитной палочке (Twister), а затем десорбируются с использованием системы термической десорбции, повторно концентрируются во входном отверстии типа GC испарителя-дозатора с прог-

раммированием температуры (PTV) и затем вводятся в GC-колонку.

Коэффициент концентрации, достигнутый с использованием SBSE-TD-GC/MS (сорбционная экстракция с перемешиванием – термическая десорбция – газовая хроматография / масс-спектрометрия), часто решает часть третьей проблемы, но иногда и это не приводит к решению. Там, где применения масс-спектрометрии оказывается недостаточно, вместо нее могут использоваться высокочувствительные времяпролетные квадрупольные масс-спектрометры (QTOF-MS).

В данной работе перед нами встала задача определения веществ, экстрагируемых из системы с пакетом для в/в инфузий. И в то же время нужно было понять, из какой части системы они поступили (вымываемые вещества будут иметь отношение к лекарственному препарату, который будет исследоваться в другой раз).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Чтобы решить эту проблему, мы применили подход, который заключался в использовании следующих методов.

1. Прямая термическая десорбция (экстракция) компонентов пакета при повышенных температурах.
2. SBSE-GC/MS (сорбционная экстракция с перемешиванием – газовая хроматография / масс-спектрометрия) водного раствора-имитатора, хранящегося в пакете при слегка повышенных температурах.
3. Использование SBSE-GC-QTOF-MS (сорбционная экстракция с перемешиванием – газовая хроматография – времяпролетная масс-спектрометрия), где это необходимо, для решения любых проблем, которые не решаются на втором шаге.

Шаг 1 чрезвычайно важен: посредством прямой десорбции отдельных компонентов пакета, выполняемой при высоких (200 °C) температурах, получается целое «меню» экстрагируемых веществ, которые будут проходить анализ/имитацию вымываемых веществ на шаге 2. Что еще более важно, при прямой термической десорбции отдельных компонентов системы для в/в вливания гораздо легче понять, из какого компонента инфузионной системы может вымываться обнаруженное соединение.

Материалы и приборы. Клиент предоставил пустые и стерильные пакеты для внутривенного вливания емкостью 250 мл. Пакеты были изготовлены из полипропилена, но, как указано на внешней упаковке, «некоторые компоненты продукта содержат ПВХ – ДЭФ пластифицированный».

Анализ компонентов пакета проводили на ГХ 890B, установленном в паре с 5977A MSD (Agilent Technologies, США), имеющим вход PTV (CIS 4). Также в нашем распоряжении был термодесорбер (TDU) и многоцелевой пробоотборник (MPS) (все производства GERSTEL).

Для проведения экспериментов методом SBSE применялись магнитные палочки Twister (GERSTEL), покрытые 24 мкл полидиметилсилоксана (PDMS). Для десорбции Twister использовалась вышеупомянутая пара приборов.

Подтверждающие анализы проводились на ГХ 7890B в паре с 7200 QTOF (Agilent Technologies, США), также оснащенном системой криогенного фокусирования PTV (CIS 4). Точно так же использовался термодесорбер и роботизированный пробоотборник MPS (GERSTEL).

Прямая термическая десорбция (экстракция) компонентов пакета для в/в инфузии

Подготовка пробы. Небольшие частички образцов (от 3 до 15 мг) были взяты из пакета для в/в инфузии в местах, показанных на рисунке 1. Затем эти материалы были помещены в пустые, предварительно подготовленные трубки устройства термической десорбции для последующей термической экстракции.

Рисунок 1. Места на пакете для в/в инфузий, откуда были взяты образцы материала

Анализ ГХ-МС. Образцы компонентов пакета для внутривенного вливания, помещенные в пустые предварительно подготовленные трубки TDU-аппарата, для проведения прямой тепловой экстракции нагревали при температурах 80, 140 и 200 °C. Во время этого процесса летучие аналиты продувались газом-носителем в предварительно охлажденную систему криогенного фокусирования (CIS). Экстрагированные соединения концентрировались на входе для последующего анализа ГХ-МС.

Термическая десорбция	**Термодесорбер (GERSTEL)**
Тип трубки	пустая (3–15 мг пробы)
Режим продувки	без деления
Режим пробы	образец убирается
Температура	30 °C, при 60 °C/мин до 80/140/200 °C (10 мин)
Температура в зоне переливания	280 °C
Вход PTV	**CIS 4 (GERSTEL)**
Охлаждение жидким азотом	
Тип лайнера	упаковано в стекловату, дезактивирован
Газ-носитель	гелий
Режим продувки	продувка растворителя
Скорость потока	50 мл/мин.
Давление потока	49 кПа до 0,1 мин
Деление потока	30 мл/мин до 0,01 мин
Температура	–150 °C (0,1 мин), при 16 °C/с до 150 °C, при 12° C/с до 280 °C (3 мин)
Газовый хроматограф (GC)	**Agilent 7890B**
Колонка	HP-5ms (Agilent), 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм
Режим	непрерывный поток, 1,0 мл /мин
Температура	40 °C (1 мин), при 10 °C/мин до 200 °C, при 20 °C/мин до 280 °C (5 мин)
Масс-селективный детектор (MSD)	**Agilent 5977A**
MS-источник	230 °C
Квадрупольный MS	150 °C
Сканирование	19–350 а.е.м., 1,14 сканов/с
Порог	40

Сорбционная экстракция с перемешиванием (SBSE) водного имитатора

Подготовка пробы. 250 мл деионизированной воды наливали в пустой пакет для в/в инфузий и хранили в течение 48 ч при слегка повышенной температуре 40 °C, чтобы соединения могли перейти в водный раствор. По истечении этого периода 10 мл аликвоты воды переносили в пустой флакон. Добавляли магнитную палочку Twister и флакон закрывали крышкой. Образец экстрагировали с перемешиванием с помощью магнитной палочки Twister в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем палочку убрали, промыли водой из бутылки, высушили и поместили в подготовленную трубку термодесорбера для анализа.

Условия GC/MS-анализа. Десорбирование магнитной палочки Twister производилось при 240 °C. Отображаются только те параметры, которые отличаются от экспериментов по термической экстракции.

Термическая десорбция	**Термодесорбер (GERSTEL)**
Тип трубки	пустая (Twister)
Температура	30 °C, при 60 °C/мин до 240 °C (5 мин)
Вход PTV	**CIS 4 (GERSTEL)**
Деление потока	30 мл/мин до 1,1 мин
Квадрупольная времяпролетная система (Q-TOF)	**Agilent 7200**
MS-источник	230 °C
Энергия электрона	70 эВ
Сканирование	29–350 а.е.м.
Скорость сбора данных	10 спектров/с
Режим настройки	4 ГГц (высокое разрешение)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прямая термическая десорбция (экстракция) компонентов пакета для в/в инфузии

Термическая экстракция твердых материалов при высоких температурах позволяет анализировать летучие и полулетучие соединения независимо от их полярности. Простота использования и эффективность данной методики позволяет проводить быстрые и фундаментальные исследования экстрагируемых веществ, поскольку охватываются наиболее важные соединения, обладающие относительно высокой мобильностью. Для анализа экстрагируемых веществ это является основным преимуществом по сравнению с экстракцией растворителя, в которой скорости экстракции аналита больше зависят от полярности растворителя, а не от их мобильности [5]. Эта процедура сводит к минимуму процесс пробоподготовки и устраняет контаминацию образца, которая возникает от растворителей.

На рисунке 2 показана полученная хроматограмма после термической экстракции 16,3 мг материала пакета для в/в инфузий, деление 1:30.

Циклогексанон часто используется в качестве растворителя в производстве ПВХ. Недавнее исследование пластиковых трубок, используемых в медицинских процедурах, где по ним циркулирует кровь за пределами тела, предполагает связь между этим соединением и снижением функции сердца, с отеком, потерей вкуса и кратковременной потерей памяти [6]. Практически весь 2-этилгексанол, производимый во всем мире, превращается в бис-2-этилгексиловый эфир фталевой кислоты (DEHP), пластификатор. Ни одно соединение, как правило, не связано с получением

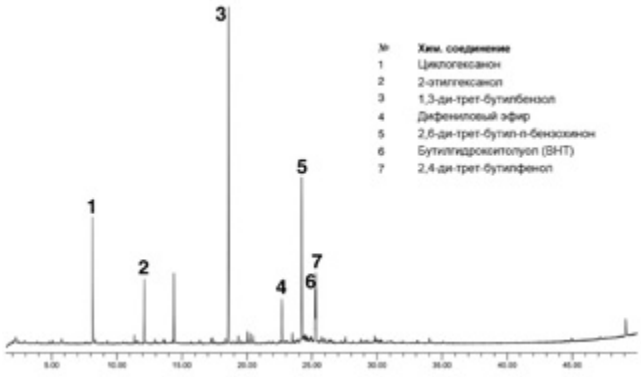


Рисунок 2. Термическая экстракция 13,6 мг материала пакета для в/в инфузии (полипропилена) при 80 ° С, разделение 1:30

полипропилена, материала, используемого для изготовления этого пакета для инфузий.

Эксперимент повторили, на этот раз установили температуру экстракции 200 °С. На рисунке 3 показано наложение хроматограмм экстракции при 80 °С (черным цветом) и при 200 °С (красным цветом).

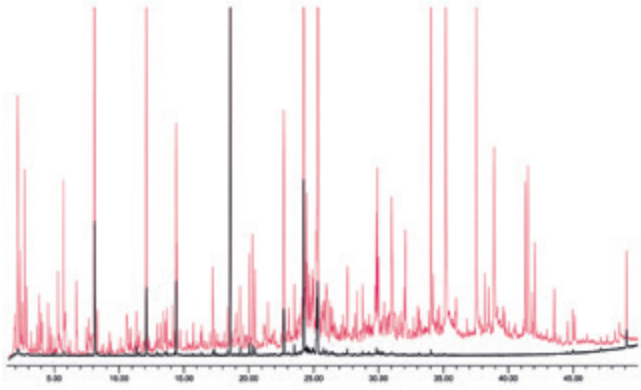


Рисунок 3. Наложение хроматограммы экстракции при 80 °С (черным цветом) и экстракции при 200 °С (красным цветом)

Полученная в результате анализа хроматограмма показывает увеличение выделения не только полулетучих соединений, что и следовало ожидать, но и летучих соединений (соединений, элюирующих перед циклогексаноном, 0–8 мин). По-видимому, эти соединения (главным образом остаточные растворители) выделяются из материала только под действием высоких температур экстракции. На рисунке 4 эта секция показана подробно.

Следующий исследованный компонент пакета был из того же самого материала, но образец был взят из той части пакета, на которой был напечатан текст (рисунок 1). Когда мы сравнили этот результат с результатом образца без печатной информации, наложив хроматограммы, были найдены три дополнительных пика (рисунок 5).

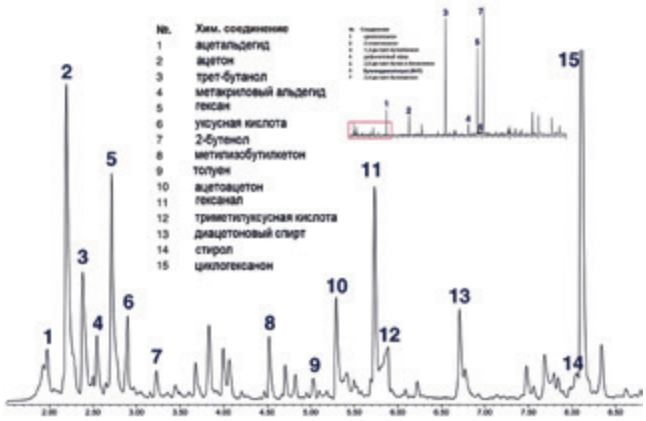


Рисунок 4. Термическая экстракция 15,1 мг материала пакета для в/в инфузий (полипропилена) при 200 °С, деление 1:30, ранние элюирующие соединения

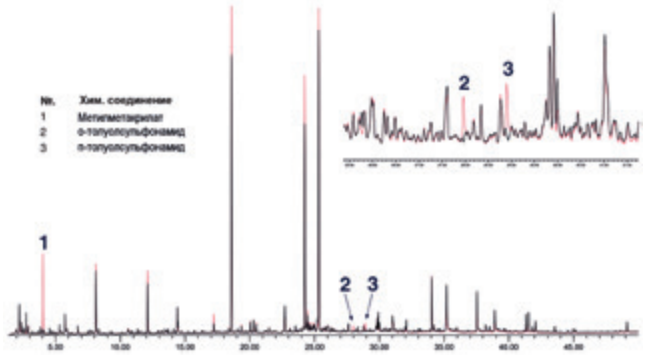


Рисунок 5. Наложенные друг на друга хроматограммы термической экстракции 15,1 мг материала пакета для в/в инфузий (черная линия) и 15,4 мг материала того же пакета с напечатанным текстом (красная линия) при 200 °С, деление 1:30

Дополнительные пики были идентифицированы как метилметакрилат, химикат, который используется, помимо всего прочего, для производства красок и лаков. Также был обнаружен о- и п-толуолсульфонамид. Последние два соединения обычно используются в качестве пластификаторов в покрытиях, красках и печатных красках. Кроме того, они способствуют адгезии и обладают превосходной термической устойчивостью. Эти соединения могут нанести вред ДНК (как генотоксические примеси). Они вызывают особую обеспокоенность. Крайне желательно, чтобы было выявлено их сверхнизкое содержание.

Из-за высокого содержания ДЭГФ в материале, взятом из трубки пакета для вливания (скорее всего, ПВХ), эксперимент по тепловой экстракции проводился только при 140 °С. Полученная хроматограмма показана на рисунке 6.

Присутствие циклогексанона и 2-этилгексанола в хроматограмме кажется весьма правдоподобным: трубка системы в/в вливания изготовлена из ПВХ, содержащего большое количество пластификатора ДЭГФ. Циклогексанон является растворите-

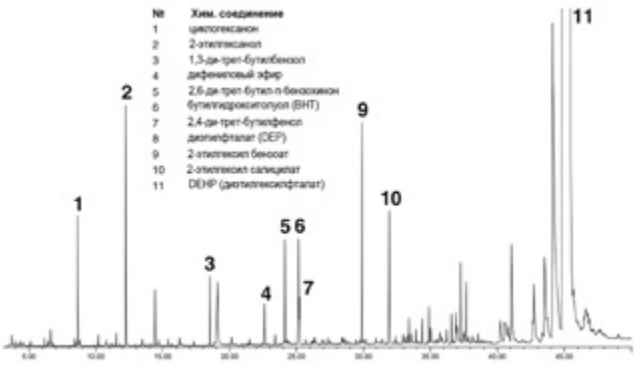


Рисунок 6. Термическая экстракция 3,7 мг трубки пакета (ПВХ) при 140 ° С, деление 1:30

лем, который часто используется во время производства ПВХ, и 2-этилгексанол является промежуточным продуктом в производстве ДЭГФ. Анализ пластикового клапана, также выполненный при 140 °С, показал аналогичный результат (рисунок 7). Это говорит о том, что клапан и трубка изготовлены из одинаковых материалов.

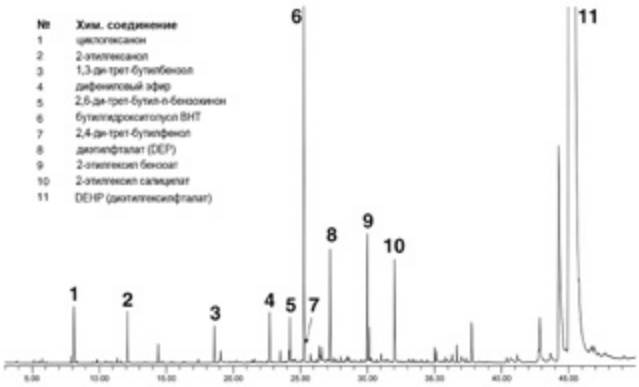


Рисунок 7. Термическая экстракция 3,5 мг образца пластмассового (ПВХ) клапана пакета для инфузий при 140 °С, деление 1:30

Основным отличием пластикового клапана является более высокая концентрация бутилгидрокситолуола (BHT) плюс присутствие диэтилфталата (DEP), часто используемого пластификатора. Сравнивая эти результаты с данными анализа материала пакета для в/в инфузий, мы пришли к выводу, что соединения из трубки и/или пластикового клапана должны были мигрировать в материал пакета и тем самым контаминировать его.

Следующая хроматограмма демонстрирует, насколько высоко содержание ДЭГФ в ПВХ-компонентах по сравнению с другими летучими соединениями из этого образца. 2,3 мг материала из пластикового клапана подвергали термической экстракции при 200 °С и вводили в колонку ГХ с делением 1:30 (рисунок 8).

Хотя объем пробы был значительно снижен до всего лишь 2,3 мг, а экстрагированные летучие ве-

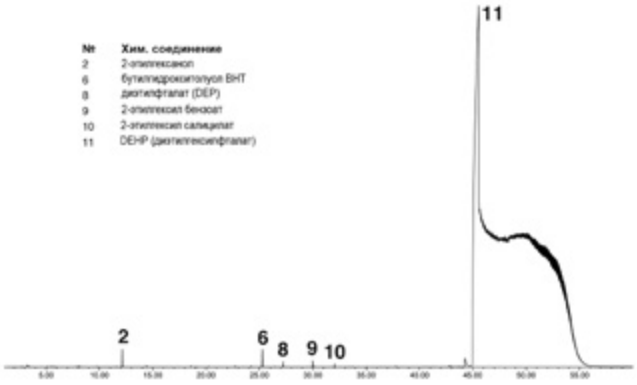


Рисунок 8. Термическая экстракция 2,3 мг образца пластмассового (ПВХ) клапана от пакета для инфузий при 200 °С, деление 1:30

щества были введены в колонку ГХ с делением 1:30, колонка перегружена ДЭГФ, и пик растягивается в течение 10 мин. Это показывает, что непременным условием для проведения успешных экспериментов с использованием прямой экстракции является создание инертного пути потока пробы. Это единственный способ гарантировать, что не проявится эффект памяти от предыдущих проб и результаты анализа не будут по этой причине искажаться даже для тех соединений, которые присутствуют в очень высоких концентрациях.

На рисунке 9 показано наложение перегруженной хроматограммы с результатом холостого анализа, проводившегося с пустой пробоотборной трубкой в точно таких же условиях, как и только что выполнен-

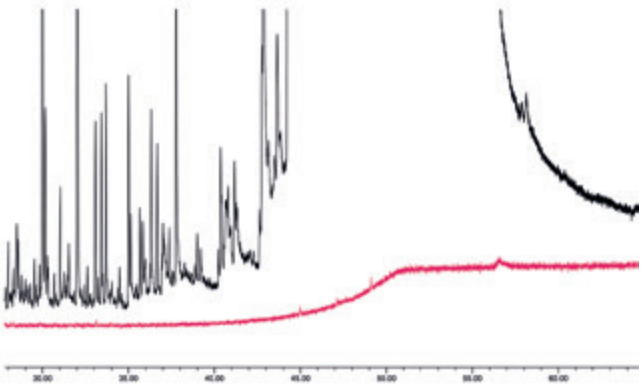


Рисунок 9. Наложение хроматограмм, полученных в результате термической экстракции 2,3 мг образца пластмассового (ПВХ) клапана от пакета для инфузий при 200 °С, деление 1:30 (черная хроматограмма), и последующего холостого анализа (красная хроматограмма), выполненного сразу же после первого с соблюдением тех же условий. Холостой анализ показывает, что переноса вещества от предыдущей пробы к следующему образцу практически нет

ный до этого полноценный анализ. Как видно, практически нет переноса вещества из предыдущих проб; поэтому даже образцы с высокой концентрацией полулетучего органического углерода (SVOC) могут подвергаться анализу и не влиять на точность последующих анализов.

Сорбционная экстракция с перемешиванием (SBSE) водного имитатора

Сорбционная экстракция с перемешиванием (SBSE) представляет собой метод экстракции образцов без присутствия растворителя. При этом методе происходит обогащение растворов, приготовленных из водных образцов. Впервые метод SBSE был представлен в 1999 году Балтуссеном (Baltussen) и др. [7]. Для SBSE подготовка проб сводится к минимуму, при этом не происходит контаминации образцов органическими растворителями, которые обычно требуются для извлечения аналитов из водных образцов. Кроме того, нет необходимости в выполнении дополнительных процедур с концентрациями, таких как экструзия большого объема экстракта. Концентрация аналитов уже содержится в PDMS-покрытии магнитной палочки.

Сорбционная экстракция с помощью вращающегося стержня Twister была применена для 10 мл аликвоты водного образца во время эксперимента с имитацией вымывания веществ, описанного в параграфе о подготовке образца (рисунок 10). Параллельно проводили экстракцию с помощью Twister холостого водного образца объемом 10 мл. Определение аналитов производилось термической десорбцией и методом GC/MS. Полученная для холостого анализа хроматограмма показала присутствие в PDMS-покрытии Twister пары силоксанов, но никаких значительных следов других органических соединений не было. На всех последующих хроматограммах силоксаны отмечены звездочкой (*).

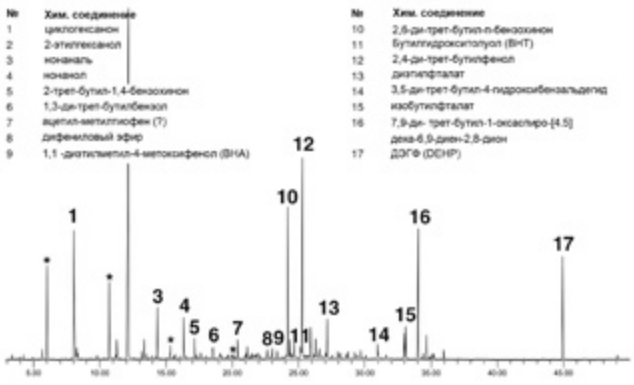


Рисунок 10. Сорбционная экстракция с перемешиванием 10 мл аликвоты 250 мл деионизированной воды, хранившейся в течение 48 ч при 40 °С в пакете для в/в инфузии, образец был введен без деления

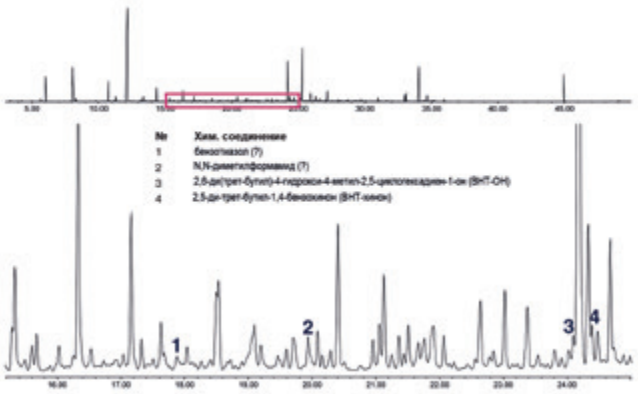


Рисунок 11. Сорбционная экстракция с перемешиванием 10 мл аликвоты 250 мл деионизированной воды, хранившейся в течение 48 ч при 40 °С в пакете для в/в инфузии, образец был введен без деления (зум на 15–25 мин)

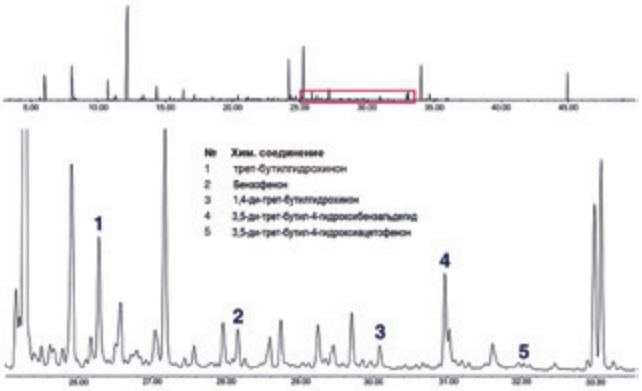


Рисунок 12. Сорбционная экстракция с перемешиванием 10 мл аликвоты 250 мл деионизированной воды, хранившейся в течение 48 ч при 40 °С в пакете для в/в инфузии, образец был введен без деления (зум на 25–33,5 мин)

С помощью SBSE стало возможным идентифицировать пару соединений, которые также были обнаружены в ранее упомянутых экспериментах по термальной экстракции, которую проводили для упаковочного материала. Очевидно, некоторые из этих соединений вымывались в водном имитаторе. Были обнаружены дополнительные соединения, которые до этого не были обнаружены в качестве экстрагируемых веществ, возможно, из-за того, что они присутствовали в очень низких концентрациях. Некоторые соединения, в том числе бензотиазол, N, N-дибутилформамид и группу соединений, у которых в качестве основных масс были m/z 125 и 140, дополнительно проверяли с помощью времяпролетной масс-спектрометрии.

На рисунке 13 показан подтверждающий результат времяпролетной масс-спектрометрии для бензотиазола. Присутствие N, N-дибутилформамида не могло быть подтверждено.

Поиск в справочной библиотеке (Wiley 6 и NIST 14) для работы в одноквадрупольном режиме не показал

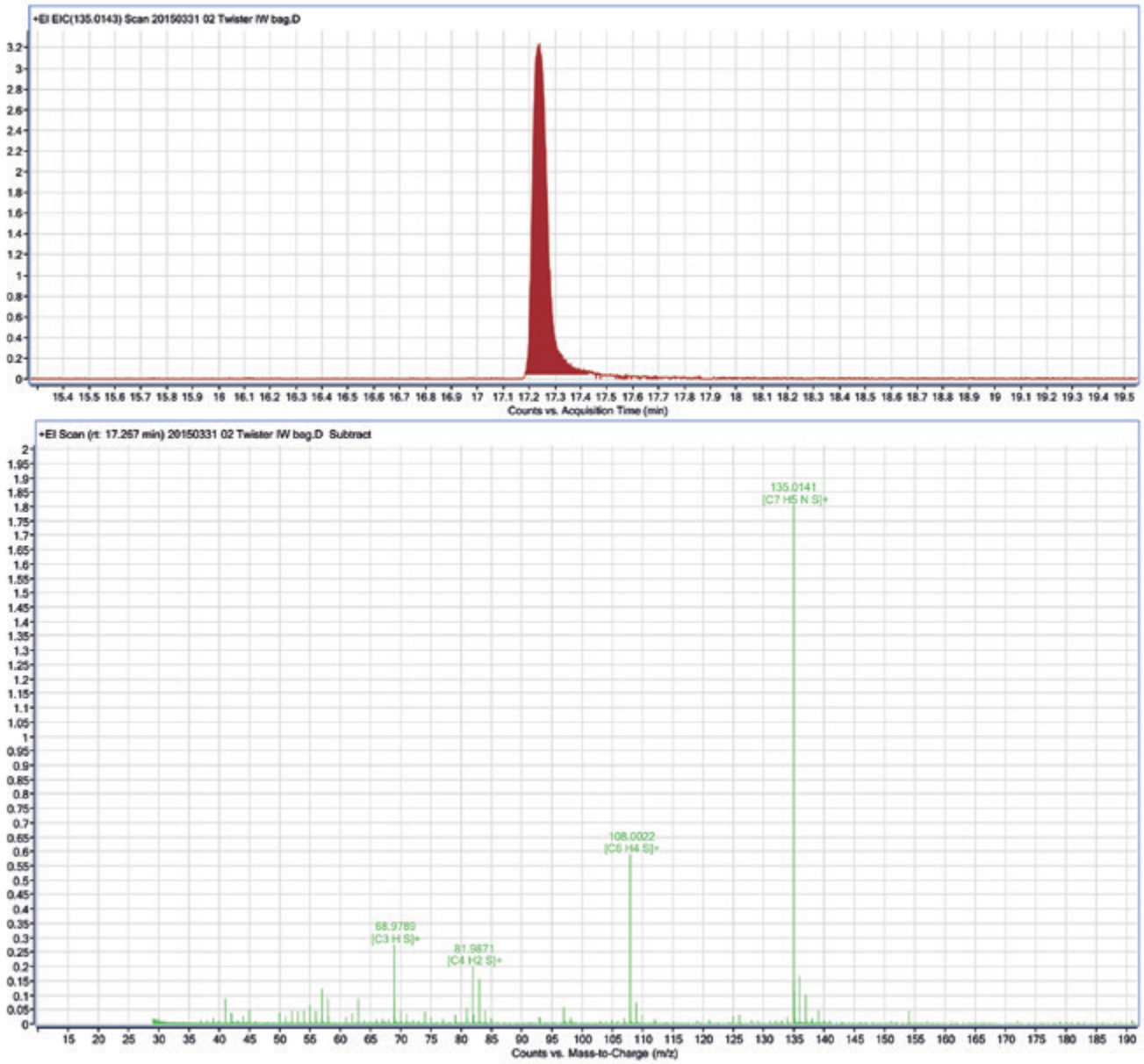


Рисунок 13. **Сорбционная экстракция с перемешиванием 10 мл аликвоты 250 мл деионизированной воды, хранившейся в течение 48 ч при 40 °C в пакете для в/в инфузии, образец бьm введен без деления. Присутствие бензотиазола, подтвержденное времяпролетной масс-спектрометрией (ошибка массы: –0,17 mDa = –1,26 ppm)**

удовлетворительных результатов, особенно для группы пиков с m/z 125 и 140. Обе библиотеки предположили, что эти соединения содержат, например, молекулы серы. Только после того, как для проверки был использован времяпролетный (TOF) анализатор, стало возможным исключение присутствия серы в молекулах. Результаты, полученные в одноквадрупольном режиме, не могут быть подтверждены (рисунок 14).

В таблице 2 перечислены соединения, выявленные с помощью сорбционной экстракции с перемешиванием, а также компоненты пакета для в/в инфузий, которые являются их источниками. Кроме того, указано их возможное происхождение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За термической десорбцией компонентов упаковки следовал анализ водных имитаторов, проводимый с помощью Twister. Это простой и эффективный способ создания доступного для понимания перечня шагов для выполнения экспериментов с вымываемыми веществами в будущем. Термическая десорбция, когда она выполняется без наличия в аналитической системе клапана или переходной линии, может успешно доставить полулетучий органический углерод в газовый хроматограф/масс-спектрометр. При этом перенос вещества от предыдущей пробы будет очень незначителен, даже если до этого использова-

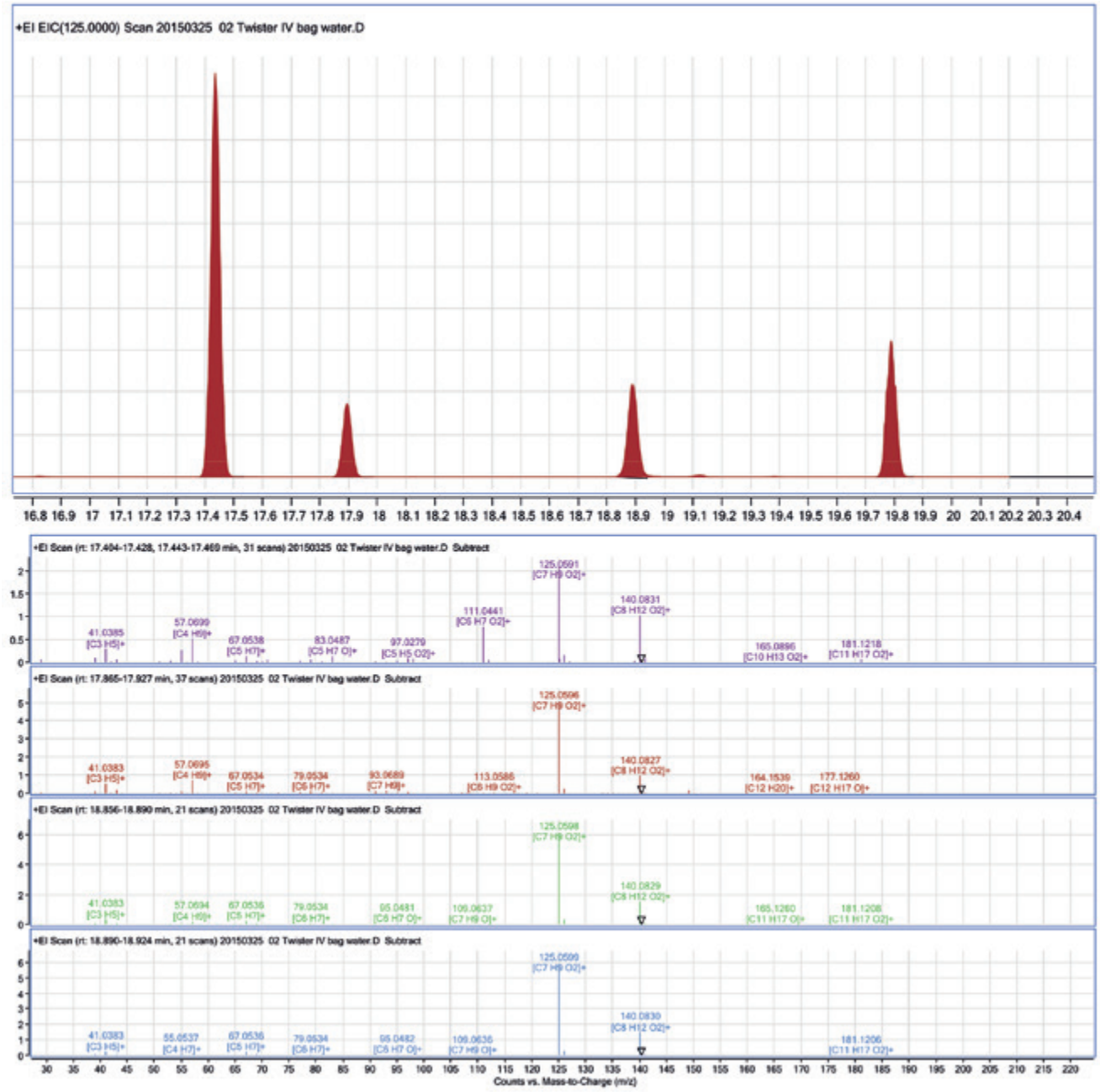


Рисунок 14. Сорбционная экстракция с перемешиванием 10 мл аликвоты 250 мл деионизированной воды, хранившейся в течение 48 часов при 40 °C в пакете для в/в инфузии, образец был введен без деления. Присутствие серосодержащих соединений с массами m/z 125 и 140 было опровергнуто с помощью времяпролетной масс-спектрометрии

лись пробы с очень большой концентрацией. Использование термической десорбции оказалось очень полезным при определении того, какой компонент упаковки являлся источником того или иного выделяющегося соединения.

Также эксперимент показал, что в некоторых случаях при выполнении GC-QTOF-MS требуется высокая разрешающая способность и точно измеренная масса. Это нужно и для подтверждения, и для исключения соединений из полученных по экстрагируемым веществам данных (и данных по продуктам вымывания тоже). На хроматограммах, сделанных во время анализа с использованием стержня Twister, отображается много следов, оставленных химическими соединениям. В этой публикации обсуждались только некоторые из них. В целом квадрупольная времяпролетная масс-спектрометрия является мощным средством для исследования всех этих соединений, если выбранный метод введения пробы обеспечит их попадание в хроматограф. Применяя такой простой, надежный и эффективный способ введения пробы в квадрупольный времяпролетный масс-спектрометр, как термическая десорбция, можно получить способ, который позволит увеличить имеющийся потенциал.

Таблица 2.

Соединения идентифицировали после проведения сорбционной экстракции с перемешиванием водного имитатора, помещенного в пакет для в/в инфузий. Был указан точный компонент пакета, откуда взяли образец материала, и возможное происхождение

№	Хим. соединение	Основной источник	Возможное происхождение
1	Циклогексанон	трубка системы в/в вливания	Остатки растворителя
2	2-этилгексанол	пластмассовый клапан	Метаболит DEHP, промежуточный продукт
3	Ацетофенон	пакет для в/в инфузий	Остатки растворителя
4	Нонаналь		
5	Нонанол		
6	2-трет-бутил-1,4-бензохинон	пакет для в/в инфузий	Метаболит бутилокситолуола
7	Бензотиазол		Агент вулканизации
8	1,3-ди-трет-бутилбензол	пакет для в/в инфузий	Продукт разложения антиоксиданта
9	Дифениловый эфир		Промежуточный метаболит при производстве поверхностно-активных веществ и высокотемпературных смазок
10	1,1-Диметилэтил -4-метоксифенол (бутилгидроксианизол BHA)	пакет для в/в инфузий	Антиоксидант
11	2,6-ди(трет-бутил)-4-гидрокси-4-метил-2,5-циклогексадиен-1-он (BHT-OH)	пакет для в/в инфузий	Метаболит бутилокситолуола
11	2,6-ди-трет-бутил-п-бензохинон	пакет для в/в инфузий	Метаболит бутилокситолуола
13	2,5-ди-трет-бутил-1,4-бензохинон (бутилокситолуол-хинон)	пакет для в/в инфузий	Метаболит бутилокситолуола
14	Бутилгидрокситолуол (BHT)	пластмассовый клапан	Антиоксидант
15	2,4-ди-трет-бутилфенол	пакет для в/в инфузий	Продукт разложения антиоксиданта
16	Трет-бутилгидрохинон	пакет для в/в инфузий	Антиоксидант
17	Диэтилфталат	пластмассовый клапан	Пластификатор
18	Бензофенон		УФ-стабилизатор
19	2-этилгексил бензоат	пласт.клапан, трубка системы	Пластификатор
20	1,4-ди-трет-бутилгидрохинон	пакет для в/в инфузий	Антиоксидант
21	3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензальдегид	пакет для в/в инфузий	Метаболит бутилокситолуола
22	3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксиацетофенон	пакет для в/в инфузий	Метаболит бутилокситолуола
23	Изобутил фталат	пакет для в/в инфузий	
24	7,9-ди-трет-бутил-1-оксаспиро- [4.5]дека-6,9-диен-2,8-дион	пакет для в/в инфузий	Продукт разложения 2,4-ди-трет-бутилфенола
25	ДЭГФ (DEHP)	пласт. клапан, трубка системы	Пластификатор

Данные, представленные в этой публикации, были получены с целью демонстрации самой концепции. Для обеспечения соответствия стандартам FDA требуется параллельно провести дополнительные исследования, а также выполнить количественную полуколичественную оценку экстрагируемых веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Guidance for industry: container–closure systems for packaging human drugs and biologics / FDA. – Rockville, MD. 1999.
2. USP 1664. Assessment of Drug Product Leachables Associated with Pharmaceutical Packaging Delivery Systems. – Rockville, MD. 2013.
3. J.T. Huang, L. Alquier, J.P. Kaisa, G. Reed, T. Gilmor, G. Vas. Method Development and Validation for the Determination of 2,4,6-Tribromoanisole, 2,4,6-Tribromophenol, 2,4,6-Trichloroanisole, and 2,4,6-Trichlorophenol in Various Drug Products using Stir Bar Sorptive Extraction and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Detection // Journal of Chromatography A. 2012.
4. B.L. Armstrong, A.F. Senyurt, V. Narayan, X. Wang, L. Alquier, G. Vas. Stir bar sorptive extraction combined with GCMS/MS for determination of low level leachable components from implantable medical devices // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2013. № 74. P. 162–170.
5. C. Zweiben, A.J. Shaw. Use of Thermal Desorption GC-MS to Characterize Packaging Materials for Potential Extractables // Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2009. V. 63. № 4.
6. C.S. Thompson-Torgerson, H.C. Champion, L. Santhanam, Z.L. Harris, A.A. Shoukas. Cyclohexanone contamination from extracorporeal circuits impairs cardiovascular function // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009. V. 296(6). P. 1926–1932.
7. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principle // Journal of Microcolumn Separations. 1999. № 11. P. 737–747.

INTEGRA

СОВРЕМЕННЫЕ ГОРЕЛКИ БУНЗЕНА

Материал предоставлен компанией Integra

ВВЕДЕНИЕ

Стерилизация пламенем – это рутинная операция, выполняемая во многих микробиологических, клинических и медико-биологических лабораториях. Горелки Бунзена дают пламя с температурой до 1200 °C. Топливом для этого типа горелок служит природный газ (в первую очередь метан), сжиженный углеводородный газ, а точнее, такие его фракции, как пропан, бутан или их смесь. Газ поступает через специальный штуцер, расположенный у основания трубки, и поднимается вверх. Также в нижней части трубки имеются отверстия, предназначенные для воздуха. Через них благодаря эффекту Вентури воздух попадает в газовый поток. Полноту сгорания смеси определяет количество кислорода (воздуха), смешанного с газовым потоком. Таким образом, газовый поток, смешанный с достаточным количеством воздуха, сгорает полностью, а температура горения получается более высокой, чем тогда, когда в газово-воздушной смеси процент кислорода гораздо ниже. В богатом воздухом пламени преобладает синий цвет и создается гудящий шум. При неполном сгорании топлива пламя желтое и шума при горении не наблюдается (рисунок 1). Зона самой высокой температуры внутри синего пламени располагается на кончике внутреннего конуса. Таким образом, для эффективного прокаливания необходимо помещать объект именно в эту часть пламени.

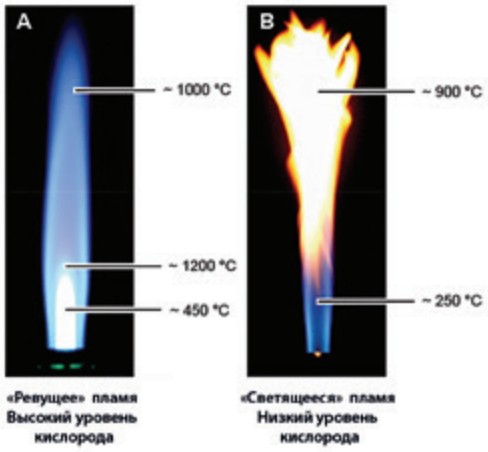


Рисунок 1. Пламя с высоким (A) и низким (B) уровнем кислорода. Профиль распределения температур

ОПАСНОСТИ, СВЯЗАННЫЕ С ТИПОВЫМИ ГОРЕЛКАМИ БУНЗЕНА

Горелки Бунзена традиционно использовались в качестве стандартного оборудования для рутинной стерилизации открытым огнем. Однако не стоит недооценивать опасность, которая сопровождает работу со спиртовыми горелками, обычными газовыми плитами или традиционными горелками Бунзена, подключенными к системе подачи газа.

Основной источник опасности заключается в возможности утечки газа, что может привести к его воспламенению.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Также несчастные случаи могут быть вызваны оставлением горелки без надзора. Кроме того, очень часто самое горячее синее пламя бывает едва различимым.

Несчастные случаи, вызванные горелками, относительно редки, но когда они происходят, они часто приводят к тяжелым травмам или пожарам. Специалисты по технике безопасности настоятельно рекомендуют работающему в лаборатории персоналу избегать использования открытого пламени, когда это возможно.

СУЩЕСТВУЕТ БЕЗОПАСНАЯ АЛЬТЕРНАТИВА!

С целью недопущения описанных выше случаев были разработаны безопасные горелки Бунзена. Безопасными горелки становятся благодаря следующим функциям.

- **Датчик пламени**

  Чтобы предотвратить утечку опасного газа, усовершенствованные горелки Бунзена пытаются автоматически произвести повторный розжиг пламени, если оно случайно гаснет. Если по какой-либо причине сделать это не удается, безопасные горелки надежно перекрывают подачу газа.

- **Максимальное время горения, определяемое пользователем**

  Автоматическое отключение после заданного пользователем максимального времени горения, исключает любую возможность, при которой горелка Бунзена будет оставлена без присмотра в рабочем состоянии. Кроме того, короткое время горения снижает риск получения ожогов.

- **Функция отображения сигнала тревоги**

  Отображение тревоги на графическом пользовательском интерфейсе указывает на то, что сопло горелки еще горячее. Оператор получает предупреждение, которое дает система безопасности, чтобы защитить его от ожогов.

Типовая безопасная горелка Бунзена работает от газового баллона. С этой горелкой у пользователей имеется возможность розжига пламени с помощью инфракрасного оптического датчика, ножного переключателя или кнопки на приборе.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДБОРУ ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ СМЕШЕНИЯ ОТ КОМПАНИИ NOVINOX

Материал предоставлен компанией Novinox

АННОТАЦИЯ

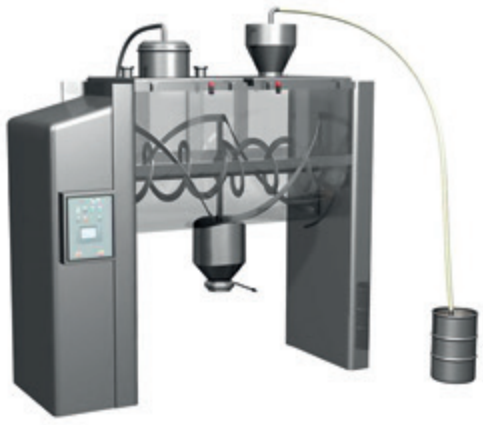
Компания Novinox, основанная в 1956 году, занимается разработкой, производством и установкой оборудования и комплектующих на протяжении 60 лет, представляя деловые интересы в сфере химической и косметической промышленности.

Среди продуктов для использования стерильных растворов в линейке Novinox представлены инъекционные растворители, реакторы, обогатительные установки, механизмы, предназначенные для обработки порошков, включая барабаны и бины, лабораторные смесители, резервуары для хранения, вибрационные грануляторы, смесители барабанного типа, смесители для бинов, а также смесители с переменным расходом воздуха или двойным конусом. Кроме жидких и твердых растворов Novinox также создает оборудование для эмульгирования кремов, мазей, лосьонов, гелей и устройства для подъема и установки барабанов, бинов, крупных контейнеров и колесных, механических или пневматических колонн.

Каждое отдельное устройство имеет индивидуальный дизайн. При разработке даже стандартных моделей команда инженеров и дизайнеров тесно сотрудничает с заказчиками, чтобы производимое оборудование полностью соответствовало производственным требованиям.

Novinox также предлагает ряд компонентов и комплектующих из нержавеющей стали, таких как лопасти, скребки, шпатели, сушилки и т.д.

ВВЕДЕНИЕ



В фармацевтической промышленности существует довольно много применений сыпучих веществ (порошков) как в качестве основного, так и вспомогательного компонента.

Зачастую порошок состоит из смеси двух и более ингредиентов. Получение качественного результата смешения в данном случае является ключевым моментом, определяющим эффективность производственного процесса в целом.

СМЕСИТЕЛИ ЛЕНТОЧНОГО ТИПА (MAN)

Данный тип смесителей применяется для смешивания трех и более ингредиентов, имеющих различные характеристики (удельный вес, физические/химические свойства).

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Смешивание порошков производится в специальной U-образной емкости с использованием перемешивающих устройств. Данный тип смесителя позволяет получать превосходные результаты за короткий период времени.

- Возможность подключения CIP-мойки.
- Управление с помощью ПЛК и упрощенной системы управления.
- Загрузка продукта может осуществляться вручную или с помощью вакуума.

ЧТО ЛУЧШЕ: БИКОНИЧЕСКИЙ (MAB) ИЛИ V-ОБРАЗНЫЙ (MAV) СМЕСИТЕЛЬ?

Данные типы смесителей идеально подходят для смешивания ингредиентов, свойства которых практически не отличаются. Различие заключается лишь в том, насколько бережное перемешивание требуется в Вашем случае. Для бережного перемешивания лучше подойдут биконические смесители, а в том случае, если небольшое сотрясение продукта допустимо, лучше выбрать V-образный смеситель, позволяющий получить несколько лучший результат смешения.

Оба типа смесительных установок крайне легко очищаются, что позволяет избежать перекрестной контаминации при смене продукта.

- Возможность подключения CIP-мойки.
- Управление с помощью ПЛК и упрощенной системы управления.
- Загрузка продукта может осуществляться вручную или с помощью вакуума.

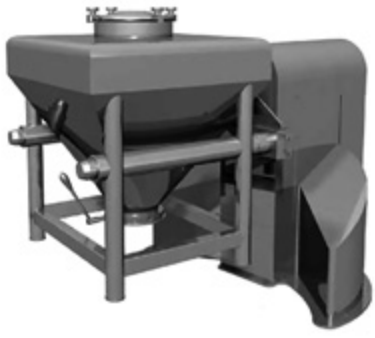
СМЕСИТЕЛЬ БАРАБАННОГО ТИПА (MGF) ИЛИ СМЕСИТЕЛЬ ДЛЯ БИНОВ (MGB)?

Данные типы смесителей отлично подходят для смешивания нескольких ингредиентов, имеющих похожие свойства.

Оба смесителя являются хорошей альтернативой биконическим и V-образным смесителям, когда пользователю требуется замкнутая система загрузки, смешивания и передачи продукта на следующий производственный этап.

Смеситель барабанного типа отлично подходит для работы с небольшими партиями до 400 lt, в то время как производительность смесителя для бинов может достигать 2000 lt.

- Возможность подключения CIP-мойки.
- Управление с помощью ПЛК и упрощенной системы управления.
- Загрузка продукта может осуществляться вручную или с помощью вакуума.



БЛИСТЕРНЫЕ И ДЕБЛИСТЕРНЫ МАШИНЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Материал предоставлен компанией O.M.A.R.

АННОТАЦИЯ

Бренд O.M.A.R представлен на международном фармацевтическом рынке более чем 35 лет. Итальянская фирма O.M.A.R. занимается производством и коммерческой реализацией блистерных машин для использования в научно-исследовательских лабораториях, проведения клинических испытаний, производства небольших и средних партий продуктов, а также деблистерных машин.

Гибкость и надежность являются фундаментальными особенностями производственного процесса компании O.M.A.R., которые позволяют полностью соответствовать требованиям клиентов, сочетая при этом высокий уровень качества вместе с конкурентоспособной ценой. Производимое оборудование компании O.M.A.R. полностью соответствует всем мировым стандартам фармацевтической промышленности.

Блистерные машины компании O.M.A.R. используются лидирующими фармацевтическими компаниями международного уровня, которые уделяют особое внимание гибкости, надежности, а также высокому качеству.

O.M.A.R. предлагает широкий диапазон решений и продуктов. Каждая блистерная машина спроектирована и построена таким образом, чтобы достигать максимальных показателей производительности, учитывая конкретные требования клиентов.

ПОРТФЕЛЬ ПРОДУКЦИИ

Компания O.M.A.R. производит как полуавтоматические, так и полностью автоматические блистерные машины. Машины могут выполнять термоформовку, кодировку / тиснение и обрезку блистеров. Машины O.M.A.R. могут производить как пластиковые блистеры, так и блистеры ALU/ALU. Все блистерные машины – это высококачественные продукты, которые производятся с использоанием ма-

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

триц, выполненных в соответствии с конкретными требованиями заказчика. Данные машины в основном применяются в фармацевтической промышленности и при производстве диетических добавок для мелкосерийных и среднесерийных партий. Также машины O.M.A.R. используются в научно-исследовательских лабораториях и при проведении клинических исследований.

Машины могут производить блистеры промышленного качества из различных материалов, которые представлены на рынке, что в свою очередь позволяет гарантировать безопасность продукта при определенных требованиях заказчика.

Все машины имеют возможность ручной подачи продукта, а также оснащаются бинами из нержавеющей стали марки 316L. Автоматические машины также могут быть оснащены автоматическими питателями для использования в автоматическом режиме: универсальный питатель с вращающимися щетками или независимый питатель оснащаются направляющими и вращающимися щетками. Все машины оснащаются колесиками для более удобного передвижения (максимальная высота 2,5 м).

КОМПАКТНЫЕ МАШИНЫ

Данное решение разработано компанией O.M.A.R. для фармацевтического рынка и на сегодняшний день является наиболее востребованным в указанном сегменте.

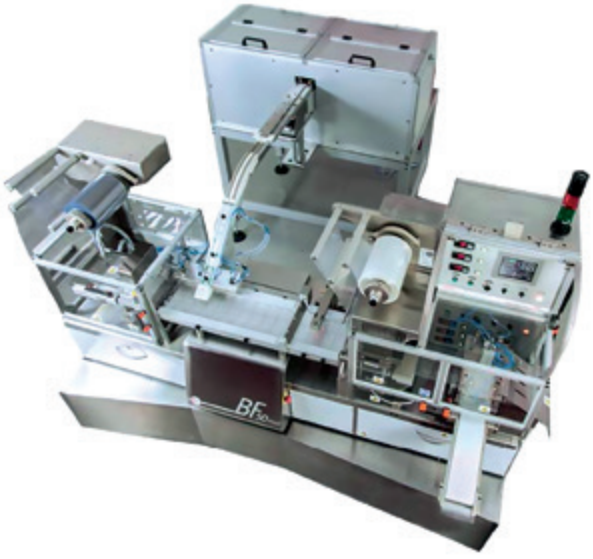
Предварительно наполненные шприцы, ампулы и флаконы

Машина серии BF50 HT – это автоматическая компактная термоформующая блистерная машина, которая предназначена для производства блистеров для упаковки различных медицинских материалов, таких как шприцы, ампулы, виалы, флаконы и т.д. Аналогичным образом данная машина может производить блистеры, которые содержат жидкие субстанции или фармацевтические и диетические продукты, пищевые добавки в виде таблеток, твердых и мягких желатиновых капсул. Машина может работать с пластиковыми материалами толщиной до 400 мкм, а также другими материалами. В качестве материала для заклеивания блистера может быть использован алюминий, медицинская бумага, тайвек, полибар и другие материалы различного происхождения и толщины.

Машина также может оснащаться автоматической системой подачи продукта с направляющими или бином для ручной подачи виал, ампул или шприцов.

BF 50 HT

Максимальный размер блистера с закругленными углами – 180x100x27 м; ячейки предварительно формуются перед формовкой при помощи тефлоновых пуансонов (или из других материалов).



Полностью автоматическая блистерная машина BF 150

Машина BF 150 была создана с применением инновационных технологий проектирования, что, в свою очередь, позволило значительно расширить

ее функциональные возможности, а также проводить установку форматных частей в автоматическом режиме.

Изменение окружности, переустановка каждой станции, – все это интегрировано в систему управления машины BF 150.

Рабочие станции – это своего рода башни, которые располагаюся на стальном основании длиной 3,5 м и используются для сбора форматных частей, установленных оператором в полной безопасности, благодаря интегрированным системам безопасности.

Область подачи продукта в машине BF150 позволяет использовать минимум пространства (1000 мм), увеличивая контроль и качество на этапе подачи продукта. Подача продукта может выполняться в ручном режиме при помощи бина из нержавеющей стали марки 316L или в автоматическом режиме. Автоматическая подача продукта выполняется при помощи универсального питателя FULL BOX с вращающимися щетками или с использованием специального питателя с направляющими.

Машина выполняет 35 ходов (ударов) в минуту (максимальный размер блистера – 170x120 мм). Машина так же может быть оснащена системой визуального контроля качества, присутствия продукта, повреждения продукта, цвета и положения внутри ячейки. В случае несоответствия блистера требованиям происходит отбраковка на конце линии. Система определения микроотверстия определяет возможные микроотверстия в блистере Alu-Alu, что обеспечивает целостность и качество блистера.

BF 50 HT

Максимальный размер блистера с круглыми углами – 180x100x27; ячейки предварительно формуются при помощи тефлоновых пуансонов (или из других материалов).

Применение деблистерных машин

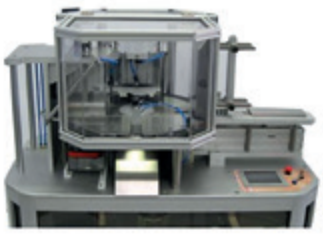
В каждой фармацевтической компании при производстве блистеров определенное количество продуктов будет отбраковываться по определенным причинам:

- из-за проблем с форматными частями;
- некорректного выхода продукта из линии;
- неправильного наполнения блистера;
- неправильной кодировки;
- использования неправильного материала.

Для безопасного извлечения упакованных лекарственных средств используются деблистерные машины.

Предположим, что для любого формата, изготовленного на автоматической блистерной машине, 5000 блистеров отбраковываются, потому что они не соответствуют требованиям. Кроме того, каждый блистер содержит 10 капсул, стоимость которых составляет около 0,03 евро. Эти капсулы не подлежат изъятию, потому что у Вас нет деблистерной машины.

Ниже приведена приблизительная калькуляция.



5000 (несоответствующие качества блистеров) x 10 (капсул в каждом блистере) = 50000 капсул;

50000 (отбракованных капсул) X € 0,03 (стоимость одной капсулы) = € 1500,00;

€ 1500,00 X 2 (при формате производства два раза в неделю) = € 3000,00.

Это означает, что вы будете в среднем нести потери в размере € 3000,00 каждую неделю в виду того, что продукт не может быть изъят из блистера.

Новая автоматическая деблистерная машина S 200 позволит вам изымать любой тип продукта из любого типа материала. Машина окупится в течение первых четырех месяцев производства блистеров.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНО НАПОЛНЕННЫЕ ШПРИЦЫ-РУЧКИ: ПОЧЕМУ СТОИТ ОТДАТЬ ПРЕДПОЧТЕНИЕ ВАКУУМНОМУ, А НЕ СТАНДАРТНОМУ НАПОЛНЕНИЮ?

Материал предоставлен компанией BAUSCH

ВВЕДЕНИЕ

Предварительно наполненные шприцы-ручки становятся все более популярными из-за удобного и контролируемого дозирования. Избыточное наполнение в этом случае ниже, чем при ручном наполнении. Как следствие, снижается затратность за счет уменьшения объема избыточного наполнения. Существует несколько основных методов наполнения шприцев-ручек: стандартное / механическое наполнение и укупорка, вакуумное наполнение и укупорка. На сегодняшний день все больше компаний используют вакуумное наполнение, хотя довольно много и тех, кто использует традиционный способ. Существует несколько причин, обуславливающих высокую эффективность произовдственного процесса при вакуумном наполнении. Вакуумное наполнение и укупорка позволяют получить продукт более высокого качества, при этой достигается высокая точность наполения, что, в свою очередь, положительно влияет на соотношение «цена – качество».

СТАНДАРТНОЕ НАПОЛНЕНИЕ VS ШПРИЦЫ-РУЧКИ

Стандартное наполнение иногда может привести к отрицательным результатам. Традиционный способ наполнения шприцев-ручек предполагает применение иглы, помещаемой в шприц почти до его основания. Как только жидкость начнет распределяться по шприцу, игла начнет медленно подниматься. После завершения процесса наполнения игла удаляется из шприца-ручки, предотвращая вытекание избыточной жидкости из наполняющей иглы.

При стандартном процессе укупорки шприц плотно закрывается пробкой с отверстием. При размещении пробки в шприце могут образоваться частицы, повреждающие пробку. При стандартном наполнении воздух может проникнуть в колпачок и иглу. При этом небольшие частички защитного покрытия колпачка могут попадать в продукт. При проверке предварительно наполненного шприца-ручки продукт может быть отбракован вследствие его чрезмерного наполнения. Другая проблема, которая может возникнуть при стандартном наполнении, – расширение и сжатие газовых пузырьков в шприце-ручке из-за смены атмосферного давления. Это может привести к вытеканию жидкости из иглы и, следовательно, к материальным затратам. Пузырьки воздуха в предварительно наполненном шприце-ручке повышают риск загрязнения продукта.

Второй метод наполнения шприцев-ручек – вакуумное контролируемое наполнение. Укупорка шприца производится непосредственно во время наполнения, при этом воздух автоматически удаляется из шприца.

Применение данного метода позволяет удалить избыточный воздух, который скапливается в верхней части шприца, что повышает точность наполения вне зависимости от положения шприца. Полностью исключены потери продукта, возникающие при смене атмосферного давления. Также это исключает риск загрязнения продукта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вакуумное наполнение и укупорка способствуют максимальному удалению пузырьков воздуха, повышая точность дозирования, безопасность введения лекарства, стабильность и стерильность. Вследствие чего, метод вакуумного наполнения и укупорки быстро завоевал популярность среди производителей.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

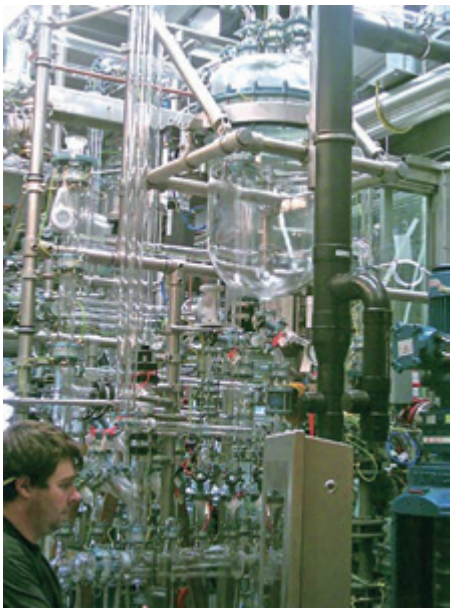
РЕАКТОРЫ ИЗ СТЕКЛА ДЛЯ ПИЛОТНОГО ПРОИЗВОДСТВА

Материал предоставлен компанией BüchiGlasUster

ВВЕДЕНИЕ

Как правило, пилотный масштаб производства является важным этапом на пути от научно-исследовательской лаборатории до опытно-промышленного или производственного предприятия. Основной целью данного этапа является производство продукции в килограммах. На данном этапе технология аппробирована только в лабораторном масштабе и многие параметры являются неизвестными. Лаборатория для пилотного производства так же используются для разработки процессов, которые можно легко повторить на опытно-промышленной установке или на производстве.

Химик, получающий методику от исследовательской лаборатории, должен за короткое время получить значительное количество продукта. Для этого ему нужна гибкая система, которая не должна быть полностью автоматизирована или должна присутствовать возможность переключения на ручной режим упровления.



Как правило, подобная система состоит из реактора с рабочим объемом от 15 до 250 л. Для эффективного перемешивания применяется мешалка с изогнутыми лопастями и диапазоном скоростей вращения от 0 до 350 rpm. Также необходимо наличие систем нагрева и охлаждения, характеристики которых зависят от процесса.

Твердые вещества добавляются непосредственно в реактор через загрузочный люк. Жидкости добавляются из подпиточной емкости с помощью клапанов или дозирующих насосов с регулировкой скорости потока.

В большинстве случаев оборудование используется для очищения и разделения фаз. Дистилляция обычно осуществляется с использованием одного или нескольких параллельно соединенных конденсоров и дополнительного конденсора для защиты вакуумного насоса от любых химических веществ. Фазы разделяются в реакторе с помощью донного выпускного клапана или посредством дистилляции через фазоразделитель. Для данного процесса иногда требуются колонки.

ПУБЛИКУЕТСЯ НА ПРАВАХ РЕКЛАМЫ

Сборка с помощью четырех винтов с пружинами, обеспечивающими отличную изоляцию, даже если обе части смещены

Дистиллят получают во вторичном реакторе или в простом стеклянном сосуде для сбора растворителей. Конденсаторы необходимо охладить водопроводной водой, используя имеющуюся систему охлаждения с гликолем или отдельную холодильную установку.

Для снабжения системы инертным газом необходим источник азота, а для проведения процесса дистилляции – источник вакуума. Отработанные газы необходимо удалять прежде чем они попадут в окружающую среду. Это можно сделать с помощью скруббера. Для последующих процессов или другого оборудования, например центрифуги, иногда требуется использование фильтров.

В лабораториях пилотного масштаба можно дорабатывать, изменять или производить оценку процесса. Также оборудование может использоваться на производственном предприятии для быстрого решения проблем, возникающих в процессе производства.

ПОЧЕМУ ИМЕННО СТЕКЛО?

Наиболее очевидным критическим параметром является химическая стойкость. Стекло устойчиво ко всем кислотным реакциям и некоторым щелочным реакциям. Наиболее подходящим вариантом является боросиликатное стекло, поскольку подобное оборудование может использоваться для различных процессов, которые уже ренее проводились в исследовательской лаборатории с применением реакторов из боросиликатного стекла. Помимо очевидного преимущества стекла (прозрачности), оно значительно дешевле других материалов.

Чем больше видит химик, тем легче ему влиять на процесс и изменять его. Во многих случаях требуется прямое вмешательство химика в процесс. Необходимо вручную записывать и оценивать происходящее, т.е. регистрировать такие параметры, как температура, давление, скорость мешалки и значение pH.

Именно поэтому стекло является наиболее подходящим материалом для производства в лабораториях пилотного масштаба .

ВОПРОСЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Использование стекла в лаборатории не является проблемой, но в случаях использования оборудования большого объема применение стекла вызвает сомнение с точки зрения безопасности. В Европе существуют строгие правила и требования, которые необходимо соблюдать при использованиии оборудования из стекла. Именно поэтому давление в подобных установках ограничено – от полного вакуума до максимального значения 0,5 бар, устройства при этом защищены предохранительными клапанами. Иногда оборудование устанавливается в вытяжные шкафы не только для дальнейшей защиты оператора, но и для уменьшения воздействия на окружающую среду, если речь идет о взрывобезопасности.

НАГРЕВ И ОХЛАЖДЕНИЕ

Другим критическим параметром при выборе материала является его способность к нагреву и охлаждению. Стекло является хорошим изолятором, свойство которого зависит от толщины. Именно поэтому лучшие реакторы – это эмалированные стальные сосуды. В данном случае диапазон рабочих температур может изменяться от –60 °C до +200 °C и даже –80 °C в случае применения специальных покрытий. Для реакции при температуре ниже –125 °C требуется сосуд Hastelloy без стеклянной секции со специальной рубашкой для жидкого азота. Во всех случаях верхняя часть сосуда может быть выполнена из стекла, так как все процессы разделения происходят при более высокой температуре. Верхняя стеклянная секция рассчитана на температуру от –60 °C до +200 °C. Данное ограничение установлено не из-за использования стекла, а вследствие применения PTFE прокладок.

ГЕРМЕТИЧНОСТЬ

Герметичность всей системы является еще одним критическим параметром. И не только с точки зрения снижения производительности вакуумного насо-

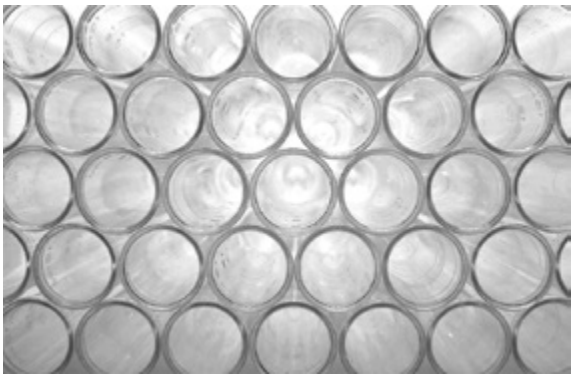
В лабораториях для пилотного производства химики работают с большим количеством химических веществ и растворителей. Даже если они упакованы должным образом, среда в помещении и в вытяжном шкафу должна быть взрывозащищенной. Типичными параметрами являются:

- ***температура.*** *Температуру реактора необходимо контролировать. В зависимости от конструкции устройства нагрева или охлаждения само устройство может быть оснащено контроллером. Можно с легкостью следить за данным показателем с помощью взрывобезопасного измерительного датчика, тогда как для изменения заданного значения требуется взрывобезопасная панель с возможностью регулирования заданного значения. Также необходимо контролировать температуру парообразования и конденсации. В случае применения колонки необходимо производить измерение температуры на каждом этапе;*
- ***давление.*** *Поскольку реакции проходят при атмосферном давлении достаточно простого отображения значения с помощью датчика. Для регистрации давления необходим датчик с локальным передатчиком и функцией отображения;*
- ***скорость мешалки.*** *Изменять значение скорости (обороты в минуту) можно с помощью бесступенчатой механической передачи или частотно-регулируемого электро- привода. Регулирование данного значения больше не является проблемой, поскольку скорость мешалки не считается критическим параметром, однако данный параметр все же должен быть известен. Данное значение также редко изменяется во время процесса.*

Другие параметры – скорость потока и значение pH.

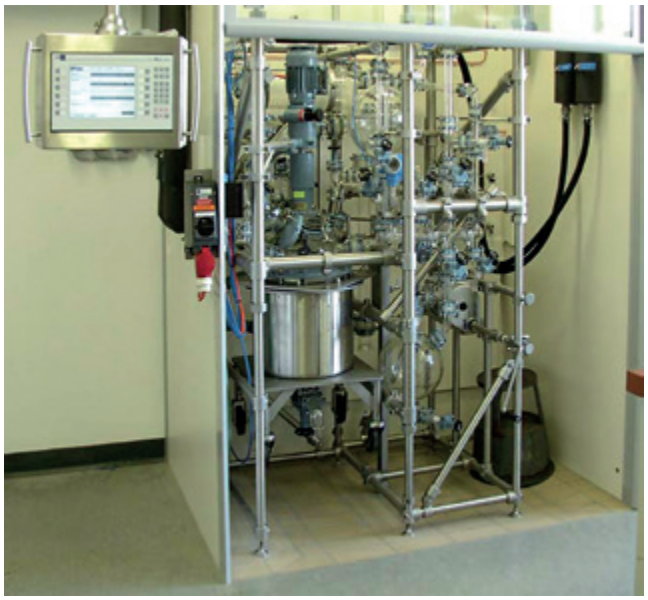
са. Поскольку кислород, как правило, негативно влияет на процесс, необходимо создать инертную среду. Этого можно достичь путем добавления азота и сведения к минимуму проницаемости соединений или уплотнений.

Стекло устойчиво ко всем кислотным реакциям и некоторым щелочным реакциям



Помимо основного преимущества – прозрачности, – стекло значительно дешевле других материалов

BÜCHI предлагает уникальный способ герметизации уплотнений: затяните каждое соединение с помощью шарниров и держателей. Держатель представляет собой отполированную полусферу, а шарнир имеет механическую PTFE подкладку. Сборка осуществляется с помощью четырех винтов с пружинами, обеспечивающими отличную изоляцию, даже если обе детали смещены. Четыре пружины компенсируют любое смещение на несколько градусов без ущерба для герметичности и без использования каких-либо дополнительных гибких элементов. Благодаря PTFE уплотнению, особенно при повышенных температурах, пружины также будут компенсировать любое смещение. Все это обеспечит минимальную степень утечки и уменьшит количество кислорода, попадающего в среду реактора. Степень утечки в установке среднего размера с использованием этой системы – ниже 5 мбар/ч.



Лучшие реакторы – это эмалированные стальные сосуды

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

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!